

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Müller-Hermelink

**Molekularbiologische Untersuchung intrazellulärer Signalwege, die in
T-Lymphozyten zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-ATc führen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Mathias Buttman
aus Würzburg

Würzburg, Juli 2001

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Müller-Hermelink

**Molekularbiologische Untersuchung intrazellulärer Signalwege, die in
T-Lymphozyten zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-ATc führen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Mathias Buttman
aus Würzburg

Würzburg, Juli 2001

Referent: Professor Dr. Dr. E. Serfling
Korreferent: Professor Dr. P. Rieckmann
Dekan: Professor Dr. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Januar 2002

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern und meiner Frau gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINFÜHRUNG IN DIE INTRAZELLULÄRE T-ZELL-SIGNALTRANSDUKTION	1
1.1 Rezeptoren und Liganden	1
1.2 Proteintyrosinkinassen (PTK)	2
1.3 Adapterproteine	5
1.4 Effektorsignalkaskaden	7
1.5 Die Familie der NF-AT-Transkriptionsfaktoren	13
1.6 Die transkriptionellen Kofaktoren p300 und CBP	19
1.7 Problemstellung	21
2. MATERIAL	23
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	23
2.2 Chemikalien und Lösungen	24
2.3 Enzyme	26
2.4 Reaktionssysteme	26
2.5 Größenmarker	26
2.6 Radioaktivität	27
2.7 Bakterien	27
2.8 Gewebekulturzellen	27
2.9 Antikörper	27
2.10 Plasmide	28
3. METHODEN	30
3.1 Bakterienkultur	30
3.2 Zellkultur	33
3.3 Ganzzellextrakt	38
3.4 Konzentrationsbestimmung von DNA und Proteinen	39
3.5 Gelelektrophoresen	40

3.6 Western-Blot	43
3.7 Klonierungstechniken	44
3.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	45
3.9 Immunpräzipitation	46
3.10 Kinase-Assay	47
3.11 Luciferase-Assay	48
4. ERGEBNISSE	50
4.1 Die TAD-A von NF-ATc wird nach TPA-Stimulation in vivo phosphoryliert	50
4.2 Die TAD-A von NF-ATc wird in vitro durch Erk2 phosphoryliert	51
4.3 Transfizierte MAP-Kinasen stimulieren die transkriptionelle TAD-A-Aktivität	52
4.4 CBP/p300 verstärkt die IL-2-Promotor- und Pu-b _d -Induktion	55
4.5 CBP/p300 interagiert in vivo physisch mit NF-ATc	56
4.6 CBP/p300 aktiviert die TAD-A von NF-ATc in vivo	58
4.7 Raf/Rac und CBP/p300 steigern die TAD-A-Induktion in synergistischer Weise	60
5. DISKUSSION	62
5.1 Mögliche Bedeutung der TAD-A-Phosphorylierung	62
5.2 CBP/p300 als Integrator von MAPK-Signalen in der TAD-A-Aktivierung	63
6. ZUSAMMENFASSUNG	67
7. LITERATURVERZEICHNIS	68

1. Einführung in die intrazelluläre T-Zell-Signaltransduktion

Normalerweise befinden sich die T-Lymphozyten der peripheren lymphatischen Organe in „ruhemem“ Zustand. Durch verschiedene Stimuli kann ihre Aktivierung und darauffolgende Differenzierung initiiert werden.

Innerhalb einiger Sekunden kommt es zur Aktivierung von Proteintyrosinkinase (Samelson et al., 1986), daraufhin folgt eine Reihe biochemischer Veränderungen, die sich über viele Stunden entwickeln: Expression von Zytokinrezeptoren (innerhalb von ca. 2 h), Sekretion von Zytokinen (innerhalb von ca. 6 h), Initiation der DNA-Replikation (innerhalb von ca. 24 h), Zellteilung (innerhalb von ca. 48 h) und eine Veränderung des Zustandes der Zelldifferenzierung (innerhalb von Tagen) (Crabtree, 1989). Nicht jede Bindung eines Liganden und nicht jeder Ligand lösen eine komplette Antwort der T-Zelle aus.

1.1 Rezeptoren und Liganden

Zwei verschiedenartige Signale durch antigenpräsentierende Zellen (APC) sind notwendig, damit diese naive T-Zellen aktivieren und deren darauffolgende Ausbildung von Effektorfunktionen auslösen können: ein antigenspezifisches Signal, das durch den Kontakt zwischen TCR/CD3-Komplex (TCR = T Cell Receptor; CD = Cluster Domain) und an MHC-Moleküle (MHC = Major Histocompatibility Complex) gekoppeltem, spezifischem Antigen auf der Oberfläche der APC vermittelt wird (Shapiro et al., 1985; Bjorkman et al., 1987), und ein antigenunabhängiges Signal, das zum Beispiel durch die Interaktion der T-Zell-Oberflächenmoleküle CD28/CTLA-4 mit Mitgliedern der B7-Proteinfamilie (B7-1, CD80, B7-2, CD86) auf der APC zustande kommen kann (Linsley et al., 1991; Allison, 1994; June et al., 1994). Der TCR erkennt das Antigen in einer Höhlung an der Oberfläche des MHC-Moleküls, die die variablen und hypervariablen, für die Antigenbindung zuständigen Regionen des MHC-Moleküls enthält (Kourilsky and Claverie, 1989). Zusätzlich binden CD4- bzw.

CD8-Proteine an die konstante Region der MHC-Moleküle und verstärken so die zelluläre Interaktion (Robey and Axel, 1990).

Auch das auf T- und B-Zellen exprimierte CD73 (Ecto-5'-Nucleosidase) kann unter Beteiligung von CD45 und TCR als antigenunabhängiger Koaktivator zur T-Zellaktivierung beitragen (Resta and Thompson, 1997), ebenso das integrinassoziierte Protein CD47 (Reinhold et al., 1997) (weitere Koaktivatoren s. Dubey and Croft, 1996, und Croft and Dubey, 1997). Expression von CD40L auf der Oberfläche aktivierter T-Zellen und Bindung an CD40 auf der APC induzieren die Präsentation kostimulatorisch wirksamer Moleküle auf der APC-Oberfläche (Grewal and Flavell, 1996).

Eine T-Zellaktivierung kann auch antigenunabhängig über das CD2-Oberflächenmolekül erfolgen (Meuer et al., 1984). Zwischen CD2 und dem TCR wurde eine strukturelle und funktionelle Interaktion dokumentiert (Brown et al., 1989), ebenso zwischen CD2 und CD45 (Schraven et al., 1989; Verhagen et al., 1996).

In vitro-Stimulation von T-Zellen mit anti-CD3 ϵ -Antikörpern imitiert die wahrscheinlich physiologische Oligomerisierung von TCRs (Fields et al., 1995; Plaksin et al., 1997) und führt zur T-Zellaktivierung (Kolanus et al., 1993; Abastado et al., 1995).

1.2 Proteintyrosinkinasen (PTK)

Alle Antworten der T-Zelle auf verschiedene Arten der Stimulierung scheinen mit einer katalytischen Aktivierung der nicht-rezeptorgebundenen Proteintyrosinkinasen (PTK) zu beginnen.

Drei verschiedene PTKs sind in ihrer Involvierung in die frühe T-Zellaktivierung bisher näher untersucht. Als erste wurde die Src-Kinase p56^{lck} identifiziert, die mit CD4- und CD8-Korezeptoren interagiert (Shaw et al., 1990; Turner et al., 1990). Ihre Bedeutung zeigt sich beispielsweise in der Beobachtung, daß T-Zellen, die keine funktionell aktive Lck besitzen - sei es als Resultat gezielter Zerstörung des Lck-Gens in der Maus, sei es durch Isolation mutierter transformierter Zelllinien -, keine biochemische Antwort auf Stimulierung durch

Antikörper zeigen, die die Quervernetzung der Antigen-Rezeptoren bewirken (Molina et al., 1992; Straus and Weiss, 1992).

Als weiteres Mitglied der Src-Familie von PTKs ist die Fyn-Kinase an der T-Zellaktivierung beteiligt. Obwohl eng verwandt mit Lck und in denselben Zellen exprimiert, kann die Fyn-Kinase Lck nicht ersetzen. Sie besitzt eine essentielle Rolle in der Regulierung der Immunantwort reifer Thymozyten (Appleby et al., 1992).

Ein zusätzlicher Hinweis darauf, daß die Übertragung von Phosphatresten durch diese beiden Src-Kinasen spätere Ereignisse in der T-Zellaktivierung stimuliert, wurde durch Experimente mit hochselektiven Kinaseinhibitoren gewonnen, die die TCR-induzierte IL-2-Sekretion und die Zellproliferation verhindern (Hanke et al., 1996).

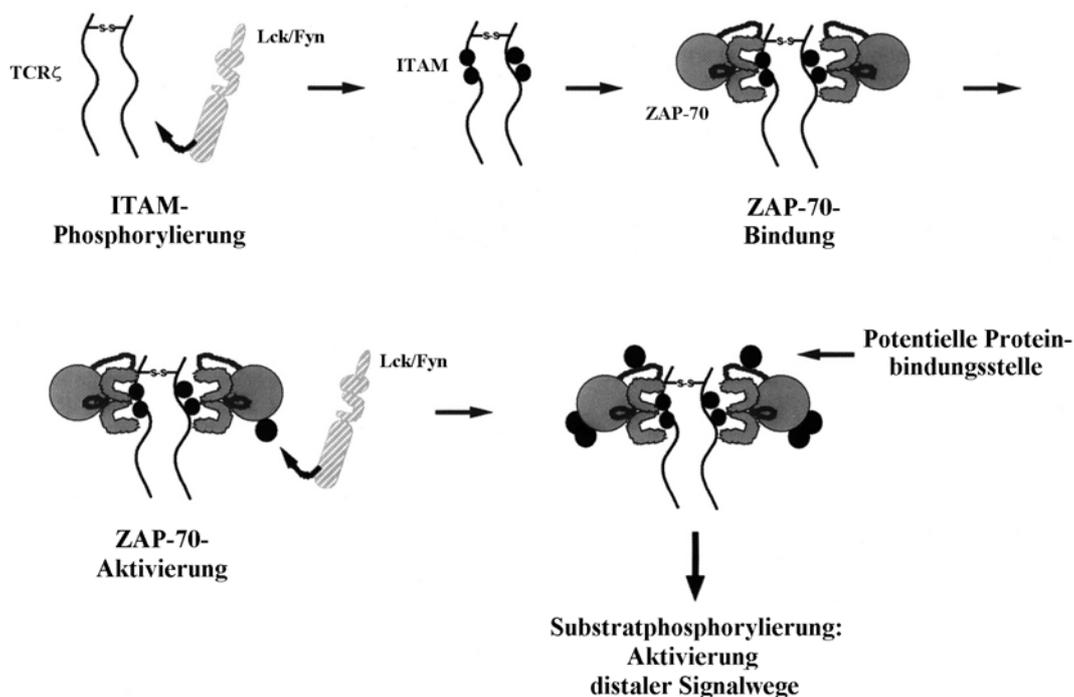


Abb. 1: Die Aktivierung nicht-rezeptorgebundener Proteintyrosinkinase ist ein früher Schritt der T-Zellaktivierung (nach Wange and Samelson, 1996).

Die dritte nicht-rezeptorgebundene PTK, die eine Rolle in der frühen T-Zellaktivierung spielt und bereits näher untersucht wurde, ist ZAP-70, ein Mitglied der Syk-Familie von PTKs. Ursprünglich wurde diese Kinase

identifiziert durch ihre Assoziation mit dem TCR ζ -Homodimer, die durch eine Bindung der beiden SH2-Domänen von ZAP-70 an tyrosinphosphorylierte Motive im ζ -Protein vermittelt wird (Chan et al., 1992; Wange et al., 1992; Labadia et al., 1997). Patienten mit Mutationen im ZAP-70-Gen zeigen eine schwere, kombinierte Immundefizienz, die mit ihrem Unvermögen, zirkulierende T-Lymphozyten zu produzieren, und der Unfähigkeit derjenigen T-Zellen, die den Thymus noch verlassen, auf eine Stimulierung des TCR zu reagieren, zusammenhängt (Arpaia et al., 1994; Chan et al., 1994). Ein noch schwereres Krankheitsbild wurde bei Mäusen gefunden, in denen das ZAP-70-Gen mutiert war und bei denen die T-Zellproduktion im Thymus zum Stillstand kommt (Negishi et al., 1995).

Das Angriffsziel der beiden angesprochenen Src-Kinasen sind ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) (Gauen et al., 1994; Watts et al., 1994), die je ein Paar Tyrosin-X-X-Leucin/Isoleucin(Y-X-X-L/I)-Phosphoakzeptor-Sequenzen enthalten, die durch eine Linkerregion von ca. 11 AS voneinander getrennt sind. ITAMs treten dreimal im TCR ζ -Protein und einmal in jeder der CD3-Untereinheiten (γ , δ und ϵ) auf (Weiss, 1993). Da jeder TCR ein TCR ζ -Dimer und zwei CD3-Dimere ($\epsilon\delta$ und $\epsilon\gamma$) enthalten kann, kann jeder TCR/CD3-Komplex insgesamt zehn ITAMs enthalten. Gleichzeitige Phosphorylierung beider Tyrosinreste innerhalb der ITAMs scheint für die Signalweiterleitung essentiell zu sein (Letourneur and Klausner, 1992). Eine Folge der ITAM-Phosphorylierung durch Lck und Fyn ist die Rekrutierung von ZAP-70 zu den phosphorylierten ITAMs und die Aktivierung dieser Kinase (Iwashima et al., 1994; van Oers and Weiss, 1995; Wange et al., 1995). Phosphorylierung von ZAP-70 durch Lck und/oder Fyn verstärkt dessen enzymatische Aktivität erheblich (Chan et al., 1995), während es umgekehrt auch Hinweise dafür gibt, daß ZAP-70 Lck an einer Stelle innerhalb der SH2-Domäne phosphorylieren könnte, dabei die Aktivität der Src-Kinase steigernd (Couture et al., 1994). Die ITAMs, die ZAP-70 enthält, stellen mögliche Andockstellen für andere Proteine dar, die SH2-Domänen besitzen (Wange and Samelson, 1996).

Eine Übersicht über die skizzierten Abläufe gibt Abb. 1 (S. 3).

1.3 Adapterproteine

Lösliche, intrazelluläre Polypeptide, die zum Beispiel an den TCR-Komplex binden können, Interaktionsdomänen und Tyrosin-Phosphorylierungsmotive besitzen und keine enzymatische Aktivität entfalten, werden Adapterproteine genannt. Sie können eine wichtige Rolle in der Regulierung der Kopplung verschiedener intrazellulärer Signalwege an den aktivierten TCR spielen.

Der bestcharakterisierte Adapter, Grb2, enthält eine SH2-Domäne, die von zwei SH3-Domänen flankiert wird, die auf T-Zellstimulierung hin den GTP/GDP-Austauschfaktor Sos binden (Buday et al., 1996).

Der ubiquitäre Adapter Shc ist fähig, an diesen Komplex zu binden, nachdem er phosphoryliert worden ist (Ravichandran et al., 1993). Die Bedeutung dieser Bindung wird jedoch kontrovers diskutiert, bestenfalls scheint ein kleiner Teil der Grb2-Moleküle phosphorylierte Shc-Proteine auf TCR-Stimulierung hin zu binden (Osman et al., 1995).

SLP-76 wurde durch seine in vitro-Bindung an die Grb2-SH3-Domänen identifiziert (Jackman et al., 1995). Es enthält viele potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsstellen, eine SH2-Domäne und eine prolinreiche Domäne, die mit Proteinen, die SH3-Domänen enthalten, interagieren kann. TCR-Aktivierung stimuliert die Phosphorylierung von SLP-76, und Überexpression von SLP-76 führt in Jurkat-T-Zellen auf TCR-Stimulierung hin zu einer gesteigerten Translokation von NF-AT (Nuclear Factor of Activated T cells) in den Zellkern, einem Schlüsselereignis der Regulation der IL-2-Expression (Motto et al., 1996).

Das Protoonkogen Vav, als ein Kofaktor von SLP-76 beschrieben, wird auf TCR-Aktivierung hin phosphoryliert und interagiert über seine SH2-Domäne auch mit der tyrosinphosphorylierten ZAP-70-PTK (Katzav et al., 1994). Die genaue Bedeutung von Vav bleibt noch unklar, auch wenn man weiß, daß eine Zerstörung des Vav-Gens zu einem Defekt in der Lymphozytenentwicklung und zu Störungen in der Signalweiterleitung vom TCR führt (Fischer et al., 1995; Tarakhovsky et al., 1995; Zhang et al., 1995). Man weiß allerdings, daß die Überexpression von Vav und/oder SLP-76 die basale und die nach TCR-

Stimulierung erfolgende NF-AT-abhängige Reporterexpression in Jurkat-Zellen verstärkt (Wu et al., 1995; Wu et al., 1996). Es gibt Hinweise, daß Vav als GDP-GTP-Austauschfaktor für Mitglieder der Rho-Proteinfamilie fungieren kann (Crespo et al., 1996; Han et al., 1997).

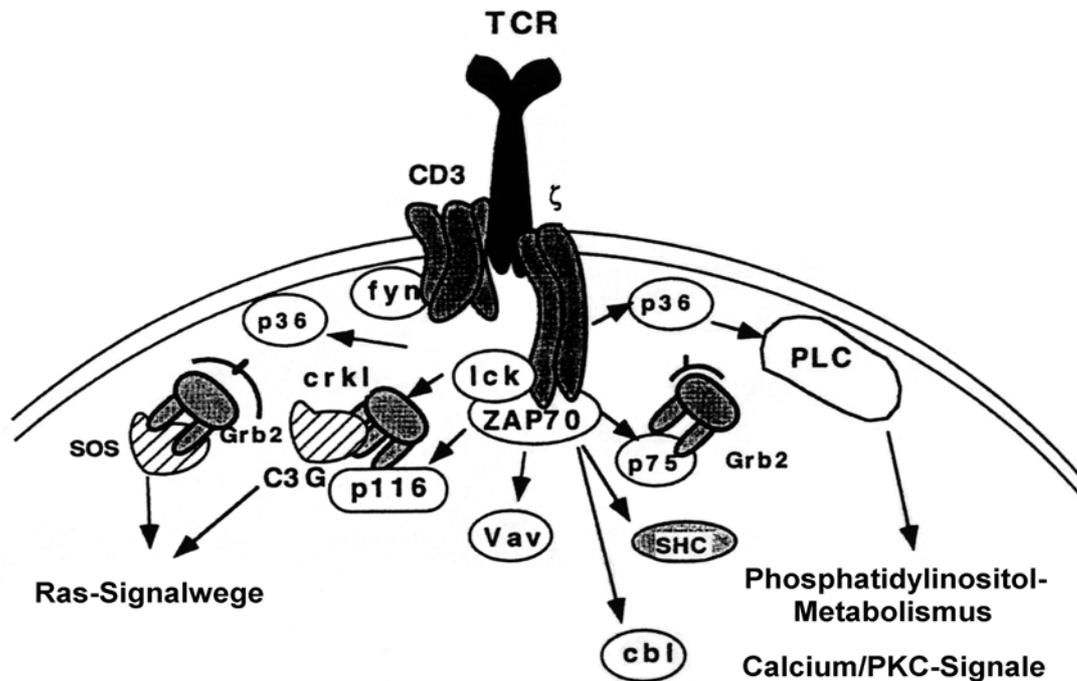


Abb. 2: Die Aktivierung von Proteintyrosinkinasen führt zur Rekrutierung verschiedener Adaptermoleküle (nach Cantrell, 1996).

Als weitere Adapterproteine, die in der T-Zellaktivierung offensichtlich eine Rolle spielen, wären das membranassoziierte p36-38, das unter anderem mit Grb2 (Buday et al., 1994), Phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1) (Sieh et al., 1994) und Phosphatidylinositol3-Kinase (PI3-K) (Fukazawa et al., 1995) assoziieren kann, zu nennen, des weiteren das in Struktur und Bindungseigenschaften sehr ähnliche 38 kDa-Protein Lnk (Huang et al., 1995), außerdem p120^{cbl}, das in vitro mit einer Vielzahl von Molekülen interagiert, so unter anderem mit Grb2, Fyn, Lck, Ras-GAP (GTPase-Activating Protein), PLC- γ , PI3-Kinase und ZAP-70 (Donovan et al., 1994; Fournel et al., 1996). Weitere Adapterproteine, die fähig sind, an die SH3-Domänen von Grb2 zu binden, über deren genauere Funktion aber noch nichts bekannt ist, sind p75 (Jackman et al., 1995) und

p116 (Motto et al., 1994).

Eine Übersicht über verschiedene Adaptermoleküle und deren Bindungseigenschaften gibt Abb. 2 (S. 6).

1.4 Effektorsignalkaskaden

Eine Reihe von Effektorsignalkaskaden wird auf die Stimulierung des TCR hin aktiviert. Die dabei vorherrschenden Signalmoleküle ähneln denen anderer Zelltypen: calciumabhängige Kinasen und Phosphatasen sowie Serin/Threonin-Kinasen vom MAPK-Typ (MAPK = Mitogen Activated Protein Kinase). Die wichtigsten Signalwege werden im folgenden besprochen.

1.4.1 Der Phosphatidylinositol (PI)-Signalweg

Der erste PTK-kontrollierte TCR-Signalweg, der detailliert charakterisiert werden konnte, wird von PLC- γ 1 (PLC = Phospholipase C) vermittelt. PLC- γ 1 wird in aktivierten T-Zellen tyrosinphosphoryliert, ein Prozeß, der für ihre Aktivierung wichtig ist (Weiss and Littman, 1994). Der TCR induziert außerdem die Assoziation zwischen den SH2-Domänen von PLC- γ 1 und dem membranständigen p36 (Sieh et al., 1994), ein Prozeß, der insofern von Bedeutung sein könnte, als die Substrate der PLC- γ 1, die Inositolphospholipide, sich in der Plasmamembran befinden, weswegen die Rekrutierung der PLC- γ 1 zur Plasmamembran von großer Bedeutung ist.

Die aktivierte PLC- γ 1 hydrolysiert nämlich Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und 1,2-Diazylglycerol (DAG), die als parallele „Second messenger“ unterschiedliche Wirkungen haben.

In vitro konnte gezeigt werden, daß PIP₃ Mitglieder der Proteinkinase C (PKC)-Familie aktivieren kann, speziell PKC ϵ und ζ (Liscovitch and Cantley, 1994). Eine wesentlich größere Bedeutung für die Aktivierung der PKC scheint jedoch DAG zu besitzen, das eine große Anzahl verwandter Serin/Threonin-Kinasen direkt aktivieren kann (Szamel and Resch, 1995).

Für verschiedene Isoformen der PKC konnten in den letzten Jahren u.a.

wichtige Funktionen bei der T-Zellentwicklung (Michie et al., 2001), -aktivierung (Bi et al., 2001), -migration (Volkov et al., 2001) und Regulation des Zelltods (Bertolotto et al., 2000) nachgewiesen werden. Eine besonders wichtige Rolle unter den verschiedenen PKC-Isoformen kommt in T-Zellen der PKC θ zu, die als einzige Isoform nach TCR-Aktivierung rasch an den Rezeptorkomplex bindet (für eine Übersicht s. Altman et al., 2000). Sie vermittelt unter anderem, wie in PKC θ -defizienten Mäusen nachgewiesen wurde, in reifen T-Zellen die vom TCR ausgehende NF- κ B-Aktivierung (Sun et al., 2000).

Die Hauptfunktion des zweiten - neben DAG - bei der Hydrolyse von PIP₂ entstehenden „Second messenger“, IP₃, ist die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern (Imboden and Stobo, 1985; Berridge, 1993), worauf im nächsten Abschnitt näher eingegangen werden wird.

1.4.2 Calciumsignale

Die Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels ist von essentieller Bedeutung für viele Ereignisse der T-Zellaktivierung (Goldsmith and Weiss, 1988; Negulescu et al., 1994). Diese schließen früh nach APC-Kontakt auftretende Veränderungen in Motilität und Zellform ein (Donnadieu et al., 1992; Donnadieu et al., 1994), die Transkription verschiedener Lymphokin-Gene (Crabtree, 1989; Rao, 1994), die Zelltötung durch zytotoxische T-Zellen (Poenie et al., 1987; Haverstick et al., 1991), die Apoptose autoreaktiver T-Zellen während ihrer Entwicklung im Thymus (McConkey et al., 1992; Nakayama et al., 1992) und die Induktion von Selbsttoleranz in reifen peripheren T-Zellen (Schwartz, 1990; Nghiem et al., 1994).

IP₃ bindet nach Aktivierung durch die im vorigen Abschnitt besprochene Signalkaskade an seinen Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) und öffnet so einen Kanal, der im ER gespeichertes Ca²⁺ ins Zytosol entläßt (Imboden and Stobo, 1985). Dieser Kanal kann auch die PTK Fyn direkt binden und wird auf TCR-Stimulierung hin an Tyrosinresten phosphoryliert, was die Ca²⁺-Freisetzung zu erleichtern scheint (Jayaraman et al., 1996). Die PTKs Lck und ZAP-70 (s. Abschnitt 1.2, S. 2) sind für die

Calciummobilisierung in T-Zellen ebenfalls notwendig (Howe and Weiss, 1995). Die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Kompartimenten ist verantwortlich für die frühe Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels nach T-Zellaktivierung, sie ist allerdings auf Grund der begrenzten Kapazität intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher nicht ausreichend und wohl auch nicht notwendig, um eine T-Zellaktivierung auszulösen (Goldsmith and Weiss, 1988).

Der Ca^{2+} -Einstrom ins Zytosol und die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels müssen für mehr als 30 min. aufrechterhalten werden, damit es zur T-Zellaktivierung und zur Transkription des IL-2-Gens kommt (Crabtree and Clipstone, 1994; Negulescu et al., 1994). Dies geschieht durch Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum über Kanäle in der Plasmamembran (Lewis and Cahalan, 1989). Diese Kanäle erhalten nach einer Hypothese Putneys (Putney, Jr., 1990), die in neueren Arbeiten immer weitere Bestätigung findet (Mason et al., 1991; Zweifach and Lewis, 1993; Premack et al., 1994), ihr Signal zur Öffnung durch die Leerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher und werden deswegen CRAC(Ca²⁺ Release-Activated Ca²⁺)-Kanäle genannt. Über die genauen Steuerungsmechanismen herrschen noch Zweifel (Lewis and Cahalan, 1995), allerdings ließ sich eine direkte Öffnung durch Depolarisation (Lewis and Cahalan, 1989; Hoth and Penner, 1992), IP_3 oder IP_4 (Hoth and Penner, 1992; Premack et al., 1994) ausschließen.

Der bestcharakterisierte Mediator von Ca^{2+} -Signalen während der T-Zellaktivierung ist die Calcium/Calmodulin-abhängige Serinphosphatase Calcineurin (Crabtree and Clipstone, 1994). Sie besteht aus einer calmodulinbindenden 59 kDa-Untereinheit A und einer Ca^{2+} -bindenden 19 kDa-Untereinheit B (Klee et al., 1988). Damit unterliegt Calcineurin in seiner enzymatischen Aktivität einer doppelten Kontrolle durch den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel: Ca^{2+} -Bindung an Calmodulin führt zu dessen Assoziation mit Calcineurin A, was die Verdrängung einer autoinhibitorischen Domäne (Hubbard and Klee, 1989) des Calcineurin A und damit verstärkte enzymatische Aktivität dessen katalytischer Domäne zur Folge hat; auf der anderen Seite erhöht die Ca^{2+} -Bindung an das Calmodulinhomolog Calcineurin B, das auch bei niedrigem Ca^{2+} -Spiegel fest an Calcineurin A gebunden ist, die

Substrataffinität von Calcineurin (Stemmer and Klee, 1994). Die Bildung eines Komplexes aus Ca^{2+} , Calmodulin, Calcineurin A und Calcineurin B ist zur Aktivierung der Phosphataseaktivität des Calcineurin notwendig (Manalan and Klee, 1983; Ueki and Kincaid, 1993).

Das bekannteste Substrat des Calcineurin ist die Familie der NF-AT-Transkriptionsfaktoren (Ruff and Leach, 1995; Loh et al., 1996a), auf die später näher eingegangen werden wird. Ein anderes Calcium/Calmodulin-abhängiges Enzym, das auf TCR-Stimulierung hin aktiviert wird, ist die CaM-Kinase II, die eindeutig eine inhibitorische Rolle bei der IL-2-Induktion spielt (Nghiem et al., 1994; Hama et al., 1995). Deren Interaktionen mit dem IL-2-induzierenden NF-AT-Signalweg sind noch nicht geklärt.

Doch nicht nur die Aktivierung bereits bestehender Signalfaktoren, sondern auch die Synthese von mRNAs einer Reihe nukleärer Faktoren, die an der IL-2-Transkription beteiligt sind - unter ihnen NF-AT2, Oct-2 und p105/NF- κ B1 -, wird, wie durch Experimente mit den Immunsuppressiva Cyclosporin A (CsA) (Shevach, 1985) und FK506 (Tanaka et al., 1987), die inhibierend auf Calcineurin wirken (Liu et al., 1991; Liu et al., 1992; Swanson et al., 1992), gezeigt werden konnte, durch Calcineurin veranlaßt (Northrop et al., 1994).

1.4.3 G-Proteine

Die fundamentale Rolle des GTP-bindenden Proteins p21^{ras} bei der Lymphozytenaktivierung wurde in zahlreichen Studien an verschiedenen Zelllinien und genetisch veränderten Tieren nachgewiesen (Izquierdo et al., 1995; Swan et al., 1995), jedoch ist der Mechanismus, durch den es von der Ligandenbindung an den TCR zur Aktivierung von p21^{ras} kommt, bis heute nicht sehr gut verstanden. Sowohl die Inhibition von Ras-GAPs, wie p120-GAP oder Neurofibromin (Downward, 1992; Izquierdo et al., 1995), als auch die Aktivierung von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren tragen höchstwahrscheinlich dazu bei. Insbesondere bei Sos, das Grb-2-vermittelt (s.a. Abschnitt 1.3, S. 5) tyrosinphosphorylierte Moleküle bindet, nimmt man eine Beteiligung an der Regulierung von p21^{ras} an (Buday et al., 1994) (für eine Übersicht über die

Aktivierung von p21^{ras} s. McCormick, 1993, und McCormick, 1994). GTP-gebundenes p21^{ras} kann eine ganze Reihe von Effektoren direkt aktivieren (Marshall, 1995); besonders hervorzuheben ist die direkte Interaktion mit der Serin/Threonin-Kinase Raf-1, die der wichtigste Aktivator einer MAPK-Kaskade ist (Crews and Erikson, 1993), die über die Aktivierung von Erks zur Stimulierung verschiedener Transkriptionsfaktoren führt (s. nächster Abschnitt). Auch Mitglieder der Rho-Familie von GTP-bindenden Signalmolekülen, unter ihnen Rac und Cdc42, deren Hauptfunktion man zunächst in der Regulation des Aufbaus des Zytoskelets sah (Stowers et al., 1995), können über die MAPKKKK PAK Serin/Threonin-Kinasen-Kaskaden aktivieren, die bei der T-Zellaktivierung eine wichtige Rolle spielen, nämlich den SAPK- und den p38-Kinase-Signalweg (Vojtek and Cooper, 1995; Teramoto et al., 1996a; Teramoto et al., 1996b). In einigen Fällen hat sich Rac als Ziel von p21^{ras} in einem Signalweg erwiesen, der eine maligne Zelltransformation vermittelt (Qiu et al., 1995).

1.4.4 Serin/Threonin-Kinasen-Kaskaden

Die MAPK-Kaskaden (MAPK = Mitogen-Activated Protein Kinase) stellen eine Gruppe von Signaltransduktionswegen dar, die charakterisiert sind durch die sukzessive Phosphorylierung von Serin/Threonin-Kinasen oder von Kinasen dualer Spezifität. Das im Prinzip allen gemeinsame Signalmodul besteht aus einer MAP-Kinase, einer MAPK-Kinase (MAPKK), die normalerweise eine Kinase dualer Spezifität ist, indem sie die MAPK an Threonin- und Tyrosinresten phosphoryliert, und einer MAPKK-Kinase (MAPKKK), die die MAPKK serinphosphoryliert und so aktiviert (Graves et al., 1995; Waskiewicz and Cooper, 1995). Zur Zeit sind in Säugerzellen drei Signalketten detailliert beschrieben, die diese Strukturmerkmale aufweisen. Die terminalen Elemente sind dabei die Erks (Extracellular-regulated kinases), die SAPKs (Stress-Activated Protein Kinases) und die p38-Kinase. In Hefen sind bereits sechs derartige Signalmodule beschrieben (Herskowitz, 1995).

Die Aktivierung der MAP-Kinasen resultiert in der raschen Induktion einer Familie von Phosphatasen dualer Spezifität, unter ihnen Pac-1, Mkp-1 und

Mek-2 (Sun et al., 1993; Misra-Press et al., 1995), die die MAP-Kinasen selbst als Ziel besitzen (Rohan et al., 1993; Bokemeyer et al., 1996; Grumont et al., 1996) und so zur Terminierung des Signals beitragen (Sun et al., 1994).

Sehr vieles spricht für eine fundamentale Rolle der Erks in der vom TCR ausgehenden Signaltransduktion. Der Signalweg, der zu ihrer Stimulierung führt, wird hauptsächlich durch GTP-gebundenes p21^{ras} aktiviert, das direkt an Raf-1, die MAPKKK in dieser Kaskade, bindet. Raf-1 wird durch seinen Kontakt mit Ras an die Plasmamembran gebunden und durch einen bisher unbekanntem Mechanismus, bei dem Tyrosinphosphorylierung eine Rolle spielt, in seiner Kinaseaktivität stimuliert (Marais et al., 1995). Es phosphoryliert und aktiviert Mek-1 und Mek-2 (die MAPKK), die ihrerseits Erk-1 und Erk-2 phosphorylieren. Aktivierte Erks werden in den Zellkern transloziert und phosphorylieren direkt verschiedene Transkriptionsfaktoren, unter ihnen c-Fos, c-Jun und Mitglieder der Ets-Familie (Graves et al., 1995; Karin, 1995; Waskiewicz and Cooper, 1995).

Die SAPKs werden aktiviert durch Inhibitoren der Proteinsynthese, inflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel TNF- α und IL-1, und, im allgemeinen, durch starken zellulären Streß (Davis, 1994; Kyriakis et al., 1994). Ursprünglich beschrieben als Kinasen, die den Transkriptionsfaktor c-Jun an seiner Aktivationsdomäne binden und phosphorylieren können, und deswegen auch JNKs (Jun NH2-terminal Kinases) genannt, sind sie als MAPKs eingebunden in eine Signalkaskade, die MKK1 als MAPKKK und MKK4/Sek-1 als MAPKK involviert (Davis, 1994). Die SAPK-Kaskade wird blockiert bei TCR-Stimulierung ohne Korezeptorsignal (DeSilva et al., 1996), allerdings reflektiert deren Aktivierung nicht spezifisch eine Stimulation durch CD28 und andere Korezeptoren, da zum Beispiel Fas nach Bindung des Fas-Liganden ebenfalls die SAPK-Stimulierung triggern kann (Wilson et al., 1996), was deren bereits in anderen Systemen beobachtete Bedeutung in der Induktion stressinduzierter Apoptose unterstreicht (Verheij et al., 1996). Die SAPK-Kaskade kann über die Aktivierung von Pak-1 und in einigen Fällen über Ras-Aktivierung durch die kleinen GTP-bindenden Proteine Rac1 und Cdc24 reguliert werden (Minden et al., 1994). Zu den Zielen dieses Signalweges gehören die Transkriptions-

faktoren c-Jun (Derijard et al., 1994) und ATF-2 (Gupta et al., 1995).

Inflammatorische Zytokine und zellulärer Streß stimulieren auch die Aktivität der p38-Kinase (Lee et al., 1994; Raingeaud et al., 1995), die ein Säugeräquivalent der in Hefen vorkommenden Hog-Kinase zu sein scheint, einem Molekül, das die Antwort auf osmolaren Streß vermittelt (Brewster et al., 1993). Als MAPKKs fungieren in der vorgeschalteten Signalkaskade MKK3, MKK6 und - unter gewissen Umständen - MKK4 (Raingeaud et al., 1996). Das MAPKKK-Enzym dieses Signalweges ist noch nicht bekannt. Die physiologischen Substrate von p38 sind noch nicht genau bekannt, man weiß allerdings, daß p38 ATF-2 und eine Kinase, MAPK-activated protein kinase 2, phosphorylieren kann, und seine Aktivierung konnte mit dem programmierten Zelltod in Zusammenhang gebracht werden (Xia et al., 1995).

1.5 Die Familie der NF-AT-Transkriptionsfaktoren

Unter Transkriptionsfaktoren versteht man durch Regulatorgene kodierte Proteine, die mit steuernden DNA-Sequenzen, den Promotoren, in Wechselwirkung treten und so die Transkription regulieren. Zum einen gibt es sogenannte generelle Transkriptionsfaktoren (GTFs): Zu ihnen gehören die RNA-Polymerase II, die in eukaryotischen Zellen die Transkription aller mRNAs katalysiert, die Strukturproteine kodieren, und die mit ihr assoziierten Faktoren TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIH und TFIIF (Conaway and Conaway, 1993; Zawel and Reinberg, 1993), die für die Promotorerkennung und die korrekte Transkriptionsinitiation notwendig sind. Andererseits gibt es Transkriptionsfaktoren, die nur in die Transkription derjenigen Gene eingreifen, deren Promotoren spezifische Bindungsstellen für diese Faktoren besitzen. Neben den DNA-bindenden Domänen (Nelson, 1995) sind für die Funktion dieser spezifischen Transkriptionsfaktoren deren transaktivierende Domänen (TADs) (Blau et al., 1996), die mit GTFs interagieren (Goodrich et al., 1993; Gill et al., 1994; Zhu et al., 1994) und so die Aktivität des RNA-Polymerase II-Holoenzym modulieren können (Ghosh, 1993), von entscheidender Bedeutung.

Eine vor allem in T-Lymphozyten wichtige Gruppe solcher spezifischen Transkriptionsfaktoren ist die Familie der NF-AT-Proteine.

1.5.1 Familienmitglieder

NF-AT (Nuclear Factor of Activated T cells) wurde zunächst als rasch induzierbarer, T-zellspezifischer Kernfaktor beschrieben, der an das ARRE-2 (Distal Antigen Receptor Response Element) des humanen IL-2-Promotors bindet (Shaw et al., 1988). Später zeigte sich, daß NF-AT-Faktoren in vielen hämatopoetischen Zelllinien vorkommen, so in B-Lymphozyten, NK-Zellen, Mastzellen, Monozyten bzw. Makrophagen, aber auch in Nervenzellen (Verweij et al., 1990; Brabletz et al., 1991; Yaseen et al., 1993; Wang et al., 1995), und daß sie eine ganze Familie von Transkriptionsfaktoren bilden: NF-AT1 (auch NF-ATp, „p“ für „preexisting“) wurde mit Hilfe der distalen NF-AT-Bindungsstelle des murinen IL-2-Promotors (Pu-b_d) aus zytoplasmatischen Extrakten eines murinen T-Zellklons isoliert und aus murinen (Ar-5) und humanen Jurkat-T-Zell-cDNA-Bibliotheken kloniert (McCaffrey et al., 1993); NF-AT2 (auch NF-ATc, „c“ für „cytoplasmic“) wurde auf ähnliche Weise aus bovinem Thymusgewebe gewonnen und aus einer Jurkat-cDNA-Bibliothek kloniert (Northrop et al., 1994). cDNA-Klone, die für NF-AT3 und NF-AT4 kodierten, wurden aus Jurkat-T-Zell- und humanen PBL(Peripheral Blood Lymphocyte)-cDNA-Bibliotheken durch Kreuzhybridisierung mit einer NF-ATp-Probe isoliert (Hoey et al., 1995). Mehrere Isoformen, die durch alternatives Spleißen zustandekommen, wurden für NF-AT1, NF-AT2 und NF-AT4 beschrieben.

1.5.2 Struktur

Die beiden Hauptregionen von Sequenzhomologie, die DNA-bindende Domäne (DBD) und die NF-AT-Homologie-Region (NHR) (Luo et al., 1996a), kommen in allen Isoformen vor. Die DNA-bindende Domäne, die in den bekannten Isoformen ungefähr zwischen den AS 400 und 700 liegt, ist hochkonserviert (ca. 70% Homologie zwischen den NF-AT-Proteinen) und zeigt im paarweisen

Vergleiche eine gewisse Sequenzhomologie mit der DNA-bindenden Domäne von Mitgliedern der Rel-Proteinfamilie (ca. 18%) und wird deswegen auch als „Rel-Homologie-Domäne (RHD)“ bezeichnet (Jain et al., 1995). Die NHR, die ca. 300 AS umspannt und direkt an das N-terminale Ende der DBD angrenzt, zeigt eine geringere Sequenzhomologie unter den NF-AT-Faktoren, weist aber einige für die NF-AT-Familie typische, stark konservierte Sequenzmotive auf (Ho et al., 1995; Masuda et al., 1995). Diese Domäne bindet Calcineurin und wird nach Aktivierung von Calcineurin dephosphoryliert; sie kontrolliert die calcineurinregulierte nukleäre Translokation von NF-ATp (Luo et al., 1996b). Vermutlich enthalten sowohl N-terminale als auch C-terminale Bereiche von NF-AT transaktivierende Domänen (TADs) (Luo et al., 1996a). Die N-terminale TAD von NF-AT1 wurde in den ca. 100 N-terminalen AS-Resten lokalisiert, die ebenso wie die korrespondierenden Bereiche von NF-AT2b, NF-AT3 und NF-AT4 reich an sauren AS und an Prolin ist (Hoey et al., 1995; Masuda et al., 1995; Luo et al., 1996a). Wenn sie als Gal4-Fusionsprotein exprimiert wird, ist die Region von NF-AT1c, die der DBD C-terminal benachbart liegt, ebenfalls zur Transaktivierung fähig (Luo et al., 1996c).

1.5.3 Regulation der transkriptionellen Aktivität

Die NF-AT-Aktivität wird in T-Zellen von vielen Signalwegen und -molekülen moduliert. Da in den meisten Experimenten die Expression eines Reportergens gemessen wurde, das unter der Kontrolle einer zusammengesetzten NF-AT/AP-1-Bindungsstelle steht, ist die Interpretation der Ergebnisse solcher Versuche notwendigerweise kompliziert, da nicht immer klar ist, ob NF-AT-Proteine oder die AP-1-Faktoren c-Jun und c-Fos für den gemessenen Effekt verantwortlich sind. Das bisherige Wissen über die Regulation der NF-AT-Aktivität wird zusammenfassend in Abb. 3 (S. 17) dargestellt.

Signalmoleküle, die in der Frühphase der T-Zellaktivierung eine Rolle spielen und die die Aktivierung von NF-ATs auslösen können, sind Lck, ZAP-70 (s. Abschnitt 1.2, S. 2) und Vav (s. Abschnitt 1.3, S. 5). Die Überexpression von Wildtyp- oder konstitutiv aktiver Lck verstärkte die NF-AT-abhängige

Reporterexpression in Lck JCam.1-Zellen (Carrera et al., 1995). Überexpression einer ZAP-70-Mutante ohne Kinaseaktivität verhinderte in Jurkat-Zellen die durch anti-TCR-Antikörper stimulierte Aktivierung von NF-AT (Qian et al., 1996), Überexpression von Vav und/oder SLP-76 in Jurkat-Zellen verstärkte die basale und die TCR-stimulierte NF-AT-abhängige Reporterexpression (Wu et al., 1995; Wu et al., 1996). Keine Verstärkung wurde in Zellen beobachtet, denen Lck, CD45 oder die TCR β -Kette fehlte, und sie wurde blockiert durch die Calcineurininhibitoren CsA und FK506 sowie durch Überexpression dominant negativer Formen von Ras und Raf. Dies ist ein Indiz dafür, daß Vav proximal dieser Moleküle oder in einem parallelen Signalweg wirkt.

TPA, dessen Haupteffekt in T-Zellen in der Aktivierung von Proteinkinase C, Ras und Raf besteht, aktiviert die NF-AT-abhängige Genexpression (Cantrell, 1996). Ras ist für die NF-AT-Aktivierung unentbehrlich: Aktiviertes Ras kann TPA voll ersetzen, und zusammen mit konstitutiv aktivem Calcineurin stimuliert es stark die NF-AT-abhängige Reporterexpression, wohingegen dominant negatives Ras die TCR-stimulierte NF-AT-Aktivierung verhindert (Woodrow et al., 1993; Genot et al., 1996). In T-Zellen waren konstitutiv aktives Raf oder MEK1 nicht in der Lage, im Synergismus mit Ionomycin die NF-AT-abhängige Transkription in gleichem Maße zu stimulieren; dominant negative Formen dieser Proteine verhinderten nur partiell die Ras-vermittelte Aktivierung (Genot et al., 1996; Whitehurst and Geppert, 1996). Nach den Ergebnissen von Genot et al. (1996) aktivierte eine konstitutiv aktive Form von Rac-1, höchstwahrscheinlich einem Effektor von Ras (s. Abschnitt 1.4.3, S. 10), die AP-1-kontrollierte Expression eines Reportergens über einen Signalweg, der Erk nicht involviert, maximal, konnte aber ein NF-AT-abhängiges Reportergen nicht effizient aktivieren, auch nicht in Kombination mit Ionomycin und konstitutiv aktiver MEK1. So wurde vorgeschlagen, daß ein dritter Ras-Effektorsignalweg existieren solle, der für die maximale Expression eines NF-AT/AP-1-kontrollierten Reportergens notwendig sei.

Die Aktivierung von NF-AT-Proteinen folgt präzise der Aktivierung von Calcineurin. In T-Zellen bleibt, wenn der intrazelluläre Calciumspiegel gesteigert

bleibt, die Calcineurinaktivität erhöht, und NF-AT1 bleibt für viele Stunden aktiviert und im Zellkern lokalisiert. Wenn die Calcineurinaktivität durch Entfernung des calciummobilisierenden Stimulus oder durch Zugabe von CsA

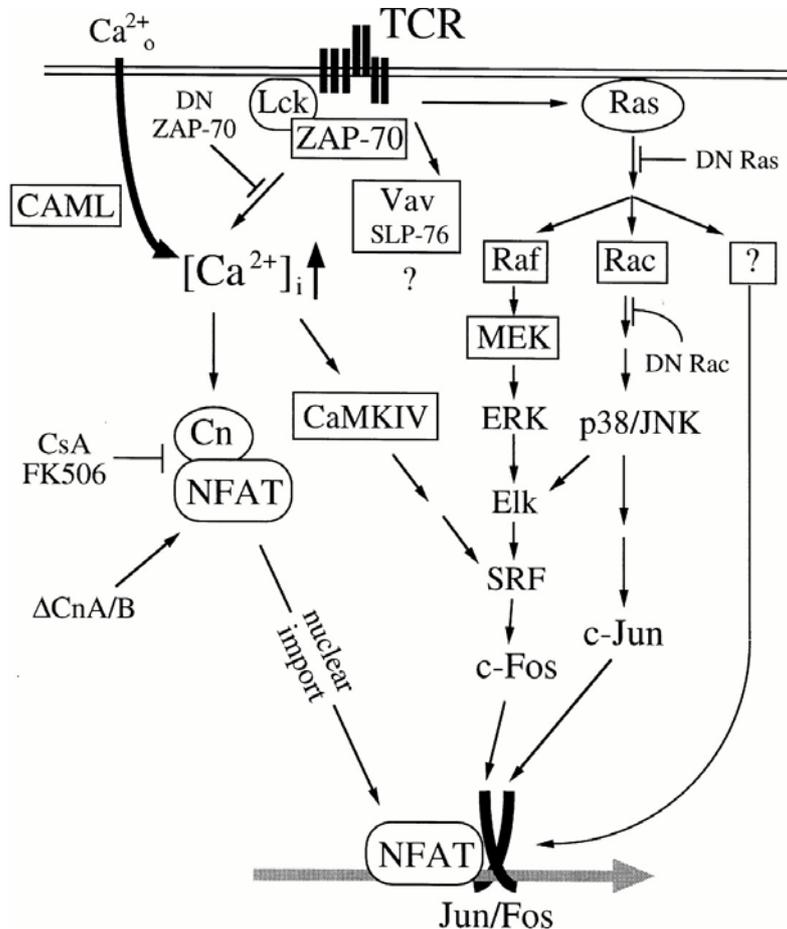


Abb. 3 faßt vereinfachend das Wissen über die NF-AT-Regulation, insbesondere durch eine Bindungsstelle des distalen IL-2-Promotors, zu Beginn unserer experimentellen Arbeiten zusammen. Beachte insbesondere, daß nicht NF-AT, sondern nur die AP-1-Faktoren c-Jun und c-Fos als Ziel für MAP-Kinasen zur Darstellung gelangen. Auch die Beteiligung von p300/CBP an der Regulation der transkriptionellen NF-AT-Aktivität war zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt (Rao, 1997).

oder FK506 zu stimulierten T-Zellen inhibiert wird, kommt es innerhalb von 5-15 min. zur Rephosphorylierung von NF-AT1 und zu dessen Rückkehr ins Zytoplasma. Der Dephosphorylierungs/Rephosphorylierungs- und der nukleäre

Import/Export-Zyklus können viele Male wiederholt werden, was man als Hinweis auf ein dynamisches Wechselspiel zwischen Calcineurin und konstitutiv aktiven Kinasen werten darf (Ruff and Leach, 1995; Loh et al., 1996a; Loh et al., 1996b). Konstitutiv aktives Calcineurin konnte partiell das für die NF-AT-abhängige Genexpression notwendige Calcium ersetzen (Clipstone and Crabtree, 1992; O'Keefe et al., 1992; Kubo et al., 1994). Zusätzlich zur nukleären Translokation scheint Calcineurin auch die DNA-Bindung von NF-AT-Faktoren zu beeinflussen. Während Hyperphosphorylierung die DNA-Bindung von NF-AT1 inhibierte, stimulierte die Dephosphorylierung durch Calcineurin (oder andere Phosphatasen) die DNA-Bindung von NF-AT1 in starkem Maße (Park et al., 1995).

Zusätzlich zur Aktivierung von Calcineurin führt die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels zur Aktivierung anderer calmodulinabhängiger Enzyme (James et al., 1995). Dabei scheinen zwei Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinasen, CaMKII γ B und CaMKIV/Gr, antagonistische Rollen in der NF-AT-Regulation zu spielen (Nghiem et al., 1994; Hama et al., 1995; Ho et al., 1996).

Eine weitere Ebene, auf der die Aktivität von NF-AT-Faktoren kontrolliert werden könnte, ist die Ebene der Transaktivierung. Induzierbare transaktivierende Domänen (TADs), deren Aktivität auf Stimulation der Zellen hin rasch zunimmt, wurden in den meisten eukaryotischen Transkriptionsfaktoren identifiziert. Im Detail wurde das zum Beispiel nachgewiesen für die C-terminale TAD von Elk-1/TCF-1 (Treisman, 1996) und für den cAMP-induzierbaren Faktor CREB (Torchia et al., 1998).

1.5.4 Gewebeverteilung und Zielgene

NF-AT2- und NF-AT1-Proteine werden - je nach Zelllinie in unterschiedlichem Ausmaß - in peripheren T-Zellen und -Zelllinien exprimiert, NF-AT1 auch in anderen Immunzellen, so zum Beispiel B-Zellen, Mastzellen, NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen (Cockerill et al., 1995a; Wang et al., 1995; Weiss et al., 1996). Außerdem findet sich NF-AT1 in olfaktorischem Epithel (Ho et al.,

1994) und in Endothelzellen (Cockerill et al., 1995b; Wang et al., 1995). Eindeutig und mehrfach belegt ist die Beteiligung von NF-AT bei der Aktivierung der IL-2- (Serfling et al., 1995), IL-4- (Chuvpilo et al., 1993), GM-CSF- (Jenkins et al., 1995) und TNF- α -Cytokingene (McCaffrey et al., 1994) in T-Zellen. Außerdem gibt es gute, aber quantitativ geringere Evidenz für die Beteiligung von NF-AT in der Regulation der IL-3- (Duncliffe et al., 1997), IL-5- (Karlen et al., 1996), IL-8- (Okamoto et al., 1994), Interferon- γ - (Campbell et al., 1996) und CD40L-Gene (Tsytsykova et al., 1996) (s.a. Abschnitt 1.1, S. 1) in T-Zellen, des TNF- α -Gens (Tsai et al., 1996) in B-Zellen und der IL-4- (Weiss et al., 1996) und IL-5-Gene (Prieschl et al., 1995) in Mastzellen.

1.6 Die transkriptionellen Kofaktoren p300 und CBP

Eine Sonderstellung nehmen die höchstwahrscheinlich ubiquitär in Säugerzellen vorkommenden Kofaktoren p300 und CBP ein, die nicht zu den eigentlichen Transkriptionsfaktoren zu rechnen sind, da sie nicht in der Lage sind, direkt an spezifische DNA-Regulationssequenzen zu binden; ihre Aufgabe besteht vielmehr darin, die Interaktion zwischen speziellen und generellen Transkriptionsfaktoren zu modulieren. Sie werden deswegen auch als transkriptionelle Adapterproteine bezeichnet. Sie gehören zu den Faktoren mit spezifischen Zielen (Bindungsregionen an verschiedenen Transkriptionsfaktoren und nukleären Rezeptoren) und sind nicht als Bestandteile des allgemeinen Transkriptionsapparates zu betrachten.

CBP wurde kloniert bei einem Expressions-Screeningversuch, der darauf abzielte, Proteine zu finden, die in der Lage sind, an den durch Proteinkinase A (PKA) phosphorylierten Transkriptionsfaktor CREB zu binden (daher CREB Binding Protein) (Chrivia et al., 1993). Eine cDNA von p300 wurde erstmals isoliert auf Grund der Fähigkeit des Proteins, das adenovirale E1A-Protein zu binden (Eckner et al., 1994). Die beiden Proteine sind in ihrer AS-Sequenz nahe verwandt, am stärksten in fünf Regionen, die (von N- nach C-terminal aufgezählt) als C/H 1-, CREB-bindende, Bromo-, C/H 2- und C/H 3-Domäne bezeichnet werden.

Zu den Transkriptionsfaktoren, die p300 und CBP binden können, gehören die Leucin-Zipperproteine c-Jun, JunB und c-Fos (Bannister et al., 1995; Bannister and Kouzarides, 1995; Lee et al., 1996; Smits et al., 1996). Weitere transkriptionelle Aktivatoren, die mit p300 oder mit CBP interagieren, sind unter anderen NF- κ B (Gerritsen et al., 1997; Perkins et al., 1997), YY-1 (Lee et al., 1995), c-Myb (Dai et al., 1996; Oelgeschläger et al., 1996), myogene bHLH-Proteine (Eckner et al., 1996a; Yuan et al., 1996), nukleäre Rezeptoren (Hörlein et al., 1995; Hanstein et al., 1996; Kamei et al., 1996; Yao et al., 1996), Sap-1 (Janknecht and Nordheim, 1996a) und die Koaktivatoren SRC-1 (Kamei et al., 1996) und p/CIP (Torchia et al., 1997). In vitro konnten Interaktionen mit dem generellen Transkriptionsfaktor TFIIB (Kwok et al., 1994) und mit der Histonenacetylase P/CAF (Yang et al., 1996) gezeigt werden. Auch wurden Bindungen an TBP (TATA-box Binding Protein) (Yuan et al., 1996) und RNA-Polymerase II (Kee et al., 1996) nachgewiesen. Das verdeutlicht die Funktion von p300 und CBP als nukleäre Adapterproteine (Janknecht and Hunter, 1996). Die Zahl der bekannten Moleküle, die mit p300/CBP interagieren, ist in den vergangenen Jahren rasch gewachsen. In den allermeisten Fällen scheint p300/CBP die Aktivierung der Transkription durch die oben genannten Transkriptionsfaktoren zu verstärken. Es wurde als Modell vorgeschlagen, daß p300 und CBP als Integratoren verschiedener extrazellulärer Stimuli im Zellkern wirken, indem Transkriptionsfaktoren und nukleäre Rezeptoren um limitierte Mengen von p300/CBP kompetitieren (Kamei et al., 1996). Ein gemeinsames Merkmal der meisten an p300/CBP bindenden Transkriptionsfaktoren ist nämlich, daß sie durch Signalwege aktiviert werden, die durch verschiedene extrazelluläre Stimuli getriggert werden.

Über die Regulierung der Aktivität von p300/CBP ist noch wenig bekannt; es gibt Hinweise, daß eine Phosphorylierung von p300/CBP, vielleicht durch eine phosphorylierungsabhängige Maskierung bzw. Demaskierung von Aktivationsdomänen, dessen Aktivität regulieren könnte (Brindle et al., 1995; Kitabayashi et al., 1995).

Daß p300 und CBP eine wichtige Aufgabe in der Kontrolle der Zellproliferation erfüllen, wird zum einen daraus ersichtlich, daß die Zahl der zellulären

Protoonkogene, von denen man weiß, daß sie mit p300/CBP interagieren, unter ihnen c-Fos, c-Jun und c-Myb, ständig wächst. Zum anderen zeigt sich ihre Bedeutung in der Tatsache, daß inzwischen mehrere virale Onkoproteine, die in der Lage sind, Säugerzellen zu immortalisieren, bekannt sind, die mit p300/CBP in Wechselwirkung treten, nämlich das adenovirale E1A-Onkoprotein (Eckner et al., 1994; Arany et al., 1995; Lundblad et al., 1995), das große T-Antigen des SV40-Virus (Avantaggiati et al., 1996; Eckner et al., 1996b) und das tax-Protein des HTLV I-Virus (Kwok et al., 1996).

1.7 Problemstellung

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die Signalübertragungsmechanismen, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-ATc in T-Lymphozyten führen, zu gewinnen. Für die Experimente wurden DNA-Konstrukte verwendet, deren Reportergene unter der Kontrolle der Transaktivierenden Domäne A (TAD-A) von NF-ATc stehen. Bisherige Arbeiten hatten meist Konstrukte benutzt, die unter der Kontrolle einer zusammengesetzten NF-AT/AP-1-Bindungsstelle stehen. Aus letzteren Experimenten erhaltene Ergebnisse waren notwendigerweise schwer interpretierbar, da mit diesem Ansatz nicht differenziert werden kann, ob die Wirkung auf das Reportergen über NF-AT oder die AP-1-Faktoren vermittelt wird.

Es konnte gezeigt werden, daß die TAD-A von NF-ATc durch konstitutiv aktive Mutanten der MAP-Kinase Raf und des GTP-bindenden Proteins Rac aktiviert wird. Darüber hinaus stellte sich heraus, daß TAD-A durch die MAP-Kinase Erk2 in vivo und in vitro phosphoryliert wird. Um die physiologische Relevanz dieser Phosphorylierung zu untersuchen, wurde eine Mutante von TAD-A, in der alle fünf Serinreste, die durch MAP-Kinasen theoretisch phosphoryliert können, durch Alaninreste ersetzt sind, in Kotransfektionen untersucht. Es zeigte sich, daß die Mutante ebenfalls durch Raf und Rac aktiviert wird.

Es stellte sich somit die Frage nach einem potentiellen Kofaktor, der die Raf/Rac-Wirkungen vermittelt, da die direkte Phosphorylierung von TAD-A offensichtlich nicht essentiell ist für ihre Aktivierung. Für immer mehr

Transkriptionsfaktoren konnte in den letzten Jahren eine Modulierung der Aktivität durch die transkriptionellen Kofaktoren CBP und p300 nachgewiesen werden. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war es, der Frage auf den Grund zu gehen, ob auch die Aktivität von NF-AT-Faktoren durch die beiden genannten Koaktivatoren moduliert wird.

Als sich schließlich herausstellte, daß CBP/p300 tatsächlich die N-terminale Transaktivationsdomäne von NF-ATc stimuliert, ergab sich die Frage, ob CBP/p300 der gesuchte Kofaktor ist, der die Raf/Rac-Wirkungen auf die TAD-A von NF-ATc vermittelt. Es konnte gezeigt werden, daß dies tatsächlich der Fall ist.

2. Material

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Autoklav	Stiefenhofer
Blotgerät TransphorLid	Hofer
Brutschrank	Heraeus
DE81-Papier (DEAE-Zellulose)	Whatman
Einmalküvetten	Hartenstein
Eismaschine	Sunbeam
Gelkammern	eigene Werkstatt
Geltrockner	BioRad
Glaspipetten	Brandt
Glaswaren	Schott
Mikroskop	Olympus
3MM-Papier	Whatman
Netzgeräte	BioRad, Pharmacia
Nitrozellulose	Schleicher & Schuell
pH-Meter	Ingold
Phosphor Imager	Molecular Dynamics
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf
Plastikmaterial	Falcon, Nunc, Greiner
Quarzküvetten	Helma
Röntgenfilme: BioMax	Kodak
Rotoren	Sorvall, Beckmann
Schüttler für:	
Mikroreaktionsgefäße	Witeg Electrics
Bakterienkulturen	Infors AG
Speed Vac	Uniequip
Spektralphotometer	Beckmann
Sterilbank	Flow Laboratories
Sterilfilter	Schleicher & Schuell

UV-Stimulationsgerät	Bachofer
UV-Handlampe	Bachofer
Verstärkerfolien	DuPont
Vortexer	Hartenstein
Waagen:	
bis 250 g	Precisa 300 MC
bis 100 g	Sartorius, Sauter
Zählkammer (Neubauer)	Hartenstein
Mikrozentrifuge	Eppendorf
Hochleistungszentrifuge	Hettich, Sorvall
Ultrazentrifuge	Beckmann
Kühlzentrifuge	Heraeus

2.2 Chemikalien und Lösungen

Chemikalien wurden hauptsächlich von folgenden Firmen bezogen: Gibco, Roche, Roth, Sigma. Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser bereitet sowie in der Regel autoklaviert oder sterilfiltriert. Nicht separat angegebene Standardreagenzien (z.B. NaCl, RbCl, CaCl, EDTA, usw.) wurden über die Firma Sigma bezogen.

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose	Sigma
Ammoniumperoxysulfat (APS)	Sigma
Antibiotika	Sigma
Bacto-Tryptone	Gibco
2-Butanol	Roth
Borsäure	Roth
Bradford-Reagenz (5-fach konzentriert)	BioRad
Bromphenolblau	Merck
BSA (Fraktion V)	Roche

Cäsiumchlorid	Roth
Cyclosporin A (CsA)	Sandoz
DEPC	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dithiothreitol (DDT)	Sigma
DMEM	Seromed
DMRIE-C™ Reagent	Gibco
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylacetat	Sigma
FCS	Hyclone, Gibco
Formamid	Roth
Glutamin	Gibco
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Gibco
Isopropanol	Roth
Ionomycin	Sigma
Lithiumchlorid	Roth
Magermilchpulver	Schlecker
MBP	Sigma
Methanol	Roth
MMS (Methyl-Methan-Sulfonat)	Merck
Natriumacetat	Roth
OPTI-MEM®	Gibco
PD098059	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
RPMI-1640	Roth
SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat)	Gibco
TEMED	Sigma
TPA (12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat)	Sigma

Tris (Hydroxymethyl-aminomethan)	Sigma
Trypanblau	Roth
Xylencyanolblau	Gibco

2.3 Enzyme

Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I von <i>E.coli</i>	Biolabs
Restriktionsendonukleasen	Biolabs
RNase A	Pharmacia
T4-DNA-Ligase	Biolabs

2.4 Reaktionssysteme

ECL Western Blotting Analysis System	Amersham
Jetsorb-Gel-Extraktions-Kit	Genomed

2.5 Größenmarker

2.5.1 DNA-Marker

Lambda-Phagen DNA, HindII/EcoRI gespalten, ergibt folgende Fragmente:	L-Marker: pUC18, AluI gespalten, ergibt folgende Fragmente:
---	---

21.221 bp	682 bp
5.150 bp	521 bp
4.974 bp	257 bp
4.271 bp	245 bp
3.538 bp	226 bp
2.024 bp	100/96/95 bp
1.906 bp	64/63 bp
1.584 bp	45/43 bp

1.374 bp
947 bp
832 bp
564 bp
125 bp

2.5.2 Proteinmarker

(¹⁴C)- Rainbow-Marker, Mol. WT 14.300-200,37 kBq Amersham

2.6 Radioaktivität

γ^{32} -P-ATP, (3000 Ci/mMol) Amersham

2.7 Bakterien

HB101: Dieser Stamm, eine Kreuzung aus *E.coli* K12 und *E.coli* B, wird häufig in der Gentechnologie verwendet, da das rec-A-Gen mutiert ist. Ohne ein aktives Rec-A-Protein findet keine genetische Rekombination statt, was diesen Stamm als Klonierungsvektor geeignet macht.

2.8 Gewebekulturzellen

Jurkat	humane T-Zell-Leukämie
293	humane embryonale Nieren-Zellen

2.9 Antikörper

Erk1	Santa Cruz (sc-93)
Erk2	Santa Cruz (sc-154)
Erk3	Santa Cruz (sc-155)

JNK1/2	Santa Cruz (sc-474)
CBP	Santa Cruz (sc-369)
p300	Santa Cruz (sc-584)
GST	Santa Cruz (sc-459)
HA	BAbCO (mAb HA.11)
NF-ATc	Affinity Bioreagents (7A6)
Sekundärantikörper	Amersham

2.10 Plasmide

2.10.1 Luciferase-Plasmide

Plasmid	Erläuterung	Quelle
5*GRE-E1b	enthält 5 hintereinandergeschaltete Bindungsstellen des Hefefaktors Gal4	A.Avots
4xPubd-Luc	enthält Tetramer der distalen NFAT-Bindungsstelle des IL-2-Promotors	S.Chuvpilo
IL-2-Luc	enthält AS +5 - -499 des humanen IL-2-Promotors	S.Chuvpilo

2.10.2 Expressionsplasmide

Plasmid	Erläuterung	Quelle
Gal4	AS 1-147 des Hefefaktors Gal4	Baniahmad, 1992
Gal4/TAD-A	AS 113-205 von NF-ATc	A.Avots
Gal4/TAD-A _{5*M}	wie Gal4/TAD-A, jedoch Serin 117, 151, 172, 199 und 203 durch Alanin ersetzt	A.Avots
Raf-BXB-CAAX	konstitutiv aktive Form von Raf-1	Whitehurst, 1995
RacV12	konstitutiv aktive Form von Rac	Genot, 1996
CBP-HA	HA-gekoppeltes CBP voller Länge	A.Avots; Martinez-

p300	p300 voller Länge	Balbas, 1998
p300-HA	HA-gekoppeltes p300 voller Länge	Eckner, 1996
E1A	Adenovirales E1A-Protein	A.Avots; Eckner, 1996
		Eckner, 1996

3. Methoden

3.1 Bakterienkultur

LB-Medium	
Bacto-Tryptone	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Agar für Platten 1.5%	

Übernachtskultur

Für eine Übernachtskultur werden 5 ml LB-Medium mit einer Bakterienkolonie von einer Agarplatte oder mit 100 µl Kultur angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Erhaltungskultur

Zu einer frischen Übernachtskultur werden 0.5 Vol 86% Glycerol gegeben, nach der Mischung wird die Suspension bei -20°C gelagert.

3.1.1 Präparation kompetenter Bakterien (RF1/RF2-Protokoll)

RF1	RF2
RbCl 100 mM	RbCl 10 mM
CaCl ₂ 2H ₂ O 10 mM	CaCl ₂ 2H ₂ O 75 mM
Glycerol 15 %	Glycerol 15 %
MnCl ₂ 4H ₂ O 50 mM	MOPS 10 mM
Kaliumazetat 30 mM	
pH 5,8 (mit 0,2 M Essigsäure zu titrieren)	pH 6,8 (mit 0,2 M NaOH zu titrieren)

Eine 5 ml-Übernachtskultur wird mit LB-Medium 1:100 verdünnt und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0.50-0.55 bei 550 nm ca. 2-2,5 Stunden im 37°C-Inkubator bei 250 UpM geschüttelt. Die Zellen werden dann ca. 30 min. auf Eis abgekühlt und schließlich 12-15 min. bei 2500 UpM und 4°C im vorgekühlten GSA-Rotor abzentrifugiert.

Das Pellet wird in 40 ml eiskaltem RF1 vorsichtig resuspendiert, 1-2 Stunden auf Eis stengelassen und dann 9 min. bei 2500 UpM erneut abzentrifugiert. Die Zellen werden nun in 7 ml eiskaltem RF2 resuspendiert und 15 min. auf Eis stengelassen. Jetzt kann die Bakterien-Suspension in Aliquots von 0,5 ml in vorgekühlte Eppendorf-Röhrchen abgefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Die Aufbewahrung kann bei -70 °C über Monate erfolgen.

Die Transformationseffizienz kann durch Probetransformation mit einer definierten Menge eines Referenzplasmids (beispielsweise 0,1 ng pUC-Plasmid-DNA auf 100 µl Bakteriensuspension) getestet werden. Verschiedene Mengen der transformierten Bakteriensuspension werden auf Ampicillinplatten ausgestrichen, und nach Auszählen der Kolonien am nächsten Tag wird die Transformationsrate errechnet. Sie sollte bei 10^6 - 10^7 Kolonien pro µg DNA liegen.

3.1.2 Transformation kompetenter Bakterien

TE	
Tris/HCl, pH 8.0	10 mM
EDTA, pH 8.0	1 mM

Die kompetenten Bakterien läßt man langsam auf Eis auftauen und mischt dann je 100 µl Zellen mit der mit TE auf 30 µl aufgefüllten DNA (10-50 ng). Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis werden die Zellen für 2 min. im 42°C-Wasserbad schockartig erwärmt. Nachdem die Bakterien danach für 2 min. auf Eis wieder abgekühlt wurden, werden sie mit 1 ml auf 37°C erwärmtem LB-Medium versetzt und dann 1 h bei 37°C geschüttelt.

Je 200 µl dieser Suspension werden auf leicht vorgetrocknete ampicillinhaltige LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Alle Bakterien, die mit dem Plasmid das Ampicillin-Resistenzgen aufgenommen haben, können wachsen und auf der Agarplatte Kolonien bilden.

3.1.3 Plasmidisolaton aus Bakterienkultur

Ish I		Ish II		Ish III	
EDTA, pH 8.0	10 mM	SDS	1,0 %	Essigsäure	2 M
Tris/HCl, pH 8.0	25 mM	NaOH	0,2 N	Kaliumazetat	3 M
Glukose	50 mM				

1 l doppelt konzentriertes LB-Medium mit 40 mg Ampicillin wird mit 3 ml einer Übernachtskultur angeimpft und ca. 40 h bei 37°C geschüttelt. Die Bakterienkultur wird bei 5.000 UpM und RT 10 min. abzentrifugiert.

Das Pellet wird in 20 ml Ish I resuspendiert und 10 min. bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 40 ml Ish II, sanftem Mischen und 10-minütiger Inkubation auf Eis werden 30 ml eiskaltes Ish III zugegeben und die Suspension wird kräftig geschüttelt. Nach 20 min. bei -20°C wird 10 min. bei 4°C und 9.000 UpM zentrifugiert.

Der Überstand wird durch ein Faltenfilter filtriert und mit dem gleichen Volumen Isopropanol 10 min. bei RT gefällt. Das Präzipitat wird bei 9.000 UpM und 20°C 10 min. abzentrifugiert.

Das Pellet wird in 3 ml TE aufgenommen und mit dem gleichen Volumen gesättigtem NaOAc werden 20 min. bei -20°C RNA und Lipopolysaccharide ausgefällt. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 7.500 UpM wird der Überstand mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt, und das Präzipitat wird 15 min. bei 6000 UpM abzentrifugiert.

Das nun erhaltene Pellet wird in 8 ml TE aufgenommen und mit 100 µl Ethidiumbromid versetzt. 9 g CsCl werden in 8.1 g dieser Lösung aufgelöst und in Ultrazentrifugen-Röhrchen gefüllt.

Während der nun folgenden mindestens zwölfstündigen Zentrifugation bei 20°C

und 50.000 UpM wird ein Dichtegradient ausgebildet, in dem sich die Plasmid-DNA in einer definierten Bande ansammelt. Diese Bande kann mit Hilfe einer Kanüle abgezogen werden. Die DNA-Lösung wird dann mit einer Lösung, die zu 50% ihres Gewichtsanteils aus CsCl und zu 50% aus TE besteht, aufgefüllt und erneut über Nacht zentrifugiert. Die entstehende Bande wird wieder abgezogen.

Das Ethidiumbromid wird aus der DNA-Lösung entfernt, indem mehrmals mit 1 Vol. NaCl-gesättigtem Isopropanol ausgeschüttelt wird. Durch Zugabe von A.dest. bis zum Erreichen des Ausgangsvolumens löst sich eventuell ausgefallenes Salz wieder.

Die Plasmid-DNA wird mit 2 Vol. TE verdünnt und mit 1 Vol. Isopropanol 30 min. bei 4°C gefällt und anschließend bei 7500 UpM 15 min. abzentrifugiert.

Das Pellet wird in 3 ml TE gelöst, es wird NaCl bis zu einer Konzentration von 50 mM hinzugefügt, dann wird die DNA mit 2.5 Vol. Ethanol 30 min. bei -20°C gefällt. Das Präzipitat wird 15 min. bei 7500 UpM abzentrifugiert.

Das Pellet wird in 200-1000 µl TE aufgenommen, und die DNA-Konzentration wird spektralphotometrisch bestimmt. Die Qualität der DNA wird - insbesondere auf das Fehlen von RNA hin - am Agarosegel überprüft.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Bestimmung der Zahl kultivierter Zellen

Die Zahl lymphoider Suspensionszellen wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zu 20 µl Zellsuspension werden 20 µl Trypanblau gegeben, ein Farbstoff, der die toten Zellen anfärbt, während lebende Zellen unter dem Mikroskop hell leuchten. Die Suspension wird in die Zählkammer gegeben und die Zahl der lebenden Zellen unter dem Mikroskop bestimmt. Man addiert die Zahl der Zellen in beiden Zählfeldern und multipliziert mit 10^4 . Dies ergibt die Zahl der Zellen pro Milliliter.

3.2.2 Kultivierung der Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in Zellkultur gehalten.

Verwendete Kulturmedien

RPMI (+): Jurkat-Suspensionszellen

DMEM (+): adhärenente 293-Zellen

	RPMI(+)-Medium	DMEM(+)-Medium
RPMI-Medium	500 ml	----
DMEM-Medium	----	500 ml
nicht essentielle Aminosäuren	5 ml	5 ml
Na-Pyruvat	5 ml	5 ml
Glutamin (200 mM)	7 ml	7 ml
Antibiotikamischung: 5 g Streptomycin + 5 g Penicillin in 50 ml H ₂ O	1 ml	1 ml
FCS (30 min. 56°C)	5%	5%
Na ₂ HCO ₃ (10%)	12.5 ml	----
25% HCl	5 ml pro 10 ltr	----

Suspensionszellen

Um die Zellkulturen mit frischen Nährstoffen zu versorgen, wurden sie regelmäßig umgesetzt. Dazu wurden die Zellen abzentrifugiert, mit RPMI(+) gewaschen und mit frischem RPMI(+) verdünnt in die Kulturgefäße zurückgegeben. Suspensionszellen sollten maximal bis zu einer Dichte von $3-6 \times 10^5$ wachsen.

Adhärenente Zellen

Adhärenente Zellen wuchsen in DMEM(+)-Medium bis zu einer konfluenten

Schicht heran. Beim Umsetzen der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden mit 5 ml ATV-Lösung überschichtet und 5 min. im Brutschrank inkubiert, abzentrifugiert, in 10-20 ml DMEM(+) gewaschen, erneut abzentrifugiert, zur Verdünnung in ein entsprechendes Volumen DMEM(+) aufgenommen und in frische Schalen ausplattiert, welche nachfolgend bis auf 10 ml mit DMEM(+) aufgefüllt wurden.

ATV-Lösung (1 ltr.)	
NaCl	8.00 g
KCl	0.27 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.20 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.10 g
Na ₂ -EDTA	1.25 g
Trypsin	1.25 g
pH 7.2 (+/- 0.1)	
sterilfiltrieren	

3.2.3 Transfektion der Zellen

3.2.3.1 Calciumphosphat-Kopräzipitation

	2xHBS	Ca-Mix
Hepes, pH 7.05	0.05 M	0.1 M
NaCl	0.28 M	---
Na ₂ HPO ₄	0.75 mM	---
NaH ₂ PO ₄	0.75 mM	---
CaCl ₂	---	0.5 M

Die adhärennten 293-Zellen wurden nach der Calciumphosphat-Kopräzipitations-Methode transfiziert. Diese Methode des DNA-Transfers in Säugerzellen wurde ursprünglich von Graham und Van der Eb entwickelt und im Laufe der Jahre von verschiedenen Autoren optimiert.

Die Zellen werden am Tag vor der Transfektion so verdünnt, daß sie am Transfektionstag zu einer 70%ig konfluenten Schicht herangewachsen sind. Pro Schale (10 ml) wird die folgende Transfektionslösung zugegeben:

- 2-10 µg DNA in 240 µl TE (gut mischen)
- 240 µl Calcium-Mix (gut mischen, 5 min. bei RT stehen lassen)
- 480 µl 2 x HBS (gut mischen, 30 min. bei RT stehen lassen)

Die Transfektionslösung wird mit dem Medium leicht gemischt, die Zellen werden zur Kopräzipitation des Calciumphosphat und der DNA über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Morgen werden die Zellen mit TBS gewaschen und mit frischem Medium versehen.

3.2.3.2 Transfektion von Zellen mit "DMRIE-CTM-Reagenz"

Diese Methode bietet sich an, wenn außer der Reporter-DNA weitere Expressionsplasmide in die Zellen transfiziert werden sollen. Da diese Methode sehr effizient ist, liegt die Wahrscheinlichkeit, daß alle zu transfizierenden DNAs von einer Zelle gleichzeitig aufgenommen werden, um ein Vielfaches höher als bei der DEAE-Dextran-Methode. Außerdem ist diese Methode schonender für die Zellen und relativ zügig durchzuführen.

Die DMRIE-C-Lösung (DMRIE = 1,2-Dimyristyloxypropyl-3-Dimethyl-Hydroxy-Ethyl-Ammonium-Bromid) ist eine 1:1 (M/M) Liposomen-Lösung von kationischen DMRIE-Lipiden und Cholesterol in gefiltertem A.dest..

Für eine Transfektion werden 1-2x10⁵ Zellen in 1.5 ml Kulturmedium eingesetzt. Die optimale DNA-Konzentration sollte jeweils austitriert werden. Gewöhnlich sind weniger als 1 µg DNA pro Ansatz ausreichend. Die entsprechende Menge DNA wird in 500 µl Kulturmedium ohne FCS (z.B. OPTI-MEM®) verdünnt. Pro Napf werden 4.5 µl DMRIE-Lösung in 500 µl OPTI-MEM® gelöst. Danach werden die beiden Lösungen vereinigt und gründlich gemischt. In jeden Napf wird 1 ml dieser Mischung pipettiert, und nach sorgfältiger Verteilung auf dem Napfbo-den durch Schwenken werden die Platten 30-45 min. bei RT inkubiert. Während

dieser Zeit werden die Zellen mit OPTI-MEM® gewaschen und anschließend so mit OPTI-MEM® resuspendiert, daß sich rechnerisch eine Zelldichte von 2×10^5 pro 0.5 ml ergibt, schließlich erfolgt die sanfte Mischung. In jeden der Näpfe werden 0.5 ml der Zellsuspension gegeben, wieder wird sanft gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 h im Brutschrank wird zu den Zellen 1.5 ml RPMI(+)-Zellkulturmedium, das 10% FCS enthält, gegeben. Die Zellen können 24-72 h nach der Transfektion geerntet werden.

3.2.4 Induktion der Zellen

	Stammlösungen	T-Zellen	adhärente Zellen
TPA	100 µg/ml in reinstem Ethanol	20 ng/ml	20 ng/ml
PD098059	10 mM in reinstem Ethanol	30 µM	30 µM
Ionomycin	5 mM in reinstem Ethanol	30 µM	30 µM
UV		1 J/cm ²	1 J/cm ²

Behandlung der Zellen

Das genaue Zeitschema für die Induktion ist im Ergebnisteil beim jeweiligen Versuch angegeben.

3.2.5 Ernten der Zellen

<u>1xPBS</u>	
NaCl	140.0 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	8.1 mM
KH ₂ PO ₄	1.5 mM

Suspensionszellen werden mit dem Medium in entsprechende Zentrifugationsgefäße überführt. Ein leichtes Nachspülen mit der Pipette kann nötig sein, um an den Wänden der Kulturgefäße anhaftende Zellen abzulösen.

Adhärente Zellen können nicht so leicht vom Untergrund gelöst werden. Das Medium wird zunächst abgesaugt, die Zellen werden mit ATV (s. S. 35) gewaschen und anschließend für 5 min. damit überschichtet und in den Brutschrank gestellt. Die Proteasen lösen die Zellen von den Wänden der Kulturgefäße, sie können dann mit PBS abgespült werden. Die Zellen werden 5 min. bei 1.200 UpM abzentrifugiert und in 10 ml PBS gewaschen. In welchen Puffer das Pellet nach dem Waschen aufgenommen wird, hängt vom nachfolgenden Experiment ab.

3.3 Ganzzelleextrakt

KLBM	
Hepes, pH 7.9	20 mM
EGTA	2 mM
α -Glycero-Phosphat	50 mM
NaN ₃	0.02 %
NaF	50 mM
Triton X-100	1%
Glycerol	10%
<i>direkt vor Gebrauch hinzuzufügen:</i>	
DTT	1 mM
Na-ortho-Vanadat	5 mM
Leupeptin	0.2 μ l/ml
PMSF	5 μ l/ml

Die geernteten und in PBS gewaschenen Zellen werden - je nach gewünschter Proteinkonzentration für den nachfolgenden Versuch - in 50 bis 1000 μ l KLBM lysiert.

Das Lysat kann nun, wenn eine Unterbrechung gewünscht wird, bei -70°C

gelagert werden. Ansonsten werden die Proben für 10 min. bei 4°C auf dem Rotator gemischt und anschließend für 20 min. bei 14000 UpM im Kühlraum zentrifugiert. Die Überstände werden in neue Mikroreaktionsgefäße überführt und der weiteren Verarbeitung zugeführt.

3.4 Konzentrationsbestimmung von DNA und Proteinen

3.4.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

3.4.1.1 Spektralphotometrische Bestimmung

Durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm kann die Konzentration einer verdünnten DNA-Lösung bestimmt werden. 50 µg/ml doppelsträngige (ds) DNA haben eine optische Dichte (OD) von 1, während einzelsträngige (ss) DNA schon bei 40 µg/ml diese optische Dichte erreicht.

Somit wird die DNA-Konzentration mit der Formel

$$OD_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} = [\text{mg/ml}] \text{ (für dsDNA) } \text{ berechnet.}$$

3.4.1.2 Vergleich mit DNA-Standards auf Mini-Agarosegelen

DNA-Farbpuffer (Gelauftragspuffer)	
Glycerol	80.00%
Bromphenolblau	0.025%
Xylencyanol	0.025%
EDTA	1.0 mM

DNA-Konzentrationen können auch auf einem 1%igen Agarose-Minigel (s. Abschnitt 3.5.1, S. 40) abgeschätzt werden. Neben einer bekannten Menge eines DNA-Markers werden je 1 µl einer Verdünnungsreihe der DNA-Lösung aufgetragen. Nach dreißigminütigem Lauf bei 100 V wird die DNA-Konzentration durch Intensitätsvergleich mit der bekannten Konzentration der Marker-DNA

abgeschätzt.

3.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Bradford-Reagenz wird 1:5 mit A.dest. verdünnt. Zur Erstellung einer Eichgeraden werden definierte Mengen BSA (1, 2.5, 5, 7.5, 10 µg) zu jeweils 1 ml der verdünnten Bradford-Lösung gegeben, die Proben werden gut gemischt und die Absorption wird bei 595 nm gemessen. Aus den erhaltenen Werten wird eine Eichgerade erstellt. Von der zu messenden Proteinlösung werden 2-5 µl zu 1 ml verdünntem Bradford-Reagenz gegeben, und die Absorption dieser Lösung wird bestimmt. Durch Vergleich mit der Eichgeraden kann die Proteinkonzentration ermittelt werden.

3.5 Gelelektrophoresen

3.5.1 Agarosegele

10xTAE (pro ltr.)	
Tris-Base	48.40 g
EDTA	3.72 g
Eisessig	11.4 ml

DNA-Fragmente können je nach ihrer Größe auf 0.7-2.5%igen Agarosegelen aufgetrennt werden. Die Agarose wird in 1xTAE durch kurzes Aufkochen gelöst und mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) versetzt. Nach dem Erhärten in einer entsprechenden Form wird das Gel in einer Elektrophoresekammer mit 1xTAE mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) überschichtet. Die DNA wird mit 1/10 Vol. DNA-Farbpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgt bei 50-200 V parallel zu DNA-Markern bekannter Größe. Unter UV-Bestrahlung kann die DNA sichtbar gemacht und photographiert werden.

Für Minigele, die man für Restriktionsanalysen und zur DNA-Konzentrationsabschätzung benutzt, wurden jeweils 16 ml flüssige Agarose auf

6 x 8 cm große Glasplatten gegossen. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte bei 100-150 V in 1xTAE als Laufpuffer.

Für präparative Gele, aus denen individuelle DNA-Fragmente aus komplexen Fragment-Gemischen (z.B. nach Restriktionsspaltungen) isoliert werden können, gießt man die Agarose (0.8-2.5%) in spezielle Kammern der jeweils benötigten Größe. Die Auftrennung fand bei maximal 60 V statt.

3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gele nach Laemmli

	5% Sammel- gel	10% Trenn- gel
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (30%)	3.22 ml	16.0 ml
1.5 M Tris, pH 8.8	----	12.0 ml
1.5 M Tris, pH 6.8	5.0 ml	----
A. dest.	11.2 ml	19.0 ml
SDS (10%)	200 µl	480 µl
<i>direkt vor dem Gießen hinzuzufügen:</i>		
TEMED	100 µl	100 µl
APS (10%)	300 µl	500 µl

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgt durch vertikale SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli.

Ein Proteingel besteht aus einem 5%igen Sammelgel und einem 6-15%igen Trenngel mit unterschiedlichen pH-Werten. Zunächst wird das Trenngel zwischen zwei senkrecht stehende Glasplatten gegossen, bis der Zwischenraum etwa zu 3/4 gefüllt ist, und mit A.dest.-gesättigtem 2-Butanol überschichtet, damit die Oberfläche gleichmäßig polymerisiert. Nach der Polymerisierung gießt man das Butanol ab, füllt mit Sammelgel auf, setzt den Kamm zur Erzeugung von Geltaschen zum Laden der Proben ein und läßt auch die obere Gelschicht polymerisieren.

Der Laufpuffer enthält Glycin, das bei niedrigem pH-Wert protoniert oder zwitterionig, bei hohem pH-Wert anionisch vorliegt (isoelektrischer Punkt ca. pH 6.0).

Im Sammelgel mit seinem niedrigen pH wandern deshalb die Chlorid-Ionen (Leitonen) schneller als das Glycin (Folgeionen). Durch diese Ladungstrennung kommt es lokal zu erhöhter Spannung. Die Proteine werden beschleunigt und kommen so fast gleichzeitig, unabhängig von ihrer Größe, am engmaschigeren Trenngel an. Durch die pH-Änderung im Trenngel wird das Glycin zum Anion und kann somit genauso schnell wie das Chlorid-Ion im elektrischen Feld wandern. Die Proteine werden nun nach ihrer Größe aufgetrennt.

Die Proteinproben wurden, bevor sie auf das Gel geladen wurden, mit gleichen Volumina 2xLaemmli-Puffer versetzt und 5 min. bei einer Temperatur von 95°C denaturiert. Das SDS (Sodiumdodecylsulfat) bewirkt eine Auftrennung der Proteine ausschließlich nach der Molekülgröße. Durch Beladung mit dem anionischen Detergenz SDS werden die Eigenladungen von Proteinen so effektiv überdeckt, daß anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen (mit ca. 1.4 g SDS pro g Protein). Zudem werden die unterschiedlichen Molekülformen ausgeglichen, indem die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst werden. Schwefelbrücken bleiben durch SDS unbeeinflusst. Der Lauf erfolgt, solange sich die Probe noch im Sammelgel befindet, bei 8 V/cm, danach bei 15 V/cm. Als Laufpuffer dient Elektrophorese-Puffer mit 0.1% SDS.

10xElektrophoresepuffer	
Tris-Base	0.25 M
Glycin	1.92 M
SDS	1.0%

2xLaemmli-Puffer	
SDS (10%)	400 µl
Glycerol (87%)	200 µl
β-Mecaptoethanol	100 µl
Tris/HCl, pH 6.8 (1 M)	125 µl
Bromphenolblau (0.1%)	20 µl

3.6 Western-Blot

Proteine, die über ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt wurden, werden auf eine Nitrozellulose-Membran überführt (geblottet) und somit immobilisiert. An die Nitrozellulose gebunden, können die Proteine mit anderen Reagenzien reagieren, z.B. können spezifische Antikörper binden. Gibt man anschließend einen enzymgekoppelten Antikörper gegen den spezifischen Antikörper zu, kann durch Umsetzung eines Substrats (meist eines Farbsubstrats) durch das Enzym die genaue Lage des entsprechenden Proteins bestimmt werden.

20x TBS (pro 1 ltr.)	
Tris	48.4 g
NaCl	160.0 g
20x Tween	
Tween	10 g/l
TBS-Tween	
1x TBS	+ 0.5 % Tween
Transfer-Puffer	
Tris	0.48 M
Glycin	0.38 M
Methanol	20 %
Block-Lösung	
5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-Tween	

Die zu untersuchenden Proteine werden in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Das Gel wird über Nacht bei 400 mA auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Die Membran wird getrocknet und die unpezifische Proteinbindung durch einstündige Behandlung der Membran mit 5% Milchpulver (Block-Lösung) in TBS-Tween geblockt. Ebenfalls 1 h läßt man den ersten, spezifischen Antikörper, entsprechend in Milchlösung verdünnt, unter ständigem Schwenken bei RT einwirken. Nach viermal 5 min. Waschen der Membran in TBS-Tween wird mit dem zweiten, gegen den ersten gerichteten, Antikörper inkubiert. Nach ein-

stündiger Inkubation und erneutem Waschen (3x5 min., 2x10 min.) mit TBS-Tween wird mit dem ECL-System gefärbt. Dazu wird die Membran leicht ange-trocknet und zwischen Folien gelegt. Man läßt eine 1:1-Mischung der beiden ECL-Komponenten 1 min. lang auf die Membran einwirken, dann wird ein Röntgenfilm aufgelegt.

3.7 Klonierungstechniken

3.7.1 Restriktionsspaltung

0.3 bis 10 µg DNA - die Menge ist davon abhängig, ob die Spaltung zu analyti-schen oder zu präparativen Zwecken durchgeführt wird - werden mit der geeig-neten Menge einer oder mehrerer Restriktionsendonukleasen versetzt. Mit 10xRestriktionspuffer, dessen Salzkonzentration je nach Enzym gewählt wer-den muß, und A.dest. wird das Volumen so eingestellt, daß die Enzymmenge nicht mehr als 1/10 des Endvolumens ausmacht. Der Enzympuffer enthält näm-lich Glycerol, das in zu hoher Konzentration die Reaktion stören könnte.

	10xRestriktionspuffer			
	niedrig-Salz	mittel-Salz	hoch-Salz	extrem-Salz
Tris, pH 7.5, [mM]	100	100	100	100
NaCl ₂ , [mM]	---	500	1.000	1.500
MgCl ₂ , [mM]	100	100	100	100
DTT, [mM]	10	10	10	10
BSA, [mg/ml]	1	1	1	1

Nach einer Inkubation von 1-2 h (zu präparativen Zwecken, wenn eine mög-lichst vollständige Spaltung gewünscht wird, auch länger) bei einer Temperatur, die abhängig vom verwendeten Enzym zu wählen ist, wird der Reaktionsansatz zur Analyse auf einem Agarosegel aufgetrennt.

Typischer Reaktionsansatz
0.3-10 mg DNA (in TE)
1/10 Vol. 10xRestriktionspuffer
1/10 Vol. Enzym
add. A.dest. auf 20 ml Endvolumen

3.7.2 Ligation

10xLigationspuffer A		10xLigationspuffer B	
Tris/Hcl, pH 7.8	0.5 M	DTT	0.2 M
MgCl ₂	0.1 M	ATP	10 mM
BSA	0.5 mg/ml		

Zur DNA gibt man je 1.5 µl Ligationspuffer A und B und 40 Einheiten T4 DNA-Ligase. Das Volumen wird mit A.dest. auf 15 µl eingestellt. Von der Vektor-DNA setzt man ca. 20-100 ng ein, das Insert sollte im 10 bis 20fachen molaren Überschuß vorliegen. Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei 14°C ("sticky-end"-Ligation, d.h. 3'- oder 5'-überhängende Enden) oder mindestens 4 h bei RT ("blunt-end"-Ligation, ohne überhängende Enden) inkubiert.

Typischer Reaktionsansatz
2-15 µg Vektor-DNA
Insert-DNA entsprechend dem molaren Verhältnis
1 µl 10xLigationspuffer A
1 µl 10xLigationspuffer B
1 µl T4-DNA-Ligase (=40-400 U)
mit A.dest. auf auf 10 µl Endvolumen auffüllen

3.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden in dieser Arbeit mit Hilfe der "Jet-Sorb"-Reagenzien

(Genomed) aus präparativen Agarose-Gelen isoliert, nachdem vorher die gewünschte Bande unter UV-Licht, möglichst nur bei Benutzung einer UV-Handlampe, aus dem Gel ausgeschnitten worden war.

100 mg eines Gelstückes werden mit 300 µl des Puffers A1 und 10 µl der DNA-Adsorptions-Kügelchen versetzt und bei 50°C 15 min. geschmolzen. Die Kügelchen werden mit 300 µl Puffer A1 und dann zweimal mit je 300 µl des Puffer 2 gewaschen und anschließend getrocknet. Werden die Kügelchen mit 20 µl TE erneut 5 min. auf 50°C erhitzt, löst sich die DNA wieder und kann nach Zentrifugation mit dem Überstand abgenommen werden.

Jet-Sorb-Lösungen			
A1		A2	
NaClO ₄	7 M	NaCl	100 mM
Sorbit	66 mM	EDTA	1 mM
NaOAc, pH 5.1	30 mM	Tris, pH 7.5	10 mM

3.9 Immunpräzipitation

Zunächst wird die Proteinkonzentration jeder Probe nach Bradford bestimmt. 100 µg Protein je Probe werden mit KLBM auf 500 µl Volumen aufgefüllt. Zu jeder Probe werden nun 100 µl des 1:100 mit KLBM verdünnten Antikörpers pipettiert. Anschließend werden die Proben 1 h auf Eis inkubiert.

Währenddessen werden 50 µl Protein A-Sepharose pro Probe in ein Mikroreaktionsgefäß gefüllt und dreimal mit KLBM gewaschen, schließlich mit KLBM wieder auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt.

Mit einer zur Erweiterung der Öffnung abgeschnittenen gelben Pipettenspitze werden 50 µl Sepharose zu jeder Probe pipettiert. Die Proben werden im Kühlraum 2-3 h auf dem Rotator inkubiert.

Anschließend werden die Sepharose-Kügelchen je dreimal mit KLBM, LiCl-Waschpuffer und zuletzt JNKA-Puffer gewaschen. Verbleibende Flüssigkeit wird mit Hilfe einer Spritze mit sehr feiner Kanüle möglichst vollständig entfernt. Die Proben können nun bei -70°C gelagert werden.

LiCl-Waschpuffer	
Tris, pH 7.8	1 M
LiCl	5 mM
Triton X-100	0.1%

JNKA-Puffer	
Hepes, pH 7.6	20 mM
EGTA	2 mM
MgCl ₂	10 mM
Triton X-100	0.1%
<i>unmittelbar vor Gebrauch hinzuzufügen:</i>	
α -Glycero-Phosphat	20 mM
NaF	5 mM
Na-ortho-Vanadat	0.5 mM
DTT	1 mM
PMSF	5 μ l/ml

3.10 Kinase-Assay

Kinase-Assay-Puffer	
MgCl ₂	50 mM
ATP	0.25 mM

Zu den trockenen Sepharose-Kügelchen mit den Immunpräzipitaten werden je 30 μ l JNKA-Puffer und 5 μ l des Substrats für die Kinase hinzupipettiert (für Erk2 0.5 μ g/ μ l MBP und für JNK1/2 0.5 μ g/ μ l GST-Jun).

Zum Kinase-Assay-Puffer (7.5 μ l pro Probe) wird 1 μ Ci γ ³²-ATP hinzugegeben. Nach gründlichem Mischen werden zu jeder Probe 7.5 μ l des ATP-Mix pipettiert. Dann werden die Proben 30 min. bei 30°C unter ständigem Schütteln inkubiert.

Die Kinasierungsreaktion wird durch Hinzufügen von jeweils 16µl 4xLaemmli-Puffer und fünfminütiges Erhitzen auf 100°C angehalten.

Nach dem Abkühlen können die Proben auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamid-Gel zur Fraktionierung geladen werden.

3.11 Luciferase-Assay

Um die Promotorfunktion von DNA-Sequenzen zu testen, kloniert man sie vor ein Reporter-gen und transfiziert dieses Konstrukt in Zellen. Das Reporter-gen kodiert normalerweise für ein Protein, das in diesen Zellen nicht vorkommt, oft für ein bakterielles Protein. Durch Quantifizierung des Genprodukts können Aussagen über die Aktivität des DNA-Fragments als Promotor in diesen Zellen gemacht werden. Auch Hemmung oder Förderung der Transaktivierungsfähigkeit des untersuchten DNA-Abschnitts durch andere Faktoren können so festgestellt werden.

Als Reporter wird im angewandten System das Luciferase-Gen verwendet. Der Luciferase-Assay ist extrem sensitiv und in relativ kurzer Zeit durchzuführen. Luciferase katalysiert die Oxidation von Luciferin, wodurch Photonen produziert werden. Das so produzierte Licht erlischt schnell, nachdem Enzym und Substrat zusammengetroffen sind, was automatische Injektionsluminometer für die Messung der Photonenproduktion erforderlich macht. Um eine optimale Luciferaseaktivität zu erzielen, müssen grundsätzlich alle verwendeten Lösungen und auch die zu untersuchenden Proben auf RT erwärmt werden. Die Luciferaseaktivität ist bis zu einigen Stunden bei RT stabil, nachdem die Zellen in 1xLysis-Puffer aufgenommen wurden. Die in Lysis-Puffer aufgenommenen Proben können auch bis zu 12 h bei 4°C aufbewahrt werden, jedoch sinkt die enzymatische Aktivität dieser gekühlten Proben um 5-10%.

Lysis- und Assay-Puffer sollten vor jedem Experiment unter Verwendung der Stocklösungen frisch angesetzt werden.

Für den Luciferase-Assay werden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen, in 100 µl Lysis-Puffer aufgenommen und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 2-5 min. werden die Zelltrümmer 4 min.

bei 12.000 UpM abzentrifugiert und je 50 µl des Überstandes in die Vertiefungen der Luminometerplatte, in die vorher je 50 µl Assay-Puffer gegeben wurden, pipettiert. Unter Verwendung des Luminometers, an welches die Luciferinlösung angeschlossen wurde, kann nun die Luciferaseaktivität gemessen werden. Die produzierten Lichteinheiten werden über einen Zeitraum von 5 Sekunden pro Probe gemessen. Nach anschließender Messung der Proteinkonzentration kann die Lichtintensität per mg Protein berechnet und die Luciferaseaktivität der Proben untereinander verglichen werden (relative Luciferaseaktivität). Vergleicht man die Luciferaseaktivität von stimulierten und nichtstimulierten Proben untereinander, so erhält man die Induktionsrate (x-fache Stimulierung).

	Stammlösung		1xLösung	
Lysis-Puffer	Tris, pH 7.8	1 M	Tris, pH 7.8	50 mM
	MES	1 M	MES	50 mM
	DTT	1 M	DTT	1 mM
	Triton X-100	20 %	Triton X-100	0.1 %
Assay-Puffer	Tris, pH 7.8	1 M	MES	125 mM
	MES	1 M	Tris, pH 7.8	125 mM
	Mg ₂ OAc	1 M	Mg ₂ OAc	25 mM
	ATP-Pulver		ATP (2.5 mg/ml)	5 mM
Luciferin			Luciferin in 5 mM KHPO ₄ , pH 7.8	1 mM

4. Ergebnisse

4.1 Die TAD-A von NF-ATc wird nach TPA-Stimulation in vivo phosphoryliert

Sowohl NF-AT als auch die AP-1-Faktoren c-Jun und c-Fos binden an die distale NF-AT-Bindungsstelle des IL-2-Promotors. Da AP1-Faktoren ein bekanntes Ziel für MAP-Kinasen sind, lag es nahe anzunehmen, daß die Aktivierung des NF-AT/AP1-Komplexes durch MAP-Kinasen-Signalwege über die AP1-Komponente erfolgt. Bisherige Arbeiten hatten meist DNA-Konstrukte untersucht, die unter der Kontrolle einer zusammengesetzten NF-AT/AP-1-Bindungsstelle stehen. Unser Ziel war es, herauszufinden, ob auch die N-terminale Transaktivierende Domäne A (TAD-A) von NF-ATc durch MAP-Kinasen aktiviert wird.

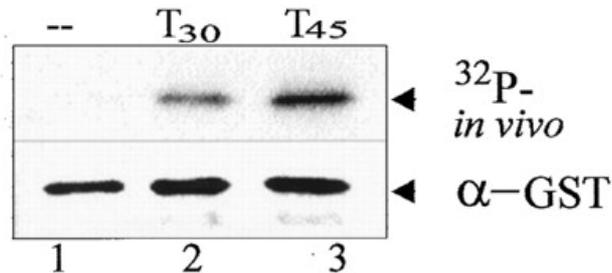


Abb. 4: TPA induziert die TAD-A-Phosphorylierung in vivo.

Ein eukaryotischer Expressionsvektor, der für das GST-gekoppelte TAD-A-Wildtypprotein kodiert, wurde in humane 293-Zellen transfiziert. Die Zellen, die sich in ³²P-enthaltendem DMEM-Medium befanden, wurden entweder unstimuliert gelassen oder 30 oder 45 min. mit TPA (20 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurden die Proteine extrahiert und das GST-Protein wurde isoliert durch Inkubation des Extrakts mit Glutathion-Sepharose-Kügelchen. Es folgten Elektrophorese, der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und die Detektion durch Autoradiographie (oberer Teil, 2 Stunden Filmexposition). Als Ladungskontrolle wurden auf derselben Membran GST-Proteine immundetektiert durch Inkubation mit einem GST-spezifischen Antikörper (unterer Teil, 2 min. Belichtung).

Um zunächst zu prüfen, ob TAD-A in vivo ein Ziel induzierbarer Phosphorylierung ist, wurde ein eukaryotischer GST/TAD-A-Protein-Expressionsvektor mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Präzipitationstechnik nach Standardprotokoll (s. Abschnitt 3.2.3.1, S. 35) in 293-Zellen transfiziert. Diese Zellen zeichnen sich durch ihre besonders hohe Transfektionseffizienz aus. Die Zellen, die sich in ^{32}P -haltigem DMEM-Medium befanden, wurden 30 oder 45 min. mit TPA stimuliert, anschließend wurden die Zellen geerntet, gewaschen und mit KLBM-Puffer lysiert. Das GST-Protein wurde durch Inkubation des Ganzzellextrakts mit Glutathion-Sepharose isoliert, gefolgt von ausführlichen Waschungen der Sepharose-Kügelchen. Mit dem erhaltenen GST-Protein wurden anschließend eine Elektrophorese, das Blotting auf eine Nitrozellulosemembran und abschließend eine Autoradiographie durchgeführt. Als Kontrolle wurde mit derselben Membran ein Westernblot mit GST-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Die TPA-Stimulation resultierte in einer raschen TAD-A-Phosphorylierung in vivo (Abb. 4, S. 50).

4.2 Die TAD-A von NF-ATc wird in vitro durch Erk2 phosphoryliert

Da TPA ein bekannter Induktor der MAP-Kinasen-Aktivität, insbesondere von Erk-Kinasen, ist, war nun herauszufinden, ob die Phosphorylierung von TAD-A durch MAP-Kinasen vermittelt wird. Wir prüften, ob die Erk-Kinasen Erk1, 2 und 3 und die JNK-Kinasen (JNK 1 und 2) in der Lage sind, TAD-A in vitro zu phosphorylieren.

Zu diesem Zweck stimulierten wir Jurkat-T-Zellen für 30 min. mit TPA, zur Stimulation der JNK-Kinasen-Aktivität wurden die Zellen zusätzlich mit 1 J/cm^2 UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen geerntet, gewaschen und mit KLBM-Puffer lysiert.

Es folgte die Immunpräzipitation der zu untersuchenden Kinasen. Hierzu wurden die Ganzzellextrakte mit Antikörpern gegen Erk1, Erk2, Erk3 oder JNK1/2 inkubiert. Anschließend wurden die Extrakte mit Protein A-beschichteten Agarose-Kügelchen versetzt. Es folgte die Isolierung der präzipitierten Kinasen.

Mit diesen wurde dann ein Proteinkinase-Assay (s. Abschnitt 3.10, S. 47)

durchgeführt. Als Substrate dienten in *E. coli* synthetisierte GST-Proteine von TAD-A und - als Kontrolle der JNK-Aktivität - c-Jun₅₋₈₉; als Kontrolle der Erk-Aktivität wurde MBP verwendet.

TAD-A stellte sich als exzellentes *in vitro*-Substrat für Erk2, nicht jedoch für die JNK1/2-Kinasen (Abb. 5), heraus.

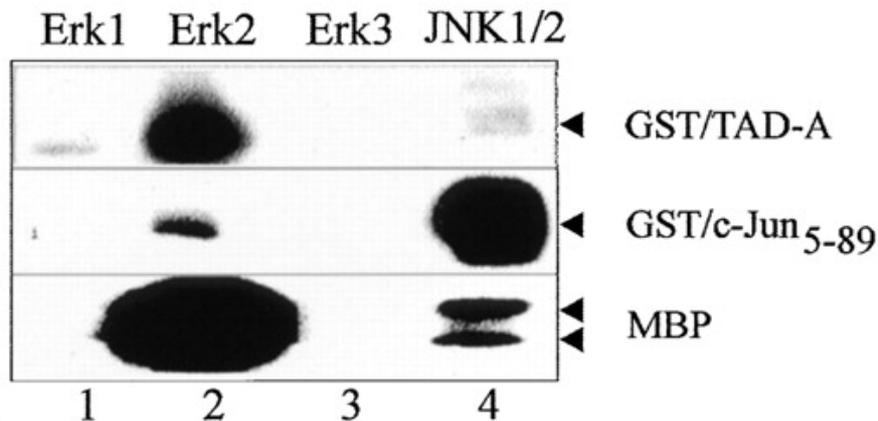


Abb. 5: Erk2 phosphoryliert TAD-A *in vitro*.

Jurkat-T-Zellen wurden für 30 min. mit TPA (20 ng/ml) behandelt und außerdem zur Stimulierung der JNK-Kinasen-Aktivität mit 1 J/cm² UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und lysiert. Nun wurden Erk- und JNK-Kinasen immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden verwendet für *in vitro*-Proteinkinase-Assays mit in *E. coli* hergestellten GST-TAD-A- und GST-c-Jun₅₋₈₉-Proteinen oder MBP als Substraten.

4.3 Transfizierte MAP-Kinasen stimulieren die transkriptionelle TAD-A-Aktivität

Um zu prüfen, ob MAP-Kinasen *in vivo* zu einer Steigerung der transkriptionellen Aktivität von TAD-A führen, wurde TAD-A, die die Aminosäurereste 113 bis 205 von NF-ATc umspannt, mit der Gal4-bindenden Domäne fusioniert und in transienten Transfektionen in Jurkat-T-Zellen untersucht. Dies erfolgte in Kotransfektionen mit DNA-Konstrukten, die zur Überexpression von Erk2, Raf-BXB-CAAX, einer konstitutiv aktiven Mutante von c-Raf, und RacV12, einer konstitutiv aktiven Mutante von Rac, führen (Abb. 7, S. 54). Sechs Stunden

nach der Transfektion wurden die Zellen entweder uninduziert gelassen oder für 20 Stunden mit TPA (20 ng/ml), in Ab- oder Anwesenheit des spezifischen MEK-Inhibitors PD098059 (30 μ M), der 45 min. vor Beginn der TPA-Stimulation zugegeben wurde, induziert. Die Messung der transkriptionellen Aktivität erfolgte in anschließenden Luciferase-Assays mit Hilfe eines ebenfalls kotransfizierten 5xGRE-E1b-Luciferase-Gens unter Kontrolle des Gal4-Response-Elements.

Kotransfektion von Erk2, Raf-BXB-CAAX oder RacV12 steigerte die relative transkriptionelle Aktivität von TAD-A in unstimulierten und mit TPA stimulierten Zellen um das zwei- bis fünffache. Diese Effekte ließen sich aufheben durch Zugabe des MEK-Inhibitors PD098059. Ein Anstieg der basalen Gal4-Aktivität durch Kotransfektion von Erk2, Raf-BXB-CAAX oder RacV12 war hingegen ebensowenig zu beobachten wie eine Verminderung der basalen Gal4-Aktivität durch PD098059. Die Steigerung der transkriptionellen Aktivität wird also durch TAD-A vermittelt. Diese Ergebnisse legen nahe, daß MAP-Kinasen, die eine wichtige Rolle in der T-Zellaktivierung spielen, die NF-ATc-vermittelte Transkription zumindest teilweise über die Aktivierung der TAD-A stimulieren.

```

113 117 119                                     151
PALESPRIEITSCGLYHNNNQFFHDVEEDVLPSSKRSPSTATLSL...
          167   172           180                               199   203 205
...PSLEAYRDPSCLSPASSLSSRSCNSEASSYESNYSYPYASPQTSPW

```

Abb. 6: Aminosäuresequenz der Transaktivierenden Domäne A (TAD-A) von NF-ATc

Die TAD-A von NF-ATc enthält fünf Serin-Prolin-Motive (schwarz unterlegte Buchstaben) und damit fünf mögliche Stellen, an denen eine Phosphorylierung durch MAP-Kinasen theoretisch möglich wäre.

In unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Phospho-Aminosäure-Analysen zeigten eine Phosphorylierung von Serin-, nicht jedoch von Threonin- und Tyrosinresten innerhalb von TAD-A, und In-Gel-Kinase-Assays zeigten unter Verwendung von GST/TAD-A als Substrat eine induzierbare Proteinkinase-Aktivität bei 42 – 44 kDa, was der Größe von Erk1 oder Erk2 entspräche (A. Avots, nicht gezeigt).

TAD-A besitzt fünf SP-Motive an den Aminosäurepositionen 117, 151, 172, 199 und 203 (s. Abb. 6, S. 53) und damit fünf mögliche Angriffspunkte für die Phosphorylierung durch MAP-Kinasen.

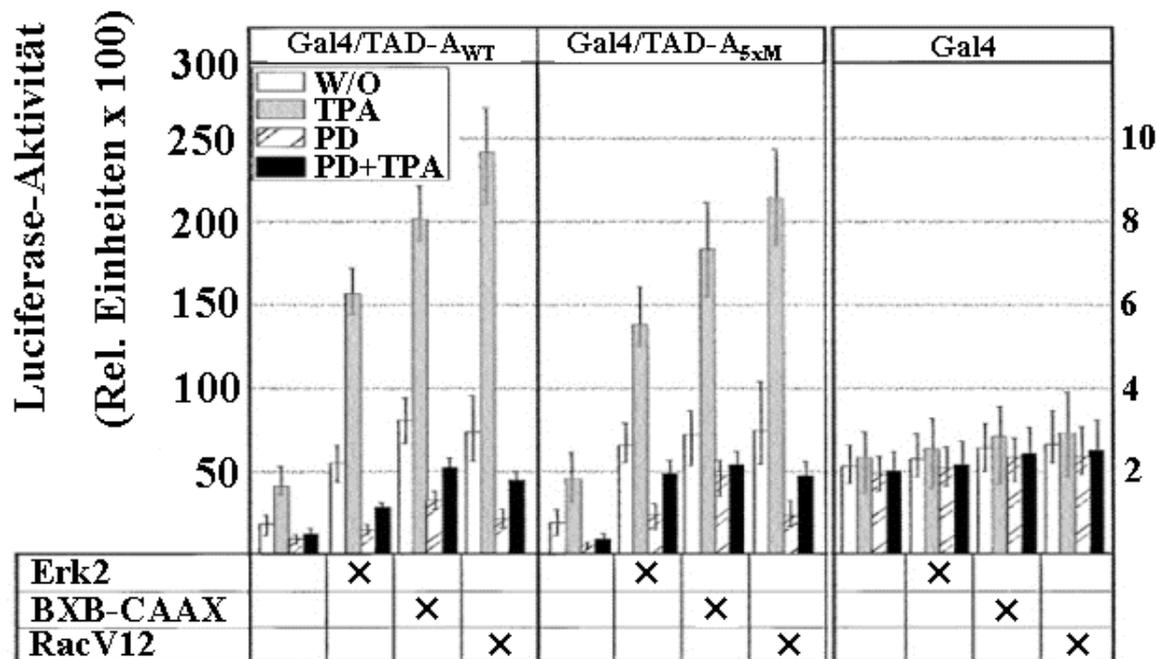


Abb. 7: Die Aktivierung von MAP-Kinasen-Signalwegen stimuliert die transkriptionelle Aktivität von TAD-A_{WT} und TAD-A_{5xM}, nicht jedoch die basale Gal4-Aktivität.

DNA-Konstrukte, die zur Expression chimärer Gal4/TAD-A_{WT}-, Gal4/TAD-A_{5xM}- oder Gal4₁₋₁₄₇-Proteine führen, wurden zusammen mit einem 5xGRE-E1b-Luciferasegen kotransfiziert in Jurkat-T-Zellen. Zusätzlich wurden – wie angezeigt - Konstrukte kotransfiziert, die zur Expression von Erk2, Raf-BXB-CAAX oder RacV12 führen. Sechs Stunden nach Transfektion wurden die Zellen entweder uninduziert gelassen oder für 20 Stunden mit TPA (20 ng/ml) induziert. Dies geschah in An- oder Abwesenheit des MEK-Inhibitors PD098059, der 45 min. vor der Stimulation mit TPA zugesetzt wurde.

Um herauszufinden, ob deren Phosphorylierung eine funktionelle Bedeutung in der Aktivierung von TAD-A besitzt, wurden Jurkat-Zellen mit einer Gal4/TAD-A-Mutante, die anstelle der fünf theoretisch durch MAP-Kinasen phosphorylierbaren Serinreste Alaninreste enthält (TAD-A_{5xM}), transfiziert. Es wurde wiederum

mit Vektoren, die zur Überexpression von Erk2, Raf-BXB-CAAX und RacV12 führen, kotransfiziert. Auch die TAD-A-Mutante wurde im Luciferase-System getestet (Abb. 7, S. 54). Überraschenderweise kam es bei Kotransfektion von Erk2, Raf-BXB-CAAX oder RacV12 in unstimulierten und stimulierten Zellen zu einer drei- bis vierfachen Steigerung der relativen transkriptionellen Aktivität. Der Effekt ließ sich aufheben durch den MEK-Inhibitor PD098059.

In der transkriptionellen Aktivierung von TAD-A durch MAP-Kinasen scheint also die Phosphorylierung von TAD-A keine essentielle Rolle zu spielen. Es erhob sich somit die Frage nach einem Kofaktor, über den die Wirkung der MAP-Kinasen auf TAD-A vermittelt wird.

4.4 CBP/p300 verstärkt die IL-2-Promotor- und Pu-b_d-Induktion

Mögliche Kandidaten für die Vermittlung der Wirkung von MAP-Kinasen auf TAD-A waren die nukleären Adapterproteine CBP und p300. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß die beiden eng verwandten Moleküle an der Aktivierung einer Reihe von Transkriptionsfaktoren beteiligt sind (s. Abschnitt 1.6, S. 19).

Zunächst wurden in Jurkat-T-Zellen Kotransfektionen eines Luciferase-Reporter-gen-Konstrukts, das entweder durch den humanen IL-2-Promotor oder durch vier Kopien der distalen NF-AT-Bindungsstelle gesteuert wurde, zusammen mit E1A, p300 oder CBP durchgeführt. E1A ist ein Inhibitor der Induktion des IL-2-Promotors in T-Zellen. Bei Kotransfektion eines DNA-Konstrukts, das für die E1A-12S-RNA kodiert, mit einem IL-2-Promotor-gesteuerten Reporter-gen in Jurkat-Zellen wurden die Aktivität und Induktion des IL-2-Promotors auf etwa 20 Prozent des Ausgangswertes gesenkt (Abb. 8, links, S. 56). Der gleiche inhibitorische Effekt war für die Induktion der distalen NF-AT-Bindungsstelle des IL-2-Promotors zu beobachten (Abb. 8, rechts). Im Gegensatz dazu waren bei Kotransfektion mit CBP- oder p300-Konstrukten anstelle von E1A eine drei- bis vierfache Verstärkung der Induktion des IL-2-Promotors und der NF-AT-Bindungsstelle zu beobachten (Abb. 8).

Da E1A hemmend an beide genannten Koaktivatoren bindet, kann geschlossen

werden, daß der hemmende Effekt von E1A auf den IL-2-Promotor und die NF-AT-Bindungsstelle zurückzuführen ist auf die Inhibition endogener CBP/p300-Aktivität, die folglich eine wichtige Rolle bei der NF-AT-Aktivierung spielt.

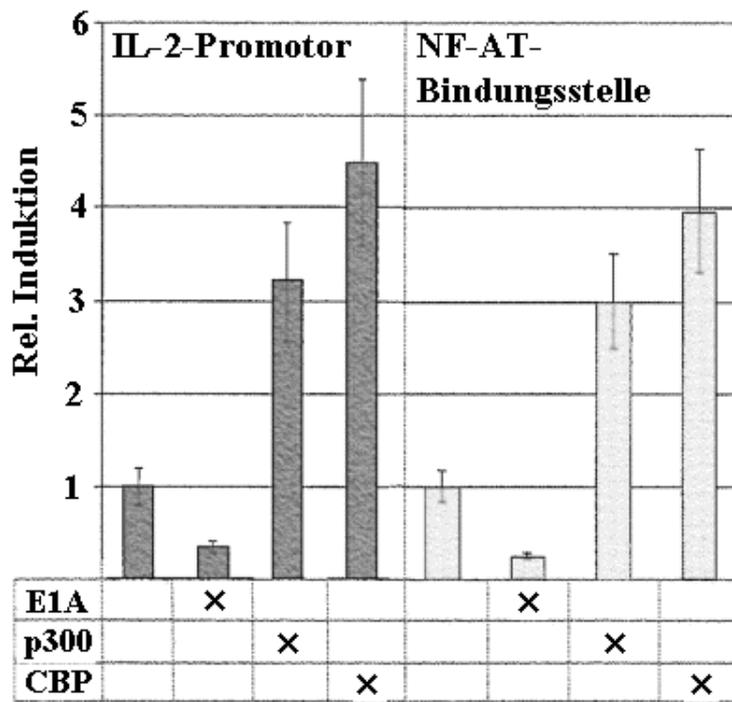


Abb. 8: CBP/p300 verstärkt in T-Zellen die Induktion des IL-2-Promotors und der distalen NF-AT-Bindungsstelle des IL-2-Promotors.

Luciferase-Reportergen-Konstrukte, gesteuert entweder durch den humanen IL-2-Promotor (von +5 bis -499) oder durch vier Kopien der distalen NF-AT-Bindungsstelle in diesem Promotor, wurden in Jurkat-T-Zellen zusammen mit Vektoren kotransfiziert, die zur Expression von E1A, p300 oder CBP führen. Nach sechs Stunden wurden die Zellen für 24 Stunden induziert mit TPA (20 ng/ml) und Ionomycin (30 µM).

4.5 CBP/p300 interagiert in vivo physisch mit NF-ATc

Um festzustellen, ob p300 und CBP in der Lage sind, physisch mit NF-AT in vivo zu interagieren, wurden carboxyterminal HA-gekoppelte p300- oder CBP-Proteine voller Länge in humanen 293-Zellen exprimiert, und zwar alleine oder zusammen mit einem NF-ATc-Konstrukt. Nach der zweistündigen Stimulation

der Zellen mit TPA und Ionomycin (T + I) wurden Ganzzell-Proteinextrakte präpariert, mit denen Immunpräzipitationen mit α -HA-Antikörpern durchgeführt wurden. Auf diese Weise wurden die HA-Proteine zusammen mit ihren Bindungspartnern isoliert. Nach Fraktionierung, Elektrophorese und Blotten dieser Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Immundetektion mit α -NF-ATc- und α -p300/CBP-Antikörpern. In Abb. 9 ist zu sehen, daß NF-ATc spezifisch koimmunpräzipitiert wurde mit koexprimiertem p300-HA oder CBP-HA. Dies ist der Beweis für eine physische Interaktion von NF-ATc und CBP/p300 in vivo.

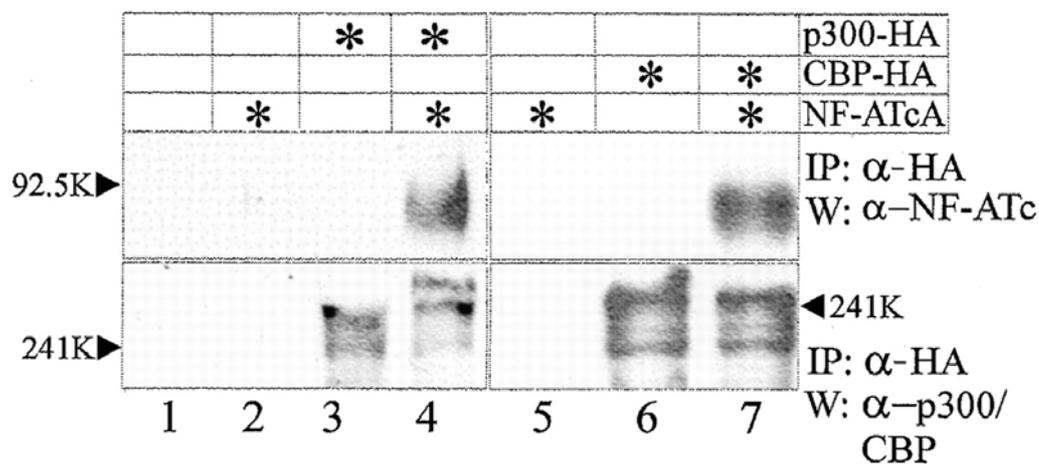


Abb. 9: In vivo-Interaktion zwischen CBP/p300 und NF-ATc

293-Zellen wurden transfiziert mit Expressionsvektoren für NF-ATc, p300-HA oder CBP-HA, alleine oder in den angezeigten Kombinationen. Nach 48 Stunden wurden die Zellen 30 min. mit TPA (20 ng/ml) und Ionomycin (30 μ M) stimuliert, anschließend wurden die p300-HA- und CBP-HA-Proteine mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen das HA-Epitop aus Ganzzell-Proteinextrakten präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden fraktioniert, geblottet und immundetektiert mit anti-NF-ATc- (o. Teil), anti-p300- (u. Teil, Bahnen 1-4) oder anti-CBP-Antikörpern (u. Teil, Bahnen 5-7).

In verschiedenen weiterführenden Experimenten konnte durch unsere Arbeitsgruppe (A.Avots) gezeigt werden, daß multiple physische Interaktionen zwischen verschiedenen Teilen von NF-ATc und p300 stattfinden.

4.6 CBP/p300 aktiviert die TAD-A von NF-ATc in vivo

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Wirkung von CBP/p300 auf NF-ATc über die Transaktivierende Domäne A (TAD-A) von NF-ATc, die, wie in Abschnitt 4.3 (S. 52) gezeigt wurde, die Wirkung der MAP-Kinasen auf NF-ATc zumindest teilweise vermittelt, zustandekommt.

Hierzu wurden wiederum transiente Kotransfektionen durchgeführt, in denen der Gal4-TAD-A-Wildtyp-Vektor und das 5xGRE-E1b-Luciferasegen mit unterschiedlichen Mengen eines Vektors, der CBP oder p300 kodiert, kombiniert wurden. Als Kontrolle wurde wiederum anstelle des TAD-A-Vektors der leere Gal4-Vektor kotransfiziert. Die Messung des Grades der transkriptionellen Aktivierung erfolgte anschließend im Luciferase-Assay.

Es zeigte sich, daß ansteigende Mengen von koexprimiertem p300 oder CBP dosisabhängig die TAD-A-Aktivität verstärken (Abb. 10).

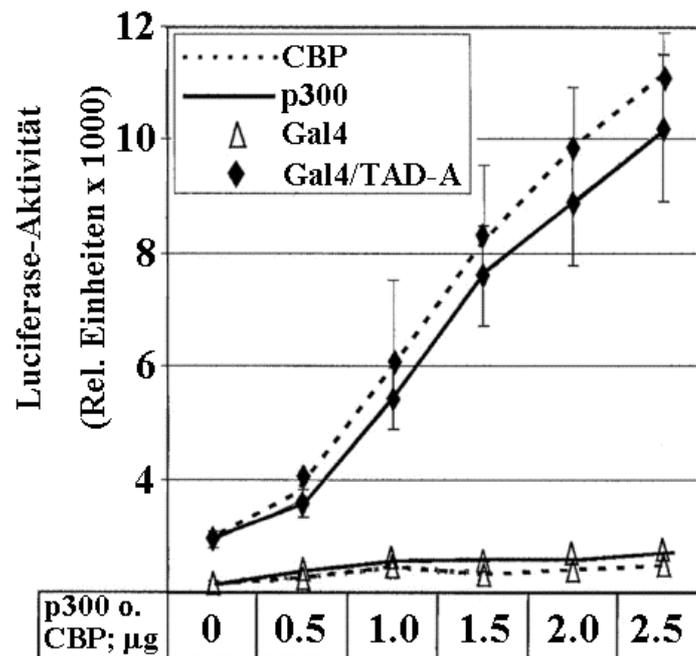


Abb. 10: p300 und CBP verstärken die TAD-A-Aktivität.

Ansteigende Mengen eines Expressionsvektors für CBP oder p300 wurden in Jurkat-T-Zellen mit konstanten Mengen eines 5xGRE-E1b-Luciferasegens und Expressionsvektoren für Gal4/TAD-A- oder Gal4-Protein kotransfiziert.

In einem weiteren Experiment wurde die Wirkung von E1A auf die TAD-A untersucht. Hierzu wurden anstelle von CBP oder p300 verschiedene Mengen von E1A mit Gal4-TAD-A und dem Luciferasegen kotransfiziert. Sechs Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen entweder unstimuliert gelassen oder für zwanzig Stunden mit TPA (20 ng/ml) stimuliert. Anschließend erfolgte der Luciferase-Assay.

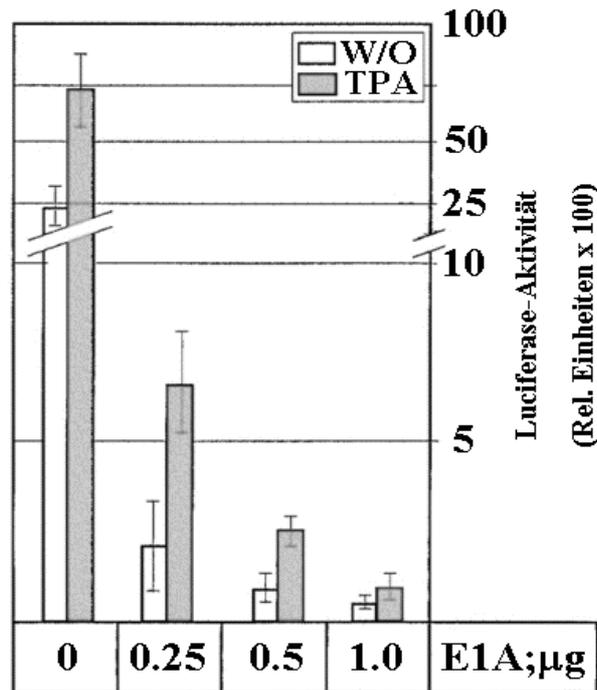


Abb. 11: E1A supprimiert die TAD-A-Aktivität.

Ansteigende Mengen eines Vektors, der zur Expression des adenoviralen E1A-Proteins führt, wurden in Jurkat-T-Zellen mit konstanten Mengen eines 5xGRE-E1b-Luciferasegens und einem Expressionsvektor für Gal4/TAD-A kotransfiziert. Sechs Stunden nach Transfektion wurden die Zellen entweder uninduziert gelassen oder 20 Stunden mit TPA (20 ng/ml) induziert.

Es zeigte sich, daß koexprimiertes E1A dosisabhängig in der Lage ist, jegliche basale und induzierbare TAD-A-Aktivität zu supprimieren (Abb. 11). Dieser Effekt kann durch p300-Überexpression aufgehoben werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Es läßt sich also folgern, daß CBP/p300 als Kofaktor die TAD-A-Aktivität kontrolliert.

4.7 Raf/Rac und CBP/p300 steigern die TAD-A-Induktion in synergistischer Weise

Schließlich sollten weitere Hinweise erarbeitet werden, zu klären, ob CBP/p300 der gesuchte Wirkungsvermittler in der Aktivierung von NF-ATc durch MAP-Kinasen-Signalwege ist. Dafür untersuchten wir, ob Raf- und Rac-Signale in der Stimulation von TAD-A mit CBP/p300 in synergistischer Weise zusammenwirken können.

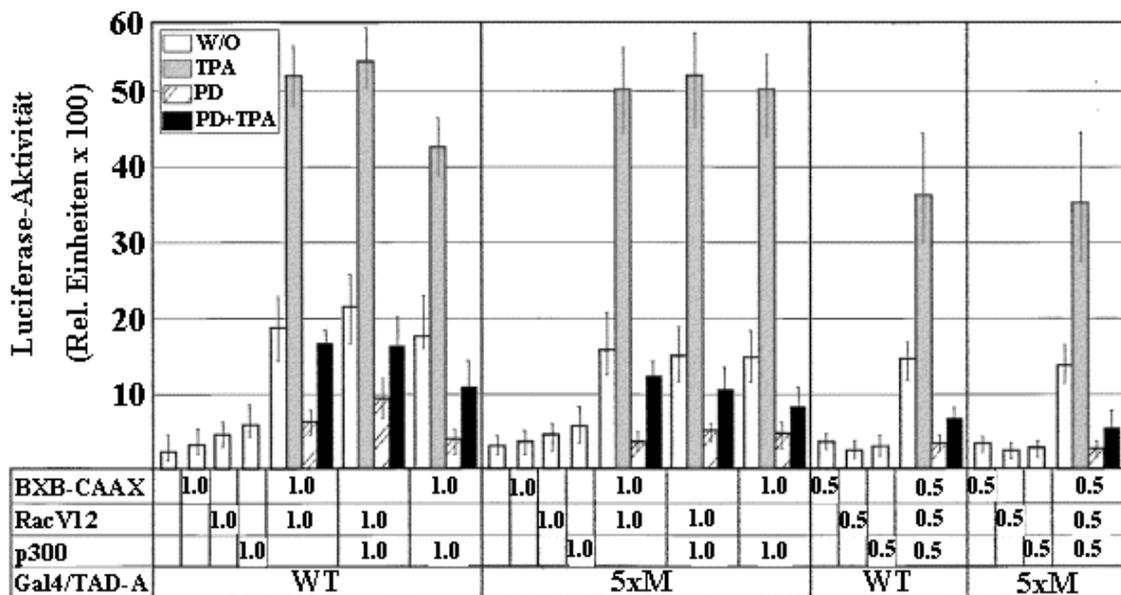


Abb. 12: p300 integriert Raf- und Rac-vermittelte Signale in der Induktion von TAD-A.

Expressionsvektoren für Gal4/TAD-A_{WT} oder Gal4/TAD-A_{5xM} wurden in Jurkat-T-Zellen zusammen mit einem 5xGRE-E1b-Luciferaserportergen kotransfiziert, allein oder in Kombination mit der angegebenen Menge (μ g) an Expressionsvektoren für Raf-BXB-CAAX, RacV12 oder p300.

In Jurkat-T-Zellen wurden der Gal4-TAD-A-Wildtypvektor, das 5xGRE-E1b-Luciferasegen und verschiedene Kombinationen von Vektoren, die Raf-BXB-CAAX, RacV12 und p300 kodieren, kotransfiziert. Die Zellen wurden entweder unstimuliert belassen oder sechs Stunden nach der Transfektion 20 Stunden

mit TPA (20 ng/ml) stimuliert. Ein Teil der unstimulierten und der stimulierten Zellen wurde zusätzlich mit dem MEK-Inhibitor PD098059, der fünfviertel Stunden nach der Transfektion zugesetzt wurde, behandelt.

Abb. 12 (S. 60) zeigt, daß Raf-BXB-CAAX und RacV12 TAD-A in Konzentrationen, in denen sie jeweils alleine zu keiner signifikanten Aktivierung von TAD-A führen, in Kombination zu einer synergistischen Aktivierung von TAD-A führen. Wie vermutet konnte dieser Effekt in T-Zellen durch CBP/p300 deutlich verstärkt werden.

Dieser Effekt ließ sich sowohl in TPA-stimulierten als auch in unstimulierten Zellen beobachten. Durch den MEK-Inhibitor PD098059 wurde die Aktivierung von TAD-A komplett gehemmt. Dies weist auf eine essentielle Bedeutung der Raf/Erk-Signalkaskade bei der CBP/p300-vermittelten Aktivierung von TAD-A hin. Zusätzlich dürfen diese Ergebnisse als weiterer starker Hinweis darauf gewertet werden, daß nicht TAD-A selbst, sondern CBP/p300 und/oder seine assoziierten Faktoren direkte Angriffsziele für Ras- und Rac-Signalkaskaden in T-Zellen sind.

5. Diskussion

5.1 Mögliche Bedeutung der TAD-A-Phosphorylierung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Transaktivierende Domäne A (TAD-A) von NF-ATc auf T-Zellstimulation hin über MAP/Erk-proteinkinaseartige Signalwege rasch phosphoryliert und aktiviert wird. Allerdings spielt die TPA-induzierte Phosphorylierung von TAD-A anscheinend nur eine geringe Rolle bei der induzierbaren transkriptionellen Aktivierung von NF-ATc. Außerdem scheint diese Phosphorylierung auch ohne Bedeutung für die Bindung an und Aktivierung durch den transkriptionellen Kofaktor CBP/p300 zu sein. In dieser Hinsicht verhält sich TAD-A sehr ähnlich wie die N-terminale TAD von c-Jun und CREB. Hatte man zunächst geglaubt, daß p300 und CBP nur mit CREB und c-Jun in Wechselwirkung treten, wenn diese phosphoryliert sind (CREB an Ser-133) (Chrivia et al., 1993; Arias et al., 1994; Parker et al., 1996), stellte sich später heraus, daß zumindest unter gewissen Umständen p300 und CBP mit c-Jun in vivo und in vitro (Bannister et al., 1995; Lee et al., 1996) und mit CREB in vivo (Bisotto et al., 1996) einen Komplex bilden können, auch wenn diese Faktoren nicht phosphoryliert sind. Deutlich anders verhält es sich hingegen mit Elk-1. Stimulationsabhängige Phosphorylierung scheint hier notwendig zu sein für die Interaktion zwischen p300 und der TAD von Elk-1 in Jurkat- und 293-Zellen. Weder im Säugetier-Zwei-Hybrid-Assay noch in Kotransfektionen beobachteten wir in unserer Arbeitsgruppe eine TAD_{Elk-1/p300}-vermittelte transkriptionelle Aktivierung in unstimulierten Zellen. TPA-Stimulation führte hingegen in beiden Zelltypen zu einer starken Induktion der TAD_{Elk-1}-Aktivität, die durch CBP/p300 noch deutlich verstärkt wurde (unpublizierte Ergebnisse der Arbeitsgruppe E. Serfling). Dieselbe Art der Stimulation führte nur zu einem geringen Anstieg der TAD-A- und der TAD_{c-Jun}-Aktivität, die allerdings beide durch CBP/p300 deutlich verstärkt wurden.

Die geringe Bedeutung der Serin-Phosphorylierung für die induzierbare TAD-A-Aktivität bedeutet nicht notwendigerweise, daß diese unwichtig für die Kontrolle

der NF-ATc-Aktivität ist. Für c-Jun wurde gezeigt, daß die induzierbare Phosphorylierung der N-terminalen TAD an den Serinresten 63 und 73 zum einen dessen ubiquitinsteuerten Abbau reduziert (Musti et al., 1997), zum anderen notwendig ist, um Fibroblasten gegen UV-induzierte Apoptose zu schützen. Für die Progression von Fibroblasten im Zellzyklus scheint diese Phosphorylierung hingegen entbehrlich zu sein (Wisdom et al., 1999). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß SPRIET, ein Heptapeptid aus der N-terminalen Region von NF-ATp, das in NF-ATc konserviert ist, notwendig ist für die effektive Erkennung und Dephosphorylierung von NF-ATp durch Calcineurin. In derselben Arbeit wurde nachgewiesen, daß das homologe Peptid aus NF-ATc, das den Serinrest 117 enthält, die Interaktion zwischen Calcineurin und einem N-terminalen Teil von NF-ATc unterdrückt (Aramburu et al., 1998). Obwohl Ser-117 in SPRIET für die Interaktion mit Calcineurin eine weniger wichtige Rolle zu spielen schien als andere Aminosäurereste, wird es von Interesse sein zu untersuchen, ob dessen Phosphorylierung die Bindung von Calcineurin an die TAD-A von nukleärem NF-ATc moduliert und die NF-AT-Aktivität in T-Zellen beeinflusst. Wenn wir auch keine Bedeutung einer Serin-Phosphorylierung für die Bindung von TAD-A an CBP/p300 feststellen konnten, so könnte dennoch die Interaktion dieser NF-AT-Domäne mit anderen Teilen des NF-AT-Moleküls und/oder anderen Faktoren die NF-AT-Aktivität beeinflussen. Da sowohl CBP/p300 als auch Calcineurin in Kontakt zu treten scheinen mit der N-terminalen TAD von NF-ATp (Garcia-Rodriguez and Rao, 1998) und NF-ATc, darf man annehmen, daß Calcineurin zusätzlich zu seiner Bedeutung in der nukleären Translokation und DNA-Bindung von NF-AT-Faktoren (Rao et al., 1997) auch deren Transaktivierung mitkontrolliert.

5.2 CBP/p300 als Integrator von MAPK-Signalen in der TAD-A-Aktivierung

Ein zentraler Befund dieser Arbeit ist die Integration von Raf/Erk- und Rac-Signalen durch CBP/p300 bei der Aktivierung von TAD-A. In ihren Untersuchungen zu den Induktionsbedingungen für die distale NF-AT/AP-1-

Bindungsstelle des IL-2-Promotors in Jurkat-Zellen kamen Genot et al. (1996) zu dem Schluß, daß die Aktivierung multipler MAP-Kinasen-Signalwege zur Aktivierung von NF-AT in T-Zellen führe. Während in dieser Arbeit nicht unterschieden werden konnte, ob NF-AT selbst oder AP-1 (c-Jun/c-Fos) oder beide Faktoren zusammen Ziele für die angesprochenen Signalkaskaden darstellen, zeigen unsere eigenen Ergebnisse (1.), daß NF-ATc selbst ein Ziel für MAP-Kinasen-Kaskaden darstellt, (2.), daß CBP/p300 ein transkriptioneller Kofaktor für NF-ATc ist, und (3.), daß CBP/p300 selbst oder assoziierte Proteine Ziel sind für MAP-Kinasen-Kaskaden und so die NF-AT-Aktivität kontrollieren. MAP-Kinasen-Kaskaden sind bekannt als essentieller Bestandteil des Signalsystems, das zu T-Zellaktivierung und Lymphokinsekretion führt (s. Abschnitt 1.4.4, S. 11).

MAP-Kinasen könnten zu CBP/p300 grundsätzlich über zwei verschiedene Mechanismen in Kontakt treten, die sich jedoch nicht gegenseitig ausschließen: Entweder wird CBP/p300 selbst phosphoryliert, oder es kommt zum Zusammenschluß größerer Molekülkomplexe, die weitere transkriptionelle Kofaktoren enthalten. Verschiedene Arbeiten vermuteten CBP/p300 als ein Ziel und direktes Substrat für Ser/Thr-spezifische Proteinkinasen, unter ihnen die MAP/Erk-Kinasen (Janknecht and Nordheim, 1996a; Janknecht and Nordheim, 1996b). Es konnte gezeigt werden, daß die C-terminale Phosphorylierung von CBP durch MAP-Kinasen dessen transaktivatorisches Potential verstärkt, auch wenn die Phosphorylierung an dieser Stelle entbehrlich zu sein scheint für die Interaktion mit den Ets-Faktoren Sap-1a und Elk-1 (Janknecht and Nordheim, 1996a). MAP-Kinasen scheinen also in der Lage zu sein, CBP/p300 unter Verstärkung dessen transkriptioneller Aktivität direkt zu phosphorylieren. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, daß die S6-Kinase pp90_{SRK}, eine der Ras/Raf/Erk-Kaskade nachgestellte Proteinkinase, an CBP bindet und notwendig ist für die Induktion Ras-abhängiger Gene (Nakajima et al., 1996). Zusammengefaßt stellt die Ras/Raf/Erk-Signalkaskade einen wichtigen Signalweg dar, durch den extrazelluläre Signale über den T-Zellrezeptor an CBP/p300 und den IL-2-Promotor weitergeleitet werden.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist unklar, wie Rac, alleine oder zusammen mit

Raf, die CBP/p300-vermittelte Transaktivierung von NF-ATc in T-Zellen stimuliert. Konnte für Rac1 eine Kooperation mit der Proteintyrosinkinase Syk in der Aktivierung von JNK-Streßkinasen-Kaskaden gezeigt werden (Jacinto et al., 1998), so wies die Überexpression von JNK/SAP- und p38-Kinasen sowohl allein als auch in Kombination mit CBP/p300 keinen deutlichen Einfluß auf die TAD-A-Aktivität auf (A.Avots, unpublizierte Ergebnisse). Direkte Phosphorylierung von NF-ATp (Martinez-Martinez et al., 1997) und NF-AT4 durch JNK, die mit einer Inhibition der nukleären Translokation von NF-AT4 korrelierte, wurde beschrieben (Chow et al., 1997). Die Fähigkeit von JNK/SAP-Kinasen, TCR/CD3-vermittelte und kostimulatorische Signale über CD28, die vor allem die NF- κ B/c-Rel-Aktivität (Bryan et al., 1994) und die Stabilität der IL-2-mRNA (Chen et al., 1998) steigern, zu integrieren (Su et al., 1994), unterstützen den Schluß, daß NF-AT-Bindungsstellen selbst keine Hauptziele für JNK/SAP-Kinasen bei der Steuerung der IL-2-Expression während der T-Zellaktivierung sind.

Für verschiedene Transkriptionsfaktoren wurde gezeigt, daß CBP/p300 als Plattform für die Interaktion weiterer Kofaktoren dient. Wenn es an intranukleäre Hormonrezeptoren bindet, rekrutiert CBP/p300 verschiedene Kernrezeptor-Kofaktoren, so z.B. NcoA-1, -2 und p/CIP, ebenso wie p/CAF, einem Homolog des Tetrahymena- und Hefeproteins GCN5, das intrinsische HAT-Aktivität aufweist (Brownell et al., 1996). Mehrere, aber nicht alle dieser Kofaktoren bilden auch einen Verbund mit CBP/p300, wenn dieses an CREB oder an STAT-Faktoren bindet (s. Torchia et al., 1998). Es ist sehr wahrscheinlich, daß auch die transkriptionelle Aktivität von NF-AT-Faktoren durch solche CBP/p300-Superkomplexe kontrolliert wird. So müssen wir gewärtig sein, daß über den T-Zellrezeptor geleitete Signale den Phosphorylierungsstatus solcher Kofaktorkomplexe modulieren und auf diese Weise die NF-AT-abhängige Transkription kontrollieren.

Abb. 13 (S. 66) stellt zusammenfassend die Erkenntnisse über die NF-ATc-Aktivierung in T-Zellen, die durch diese Arbeit gewonnen wurden, in einem Schaubild dar.

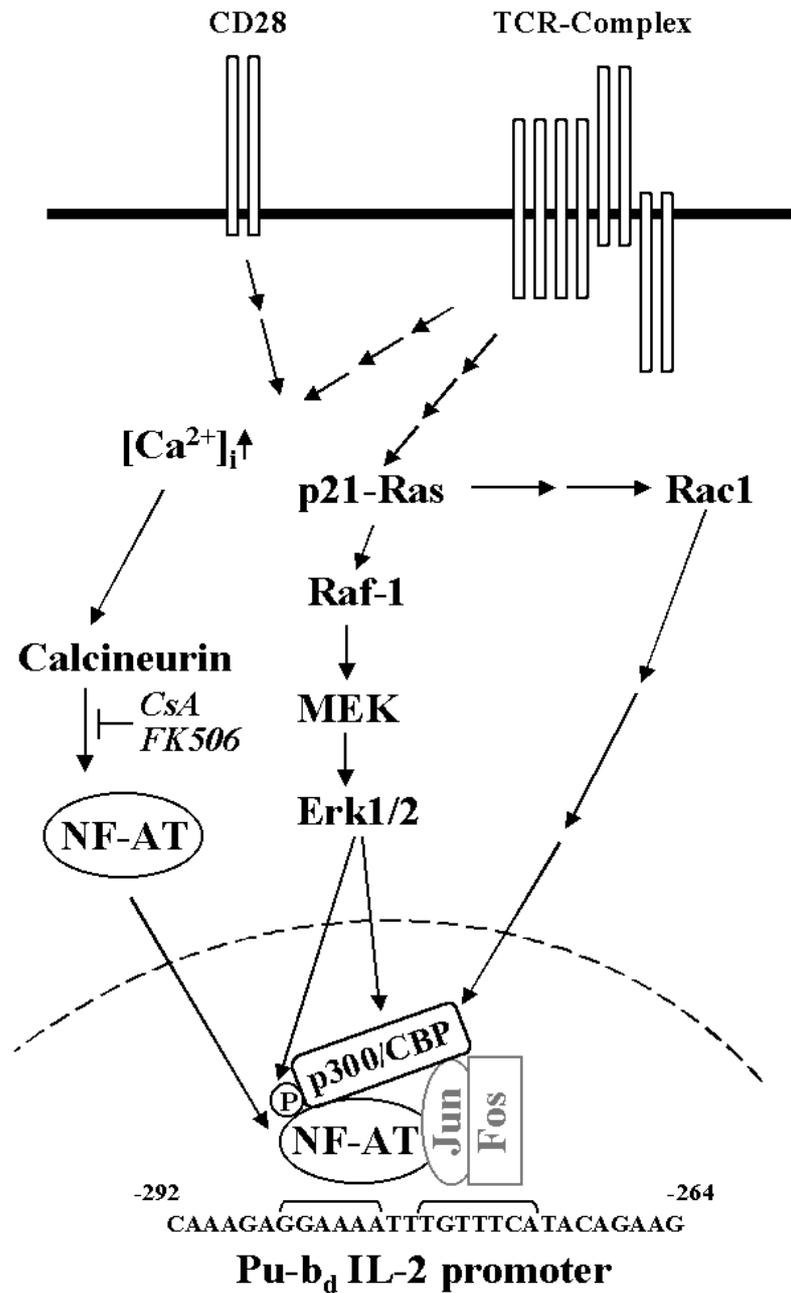


Abb. 13 stellt zusammenfassend die Erkenntnisse dar, die durch unsere Untersuchungen über die NF-AT-Aktivierung in T-Zellen gewonnen wurden (vgl. Abb. 3, S. 17). NF-AT gelangt hier als Phosphorylierungsziel für MAP-Kinasen zur Darstellung. Außerdem ist dargestellt, wie über p300/CBP verschiedene MAPK-Signalwege in der NF-AT-Aktivierung synergieren.

6. Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor NF-ATc (Nuclear Factor of Activated T cells) kontrolliert die Genexpression in T-Lymphozyten.

In dieser Arbeit, in der Jurkat-T-Zellen und embryonale 293-Zellen als Modellsysteme verwendet wurden, konnte gezeigt werden, daß die N-terminale transaktivierende Domäne TAD-A von NF-ATc in vivo induzierbar durch den Phorbolster TPA, in vitro durch die MAP-Kinase Erk2 phosphoryliert wird. In Transfektionsexperimenten mit einer TAD-A-Mutante, in der alle fünf Serinreste, die theoretisch durch MAP-Kinasen phosphoryliert werden können, durch Alaninreste ersetzt worden waren, konnte gezeigt werden, daß diese Phosphorylierung nicht notwendig für die Aktivierung von TAD-A ist. Vielmehr gelang der Nachweis, daß verschiedene MAP-Kinasen-Signalwege ihre Wirkung auf NF-ATc über die transkriptionellen Koaktivatoren CBP und p300 entfalten, die an die N-terminale transaktivierende Domäne TAD-A von NF-ATc binden und dessen Aktivität kontrollieren. Der Nachweis, daß konstitutiv aktive Mutanten von c-Raf und Rac synergistisch die CBP/p300-vermittelte TAD-A-Aktivierung verstärken, unterstreicht die wichtige Rolle, die CBP/p300 bei der Integration von T-Zell-Aktivierungssignalen spielt.

7. Literaturverzeichnis

Abastado,J.P., Lone,Y.C., Casrouge,A., Boulot,G., and Kourilsky,P. (1995). Dimerization of soluble major histocompatibility complex-peptide complexes is sufficient for activation of T cell hybridoma and induction of unresponsiveness. *J. Exp. Med.* *182*, 439-447.

Allison,J.P. (1994). CD28-B7 interactions in T-cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* *6*, 414-419.

Altman,A., Isakov,N., and Baier,G. (2000). Protein kinase Ctheta: a new essential superstar on the T-cell stage. *Immunol. Today* *21*, 567-573.

Anderson,G., Anderson,K.L., Conroy,L.A., Hallam,T.J., Moore,N.C., Owen,J.J., and Jenkinson,E.J. (1995). Intracellular signaling events during positive and negative selection of CD4+CD8+ thymocytes in vitro. *J. Immunol.* *154*, 3636-3643.

Appleby,M.W., Gross,J.A., Cooke,M.P., Levin,S.D., Qian,X., and Perlmutter,R.M. (1992). Defective T cell receptor signaling in mice lacking the thymic isoform of p59fyn. *Cell* *70*, 751-763.

Aramburu,J., Garcia-Cozar,F., Raghavan,A., Okamura,H., Rao,A., and Hogan,P.G. (1998). Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol. Cell* *1*, 627-637.

Arany,Z., Newsome,D., Oldread,E., Livingston,D.M., and Eckner,R. (1995). A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein. *Nature* *374*, 81-84.

Arias,J., Alberts,A.S., Brindle,P., Claret,F.X., Smeal,T., Karin,M., Feramisco,J., and Montminy,M. (1994). Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* *370*, 226-229.

Arpaia,E., Shahar,M., Dadi,H., Cohen,A., and Roifman,C.M. (1994). Defective T cell receptor signaling and CD8+ thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. *Cell* *76*, 947-958.

Avantaggiati,M.L., Carbone,M., Graessmann,A., Nakatani,Y., Howard,B., and Levine,A.S. (1996). The SV40 large T antigen and adenovirus E1a oncoproteins interact

with distinct isoforms of the transcriptional co-activator, p300. *EMBO J.* *15*, 2236-2248.

Baier-Bitterlich,G., Uberall,F., Bauer,B., Fresser,F., Wachter,H., Grunicke,H., Utermann,G., Altman,A., and Baier,G. (1996). Protein kinase C-theta isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes. *Mol. Cell Biol.* *16*, 1842-1850.

Baniahmad,A., Köhne,A.C., and Renkawitz,R. (1992). A transferable silencing domain is present in the thyroid hormone receptor, in the v-erbA oncogene product and in the retinoic acid receptor, *EMBO J.* *11*, 1015-1023

Bannister,A.J. and Kouzarides,T. (1995). CBP-induced stimulation of c-Fos activity is abrogated by E1A. *EMBO J.* *14*, 4758-4762.

Bannister,A.J., Oehler,T., Wilhelm,D., Angel,P., and Kouzarides,T. (1995). Stimulation of c-Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation in vivo and CBP binding in vitro. *Oncogene* *11*, 2509-2514.

Berridge,M.J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* *361*, 315-325.

Bertolotto,C., Maulon,L., Filippa,N., Baier,G., and Auberger,P. (2000). Protein kinase C theta and epsilon promote T-cell survival by a rsk- dependent phosphorylation and inactivation of BAD. *J. Biol. Chem.* *275*, 37246-37250.

Bisotto,S., Minorgan,S., and Rehfuss,R.P. (1996). Identification and characterization of a novel transcriptional activation domain in the CREB-binding protein. *J. Biol. Chem.* *271*, 17746-17750.

Bjorkman,P.J., Saper,M.A., Samraoui,B., Bennett,W.S., Strominger,J.L., and Wiley,D.C. (1987). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* *329*, 512-518.

Blau,J., Xiao,H., McCracken,S., O'Hare,P., Greenblatt,J., and Bentley,D. (1996). Three functional classes of transcriptional activation domain. *Mol. Cell Biol.* *16*, 2044-2055.

Bokemeyer,D., Sorokin,A., Yan,M., Ahn,N.G., Templeton,D.J., and Dunn,M.J. (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 fi-

broblasts. *J. Biol. Chem.* 271, 639-642.

Brabletz, T., Pietrowski, I., and Serfling, E. (1991). The immunosuppressives FK 506 and cyclosporin A inhibit the generation of protein factors binding to the two purine boxes of the interleukin 2 enhancer. *Nucleic Acids Res.* 19, 61-67.

Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E., and Gustin, M.C. (1993). An osmo-sensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259, 1760-1763.

Brindle, P., Nakajima, T., and Montminy, M. (1995). Multiple protein kinase A-regulated events are required for transcriptional induction by cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 10521-10525.

Brown, M.H., Cantrell, D.A., Brattsand, G., Crumpton, M.J., and Gullberg, M. (1989). The CD2 antigen associates with the T-cell antigen receptor CD3 antigen complex on the surface of human T lymphocytes. *Nature* 339, 551-553.

Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y., and Allis, C.D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84, 843-851.

Bryan, R.G., Li, Y., Lai, J.H., Van, M., Rice, N.R., Rich, R.R., and Tan, T.H. (1994). Effect of CD28 signal transduction on c-Rel in human peripheral blood T cells. *Mol. Cell Biol.* 14, 7933-7942.

Buday, L., Egan, S.E., Rodriguez, V.P., Cantrell, D.A., and Downward, J. (1994). A complex of Grb2 adaptor protein, Sos exchange factor, and a 36-kDa membrane-bound tyrosine phosphoprotein is implicated in ras activation in T cells. *J. Biol. Chem.* 269, 9019-9023.

Buday, L., Khwaja, A., Sipeki, S., Farago, A., and Downward, J. (1996). Interactions of Cbl with two adapter proteins, Grb2 and Crk, upon T cell activation. *J. Biol. Chem.* 271, 6159-6163.

Campbell, P.M., Pimm, J., Ramassar, V., and Halloran, P.F. (1996). Identification of a calcium-inducible, cyclosporine sensitive element in the IFN-gamma promoter that is a potential NFAT binding site. *Transplantation* 61, 933-939.

Cantrell, D. (1996). T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu. Rev.*

Immunol. 14, 259-274.

Carrera,A.C., Paradis,H., Borlado,L.R., Roberts,T.M., and Martinez,C. (1995). Lck unique domain influences Lck specificity and biological function. *J. Biol. Chem.* 270, 3385-3391.

Chan,A.C., Iwashima,M., Turck,C.W., and Weiss,A. (1992). ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 71, 649-662.

Chan,A.C., Kadlecsek,T.A., Elder,M.E., Filipovich,A.H., Kuo,W.L., Iwashima,M., Parslow,T.G., and Weiss,A. (1994). ZAP-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science* 264, 1599-1601.

Chan,A.C., Dalton,M., Johnson,R., Kong,G.H., Wang,T., Thoma,R., and Kurosaki,T. (1995). Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO J.* 14, 2499-2508.

Chen,C.Y., Gatto-Konczak,F., Wu,Z., and Karin,M. (1998). Stabilization of interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *Science* 280, 1945-1949.

Chow,C.W., Rincon,M., Cavanagh,J., Dickens,M., and Davis,R.J. (1997). Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* 278, 1638-1641.

Chrivia,J.C., Kwok,R.P., Lamb,N., Hagiwara,M., Montminy,M.R., and Goodman,R.H. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365, 855-859.

Chuvpilo,S., Schomberg,C., Gerwig,R., Heinfling,A., Reeves,R., Grummt,F., and Serfling,E. (1993). Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMG I(Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter. *Nucleic Acids Res.* 21, 5694-5704.

Clipstone,N.A. and Crabtree,G.R. (1992). Identification of calcineurin as a key signaling enzyme in T- lymphocyte activation. *Nature* 357, 695-697.

Cockerill,P.N., Bert,A.G., Jenkins,F., Ryan,G.R., Shannon,M.F., and Vadas,M.A. (1995a). Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhancer function is associated with cooperative interactions between AP-1 and NFATp/c. *Mol. Cell Biol.* 15, 2071-2079.

Cockerill,G.W., Bert,A.G., Ryan,G.R., Gamble,J.R., Vadas,M.A., and Cockerill,P.N. (1995b). Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and E- selectin expression in endothelial cells by cyclosporin A and the T- cell transcription factor NFAT. *Blood* 86, 2689-2698.

Conaway,R.C. and Conaway,J.W. (1993). General initiation factors for RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 161-190.

Couture,C., Baier,G., Oetken,C., Williams,S., Telford,D., Marie-Cardine,A., Baier-Bitterlich,G., Fischer,S., Burn,P., Altman,A., and . (1994). Activation of p56lck by p72syk through physical association and N- terminal tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* 14, 5249-5258.

Crabtree,G.R. (1989). Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* 243, 355-361.

Crabtree,G.R. and Clipstone,N.A. (1994). Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 1045-1083.

Crespo,P., Bustelo,X.R., Aaronson,D.S., Coso,O.A., Lopez-Barahona,M., Barbacid,M., and Gutkind,J.S. (1996). Rac-1 dependent stimulation of the JNK/SAPK signaling pathway by Vav. *Oncogene* 13, 455-460.

Crews,C.M. and Erikson,R.L. (1993). Extracellular signals and reversible protein phosphorylation: what to Mek of it all. *Cell* 74, 215-217.

Croft,M. and Dubey,C. (1997). Accessory molecule and costimulation requirements for CD4 T cell response. *Crit Rev. Immunol.* 17, 89-118.

Dai,P., Akimaru,H., Tanaka,Y., Hou,D.X., Yasukawa,T., Kanei-Ishii,C., Takahashi,T., and Ishii,S. (1996). CBP as a transcriptional coactivator of c-Myb. *Genes Dev.* 10, 528-540.

Davis,R.J. (1994). MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem. Sci.* 19, 470-473.

Derijard,B., Hibi,M., Wu,I.H., Barrett,T., Su,B., Deng,T., Karin,M., and Davis,R.J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76, 1025-1037.

DeSilva,D.R., Feeser,W.S., Tancula,E.J., and Scherle,P.A. (1996). Anergic T cells are defective in both jun NH2-terminal kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J. Exp. Med.* *183*, 2017-2023.

Donnadieu,E., Cefai,D., Tan,Y.P., Paresys,G., Bismuth,G., and Trautmann,A. (1992). Imaging early steps of human T cell activation by antigen-presenting cells. *J. Immunol.* *148*, 2643-2653.

Donnadieu,E., Bismuth,G., and Trautmann,A. (1994). Antigen recognition by helper T cells elicits a sequence of distinct changes of their shape and intracellular calcium. *Curr. Biol.* *4*, 584-595.

Donovan,J.A., Wange,R.L., Langdon,W.Y., and Samelson,L.E. (1994). The protein product of the c-cbl protooncogene is the 120-kDa tyrosine- phosphorylated protein in Jurkat cells activated via the T cell antigen receptor. *J. Biol. Chem.* *269*, 22921-22924.

Downward,J. (1992). Regulation of p21ras by GTPase activating proteins and guanine nucleotide exchange proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *2*, 13-18.

Dubey,C. and Croft,M. (1996). Accessory molecule regulation of naive CD4 T cell activation. *Immunol. Res.* *15*, 114-125.

Duncliffe,K.N., Bert,A.G., Vadas,M.A., and Cockerill,P.N. (1997). A T cell-specific enhancer in the interleukin-3 locus is activated cooperatively by Oct and NFAT elements within a DNase I-hypersensitive site. *Immunity.* *6*, 175-185.

Eckner,R., Ewen,M.E., Newsome,D., Gerdes,M., DeCaprio,J.A., Lawrence,J.B., and Livingston,D.M. (1994). Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A- associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev.* *8*, 869-884.

Eckner,R., Yao,T.P., Oldread,E., and Livingston,D.M. (1996a). Interaction and functional collaboration of p300/CBP and bHLH proteins in muscle and B-cell differentiation. *Genes Dev.* *10*, 2478-2490.

Eckner,R., Ludlow,J.W., Lill,N.L., Oldread,E., Arany,Z., Modjtahedi,N., DeCaprio,J.A., Livingston,D.M., and Morgan,J.A. (1996b). Association of p300 and CBP with simian virus 40 large T antigen. *Mol. Cell Biol.* *16*, 3454-3464.

Fields,B.A., Ober,B., Malchiodi,E.L., Lebedeva,M.I., Braden,B.C., Ysern,X., Kim,J.K., Shao,X., Ward,E.S., and Mariuzza,R.A. (1995). Crystal structure of the V alpha domain of a T cell antigen receptor. *Science* 270, 1821-1824.

Fischer,K.D., Zmuldzinas,A., Gardner,S., Barbacid,M., Bernstein,A., and Guidos,C. (1995). Defective T-cell receptor signalling and positive selection of Vav- deficient CD4+ CD8+ thymocytes. *Nature* 374, 474-477.

Fournel,M., Davidson,D., Weil,R., and Veillette,A. (1996). Association of tyrosine protein kinase Zap-70 with the protooncogene product p120c-cbl in T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183, 301-306.

Fukazawa,T., Reedquist,K.A., Panchamoorthy,G., Soltoff,S., Trub,T., Druker,B., Cantley,L., Shoelson,S.E., and Band,H. (1995). T cell activation-dependent association between the p85 subunit of the phosphatidylinositol 3-kinase and Grb2/phospholipase C-gamma 1-binding phosphotyrosyl protein pp36/38. *J. Biol. Chem.* 270, 20177-20182.

Garcia-Rodriguez,C. and Rao,A. (1998). Nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent transactivation regulated by the coactivators p300/CREB-binding protein (CBP). *J. Exp. Med.* 187, 2031-2036.

Gauen,L.K., Zhu,Y., Letourneur,F., Hu,Q., Bolen,J.B., Matis,L.A., Klausner,R.D., and Shaw,A.S. (1994). Interactions of p59fyn and ZAP-70 with T-cell receptor activation motifs: defining the nature of a signalling motif. *Mol. Cell Biol.* 14, 3729-3741.

Genot,E.M., Parker,P.J., and Cantrell,D.A. (1995). Analysis of the role of protein kinase C-alpha, -epsilon, and -zeta in T cell activation. *J. Biol. Chem.* 270, 9833-9839.

Genot,E., Cleverley,S., Henning,S., and Cantrell,D. (1996). Multiple p21ras effector pathways regulate nuclear factor of activated T cells. *EMBO J.* 15, 3923-3933.

Gerritsen,M.E., Williams,A.J., Neish,A.S., Moore,S., Shi,Y., and Collins,T. (1997). CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 2927-2932.

Ghosh,D. (1993). Status of the transcription factors database (TFD). *Nucleic Acids Res.* 21, 3117-3118.

Gill,G., Pascal,E., Tseng,Z.H., and Tjian,R. (1994). A glutamine-rich hydrophobic patch

in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 192-196.

Goldsmith, M.A. and Weiss, A. (1988). Early signal transduction by the antigen receptor without commitment to T cell activation. *Science* *240*, 1029-1031.

Goodrich, J.A., Hoey, T., Thut, C.J., Admon, A., and Tjian, R. (1993). Drosophila TAFII40 interacts with both a VP16 activation domain and the basal transcription factor TFIIB. *Cell* *75*, 519-530.

Graves, J.D., Campbell, J.S., and Krebs, E.G. (1995). Protein serine/threonine kinases of the MAPK cascade. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *766*, 320-343.

Grewal, I.S. and Flavell, R.A. (1996). The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol. Rev.* *153*, 85-106.

Grumont, R.J., Rasko, J.E., Strasser, A., and Gerondakis, S. (1996). Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway induces transcription of the PAC-1 phosphatase gene. *Mol. Cell Biol.* *16*, 2913-2921.

Gupta, S., Campbell, D., Derijard, B., and Davis, R.J. (1995). Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* *267*, 389-393.

Hama, N., Paliogianni, F., Fessler, B.J., and Boumpas, D.T. (1995). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II downregulates both calcineurin and protein kinase C-mediated pathways for cytokine gene transcription in human T cells. *J. Exp. Med.* *181*, 1217-1222.

Han, J., Das, B., Wei, W., Van Aelst, L., Mosteller, R.D., Khosravi-Far, R., Westwick, J.K., Der, C.J., and Broek, D. (1997). Lck regulates Vav activation of members of the Rho family of GTPases. *Mol. Cell Biol.* *17*, 1346-1353.

Hanke, J.H., Gardner, J.P., Dow, R.L., Changelian, P.S., Brissette, W.H., Weringer, E.J., Pollok, B.A., and Connelly, P.A. (1996). Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J. Biol. Chem.* *271*, 695-701.

Hanstein, B., Eckner, R., DiRenzo, J., Halachmi, S., Liu, H., Searcy, B., Kurokawa, R., and

Brown,M. (1996). p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 11540-11545.

Haverstick,D.M., Engelhard,V.H., and Gray,L.S. (1991). Three intracellular signals for cytotoxic T lymphocyte-mediated killing. Independent roles for protein kinase C, Ca²⁺ influx, and Ca²⁺ release from internal stores. *J. Immunol.* 146, 3306-3313.

Herskowitz,I. (1995). MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* 80, 187-197.

Ho,A.M., Jain,J., Rao,A., and Hogan,P.G. (1994). Expression of the transcription factor NFATp in a neuronal cell line and in the murine nervous system. *J. Biol. Chem.* 269, 28181-28186.

Ho,N., Gullberg,M., and Chatila,T. (1996). Activation protein 1-dependent transcriptional activation of interleukin 2 gene by Ca²⁺/calmodulin kinase type IV/Gr. *J. Exp. Med.* 184, 101-112.

Ho,S.N., Thomas,D.J., Timmerman,L.A., Li,X., Francke,U., and Crabtree,G.R. (1995). NFATc3, a lymphoid-specific NFATc family member that is calcium- regulated and exhibits distinct DNA binding specificity. *J. Biol. Chem.* 270, 19898-19907.

Hoey,T., Sun,Y.L., Williamson,K., and Xu,X. (1995). Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins. *Immunity.* 2, 461-472.

Hörlein,A.J., Näär,A.M., Heinzl,T., Torchia,J., Gloss,B., Kurokawa,R., Ryan,A., Kamei,Y., Söderström,M., Glass,C.K., and . (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404.

Hoth,M. and Penner,R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355, 353-356.

Howe,L.R. and Weiss,A. (1995). Multiple kinases mediate T-cell-receptor signaling. *Trends Biochem. Sci.* 20, 59-64.

Huang,X., Li,Y., Tanaka,K., Moore,K.G., and Hayashi,J.I. (1995). Cloning and characterization of Lnk, a signal transduction protein that links T-cell receptor activation signal

to phospholipase C gamma 1, Grb2, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 11618-11622.

Hubbard,M.J. and Klee,C.B. (1989). Functional domain structure of calcineurin A: mapping by limited proteolysis. *Biochemistry* **28**, 1868-1874.

Imboden,J.B. and Stobo,J.D. (1985). Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. Perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions from intracellular stores. *J. Exp. Med.* **161**, 446-456.

Iwashima,M., Irving,B.A., van Oers,N.S., Chan,A.C., and Weiss,A. (1994). Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* **263**, 1136-1139.

Izquierdo,M., Leever,S.J., Williams,D.H., Marshall,C.J., Weiss,A., and Cantrell,D. (1994). The role of protein kinase C in the regulation of extracellular signal-regulated kinase by the T cell antigen receptor. *Eur. J. Immunol.* **24**, 2462-2468.

Izquierdo,P.M., Reif,K., and Cantrell,D. (1995). The regulation and function of p21ras during T-cell activation and growth. *Immunol. Today* **16**, 159-164.

Jacinto,E., Werlen,G., and Karin,M. (1998). Cooperation between Syk and Rac1 leads to synergistic JNK activation in T lymphocytes. *Immunity*. **8**, 31-41.

Jackman,J.K., Motto,D.G., Sun,Q., Tanemoto,M., Turck,C.W., Peltz,G.A., Koretzky,G.A., and Findell,P.R. (1995). Molecular cloning of SLP-76, a 76-kDa tyrosine phosphoprotein associated with Grb2 in T cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 7029-7032.

Jain,J., Burgeon,E., Badalian,T.M., Hogan,P.G., and Rao,A. (1995). A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region. *J. Biol. Chem.* **270**, 4138-4145.

James,P., Vorherr,T., and Carafoli,E. (1995). Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted? *Trends Biochem. Sci.* **20**, 38-42.

Janknecht,R. and Nordheim,A. (1996a). Regulation of the c-fos promoter by the ternary complex factor Sap-1a and its coactivator CBP. *Oncogene* **12**, 1961-1969.

Janknecht,R. and Nordheim,A. (1996b). MAP kinase-dependent transcriptional coacti-

vation by Elk-1 and its cofactor CBP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228**, 831-837.

Janknecht,R. and Hunter,T. (1996c). Versatile molecular glue. *Transcriptional control. Curr. Biol.* **6**, 951-954.

Jayaraman,T., Ondrias,K., Ondriasova,E., and Marks,A.R. (1996). Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by tyrosine phosphorylation. *Science* **272**, 1492-1494.

Jenkins,F., Cockerill,P.N., Bohmann,D., and Shannon,M.F. (1995). Multiple signals are required for function of the human granulocyte- macrophage colony-stimulating factor gene promoter in T cells. *J. Immunol.* **155**, 1240-1251.

June,C.H., Bluestone,J.A., Nadler,L.M., and Thompson,C.B. (1994). The B7 and CD28 receptor families. *Immunol. Today* **15**, 321-331.

Kamei,Y., Xu,L., Heinzl,T., Torchia,J., Kurokawa,R., Gloss,B., Lin,S.C., Heyman,R.A., Rose,D.W., Glass,C.K., and Rosenfeld,M.G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* **85**, 403-414.

Karin,M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **270**, 16483-16486.

Karlen,S., D'Ercole,M., and Sanderson,C.J. (1996). Two pathways can activate the interleukin-5 gene and induce binding to the conserved lymphokine element 0. *Blood* **88**, 211-221.

Katzav,S., Sutherland,M., Packham,G., Yi,T., and Weiss,A. (1994). The protein tyrosine kinase ZAP-70 can associate with the SH2 domain of proto-Vav. *J. Biol. Chem.* **269**, 32579-32585.

Kee,B.L., Arias,J., and Montminy,M.R. (1996). Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator. *J. Biol. Chem.* **271**, 2373-2375.

Kitabayashi,I., Eckner,R., Arany,Z., Chiu,R., Gachelin,G., Livingston,D.M., and Yokoyama,K.K. (1995). Phosphorylation of the adenovirus E1A-associated 300 kDa protein in response to retinoic acid and E1A during the differentiation of F9 cells. *EMBO J.* **14**, 3496-3509.

Klee,C.B., Draetta,G.F., and Hubbard,M.J. (1988). Calcineurin. *Adv. Enzymol. Relat Areas Mol. Biol.* 61, 149-200.

Kolanus,W., Romeo,C., and Seed,B. (1993). T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell* 74, 171-183.

Kourilsky,P. and Claverie,J.M. (1989). MHC restriction, alloreactivity, and thymic education: a common link? *Cell* 56, 327-329.

Kubo,M., Kincaid,R.L., Webb,D.R., and Ransom,J.T. (1994). The Ca²⁺/calmodulin-activated, phosphoprotein phosphatase calcineurin is sufficient for positive transcriptional regulation of the mouse IL-4 gene. *Int. Immunol.* 6, 179-188.

Kwok,R.P., Lundblad,J.R., Chrivia,J.C., Richards,J.P., Bachinger,H.P., Brennan,R.G., Roberts,S.G., Green,M.R., and Goodman,R.H. (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370, 223-226.

Kwok,R.P., Laurance,M.E., Lundblad,J.R., Goldman,P.S., Shih,H., Connor,L.M., Marriott,S.J., and Goodman,R.H. (1996). Control of cAMP-regulated enhancers by the viral transactivator Tax through CREB and the co-activator CBP. *Nature* 380, 642-646.

Kyriakis,J.M., Banerjee,P., Nikolakaki,E., Dai,T., Rubie,E.A., Ahmad,M.F., Avruch,J., and Woodgett,J.R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369, 156-160.

Labadia,M.E., Jakes,S., Grygon,C.A., Greenwood,D.J., Schembri-King,J., Lukas,S.M., Warren,T.C., and Ingraham,R.H. (1997). Interaction between the SH2 domains of ZAP-70 and the tyrosine-based activation motif 1 sequence of the zeta subunit of the T-cell receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* 342, 117-125.

Lee,J.C., Laydon,J.T., McDonnell,P.C., Gallagher,T.F., Kumar,S., Green,D., McNulty,D., Blumenthal,M.J., Heys,J.R., Landvatter,S.W., and . (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372, 739-746.

Lee,J.S., Galvin,K.M., See,R.H., Eckner,R., Livingston,D., Moran,E., and Shi,Y. (1995). Relief of YY1 transcriptional repression by adenovirus E1A is mediated by E1A-associated protein p300. *Genes Dev.* 9, 1188-1198.

Lee,J.S., See,R.H., Deng,T., and Shi,Y. (1996). Adenovirus E1A downregulates cJun-

and JunB-mediated transcription by targeting their coactivator p300. *Mol. Cell Biol.* **16**, 4312-4326.

Letourneur,F. and Klausner,R.D. (1992). Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon. *Science* **255**, 79-82.

Lewis,R.S. and Cahalan,M.D. (1989). Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca²⁺ and transmembrane Ca²⁺ current in human leukemic T cells. *Cell Regul.* **1**, 99-112.

Lewis,R.S. and Cahalan,M.D. (1995). Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 623-653.

Linsley,P.S., Brady,W., Grosmaire,L., Aruffo,A., Damle,N.K., and Ledbetter,J.A. (1991). Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* **173**, 721-730.

Liscovitch,M. and Cantley,L.C. (1994). Lipid second messengers. *Cell* **77**, 329-334.

Liu,J., Farmer,J.D., Jr., Lane,W.S., Friedman,J., Weissman,I., and Schreiber,S.L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP- FK506 complexes. *Cell* **66**, 807-815.

Liu,J., Albers,M.W., Wandless,T.J., Luan,S., Alberg,D.G., Belshaw,P.J., Cohen,P., MacKintosh,C., Klee,C.B., and Schreiber,S.L. (1992). Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry* **31**, 3896-3901.

Loh,C., Shaw,K.T., Carew,J., Viola,J.P., Luo,C., Perrino,B.A., and Rao,A. (1996a). Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 10884-10891.

Loh,C., Carew,J.A., Kim,J., Hogan,P.G., and Rao,A. (1996b). T-cell receptor stimulation elicits an early phase of activation and a later phase of deactivation of the transcription factor NFAT1. *Mol. Cell Biol.* **16**, 3945-3954.

Lundblad,J.R., Kwok,R.P., Lurance,M.E., Harter,M.L., and Goodman,R.H. (1995). Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP. *Nature* **374**, 85-88.

Luo,C., Burgeon,E., Carew,J.A., McCaffrey,P.G., Badalian,T.M., Lane,W.S., Hogan,P.G., and Rao,A. (1996a). Recombinant NFAT1 (NFATp) is regulated by calcineurin in T cells and mediates transcription of several cytokine genes. *Mol. Cell Biol.* *16*, 3955-3966.

Luo,C., Shaw,K.T., Raghavan,A., Aramburu,J., Garcia-Cozar,F., Perrino,B.A., Hogan,P.G., and Rao,A. (1996b). Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 8907-8912.

Luo,C., Burgeon,E., and Rao,A. (1996c). Mechanisms of transactivation by nuclear factor of activated T cells-1. *J. Exp. Med.* *184*, 141-147.

Manalan,A.S. and Klee,C.B. (1983). Activation of calcineurin by limited proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *80*, 4291-4295.

Marais,R., Light,Y., Paterson,H.F., and Marshall,C.J. (1995). Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* *14*, 3136-3145.

Marshall,M.S. (1995). Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J.* *9*, 1311-1318.

Martinez-Balbas,M.A., Bannister,A.J., Martin,K., Haus-Seuffert,P., Meisterernst,M., and Kouzarides,T. (1998). The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription. *EMBO J.* *17*, 2886-2893

Martinez-Martinez,S., Gomez,d.A., Armesilla,A.L., Aramburu,J., Luo,C., Rao,A., and Redondo,J.M. (1997). Blockade of T-cell activation by dithiocarbamates involves novel mechanisms of inhibition of nuclear factor of activated T cells. *Mol. Cell Biol.* *17*, 6437-6447.

Mason,M.J., Garcia-Rodriguez,C., and Grinstein,S. (1991). Coupling between intracellular Ca²⁺ stores and the Ca²⁺ permeability of the plasma membrane. Comparison of the effects of thapsigargin, 2,5-di- (tert-butyl)-1,4-hydroquinone, and cyclopiazonic acid in rat thymic lymphocytes. *J. Biol. Chem.* *266*, 20856-20862.

Masuda,E.S., Naito,Y., Tokumitsu,H., Campbell,D., Saito,F., Hannum,C., Arai,K., and Arai,N. (1995). NFATx, a novel member of the nuclear factor of activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus. *Mol. Cell Biol.* *15*, 2697-2706.

McCaffrey,P.G., Luo,C., Kerppola,T.K., Jain,J., Badalian,T.M., Ho,A.M., Burgeon,E., Lane,W.S., Lambert,J.N., Curran,T., and . (1993). Isolation of the cyclosporin-sensitive T cell transcription factor NFATp. *Science* 262, 750-754.

McCaffrey,P.G., Goldfeld,A.E., and Rao,A. (1994). The role of NFATp in cyclosporin A-sensitive tumor necrosis factor- alpha gene transcription. *J. Biol. Chem.* 269, 30445-30450.

McConkey,D.J., Jondal,M., and Orrenius,S. (1992). Cellular signaling in thymocyte apoptosis. *Semin. Immunol.* 4, 371-377.

McCormick,F. (1993). Signal transduction. How receptors turn Ras on. *Nature* 363, 15-16.

McCormick,F. (1994). Activators and effectors of ras p21 proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 71-76.

Meuer,S.C., Hussey,R.E., Fabbi,M., Fox,D., Acuto,O., Fitzgerald,K.A., Hodgdon,J.C., Protentis,J.P., Schlossman,S.F., and Reinherz,E.L. (1984). An alternative pathway of T-cell activation: a functional role for the 50 kd T11 sheep erythrocyte receptor protein. *Cell* 36, 897-906.

Michie,A.M., Soh,J.W., Hawley,R.G., Weinstein,I.B., Zuniga-Pflucker,J.C. (2001). Allelic exclusion and differentiation by protein kinase C-mediated signals in immature thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(2), 609-614

Minden,A., Lin,A., McMahon,M., Lange-Carter,C., Derijard,B., Davis,R.J., Johnson,G.L., and Karin,M. (1994). Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* 266, 1719-1723.

Misra-Press,A., Rim,C.S., Yao,H., Roberson,M.S., and Stork,P.J. (1995). A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase. Structure, expression, and regulation. *J. Biol. Chem.* 270, 14587-14596.

Molina,T.J., Kishihara,K., Siderovski,D.P., van Ewijk,W., Narendran,A., Timms,E., Wakeham,A., Paige,C.J., Hartmann,K.U., Veillette,A., and . (1992). Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck. *Nature* 357, 161-164.

Motto,D.G., Ross,S.E., Jackman,J.K., Sun,Q., Olson,A.L., Findell,P.R., and Koretz-

ky,G.A. (1994). In vivo association of Grb2 with pp116, a substrate of the T cell antigen receptor-activated protein tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 269, 21608-21613.

Motto,D.G., Ross,S.E., Wu,J., Hendricks-Taylor,L.R., and Koretzky,G.A. (1996). Implication of the GRB2-associated phosphoprotein SLP-76 in T cell receptor-mediated interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 183, 1937-1943.

Musti,A.M., Treier,M., and Bohmann,D. (1997). Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science* 275, 400-402.

Nakajima,T., Fukamizu,A., Takahashi,J., Gage,F.H., Fisher,T., Blenis,J., and Montminy,M.R. (1996). The signal-dependent coactivator CBP is a nuclear target for pp90RSK. *Cell* 86, 465-474.

Nakayama,T., Ueda,Y., Yamada,H., Shores,E.W., Singer,A., and June,C.H. (1992). In vivo calcium elevations in thymocytes with T cell receptors that are specific for self ligands. *Science* 257, 96-99.

Negishi,I., Motoyama,N., Nakayama,K., Nakayama,K., Senju,S., Hatakeyama,S., Zhang,Q., Chan,A.C., and Loh,D.Y. (1995). Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 376, 435-438.

Negulescu,P.A., Shastri,N., and Cahalan,M.D. (1994). Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 2873-2877.

Nelson,H.C. (1995). Structure and function of DNA-binding proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 180-189.

Nghiem,P., Ollick,T., Gardner,P., and Schulman,H. (1994). Interleukin-2 transcriptional block by multifunctional Ca²⁺/calmodulin kinase. *Nature* 371, 347-350.

Northrop,J.P., Ho,S.N., Chen,L., Thomas,D.J., Timmerman,L.A., Nolan,G.P., Admon,A., and Crabtree,G.R. (1994). NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T- cell activation. *Nature* 369, 497-502.

O'Keefe,S.J., Tamura,J., Kincaid,R.L., Tocci,M.J., and O'Neill,E.A. (1992). FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* 357, 692-694.

Oelgeschläger,M., Janknecht,R., Krieg,J., Schreek,S., and Lüscher,B. (1996). Interaction of the co-activator CBP with Myb proteins: effects on Myb- specific transactivation and on the cooperativity with NF-M. *EMBO J.* 15, 2771-2780.

Okamoto,S., Mukaida,N., Yasumoto,K., Rice,N., Ishikawa,Y., Horiguchi,H., Murakami,S., and Matsushima,K. (1994). The interleukin-8 AP-1 and kappa B-like sites are genetic end targets of FK506-sensitive pathway accompanied by calcium mobilization. *J. Biol. Chem.* 269, 8582-8589.

Osman,N., Lucas,S.C., Turner,H., and Cantrell,D. (1995). A comparison of the interaction of Shc and the tyrosine kinase ZAP-70 with the T cell antigen receptor zeta chain tyrosine-based activation motif. *J. Biol. Chem.* 270, 13981-13986.

Park,J., Yaseen,N.R., Hogan,P.G., Rao,A., and Sharma,S. (1995). Phosphorylation of the transcription factor NFATp inhibits its DNA binding activity in cyclosporin A-treated human B and T cells. *J. Biol. Chem.* 270, 20653-20659.

Parker,D., Ferreri,K., Nakajima,T., LaMorte,V.J., Evans,R., Koerber,S.C., Hoeger,C., and Montminy,M.R. (1996). Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB- binding protein via a direct mechanism. *Mol. Cell Biol.* 16, 694-703.

Perkins,N.D., Felzien,L.K., Betts,J.C., Leung,K., Beach,D.H., and Nabel,G.J. (1997). Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science* 275, 523-527.

Plaksin,D., Polakova,K., McPhie,P., and Margulies,D.H. (1997). A three-domain T cell receptor is biologically active and specifically stains cell surface MHC/peptide complexes. *J. Immunol.* 158, 2218-2227.

Poenie,M., Tsien,R.Y., and Schmitt-Verhulst,A.M. (1987). Sequential activation and lethal hit measured by $[Ca^{2+}]_i$ in individual cytolytic T cells and targets. *EMBO J.* 6, 2223-2232.

Premack,B.A., McDonald,T.V., and Gardner,P. (1994). Activation of Ca^{2+} current in Jurkat T cells following the depletion of Ca^{2+} stores by microsomal Ca^{2+} -ATPase inhibitors. *J. Immunol.* 152, 5226-5240.

Prieschl,E.E., Gouilleux-Gruart,V., Walker,C., Harrer,N.E., and Baumruker,T. (1995). A

nuclear factor of activated T cell-like transcription factor in mast cells is involved in IL-5 gene regulation after IgE plus antigen stimulation. *J. Immunol.* *154*, 6112-6119.

Putney, J.W., Jr. (1990). Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* *11*, 611-624.

Qian, D., Mollenauer, M.N., and Weiss, A. (1996). Dominant-negative zeta-associated protein 70 inhibits T cell antigen receptor signaling. *J. Exp. Med.* *183*, 611-620.

Qiu, R.G., Chen, J., Kirn, D., McCormick, F., and Symons, M. (1995). An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* *374*, 457-459.

Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J., and Davis, R.J. (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*, 7420-7426.

Raingeaud, J., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Derijard, B., and Davis, R.J. (1996). MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell Biol.* *16*, 1247-1255.

Rao, A. (1994). NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol. Today* *15*, 274-281.

Rao, A., Luo, C., and Hogan, P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 707-747.

Ravichandran, K.S., Lee, K.K., Songyang, Z., Cantley, L.C., Burn, P., and Burakoff, S.J. (1993). Interaction of Shc with the zeta chain of the T cell receptor upon T cell activation. *Science* *262*, 902-905.

Reinhold, M.I., Lindberg, F.P., Kersh, G.J., Allen, P.M., and Brown, E.J. (1997). Costimulation of T cell activation by integrin-associated protein (CD47) is an adhesion-dependent, CD28-independent signaling pathway. *J. Exp. Med.* *185*, 1-11.

Resta, R. and Thompson, L.F. (1997). T cell signalling through CD73. *Cell Signal.* *9*, 131-139.

Robey, E. and Axel, R. (1990). CD4: collaborator in immune recognition and HIV infection. *Cell* *60*, 697-700.

Rohan,P.J., Davis,P., Moskaluk,C.A., Kearns,M., Krutzsch,H., Siebenlist,U., and Kelly,K. (1993). PAC-1: a mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase. *Science* 259, 1763-1766.

Ruff,V.A. and Leach,K.L. (1995). Direct demonstration of NFATp dephosphorylation and nuclear localization in activated HT-2 cells using a specific NFATp polyclonal antibody. *J. Biol. Chem.* 270, 22602-22607.

Samelson,L.E., Patel,M.D., Weissman,A.M., Harford,J.B., and Klausner,R.D. (1986). Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor. *Cell* 46, 1083-1090.

Schraven,B., Roux,M., Hutmacher,B., and Meuer,S.C. (1989). Triggering of the alternative pathway of human T cell activation involves members of the T 200 family of glycoproteins. *Eur. J. Immunol.* 26, 2841-2849.

Schwartz,R.H. (1990). A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248, 1349-1356.

Serfling,E., Avots,A., and Neumann,M. (1995). The architecture of the interleukin-2 promoter: a reflection of T lymphocyte activation. *Biochim. Biophys. Acta* 1263, 181-200.

Shapiro,D.N., Adams,B.S., and Niederhuber,J.E. (1985). Antigen-specific T cell activation results in an increase in cytoplasmic free calcium. *J. Immunol.* 135, 2256-2261.

Shaw,A.S., Chalupny,J., Whitney,J.A., Hammond,C., Amrein,K.E., Kavathas,P., Sefton,B.M., and Rose,J.K. (1990). Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediate binding to the amino-terminal domain of the p56lck tyrosine protein kinase. *Mol. Cell Biol.* 10, 1853-1862.

Shaw,J.P., Utz,P.J., Durand,D.B., Toole,J.J., Emmel,E.A., and Crabtree,G.R. (1988). Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 241, 202-205.

Shevach,E.M. (1985). The effects of cyclosporin A on the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 3, 397-423.

Sieh,M., Batzer,A., Schlessinger,J., and Weiss,A. (1994). GRB2 and phospholipase C-

gamma 1 associate with a 36- to 38-kilodalton phosphotyrosine protein after T-cell receptor stimulation. *Mol. Cell Biol.* 14, 4435-4442.

Smits,P.H., de Wit,L., van der Eb,A.J., and Zantema,A. (1996). The adenovirus E1A-associated 300 kDa adaptor protein counteracts the inhibition of the collagenase promoter by E1A and represses transformation. *Oncogene* 12, 1529-1535.

Stemmer,P.M. and Klee,C.B. (1994). Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry* 33, 6859-6866.

Stowers,L., Yelon,D., Berg,L.J., and Chant,J. (1995). Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 5027-5031.

Straus,D.B. and Weiss,A. (1992). Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 70, 585-593.

Su,B., Jacinto,E., Hibi,M., Kallunki,T., Karin,M., and Ben Neriah,Y. (1994). JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* 77, 727-736.

Sun,H., Charles,C.H., Lau,L.F., and Tonks,N.K. (1993). MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* 75, 487-493.

Sun,H., Tonks,N.K., and Bar-Sagi,D. (1994). Inhibition of Ras-induced DNA synthesis by expression of the phosphatase MKP-1. *Science* 266, 285-288.

Sun,Z., Arendt,C.W., Ellmeier,W., Schaeffer,E.M., Sunshine,M.J., Gandhi,L., Annes,J., Petrzilka,D., Kupfer,A., Schwartzberg,P.L., and Littman,D.R. (2000). PKC- θ is required for TCR-induced NF- κ B activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* 404, 402-407

Swan,K.A., Alberola-Ila,J., Gross,J.A., Appleby,M.W., Forbush,K.A., Thomas,J.F., and Perlmutter,R.M. (1995). Involvement of p21ras distinguishes positive and negative selection in thymocytes. *EMBO J.* 14, 276-285.

Swanson,S.K., Born,T., Zydowsky,L.D., Cho,H., Chang,H.Y., Walsh,C.T., and Rusnak,F. (1992). Cyclosporin-mediated inhibition of bovine calcineurin by cyclophilins A and B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 3741-3745.

Szamel,M. and Resch,K. (1995). T-cell antigen receptor-induced signal-transduction pathways-- activation and function of protein kinases C in T lymphocytes. *Eur. J. Biochem.* **228**, 1-15.

Tanaka,K., Kuroda,A., Marusawa,H., Hatanaka,H., Kino,T., Goto,T., Hashimoto,M., and Taga,T. (1987). *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 5031-5033.

Tarakhovsky,A., Turner,M., Schaal,S., Mee,P.J., Duddy,L.P., Rajewsky,K., and Tybulewicz,V.L. (1995). Defective antigen receptor-mediated proliferation of B and T cells in the absence of Vav. *Nature* **374**, 467-470.

Teramoto,H., Coso,O.A., Miyata,H., Igishi,T., Miki,T., and Gutkind,J.S. (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**, 27225-27228.

Teramoto,H., Crespo,P., Coso,O.A., Igishi,T., Xu,N., and Gutkind,J.S. (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**, 25731-25734.

Thompson,C.B., Wang,C.Y., Ho,I.C., Bohjanen,P.R., Petryniak,B., June,C.H., Miesfeldt,S., Zhang,L., Nabel,G.J., Karpinski,B., et al.. (1992). cis-acting sequences required for inducible interleukin-2 enhancer function bind a novel Ets-related protein, Elf-1. *Mol. Cell Biol.* **12**, 1043-1053.

Torchia,J., Rose,D.W., Inostroza,J., Kamei,Y., Westin,S., Glass,C.K., and Rosenfeld,M.G. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear- receptor function. *Nature* **387**, 677-684.

Torchia,J., Glass,C., and Rosenfeld,M.G. (1998). Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 373-383.

Treisman,R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 205-215.

Tsai,E.Y., Jain,J., Pesavento,P.A., Rao,A., and Goldfeld,A.E. (1996). Tumor necrosis factor alpha gene regulation in activated T cells involves ATF-2/Jun and NFATp. *Mol.*

Cell Biol. 16, 459-467.

Tsytsykova,A.V., Tsitsikov,E.N., and Geha,R.S. (1996). The CD40L promoter contains nuclear factor of activated T cells-binding motifs which require AP-1 binding for activation of transcription. J. Biol. Chem. 271, 3763-3770.

Turner,J.M., Brodsky,M.H., Irving,B.A., Levin,S.D., Perlmutter,R.M., and Littman,D.R. (1990). Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. Cell 60, 755-765.

Ueki,K. and Kincaid,R.L. (1993). Interchangeable associations of calcineurin regulatory subunit isoforms with mammalian and fungal catalytic subunits. J. Biol. Chem. 268, 6554-6559.

van Oers,N.S. and Weiss,A. (1995). The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. Semin. Immunol. 7, 227-236.

Verhagen,A.M., Schraven,B., Wild,M., Wallich,R., and Meuer,S.C. (1996). Differential interaction of the CD2 extracellular and intracellular domains with the tyrosine phosphatase CD45 and the zeta chain of the TCR/CD3/zeta complex. Eur. J. Immunol. 26, 2841-2849.

Verheij,M., Bose,R., Lin,X.H., Yao,B., Jarvis,W.D., Grant,S., Birrer,M.J., Szabo,E., Zon,L.I., Kyriakis,J.M., Haimovitz-Friedman,A., Fuks,Z., and Kolesnick,R.N. (1996). Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress- induced apoptosis. Nature 380, 75-79.

Verweij,C.L., Guidos,C., and Crabtree,G.R. (1990). Cell type specificity and activation requirements for NFAT-1 (nuclear factor of activated T-cells) transcriptional activity determined by a new method using transgenic mice to assay transcriptional activity of an individual nuclear factor. J. Biol. Chem. 265, 15788-15795.

Vojtek,A.B. and Cooper,J.A. (1995). Rho family members: activators of MAP kinase cascades. Cell 82, 527-529.

Volkov,Y., Long,A., McGrath,S., Eidhin,D.N., and Kelleher,D. (2001). Crucial importance of PKC-beta(I) in LFA-1-mediated locomotion of activated T cells. Nat. Immunol. 2, 508-514.

- Wang,D.Z., McCaffrey,P.G., and Rao,A. (1995). The cyclosporin-sensitive transcription factor NFATp is expressed in several classes of cells in the immune system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 766, 182-194.
- Wange,R.L., Kong,A.N., and Samelson,L.E. (1992). A tyrosine-phosphorylated 70-kDa protein binds a photoaffinity analogue of ATP and associates with both the zeta chain and CD3 components of the activated T cell antigen receptor. *J. Biol. Chem.* 267, 11685-11688.
- Wange,R.L., Guitian,R., Isakov,N., Watts,J.D., Aebersold,R., and Samelson,L.E. (1995). Activating and inhibitory mutations in adjacent tyrosines in the kinase domain of ZAP-70. *J. Biol. Chem.* 270, 18730-18733.
- Wange,R.L. and Samelson,L.E. (1996). Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity.* 5, 197-205.
- Waskiewicz,A.J. and Cooper,J.A. (1995). Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 798-805.
- Watts,J.D., Affolter,M., Krebs,D.L., Wange,R.L., Samelson,L.E., and Aebersold,R. (1994). Identification by electrospray ionization mass spectrometry of the sites of tyrosine phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase ZAP-70. *J. Biol. Chem.* 269, 29520-29529.
- Weiss,A. (1993). T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell* 73, 209-212.
- Weiss,A. and Littman,D.R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76, 263-274.
- Weiss,D.L., Hural,J., Tara,D., Timmerman,L.A., Henkel,G., and Brown,M.A. (1996). Nuclear factor of activated T cells is associated with a mast cell interleukin 4 transcription complex. *Mol. Cell Biol.* 16, 228-235.
- Whitehurst,C.E. and Geppert,T.D. (1996). MEK1 and the extracellular signal-regulated kinases are required for the stimulation of IL-2 gene transcription in T cells. *J. Immunol.* 156, 1020-1029.

Williams,D.H., Woodrow,M., Cantrell,D.A., and Murray,E.J. (1995). Protein kinase C is not a downstream effector of p21ras in activated T cells. *Eur. J. Immunol.* 25, 42-47.

Wilson,D.J., Fortner,K.A., Lynch,D.H., Mattingly,R.R., Macara,I.G., Posada,J.A., and Budd,R.C. (1996). JNK, but not MAPK, activation is associated with Fas-mediated apoptosis in human T cells. *Eur. J. Immunol.* 26, 989-994.

Wisdom,R., Johnson,R.S., and Moore,C. (1999). c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J.* 18, 188-197.

Woodrow,M., Clipstone,N.A., and Cantrell,D. (1993). p21ras and calcineurin synergize to regulate the nuclear factor of activated T cells. *J. Exp. Med.* 178, 1517-1522.

Wu,J., Katzav,S., and Weiss,A. (1995). A functional T-cell receptor signaling pathway is required for p95vav activity. *Mol. Cell Biol.* 15, 4337-4346.

Wu,J., Motto,D.G., Koretzky,G.A., and Weiss,A. (1996). Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation. *Immunity.* 4, 593-602.

Xia,Z., Dickens,M., Raingeaud,J., Davis,R.J., and Greenberg,M.E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331.

Yang,X.J., Ogryzko,V.V., Nishikawa,J., Howard,B.H., and Nakatani,Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382, 319-324.

Yao,T.P., Ku,G., Zhou,N., Scully,R., and Livingston,D.M. (1996). The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 10626-10631.

Yaseen,N.R., Maizel,A.L., Wang,F., and Sharma,S. (1993). Comparative analysis of NFAT (nuclear factor of activated T cells) complex in human T and B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 268, 14285-14293.

Yuan,W., Condorelli,G., Caruso,M., Felsani,A., and Giordano,A. (1996). Human p300 protein is a coactivator for the transcription factor MyoD. *J. Biol. Chem.* 271, 9009-9013.

Zawel,L. and Reinberg,D. (1993). Initiation of transcription by RNA polymerase II: a

multi-step process. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 44, 67-108.

Zhang,R., Alt,F.W., Davidson,L., Orkin,S.H., and Swat,W. (1995). Defective signalling through the T- and B-cell antigen receptors in lymphoid cells lacking the vav proto-oncogene. *Nature* 374, 470-473.

Zhu,H., Joliot,V., and Prywes,R. (1994). Role of transcription factor TFIIF in serum response factor-activated transcription. *J. Biol. Chem.* 269, 3489-3497.

Zweifach,A. and Lewis,R.S. (1993). Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 6295-6299.

Veröffentlichungen

- Immunity, Vol. 10, 515-524, May, 1999
Andris Avots, Mathias Buttmann, Sergei Chuvpilo, Cornelia Escher, Ute Smola,
Andrew J. Bannister, Ulf R. Rapp, Tony Kouzarides, and Edgar Serfling
"CBP/p300 integrates Raf/Rac-signalling Pathways in the Transcriptional Induction of
NF-ATc during T Cell Activation"
- Vortrag auf der 13. Frühjahrstagung der deutschen Gesellschaft f. Immunologie 1997
Mathias Buttmann and Andris Avots, Edgar Serfling
"The role of MAP kinase pathways in the activation of NF-ATc" (abstract L13)

Danksagung

Ganz besonders herzlich möchte ich Herrn Prof. Edgar Serfling und Herrn Dr. Andris Avots danken. War doch die Zeit, die ich während der Anfertigung meiner Arbeit in diesem Labor verbringen durfte, wissenschaftlich und menschlich eine große Bereicherung für mich. Herrn Prof. Serfling danke ich speziell für die Überlassung des Themas und dafür, daß seine sehr freundliche Unterstützung nicht mit dem Abschluß der vorgestellten Untersuchungen beendet war, sondern er mir bis heute großzügig die Mitbenutzung seiner Laborräume und –ausrüstung zur Durchführung neuer Forschungsarbeiten als Mitglied der Neuroimmunologischen Arbeitsgruppe ermöglicht hat. Dr. Avots danke ich für sein unermüdliches Interesse am Fortkommen meiner Arbeit und dafür, daß auch er meiner Begeisterung für die Molekularbiologie stets neue Nahrung zu geben verstand. Immer war er daran interessiert, mir eine breite Ausbildung und ein fundiertes Verständnis zu vermitteln. Nie wurden ihm meine Fragen zu viel. Nach wie vor ist er mir ein wichtiger und äußerst anregender Diskussionspartner.

Das gute, von gegenseitiger Hilfsbereitschaft geprägte Klima in diesem Labor wird aber natürlich von allen geschaffen, die dort arbeiten. Besonders hervorheben möchte ich Frau Dr. Friederike Berberich-Siebelt, Herrn Dr. Stefan Klein-Heßling, Herrn Dr. Sergej Chuvpilo und Herrn PD Dr. Manfred Neumann, die mir alle nach wie vor lehrreiche, hilfreiche und hilfsbereite Gesprächs- und z.T. Kollaborationspartner sind. Ein besonderer Dank geht an Frau Ilona Petrowski, die in der Zellkultur wertvolle Arbeit geleistet hat.

Danken möchte ich auch Doreen Cantrell, Angelika Hoffmeyer, Egbert Flory, Patrick Matthias, Peter Shaw und vor allem auch Richard Eckner für großzügig zur Verfügung gestellte Reagenzien.

Zuletzt möchte ich mich noch bedanken bei Herrn Prof. Walter Sebald. Der Funkenschlag seiner Begeisterung hat mein Interesse für die Molekularbiologie entfacht.

Lebenslauf

Name: Mathias Buttman
Anschrift: Ernst-Reuter-Str. 16
97080 Würzburg
Geburtsdatum/ -ort: 17.12.1970, Freising/Obb.
Familienstand: verheiratet

9/1977 - 7/1981 GRUNDSCHULE, Gochsheim
9/1981 - 5/1990 CELTIS-GYMNASIUM, Schweinfurt
29.06.1990 Abitur
6/1990 - 8/1991 LEOPOLDINA-KRANKENHAUS, Schweinfurt
Zivildienst Neurologie
9/1991 - 7/99 HERMANN-ZILCHER-KONSERVATORIUM, Würzburg
29.04.1998 Staatliche Reifeprüfung „Berufsmusiker Violine“
9/1998 - 7/1999 Aufbaustudium Kammermusik
11/1992 - 11/1999 JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT, Würzburg
13.09.1994 Ärztliche Vorprüfung
29.08.1995 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03.09.1998 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/1998 - 9/1999 Praktisches Jahr Universitätsklinik Würzburg
17.11.1999 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/1996 – 3/1999 STUDIENSTIFTUNG DES DEUTSCHEN VOLKES
Stipendium
22.11.1999 REGIERUNG VON UNTERFRANKEN, Würzburg
Erteilung der vorläufigen Approbation
1/2000 bis 6/2001 NEUROLOGISCHE UNIVERSITÄTSKLINIK, Würzburg
Arzt im Praktikum
01.07.2001 REGIERUNG VON UNTERFRANKEN, Würzburg
Erteilung der Approbation
seit 7/2001 NEUROLOGISCHE UNIVERSITÄTSKLINIK, Würzburg
Assistenzarzt