

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ingolf Cascorbi)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Differenzielle Regulation des Wachstums neuronaler Zellen
durch Spleißvarianten der
Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kinase 4**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Leif Tüffers

aus **Berlin**

Kiel **2016**

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Thomas Herdegen

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Janka Held-Feindt

Tag der mündlichen Prüfung:

30. 05. 2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

23. 03. 2017

gez.: Prof. Dr. Peter Gohlke

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase 4 | 2 |
| 1.1.1. MAP2K4 aktivierende Stimuli und ihre Übertragung | 3 |
| 1.1.2. MAP2K4 als Aktivator von JNK | 4 |
| 1.1.3. MAP2K4 als Aktivator von p38 | 5 |
| 1.2. Physiologische und pathologische Funktionen von MAP2K4 | 6 |
| 1.3. Das PC12-Zellsystem | 7 |
| 1.4. Paclitaxel und MAP2K4 | 7 |
| 1.5. Fragestellung | 9 |
| 2. Material und Methoden | 10 |
| 2.1. Verbrauchsmaterialien | 10 |
| 2.2. Herstellung stabil transfizierter PC12-Zellen | 12 |
| 2.3. Kultivierung der PC12-Zellen | 13 |
| 2.3.1. Passage | 14 |
| 2.3.2. Bestimmung der Zellzahl | 14 |
| 2.3.3. Stimulation der Zellen mit Inhibitoren und Stressoren | 15 |
| 2.3.4. Auftauen und Einfrieren von Zellen | 15 |
| 2.4. Zählversuche | 15 |
| 2.5. 5-Bromo-2-Desoxyuridin – Assay | 16 |
| 2.6. RNA-Isolierung | 16 |
| 2.7. cDNA-Synthese | 17 |
| 2.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 18 |
| 2.8.1. Agarose-Gelelektrophorese | 19 |
| 2.9. Herstellung von Zelllysaten | 20 |
| 2.9.1. Ganzzelllyse | 20 |
| 2.9.2. Kern-Zytoplasma-Lyse | 21 |
| 2.9.3. Lyse für die Caspase-3-Aktivierung | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 2.9.4. Bestimmung der Proteinkonzentration _____ | 22 |
| 2.10. Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese _____ | 23 |
| 2.11. Western Blot _____ | 25 |
| 2.11.1. Strippen von Western Blot Membranen _____ | 28 |
| 2.11.2. Ponceau S – Färbung der Western Blot Membranen _____ | 28 |
| 2.12. Durchflusszytometrie _____ | 28 |
| 2.13. Statistische Auswertung _____ | 29 |
| 3. Ergebnisse _____ | 30 |
| 3.1. Identifikation von <i>MAP2K4δ</i> , einer unbekanntes Spleißvariante von <i>MAP2K4</i> ____ | 30 |
| 3.1.1. Nachweis der <i>MAP2K4δ</i> -mRNA in verschiedenen Spezies _____ | 30 |
| 3.2. Effekte von MAP2K4 und MAP2K4 δ unter unstimulierten Wachstumsbedingungen | 32 |
| 3.2.1. Synthese und Funktionalität der endogenen MAP2K4 und MAP2K4 δ ____ | 32 |
| 3.2.2. Einfluss von <i>MAP2K4</i> -Spleißvarianten auf die zelluläre Morphologie ____ | 32 |
| 3.2.3. Unter basalen Wachstumsbedingungen werden Transkriptionsfaktoren durch MAP2K4-Spleißvarianten differenziell reguliert _____ | 33 |
| 3.2.4. MAP2K4 beeinflusst die zelluläre Lokalisation der Transkriptionsfaktoren _ | 36 |
| 3.2.5. Die Regulation der Transkriptionsfaktoren wird durch die Aktivität der MAPK vermittelt _____ | 37 |
| 3.2.6. MAP2K4-Spleißvarianten haben gegensätzliche Effekte auf die Anzahl lebender Zellen _____ | 39 |
| 3.2.7. Beide <i>MAP2K4</i> -Spleißvarianten hemmen die intrinsische Apoptose _____ | 40 |
| 3.2.8. Die Hemmung der Apoptose ist durch JNK-Aktivität vermittelt _____ | 41 |
| 3.2.9. MAP2K4-Spleißvarianten haben entgegengesetzte Effekte auf die DNA- Synthese _____ | 42 |
| 3.2.10. <i>MAP2K4</i> -Spleißvarianten regulieren den G1/S-Checkpoint des Zellzyklus _ | 43 |
| 3.2.11. Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus _____ | 44 |
| 3.2.12. Übersicht über die Ergebnisse unter basalen Wachstumsbedingungen _____ | 45 |
| 3.3. Effekte von MAP2K4 und MAP2K4 δ bei Stimulation mit Paclitaxel _____ | 46 |
| 3.3.1. Paclitaxel aktiviert die MAP2K4-JNK-Signalkaskade _____ | 46 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.3.2. | <i>MAP2K4</i> δ -Überexpression resultiert in einer geringeren Zahl lebender Zellen nach Paclitaxel-Stimulation | 48 |
| 3.3.3. | Paclitaxel-Stimulation hat einen deutlichen Einfluss auf MAPK-assozierte Transkriptionsfaktoren | 49 |
| 3.3.4. | Paclitaxel führt zur Aktivierung der Apoptose | 52 |
| 3.3.5. | Paclitaxel unterdrückt die zelluläre Proliferation | 53 |
| 3.3.6. | Zusammenfassung der Ergebnisse unter Paclitaxel-Stimulation | 55 |
| 4. | Diskussion | 56 |
| 4.1. | Stabile Überexpression als Methode zur Untersuchung der Proteinfunktion | 56 |
| 4.2. | Das PC12-Zellsystem | 57 |
| 4.3. | Mögliche Effekte der Insertion in <i>MAP2K4</i> δ | 58 |
| 4.4. | <i>MAP2K4</i> und <i>MAP2K4</i> δ regulieren die zelluläre Proliferation unter basalen Wachstumsbedingungen | 59 |
| 4.4.1. | <i>MAP2K4</i> und <i>MAP2K4</i> δ aktivieren JNK und p38 | 60 |
| 4.4.2. | Regulation der Aktivatorprotein-1-Aktivität durch <i>MAP2K4</i> -Spleißvarianten | 61 |
| 4.4.3. | Gegensätzliche Effekte von <i>MAP2K4</i> und <i>MAP2K4</i> δ auf die Zellzahl | 63 |
| 4.4.4. | Regulation der zellulären Proliferation durch <i>MAP2K4</i> und <i>MAP2K4</i> δ | 64 |
| 4.4.5. | Regulation der Apoptose durch <i>MAP2K4</i> und <i>MAP2K4</i> δ | 68 |
| 4.5. | Signaltransduktion durch <i>MAP2K4</i> -Spleißvarianten nach Stimulation mit Paclitaxel | 71 |
| 4.5.1. | Effekte von Paclitaxel auf die MAPK-Signalkaskade in PC12-Zellen | 71 |
| 4.5.2. | <i>MAP2K4</i> und <i>MAP2K4</i> δ vermitteln die JNK-Aktivierung als Antwort auf Paclitaxel | 72 |
| 4.6. | Ausblick | 75 |
| 5. | Zusammenfassung | 76 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 78 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Struktur von MAP2K4..... | 3 |
| Abbildung 2: Die MAPK-Signalkaskade | 4 |
| Abbildung 3: Primärsequenzen von MAP2K4 und MAP2K4 δ | 31 |
| Abbildung 4: Nachweis der <i>MAP2K4</i> -Spleißvarianten | 31 |
| Abbildung 5: Synthese und Aktivierung von MAP2K4 und MAP2K4 δ | 32 |
| Abbildung 6: Morphologie der Zelllinien..... | 33 |
| Abbildung 7: MAP2K7, JNK und p38 unter normalen Wachstumsbedingungen..... | 34 |
| Abbildung 8: Transkriptionsfaktoren unter normalen Wachstumsbedingungen | 34 |
| Abbildung 9: Intrazelluläre Verteilung der Transkriptionsfaktoren | 36 |
| Abbildung 10: Transkriptionsfaktoren unter dem Einfluss von MAPK-Hemmern | 38 |
| Abbildung 11: Viabilität der Zellen unter normalen Wachstumsbedingungen | 39 |
| Abbildung 12: Apoptose-regulierende Proteine unter normalen Wachstumsbedingungen ... | 40 |
| Abbildung 13: Apoptose-regulierende Proteine unter MAPK-Hemmung | 41 |
| Abbildung 14: BrdU-Inkorporation unter normalen Wachstumsbedingungen | 42 |
| Abbildung 15: Zellzyklusregulatoren unter normalen Wachstumsbedingungen | 43 |
| Abbildung 16: Zellzyklusphasen unter normalen Wachstumsbedingungen | 44 |
| Abbildung 17: Konzentrations- und Zeitreihe der Paclitaxel-Stimulation..... | 47 |
| Abbildung 18: Viabilität der stabil transfizierten Zellen unter Stimulation..... | 48 |
| Abbildung 19: MAP2K und MAPK unter Stimulation..... | 50 |
| Abbildung 20: Transkriptionsfaktoren unter Paclitaxel-Stimulation | 51 |
| Abbildung 21: Apoptose-regulierende Faktoren unter Paclitaxel-Stimulation | 52 |
| Abbildung 22: BrdU-Inkorporation und DNA-Synthese nach Stimulation | 53 |
| Abbildung 23: Zellzyklusproteine unter Stimulation | 54 |
| Abbildung 24: Schematisches Modell der MAP2K4-Signaltransduktion unter basalen Wachstumsbedingungen | 67 |
| Abbildung 25: Schematisches Modell der Signaltransduktion durch <i>MAP2K4</i> -Spleißvarianten unter Paclitaxel-Stimulation | 74 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-------------|--|----|
| Tabelle 1: | Chemikalien und Verbrauchsmaterial | 10 |
| Tabelle 2: | Zusammensetzung des Zellkulturmediums | 13 |
| Tabelle 3: | Übersicht über die verwendeten Kulturschalen..... | 14 |
| Tabelle 4: | Primer und Parameter der PCR | 18 |
| Tabelle 5: | Zusammensetzung des PCR Master Mix | 19 |
| Tabelle 6: | Zusammensetzung des 10x TBE-Puffers (Agarose-Gelelektrophorese)..... | 19 |
| Tabelle 7: | Zusammensetzung des 10x <i>Loading Buffer</i> (Agarose-Gelelektrophorese)..... | 19 |
| Tabelle 8: | Zusammensetzung des 2x-DLB-Puffers (Ganzzelllyse) | 21 |
| Tabelle 9: | Zusammensetzung des Puffers für die Kern-Plasma-Lyse..... | 21 |
| Tabelle 10: | Zusammensetzung des Puffers zur Caspase-3-Lyse | 22 |
| Tabelle 11: | Zusammensetzung der Trenngele (SDS-PAGE)..... | 23 |
| Tabelle 12: | Zusammensetzung der Sammelgele (SDS-PAGE) | 24 |
| Tabelle 13: | Zusammensetzung des 5x <i>Sample Buffer</i> (SDS-PAGE)..... | 24 |
| Tabelle 14: | Zusammensetzung der Elektrophoresepuffer-Stammlösung (SDS-PAGE)..... | 25 |
| Tabelle 15: | Zusammensetzung der Puffer für den Western Blot | 25 |
| Tabelle 16: | Zusammensetzung des TBST-Puffers (Western Blot)..... | 26 |
| Tabelle 17: | Liste der verwendeten Antikörper..... | 27 |
| Tabelle 18: | Zusammensetzung der <i>Stripping Solution</i> | 28 |
| Tabelle 19: | Zusammensetzung der Propidiumiodid-Lösung (Durchflusszytometrie) | 29 |
| Tabelle 20: | Zusammenfassung der Ergebnisse unter unstimulierten Bedingungen..... | 45 |
| Tabelle 21: | Zusammenfassung der Effekte der MAPK | 46 |
| Tabelle 22: | Zusammenfassung der Ergebnisse unter Stimulation | 55 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|---|
| ANOVA | Varianzanalyse (<i>ANalysis Of VAriance</i>) |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| Aqua bd. | Bidestilliertes Wasser |
| ASK | Apoptosesignal-regulierende Kinase |
| ATF-2 | Aktivierender Transkriptionsfaktor 2 |
| Bcl-2 | <i>B-Cell Lymphoma 2</i> - Protein |
| BrdU | Bromodesoxyuridin |
| BS | <i>Blocking Solution</i> |
| CD | <i>Common Docking</i> (Domäne) |
| CD 40 | <i>Cluster of Differentiation 40</i> (Protein) |
| CDK | Cyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin-dependent Kinase</i>) |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CHAPS | (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat) |
| DLB | <i>Denaturing Lysis Buffer</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DTT | Dithiotreitol |
| DVD | <i>Domain for Versatile Docking</i> |
| ECL | Elektrochemilumineszenz |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| eGFP | <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> |
| ERK | <i>Extracellular signal-regulated Kinase</i> |
| FACS | Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>) |
| HEPES | Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure |
| IL-1 | Interleukin 1 |
| JNK | c-Jun N-terminale Kinase |
| JNKK1 | c-Jun N-terminale Kinase-Kinase 1 (= MAP2K4) |
| <i>ko</i> | <i>knockout</i> |
| kDa | Kilodalton |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Proteinkinase |
| MAP2K | Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase |
| MAP3K | Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase |
| Mdm2 | <i>Murine double minute 2</i> - Protein |

| | |
|--------------|---|
| MEKK | MAPK/ERK Kinase-Kinase |
| MLK | <i>Mixed Lineage Kinase</i> |
| MSK | Mitogen- und Stress-aktivierte Proteinkinase |
| NGF | <i>Nerve Growth Factor</i> |
| pAK | Primärer Antikörper |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| PIPES | Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure) |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute (Medium) |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase – Polymerase-Kettenreaktion |
| sAK | Sekundärer Antikörper |
| SDS | Natriumlaurylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>) |
| SDS-PAGE | Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| SEK1 | <i>Stress-activated / Extracellular signal-regulated kinase kinase 1</i> (= MAP2K4) |
| TAK | TGF- β -aktivierte Kinase |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| TBST | <i>Tris Buffered Saline</i> -Puffer mit Tween [®] 20 |
| TGF- β | <i>Transforming Growth Factor</i> β |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| TNF α | Tumornekrosefaktor α |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |

1. Einleitung

Die Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) bildet einen wichtigen Mechanismus der Übersetzung extrazellulärer Signale in eine zelluläre Antwort. Ein zentrales Element, das sich in allen eukaryotischen Lebensformen nachweisen lässt (Ahn und Krebs 1990, Widmann *et al.* 1999), ist dabei die mehrstufige Anordnung dieser Serin-/Threonin-Kinasen. In Säugetierzellen konnten drei Hauptgruppen von MAPK nachgewiesen werden: die *extracellular signal-regulated kinases* (ERK, Boulton *et al.* 1990), die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK, Pombo *et al.* 1994) und die Gruppe der p38-Kinasen (p38, Lee *et al.* 1994).

MAPK werden durch Phosphorylierung aktiviert. Die dafür verantwortlichen MAPK-Kinasen (MAP2K) werden wiederum durch spezielle MAPK-Kinase-Kinasen (MAP3K) phosphoryliert und aktiviert (s. Abbildung 2). Dieser dreigliedrige Aufbau im Zentrum der Signalkaskade ermöglicht nicht nur die Einbindung einer großen Anzahl von Signalen, sondern auch eine Signalverstärkung (Widmann *et al.* 1999). Zu den Zielstrukturen aktivierter MAPK gehören unter anderem Transkriptionsfaktoren, Proteine des Zytoskeletts und Regulatoren von Apoptose und Proliferation, über die die MAPK Einfluss auf Genexpression, Proteinsynthese, Überleben und Differenzierung der Zelle ausüben (Kyriakis und Avruch 2001, Cuadrado und Nebreda 2010).

In ihrer Gesamtheit bieten die bekannten MAPK-Signalwege der Zelle somit die Möglichkeit, auf verschiedenste Signale zu reagieren. Dies sind vor allem Wachstumsfaktoren, Entzündungsmediatoren und zelluläre Stressoren, wie z.B. ultraviolette Strahlung oder fehlerhafte Proteinbiosynthese. Die zellulären Antworten können von verstärkter Proliferation über die Produktion inflammatorischer Mediatoren oder Differenzierung neuronaler Zellen bis hin zur Apoptose reichen (Kyriakis und Avruch 2012, Waetzig *et al.* 2006). Nicht zuletzt spielen MAPK auch eine Rolle bei der Entstehung von Tumoren, häufigen neurodegenerativen Erkrankungen und anderen Krankheiten sowie deren Therapie (Dhillon *et al.* 2007, Kim und Choi 2010, Boldt *et al.* 2002).

Die Vielzahl an beteiligten Proteinen, auslösenden Signalen und möglichen Auswirkungen macht eine eindeutige Zuordnung bestimmter Effekte zu einzelnen Teilen der Signalkaskade weiterhin sehr schwierig. So kann die Aktivierung von MAPK unter anderem sowohl die Apoptose einleiten als auch die zelluläre Proliferation beschleunigen. Die Regulation dieser gegensätzlichen Effekte ist bisher trotz intensiver Forschung nicht geklärt.

1.1. Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase 4

Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase 4 (MAP2K4, ältere Bezeichnungen: MEK4, MKK4) wurde erstmals 1993 in Embryos des Krallenfrosches *Xenopus laevis* identifiziert und bald darauf auch in menschlichen Zellen nachgewiesen (Yashar *et al.* 1993, Sanchez *et al.* 1994, Derijard *et al.* 1995, Lin *et al.* 1995). Sie wurde zunächst JNK-Kinase 1 (JNKK1) genannt. In der Literatur findet sich weiterhin der Name SEK1. Das *MAP2K4*-Gen kodiert für ein stark konserviertes 399 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 43 kDa (Lin *et al.* 1995). Die in dieser Arbeit untersuchte MAP2K4 der Ratte unterscheidet sich dabei nur in 6 Positionen von der des Menschen (s. Abbildung 3, Seite 31).

Im Gegensatz zu den meisten anderen Komponenten der MAPK-Kaskade, z.B. JNK (Gupta *et al.* 1996) oder auch MAP2K7 (Tournier *et al.* 1999), wurden für MAP2K4 in Säugetierzellen bisher keine Spleißvarianten beschrieben. Während der Vorbereitungen zu dieser Arbeit wurde jedoch eine um 33 Basen verlängerte Spleißvariante aus PC12-Zellen kloniert und sequenziert (s. Kapitel 3.1).

Im molekularen Aufbau zeigt MAP2K4 eine zentrale katalytische Domäne, vergleichbar mit anderen Serin-/Threonin-Kinasen (s. Abbildung 1). Darin befindet sich das Aktivierungsmotiv Ser-Ile-Ala-Tyr-Thr (S-I-A-K-T), das durch verschiedene MAP3K an Serin und Threonin phosphoryliert wird (Derijard *et al.* 1995). Die dabei stattfindende Interaktion wird von Seiten der MAP2K4 durch die sogenannte DVD-Domäne (*domain for versatile docking*) ermöglicht, die sich C-terminal der katalytischen Domäne befindet (Takekawa *et al.* 2005).

MAP2K4 hat als einzige MAP2K die Fähigkeit, zwei verschiedene Gruppen von MAPK zu binden und zu aktivieren, nämlich JNK und p38 (Lin *et al.* 1995). N-terminal von der katalytischen Domäne findet sich die D-Domäne (*docking domain*, auch: *D-site*) mit der MAP2K4 ihre Substrate bindet (Ho *et al.* 2003). Vergleichbare D-Domänen finden sich auch in anderen MAP2K sowie zahlreichen Substraten der MAPK (Tanoue und Nishida 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass MAP2K4 auch Bindestelle und Bestandteil mehrerer Signalosomen ist (Zanke *et al.* 1996). Diese Proteinkomplexe stellen eine Interaktionsmöglichkeit innerhalb der MAPK-Kaskaden dar, wobei sich mehrere beteiligte Enzyme zusammenfinden um eine effektive und besser steuerbare Signalübertragung zu ermöglichen. Eine Rolle können dabei auch Gerüstproteine, sogenannte *scaffold proteins*, spielen (Haeusgen *et al.* 2011a, Nakagawa *et al.* 2010, Li *et al.* 2009).

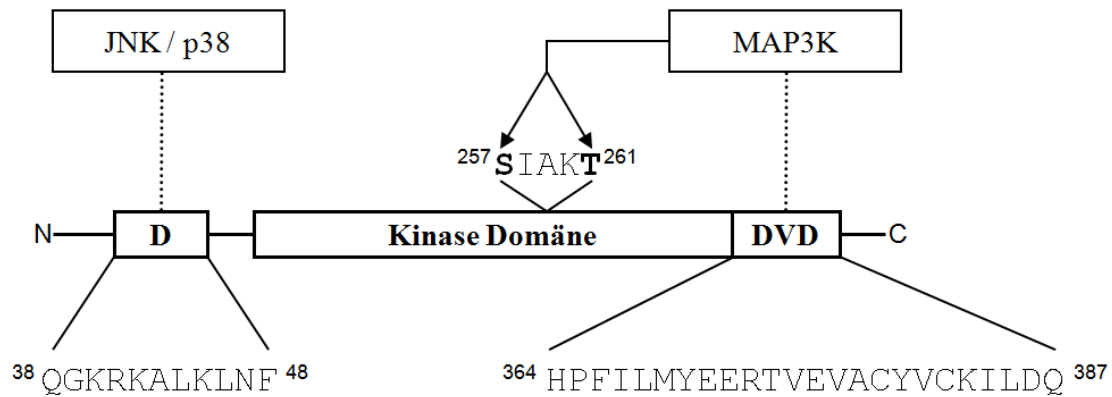


Abbildung 1: Struktur von MAP2K4

N-terminal gelegen die D-Domäne (D), C-terminal die *domain for versatile docking* (DVD). Darunter jeweils die zugehörige Primärsequenz. Gepunktete Linien zeigen die an die jeweiligen Domänen bindenden Substrate. Pfeile: durch MAP3K phosphorylierte Reste Serin257 und Threonin261 innerhalb des SIAKT-Motivs.

1.1.1. MAP2K4 aktivierende Stimuli und ihre Übertragung

Die Stimuli, die letztendlich über MAP2K4 weitergeleitet werden, sind vielfältig und umfassen sowohl intra- als auch extrazelluläre Reize (s. Abbildung 2). So wird MAP2K4 beispielsweise durch UV-Bestrahlung und Veränderungen des osmotischen Gleichgewichts aktiviert (Lin *et al.* 1995, Lawler *et al.* 1997). Auch durch pharmakologische Hemmung der Translation entsteht eine zelluläre Antwort über MAP2K4 (Sanchez *et al.* 1994). Bei der Signaltransduktion von Zytokinen wie TNF α ist MAP2K4 ebenfalls involviert, spielt aber gegenüber MAP2K7 nur eine untergeordnete Rolle (Lawler *et al.* 1998, Tournier *et al.* 2001). Auch für die Wirkung einiger Medikamente, insbesondere Chemotherapeutika, ist MAP2K4 wichtig. Mehrere häufig eingesetzte Spindelgifte wie Paclitaxel und Vincristin lösen über die Aktivierung von MAP2K4 Apoptose aus (s. Kapitel 1.4) und führen zum erhofften Ergebnis in der Therapie von Malignomen (Wang *et al.* 1998).

Die Übertragung dieser und zahlreicher weiterer Signale auf MAP2K4 erfolgt durch die große Gruppe der MAP3K. Einige Mitglieder dieser Gruppe, beispielsweise MEKK, MLK oder ASK, haben MAP2K4 als Substrat und phosphorylieren es am o.g. SIAKT-Motiv (Cuenda 2000, Kyriakis und Avruch 2012). Während die Interaktionen von MAP3K mit membranständigen Rezeptoren wie CD 40 oder dem IL-1-Rezeptor in vielen Fällen aufgeklärt sind, ist die genaue Signalübertragung zellulärer Stressoren auf MAPK-Kernmodule nur lückenhaft bekannt.

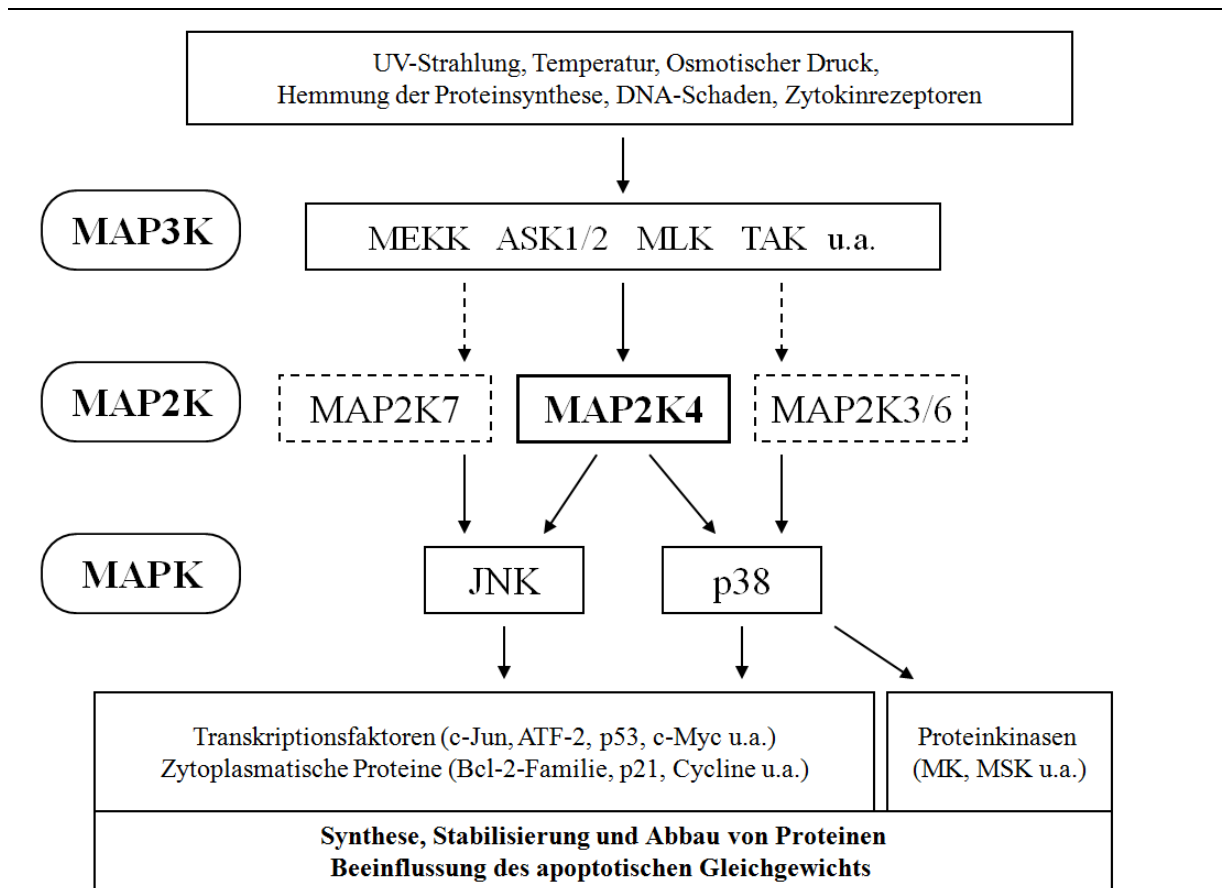


Abbildung 2: Die MAPK-Signalkaskade

Übersicht über die Stellung von MAP2K4 innerhalb der MAPK-Signalkaskade mit aktivierenden Stimuli oben und möglichen über JNK und p38 ausgeübten Effekten unten. Parallele Aktivierungswege über weitere MAP2K gestrichelt. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Angegebene Stimuli und Substrate sind exemplarisch und beziehen sich insbesondere auf in dieser Arbeit untersuchte Zusammenhänge.

1.1.2. MAP2K4 als Aktivator von JNK

Die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) sind eine Gruppe von MAPK, die vor allem die zelluläre Antwort auf Stressoren wie Veränderungen des osmotischen Drucks oder der Temperatur, falsch gefaltete Proteine und einige inflammatorische Mediatoren koordinieren (Weston und Davis 2007). Dabei werden zum einen diverse Transkriptionsfaktoren aktiviert; allen voran der namensgebende c-Jun (Pombo *et al.* 1994), zum anderen nehmen JNK Einfluss auf das Gleichgewicht der Apoptose-regulierenden Faktoren und können so über das Überleben der Zelle entscheiden (Yamamoto *et al.* 1999, Ahmed und Milner 2009). In neuronalen Zellen und Zellen der Immunabwehr übernehmen JNK auch zentrale Rollen in der Differenzierung und Reifung (Waetzig *et al.* 2006, Dong *et al.* 1998).

Aus den Transkripten der drei bekannten Gene *JNK1*, *JNK2* und *JNK3* entstehen durch alternatives Spleißen zehn verschiedene Varianten der Isoformen JNK1, JNK2 und JNK3 (Gupta *et al.* 1996). Diese unterscheiden sich unter anderem in der Verteilung: JNK 1 und 2 finden sich in allen Körperzellen, während *JNK3* nur in ZNS, Hoden und Herz exprimiert wird. MAP2K4 interagiert mit allen bisher untersuchten Spleißvarianten der JNK (Zanke *et al.* 1996, Xia *et al.* 1998, Lisnock *et al.* 2000). Die Bindung erfolgt von Seiten der MAP2K durch die bereits erwähnte D-Domäne, von Seiten der MAPK durch die sogenannte *CD (common docking) domain* in Kooperation mit der *ED (Glutamat-Aspartat) site* (Tanoue und Nishida 2003).

JNK werden, wie auch MAP2K, durch duale Phosphorylierung aktiviert. Das dafür vorgesehene Motiv enthält einen Tyrosin- und einen Threonin-Rest als Empfänger der Phosphatgruppen (Davis 1994). JNK binden von allen verfügbaren MAP2K nur MAP2K4 und MAP2K7, die sich die Aufgabe der Aktivierung teilen (Moriguchi *et al.* 1995, Lawler *et al.* 1998, Bardwell *et al.* 2009). MAP2K4 phosphoryliert primär den Tyrosinrest, kann jedoch auch an Threonin wirken (Lawler *et al.* 1998). MAP2K7 überträgt eine Phosphatgruppe auf den Threoninrest, was in einigen Zellreihen der wichtigere Schritt zu sein scheint (Tournier *et al.* 2001). Der genaue Ablauf scheint jedoch sowohl von der untersuchten Zellreihe als auch vom auslösenden Stimulus abzuhängen (Wada *et al.* 2001).

1.1.3. MAP2K4 als Aktivator von p38

Auch die Gruppe der p38-MAPK überträgt vor allem Stresssignale in eine zelluläre Antwort. Unter den Stimuli, die p38 aktivieren, finden sich UV-Bestrahlung und oxidativer Stress, doch p38 ist auch in die Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren eingebunden (Cuadrado und Nebreda 2010). Die Substrate der aktiven p38 umfassen sowohl Transkriptionsfaktoren als auch weitere Kinasen und andere zytoplasmatische Proteine (Kyriakis und Avruch 2012). Menschliche p38-MAPK liegen in 4 Isoformen namens *p38 α* , *p38 β* , *p38 γ* und *p38 δ* mit unterschiedlichen Expressionsmustern und teilweiser funktioneller Redundanz vor. Eine Interaktion von MAP2K4 mit *p38 α* konnte wiederholt beobachtet werden, während die Aktivierung von *p38 β* , *p38 γ* und *p38 δ* weniger eindeutig ist (Brancho *et al.* 2003, Enslen *et al.* 1998).

Analog zu JNK wird auch p38 durch duale Phosphorylierung an Threonin und Tyrosin aktiviert. Die wichtigsten Aktivatoren von p38 sind MAP2K3 und MAP2K6 (Enslen *et al.* 1998). Jedoch konnte gezeigt werden, dass auch in Zellen, die diese Enzyme nicht

synthetisieren können, eine p38-Aktivierung nach bestimmten Stressoren erfolgte, und dass diese Aktivierung durch MAP2K4 vermittelt wurde (Brancho *et al.* 2003, Wang *et al.* 2012). In anderen Experimenten war MAP2K4 dagegen nicht notwendig, um p38 zu aktivieren (Nishina *et al.* 1997b). Alles in allem scheint die Rolle der MAP2K4 in der p38-Signalkaskade vom untersuchten Zelltyp und vom benutzten Stressor abzuhängen und die Frage, ob MAP2K4 hier nur eine zu MAP2K3 und 6 redundante Rolle einnimmt, ist vor allem *in vivo* noch nicht ausreichend geklärt.

1.2. Physiologische und pathologische Funktionen von MAP2K4

Schon in der frühen Embryonalphase übernimmt MAP2K4 zentrale Aufgaben. Im Mausmodell waren MAP2K4-*knockout*-Embryos nicht lebensfähig und starben spätestens 14 Tage nach der Befruchtung an fehlerhafter Hepatogenese und an Anämie (Yang *et al.* 1997, Ganiatsas *et al.* 1998). Auch in der Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten scheint MAP2K4 eine Rolle zu spielen, dabei scheint besonders die Interaktion mit p38 wichtig zu sein (Wang *et al.* 2012).

Während der Embryonalentwicklung können hohe MAP2K4-Spiegel im gesamten ZNS nachgewiesen werden, insbesondere in Hippocampus, Cortex und den Purkinje-Zellen des Kleinhirns. Ein vorübergehender zweiter Schwerpunkt liegt in der sich entwickelnden Leber. Nach der Geburt bleibt die *MAP2K4*-mRNA im ZNS stärker nachweisbar als in anderen Organen (Lee *et al.* 1999).

Auch die Rolle von MAP2K4 innerhalb des Immunsystems wurde bereits intensiv erforscht, jedoch kam es dabei teils zu widersprüchlichen Ergebnissen. Während eine Arbeitsgruppe der Kinase eine wichtige Funktion in der Reifung von B-Lymphozyten zuschrieb (Nishina *et al.* 1997a), wurde dieser Zusammenhang in einer anderen Arbeit nicht nachgewiesen und MAP2K4 stattdessen mit polyklonaler Lymphozytenexpansion in Verbindung gebracht (Swat *et al.* 1998).

Die Signalwege über JNK und p38 sind an zahlreichen Krankheitsprozessen beteiligt. Besondere Aufmerksamkeit verdient dabei ihre Rolle bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen, von Diabetes mellitus und verschiedenen Malignomen (Kim und Choi 2010, Whitmarsh und Davis 2007). Damit ist auch die Beteiligung von MAP2K4 an diesen Prozessen wahrscheinlich und in vielen Fällen auch belegt, obwohl die genauen pathophysiologischen Abläufe oftmals nicht im Detail geklärt sind.

Insbesondere bei der Entstehung von Malignomen ist MAP2K4 aufgrund seiner möglichen Beeinflussung von Proliferation und Apoptose, sowie in der Wirkung von Chemotherapeutika, von Interesse. Dabei gibt es einerseits Belege für eine Funktion als Tumorsuppressor und Unterdrücker von Metastasierung (Yoshida *et al.* 1999, Lotan *et al.* 2008), andererseits jedoch auch als entartungsfördernder Faktor (Cunningham *et al.* 2006). Insgesamt gesehen scheint das Resultat der MAP2K4-Aktivierung in dieser Hinsicht von Zelltyp, Umgebungsfaktoren und Stadium des Tumors abzuhängen. Daher lässt sich MAP2K4 nicht ohne weiteres klar als karzinogen oder antiproliferativ einordnen (Whitmarsh und Davis 2007).

Aufgrund der vielfältigen Funktionen von MAP2K4 und ihrer Substrate in der Pathophysiologie der genannten Erkrankungen stellt sich die Frage, ob eine medikamentöse Beeinflussung dieser Enzyme neue therapeutische Möglichkeiten, beispielsweise in der Chemotherapie maligner Tumoren, der Verhinderung neurodegenerativer Erkrankungen oder der Beeinflussung autoimmuner Prozesse bieten könnte.

1.3. Das PC12-Zellsystem

PC12-Zellen wurden aus einem Phäochromozytom der Ratte isoliert und sind bereits seit einigen Jahrzehnten ein viel genutztes Zellsystem (Greene und Tischler 1976). Durch Behandlung mit *nerve growth factor* (NGF) wird ihre ansonsten regelmäßige Proliferation gestoppt und die Zellen differenzieren in einen Phänotyp, der mit seinen zahlreichen dendritischen Ausläufern sympathischen Neuronen ähnelt (Greene und Tischler 1976). Daher werden PC12-Zellen als Modell für neuronale Differenzierung und die Prozesse der neuronalen Apoptose im Rahmen von Erkrankungen verwendet.

Für den Ablauf der Apoptose und der NGF-abhängigen Differenzierung ist in PC12-Zellen die Aktivierung von MAPK-Signalkaskaden unerlässlich. Dabei können einzelne MAPK gemeinsam, aber auch entgegengesetzt wirken (Xia *et al.* 1995, Waetzig und Herdegen 2003a). Die Behandlung von PC12-Zellen mit verschiedenen Stressoren wie UV-Bestrahlung oder Paclitaxel ist dabei etabliert (Waetzig und Herdegen 2003b, Haeusgen *et al.* 2010).

1.4. Paclitaxel und MAP2K4

Paclitaxel ist ein Spindelgift natürlichen Ursprungs (*Taxus brevifolia*). Es verhindert die Depolymerisation von Mikrotubuli und stört damit die Ausbildung des mitotischen Spindelapparates, was zur Einleitung der Apoptose führt. Diese zytotoxische Wirkung hat zu

einer breit gefächerten Anwendung in der antineoplastischen Pharmakotherapie geführt. Paclitaxel ist unter anderem ein fester Bestandteil der Chemotherapie von gynäkologischen Tumoren und Bronchialkarzinomen (Suh *et al.* 2014, Al-Farsi und Ellis 2014). Aber auch die in der Angioplastie eingesetzten *drug-eluting stents* sind teils mit Paclitaxel beschichtet (Yan *et al.* 2014). Die Störung der Funktion der Mikrotubuli kann jedoch als Nebenwirkung auch zu einer ausgeprägten peripheren Neuropathie führen (Baas und Ahmad 2013).

Auf zellulärer Ebene ist bekannt, dass Paclitaxel über die Störung der Mikrotubuli den G2/M-Checkpoint des Zellzyklus aktiviert, dadurch den Zellzyklus stoppt und Apoptose auslöst (Wang *et al.* 1998, Yamamoto *et al.* 1999). Der genaue Weg der Signalübertragung ist nicht im Detail aufgeklärt, die MAPK JNK und p38 scheinen aber eine wichtige Rolle zu spielen (Waetzig und Herdegen 2003b, Deacon *et al.* 2003). Dementsprechend wird auch MAP2K4 durch Paclitaxel aktiviert (Wang *et al.* 1998, Stone und Chambers 2000). Daher kann Paclitaxel, wie in dieser Arbeit, eingesetzt werden um diese Signalkaskade zu aktivieren. Die genaue Signaltransduktion zwischen Mikrotubuli und MAPK-Kaskade ist noch nicht bekannt. Die MAP3K ASK1, die auch mit MAP2K4 interagiert, wird durch Taxane aktiviert und stellt eine mögliche Verbindung dar (Wang *et al.* 1999).

Die Aufklärung der genauen Signaltransduktion und Apoptose-auslösenden Mechanismen durch Paclitaxel in neuronalen Zellen kann dazu beitragen, dieses Medikament in seiner chemotherapeutischen Funktion zu optimieren. Insbesondere kann ein detaillierteres Verständnis der Schädigung von neuronalen Zellen neue Möglichkeiten zur Vermeidung der Nebenwirkungen eröffnen.

1.5. Fragestellung

Als zentraler Regulationsmechanismus zahlreicher zellulärer Funktionen werden die MAPK-Kaskaden seit vielen Jahren untersucht. Dabei wurden jedoch vielfach widersprüchliche Ergebnisse, insbesondere in Bezug auf die Rolle der MAPK bei der Regulation von Proliferation und Zelltod, berichtet. Eine Klärung dieser Widersprüche und ein genaueres Verständnis der Mechanismen können zum Verständnis von pathophysiologischen Prozessen, die durch zellulären Stress und maligne Entartung ausgelöst werden, beitragen. Im Bereich des Nervensystems sind dies insbesondere Ischämien und neurodegenerative Prozesse wie das Parkinson-Syndrom oder dementielle Erkrankungen. Eine detaillierte Aufklärung der Signaltransduktion kann in zukünftigen Schritten eine gezieltere pharmakologische Therapie ermöglichen oder zum Beispiel Nebenwirkungen an Nervenzellen reduzieren.

In dieser Arbeit sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Bewirkt die Überexpression einzelner Spleißvarianten von *MAP2K4* einen bestimmten Phänotyp in PC12-Zellen?
- Welchen Effekt haben einzelne *MAP2K4*-Spleißvarianten auf die Proliferation und die Apoptose neuronaler Zellen unter basalen und gestressten Wachstumsbedingungen?
- Wie wirkt sich die verstärkte Expression von *MAP2K4* und der bislang unbeschriebenen Spleißvariante auf die beiden MAPK JNK und p38 aus?
- Wie beeinflussen die Spleißvarianten von *MAP2K4* die über JNK vermittelte Signaltransduktion, zum Beispiel die intrazelluläre Konzentration und die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und Apoptose-regulierenden Proteinen?
- Bieten die *MAP2K4*-Spleißvarianten einen Ansatz zur Erklärung/Aufklärung der pleiotropen MAPK-Effekte in neuronalen Zellen?

2. Material und Methoden

2.1. Verbrauchsmaterialien

Die folgende Tabelle enthält eine Übersicht der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien. Alle Chemikalien hatten den Reinheitsgrad *pro analysi*.

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Lösungen in bidestilliertem Wasser, welches im Folgenden als „Aqua bd.“ bezeichnet wird, hergestellt. Für die Destillation wurde die Anlage Seradest RO-25 compact / Seralpur Pro90CN (Seral, Ransbach-Baumbach) benutzt.

Tabelle 1: Chemikalien und Verbrauchsmaterial

| Chemikalie / Material | Hersteller |
|--|--------------------------------------|
| Agarose | Lonza, Köln |
| 6-Aminohexansäure | Merck-Schuchardt, Hohenbrunn |
| Acrylamid / Bis-Acrylamid – Lösung (30%) | BioRad, München |
| Aprotinin | Sigma, München |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Merck, Darmstadt |
| β-Mercaptoethanol | Sigma, München |
| Biofreeze - Einfriermedium | Biochrom, Berlin |
| Borsäure | Merck, Darmstadt |
| Broad Range Prestained Protein Marker | New England Biolabs, Frankfurt a. M. |
| Bromphenolblau | Merck, Darmstadt |
| CASYton isotonische Salzlösung | Schärfe System, Hamburg |
| Cell Proliferation Assay, BrdU (colorimetric) Kit | Roche, Mannheim |
| 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS) | Merck, Darmstadt |
| DreamTaq | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| DreamTaq 10x buffer | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck, Darmstadt |
| dNTP Mix | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| Dithiotreitol (DTT) | Invitrogen, Karlsruhe |
| Durchflusszytometrie - Röhrchen | Sarstedt, Nümbrecht |
| Dye - Reagent | BioRad, München |
| ECL Plus Reagent | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ethanol | Carl Roth, Karlsruhe |

| Chemikalie / Material | Hersteller |
|---|------------------------------------|
| Ethidiumbromid | Carl Roth, Karlsruhe |
| FastRuler™ DNA Ladder, low range | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| Fetales Kälberserum | Biochrom, Berlin |
| Filterpapier | Whatman, Maidstone, UK |
| G418 - Lösung | Biochrom, Berlin |
| Glycerol | Merck, Darmstadt |
| Glycin | Merck, Darmstadt |
| Chlorwasserstoffsäure (HCl) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure (HEPES) | Merck, Darmstadt |
| Hyperfilm ECL | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Kaliumchlorid (KCl) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Kanüle (21G, Microlance™ 3) | Becton-Dickinson, Heidelberg |
| Kollagen - Lösung | Biochrom, Berlin |
| Kryoröhrchen (2 ml) | Sarstedt, Nümbrecht |
| Küvette (1 cm Dicke) | Sarstedt, Nümbrecht |
| Leupeptin | Sigma, München |
| Magermilchpulver | Uelzena, Uelzen |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Methanol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumchlorid (NaCl) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumcitrat | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Nonidet P40 | Fluka Chemie, Buchs, Schweiz |
| Paclitaxel | Calbiochem, Darmstadt |
| <i>Phosphate Buffered Saline</i> , ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ (PBS, 10x) | PAA, Cölbe |
| Penicillin / Streptomycin - Lösung | PAA, Cölbe |
| Pepstatin | Sigma, München |
| Pferdeserum | Biochrom, Berlin |
| Phosphatase Inhibitor Cocktail II (Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure) (PIPES) | Sigma, München |
| Pipetten, steril (5 ml, 10 ml, 25 ml) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl) | Sarstedt, Nümbrecht |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | Sarstedt, Nümbrecht |
| Polyvinylidenfluorid-Membran (Immobilon P) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ponceau S | Millipore, Eschborn |
| | Sigma, München |

| Chemikalie / Material | Hersteller |
|---|------------------------------------|
| Propidiumiodid | Carl Roth, Karlsruhe |
| Proteinstandard II | BioRad, München |
| Reaktionsgefäß (1,5 ml) | Sarstedt, Nümbrecht |
| Reaktionsgefäß, steril (15 ml, 50 ml) | Sarstedt, Nümbrecht |
| RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| RNeasy Plus Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| RPMI 1640 | PAA, Cölbe |
| SB203580 | Calbiochem, Darmstadt |
| Natriumlaurylsulfat (SDS) | Carl Roth, Karlsruhe |
| SP600125 | Alexis, Grünberg |
| Spritze (5 ml, Discardit™ II) | Becton-Dickinson, Heidelberg |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Triton x-100 | Merck, Darmstadt |
| Tween 20 (Polysorbat 20) | Calbiochem, Darmstadt |
| Ultra Pure Water | Biochrom, Berlin |
| Zellkulturschalen (10 cm) | Sarstedt, Nümbrecht |
| Zellkulturschalen (6-well) | Sarstedt, Nümbrecht |
| Zellkulturschalen (96-well) | Sarstedt, Nümbrecht |
| Zellschaber | Sarstedt, Nümbrecht |

2.2. Herstellung stabil transfizierter PC12-Zellen

Die untersuchten stabil transfizierten PC12-Zelllinien stammten aus dem Bestand der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Herdegen (ursprünglich American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Zur funktionellen Untersuchung von MAP2K4 wurden von Frau Dr. rer. nat. Wiebke Häusgen die kodierenden Sequenzen für *MAP2K4* bzw. die bei diesem Prozess neu entdeckte Spleißvariante *MAP2K4 δ* (s. Kapitel 3.1) aus der Ratte in die *multiple cloning site* (Schnittstellen HindIII / BamHI) des Säugetier-Expressionsvektors pEGFP-C3 (Clontech, Heidelberg) kloniert.

Dieser Vektor ermöglicht die Expression eines Gens unter Kontrolle des Promoters SV40. Außerdem werden Gene, die in die *multiple cloning site* des Vektors kloniert werden, als Fusionsprotein mit EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) exprimiert und können so mikroskopisch lokalisiert werden. Mittels Lipofektion wurden PC12-Zellen mit den Konstrukten und dem pEGFP-C3-Vektor transfiziert. Das Geneticin-Resistenzgen des

Vektors ermöglichte die Selektion von transfizierten Zellen durch Zugabe von G418 (500 µg/ml) zum Kulturmedium. Auf diese Weise wurden verschiedene stabil transfizierte PC12-Zelllinien gewonnen.

2.3. Kultivierung der PC12-Zellen

Alle in der Zellkultur verwendeten Materialien und Lösungen wurden entweder steril erworben oder autoklaviert (Lösungen bei 120 °C und 2 bar für 30 Minuten, Feststoffe bei 134 °C und 2,2 bar für 20 Minuten; Gerät: 3850 EL, Tuttnauer, Breda, Niederlande)

Das Pferdeserum und das fetale Kälberserum, die dem Kulturmedium zugegeben wurden, wurden vor der Benutzung durch Erwärmen auf 56 °C für 30 min hitzeinaktiviert, das Pferdeserum wurde zusätzlich steril filtriert. Danach wurden Aliquots erstellt, die bis zur Nutzung bei -20 °C eingefroren wurden. Auch die Penicillin/Streptomycin-Lösung wurde bei -20 °C gelagert. Das Kulturmedium RPMI 1640 wurden bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Zellkulturmediums

| | |
|--|-----|
| Pferdeserum | 10% |
| Fetales Kälberserum | 5% |
| Penicillin/Streptomycin-Lösung | 1% |
| in RPMI 1640, unter der Sterilbank angesetzt | |

Der PBS-Puffer (*Phosphate Buffered Saline*) für die Zellkultur lag in einer 10x-konzentrierten Stammlösung vor und wurde 1:10 mit Ultra Pure Water verdünnt.

Alle Arbeitsschritte der Zellkultur wurden unter einer Sterilbank (HERA*safe*, Heraeus, Osterode) ausgeführt, ausgenommen die Bestimmung der Zellzahl während der Passage. Kulturmedium und PBS-Puffer wurden zuvor im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Da PC12-Zellen adhärent wachsen, mussten alle Kulturschalen zuvor mit Kollagen beschichtet werden. Dazu wurden 2-3 ml einer Kollagenlösung (0,1 mg/ml in 1x PBS) in die Kulturschalen bzw. Wells gegeben und durch vorsichtiges Schwenken der gesamte Boden bedeckt. Der Überschuss wurde mit einer Pipette abgenommen und weiterverwendet. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurde ungebundenes Kollagen mit 1x PBS abgespült und die Platten bis zur vollständigen Trocknung in der Sterilbank ausgebreitet.

Die PC12-Zellen wurden in Kulturmedium (s. Tabelle 2) bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank (HERA*cell*, Heraeus, Osterode) kultiviert. Alle 2 bis 3 Tage wurde das Medium

gewechselt. Das bei höheren Temperaturen instabile G418 wurde bei 4 °C gesondert aufbewahrt und jeweils nachträglich zugegeben (500 µg pro ml Medium).

Alle Kulturschalen wurden nach dem Entnehmen aus dem Brutschrank unter einem inversen Mikroskop (CK2, Olympus, Hamburg) untersucht. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten wurden alle Kulturen nach höchstens 20 Passagen verworfen.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Kulturschalen

| Kulturschale | Medium | Zellzahl | Nutzung für |
|--------------|--------|--------------------------|------------------------------------|
| Ø 10cm | 7 ml | 1 bis $1,25 \times 10^6$ | Zellkultur, Lysen, RNA-Isolierung |
| 6-well | 2 ml | $0,3 \times 10^6$ | Zählversuche, Durchflusszytometrie |
| 96-well | 100 µl | 1×10^4 | BrdU - Assays |

2.3.1. Passage

Alle sieben Tage wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Medium mit einer Saugpumpe (KNF Miniport, Omnilab, Bremen) entfernt und jede Kulturschale vorsichtig mit 2 ml 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Passage-EDTA-Lösung (0,5 mM in 1x PBS, bei 4 °C aufbewahrt, auf 37 °C erwärmt) zugegeben und die Schalen für 2 min bei 37 °C inkubiert um die Ablösung der Zellen von den Schalen sowie voneinander zu erreichen. Nach Zugabe von 5 ml Kulturmedium wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers gelöst und mit einer Pipette in ein 15ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Röhren wurden bei 1000 g für 10 min zentrifugiert (Varifuge 3.0, Heraeus, Osterode).

Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Zellpellets in je 2 ml Vollmedium mit einer Einwegspritze mit 21-gauge-Kanüle resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden je 50 µl in ein Reaktionsgefäß abpipettiert um die Zellzahl zu bestimmen (s. Kapitel 2.3.2). Die daraus errechnete Menge an Zellsuspension für die gewünschten Zellzahlen (s. Tabelle 3) wurde auf neue Kulturschalen gegeben.

2.3.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzählungen erfolgten mit dem Zählgerät CASY TT (Schärfe System, Hamburg). Die gleichnamige Messmethode, die dieses Gerät nutzt, beruht auf dem Widerstand, den eine Zellmembran einer elektrischen Spannung entgegenbringt. Die in isotonischer Salzlösung suspendierten Zellen werden einzeln durch eine Messpore, über der eine Spannung liegt, bewegt. Dabei erzeugen intakte, lebende Zellen einen größeren Widerstand als tote Zellen

oder Trümmer. Des Weiteren korreliert die Größe des Widerstands mit dem Zelldurchmesser. Durch Festlegung von Grenzwerten lässt sich der auszuwertende Ergebnisbereich auf lebende Zellen begrenzen.

Für jede Zählung wurden 25 µl der Zellsuspension in 5 ml der mitgelieferten CASYton-Lösung pipettiert und vorsichtig vermengt. Dieser Verdünnungsfaktor ($2,01 \times 10^2$) wurde in das Gerät einprogrammiert und vor der Ergebnisdarstellung berücksichtigt.

2.3.3. Stimulation der Zellen mit Inhibitoren und Stressoren

Paclitaxel lag als 10 mM Stammlösung in DMSO vor. Die Konzentration zur Stimulation der Zellen lag, falls nicht anders angegeben, bei 5 µM. Je nach Verwendung der Zellen wurde die Stimulation für unterschiedliche Zeiträume belassen.

Der JNK-Inhibitor SP600125 und der p38-Inhibitor SB203580 (beide 10 mM) lagen ebenfalls in DMSO gelöst vor. Die Konzentration im Medium betrug 2 µM für SP600125 und 1 µM für SB203580.

Alle Inhibitoren und Stressoren wurden bei -20 °C lichtgeschützt gelagert.

2.3.4. Auftauen und Einfrieren von Zellen

Ein Vorrat an Zellen wurde bei -80 °C aufbewahrt. Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und in vorbereitete Kulturschalen mit Kulturmedium gegeben. Das Medium wurde nach 24 Stunden gewechselt um Rückstände des Einfriermediums zu entfernen.

Zum Einfrieren wurden die Zellen zuerst analog zur normalen Passage verarbeitet (s. Kapitel 2.3.1), nach der Zentrifugation dann aber in 2 ml Einfriermedium resuspendiert. Zu diesem Zweck wurde das DMSO-freie Medium „Biofreeze“ (Biochrom, Berlin) verwendet. Je 500µl der Suspension wurde in ein Kryoröhrchen pipettiert. Die Zellen wurden zuerst für 10 min bei Raumtemperatur, dann für 35 min auf Eis inkubiert und schließlich für 45 min bei -20 °C eingefroren. Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

2.4. Zählversuche

Für die Zählversuche wurden 3×10^5 Zellen auf 6-well-Platten ausgesät. Alle 2 - 3 Tage wurde das Medium gewechselt. Nach 5 Tagen wurden die Zellen gezählt, je nach Bedarf wurden sie 24 Stunden zuvor mit Paclitaxel stimuliert (s. Kapitel 2.3.3).

Die Vorbereitung dazu erfolgte analog zu einer normalen Passage unter der Sterilbank (s. Kapitel 2.3.1). Nach der Zentrifugation wurden die Zellen jedoch in 2 ml Vollmedium resuspendiert, um das gleiche Verdünnungsverhältnis wie zuvor herzustellen. Von diesen Suspensionen wurden je 25 µl zur Bestimmung der Zellzahl verwendet (s. Kapitel 2.3.2).

2.5. 5-Bromo-2-Desoxyuridin – Assay

Der Einbau von 5-Bromo-2-Desoxyuridin (BrdU) in die DNA sich teilender Zellen bietet eine Möglichkeit, die DNA-Synthese und somit die Zellproliferation mit Hilfe eines kolorimetrischen ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) zu quantifizieren. BrdU wird nach Zugabe zum Kulturmedium anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut und ist mit Antikörpern markierbar.

Der Assay wurde entsprechend der Anleitung mit dem Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) kit (Roche, Mannheim) durchgeführt. Dazu wurden Zellen für 5 Tage auf 96-*well*-Platten kultiviert (s. Kapitel 2.3) und bei Bedarf für 18 Stunden mit Paclitaxel stimuliert. Für die Auswertung wurde für 4 Stunden die BrdU-Lösung (weiterhin unter Kulturbedingungen) zugegeben. Anschließend wurden die Zellen fixiert und zuerst für 90 Minuten mit der Anti-BrdU-Lösung, dann für 25 Minuten mit der Substratlösung inkubiert. Die kolorimetrische Auswertung erfolgte bei 370 nm (Referenzwellenlänge 492 nm) in einem ELISA-*Reader* (Microplate Reader Model 680, BioRad, München).

2.6. RNA-Isolierung

Die selektive Isolierung von RNA aus Gewebe ermöglicht in Kombination mit einer RT-PCR (s. Kapitel 2.7) die Darstellung der in dem Gewebe tatsächlich transkribierten Gene in ihrer nahezu endgültigen Basenabfolge. In dieser Arbeit wurde dazu das *RNeasy Plus Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet.

Die PC12-Zellen wurden auf 10 cm-Zellkulturschalen passagiert und für 5 Tage unter normalen Kulturbedingungen gehalten (s. Kapitel 2.3). Unmittelbar vor dem Beginn der Experimente wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmalig mit 1x PBS gewaschen. Zur Untersuchung der Genexpression in lebenden Organismen wurden Proben aus dem ZNS von Maus, Ratte und Mensch aus dem Bestand der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Herdegen in flüssigem Stickstoff gefroren, anschließend gemörsert und dann wie die PC12-Zellen weiterverarbeitet.

Dazu wurden 600 µl des im Kit enthaltenen Puffers, dem zuvor gemäß der Anleitung β-Mercaptoethanol zugegeben wurde, zu den Proben gegeben. Die PC12-Zellen wurden mit einem sterilen Zellschaber abgelöst. Die entstandene Lösung wurde nach den Anweisungen weiterverarbeitet, wodurch zunächst die Zellen aufgeschlossen und die enthaltene DNA entfernt wurde. Die nötigen Zentrifugationen wurden bei 18900 g und Raumtemperatur durchgeführt (1-15K, Sigma, Osterode). Dann wurde 70% Ethanol zur Ausfällung der RNA im Verhältnis 1:1 zum verwendeten Puffer zugegeben. Durch eine weitere Zentrifugation wurde die Adsorption der RNA an die enthaltene Säule bewirkt.

Die so erhaltene RNA wurde nach Anleitung weiter verarbeitet, dabei zunächst gewaschen und schließlich mit 45 µl RNase-freiem Wasser aus der Säule gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. 2 µl wurden zur Konzentrationsbestimmung verwendet, der Rest der Probe entweder direkt weiter verwendet oder bei -80 °C eingefroren.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die RNA im Verhältnis 1:25 mit Ultra Pure Water verdünnt. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg). Dabei entspricht eine Extinktion (E) von einer Einheit einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Die RNA-Konzentration errechnete sich also nach folgender Formel:

$$c(\text{Probe}) = E(\text{Probe}) \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.7. cDNA-Synthese

Bei einer RT-PCR wird aus RNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase sogenannte komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Die cDNA lässt sich dann in einem weiteren Schritt selektiv amplifizieren (s. Kapitel 2.8). Für die RT-PCR wurde das *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) verwendet.

500 ng RNA wurden zunächst in 12 µl Ultra Pure Water mit 1µl *Random Hexamer Primer* versetzt und für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert, um die Bindung der Primer zu ermöglichen. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt um den Abbau der Nukleinsäuren so gering wie möglich zu halten.

Die nötigen Reagenzien wurden nach Anleitung zur Probe gegeben und die cDNA anschließend in einem Thermocycler (T100 Thermal Cycler, BioRad, München) synthetisiert. Zunächst wurden die Proben für 5 Minuten bei 25 °C, dann für 60 Minuten bei 42 °C und schließlich für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert, um die RNA von der cDNA zu lösen.

2.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch eine PCR lassen sich DNA-Abschnitte vermehren, um sie anschließend visuell darzustellen oder zu sequenzieren. Durch eine genaue Anpassung der verwendeten Primer lassen sich diese Abschnitte hochspezifisch auswählen. Die Primer wurden von Frau Dr. rer. nat. Wiebke Häusgen anhand der jeweiligen Sequenzen für die nachzuweisenden Gene erstellt. Aus den Sequenzen der Primer ergaben sich die verschiedenen Bindetemperaturen.

Zunächst wurde 1 µl der cDNA (s. Kapitel 2.7) in 49 µl des PCR Master Mix (s. Tabelle 5) mit den jeweiligen Primern (s. Tabelle 4) gemischt und die DNA-Polymerase (DreamTaq) kurz vor Beginn der PCR zugegeben. Zu Beginn wurde das Gemisch für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt um bestehende Nukleinsäurepaarungen aufzuheben. Es schlossen sich 26 bzw. 36 PCR-Zyklen nach dem folgenden Schema an: 30 Sekunden bei 95 °C, 30 Sekunden bei der für den jeweiligen Primer errechneten idealen Bindetemperatur (s. Tabelle 4) und 30 Sekunden bei 72 °C, der optimalen Temperatur für die Taq-Polymerase. Nach dem letzten Zyklus wurde die Temperatur von 72 °C für weitere 10 Minuten gehalten, um begonnene DNA-Synthesen zu Ende zu führen. Die PCR-Produkte wurden bis zur Auswertung bei 4 °C aufbewahrt.

Tabelle 4: Primer und Parameter der PCR

| Spezies | Gen | Primer | bp | T (°C) | Zykl. |
|------------------|-------------|------------------------------------|-----|-----------|-------|
| Ratte | H2A.z for | CGT ATT CAT CGA CAC CTG AAA | 282 | 53 | 26 |
| | H2A.z rev | CTG TTG TCC TTT CTT CCC AAT | | | |
| | MAP2K4 for | AGG GTA AAC GCA AAG CCC T | 289 | 58 | 36 |
| | MAP2K4 rev | CGT ATT CTT TTA ACT GCC ATT ATC TG | | | |
| | MAP2K4δ for | GCA TGC AGG GCT TTC AGA TA | 691 | 58 | 36 |
| | MAP2K4δ rev | ACG AGC TGT CCA CTG ATG CCG A | | | |
| Maus / Mensch | H2A.z for | CGT ATT CAT CGA CAC CTG AAA | 282 | 53 | 26 |
| | H2A.z rev | CTG TTG TCC TTT CTT CCC AAT | | | |
| | MAP2K4 for | AGG GTA AAC GCA AAG CAC TG | 349 | 59 | 36 |
| | MAP2K4 rev | TCA CTA CTC CGC ATT ACT ACA TCC | | | |
| | MAP2K4δ for | GCA TGC AGG GCT TTC AGA TA | 384 | 58 | 36 |
| | MAP2K4δ rev | TCA CTA CTC CGC ATT ACT ACA TCC | | | |

for: forward Primer; rev: reverse Primer; bp: Länge der PCR-Produkte in Basenpaaren; T: optimale Bindetemperatur der Primer; Zykl.: Anzahl der PCR-Zyklen

Tabelle 5: Zusammensetzung des PCR Master Mix

| | |
|--|--------|
| DreamTaq Buffer | 1% |
| dNTP Mix | 0,2 mM |
| Primer | 4% |
| DreamTaq (unmittelbar vor PCR zugegeben) | 0,5% |
| in Ultra Pure Water | |

2.8.1. Agarose-Gelelektrophorese

Mit diesem Verfahren lassen sich Nukleinsäuren ihrer Größe nach auftrennen und bei Zugabe des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid unter UV-Licht nachweisen.

Die Gele wurden hergestellt, indem 2 g Agarosepulver in 100 ml 1x TBE-Puffer (s. Tabelle 6) durch Erhitzen in einem Mikrowellenofen gelöst wurden. Anschließend wurden 6 µl Ethidiumbromid, (finale Konzentration 0,6 µg/ml), zugegeben. Die Mischung wurde in ein 14 x 12 cm Gelbett mit einem Kamm für 20 Taschen (GCT 14-101, C.B.S. Scientific / VWR International, Darmstadt) gegeben und dort bei Raumtemperatur auspolymerisiert.

Anschließend wurde das Gel aus dem Bett gelöst und in die passende Elektrophoreseapparatur übertragen (MGU-502T, C.B.S. Scientific / VWR International, Darmstadt). Der Kamm wurde entfernt und das Gel vollständig mit 1x TBE-Puffer bedeckt.

Tabelle 6: Zusammensetzung des 10x TBE-Puffers (Agarose-Gelelektrophorese)

| | |
|--|-------|
| TRIS | 0,9 M |
| Borsäure | 0,9 M |
| EDTA | 20 mM |
| In Aqua bd., anschließend autoklaviert | |

Tabelle 7: Zusammensetzung des 10x Loading Buffer (Agarose-Gelelektrophorese)

| | |
|------------------|-------|
| Bromphenolblau | 0,25% |
| Glycerol | 30% |
| in 1x TBE-Puffer | |

Unmittelbar vor der Elektrophorese wurden 50 µl der PCR-Ansätze mit 10 µl Loading Buffer (s. Tabelle 7) vermischt und 30 µl des Gemischs in eine der Taschen gegeben. Als Marker zur Längenabschätzung der Nukleinsäuren wurden 6,5 µl FastRuler Low Range in eine Tasche

pipettiert. Die Elektrophorese wurde für ca. 1 Stunde bei 100 mV durchgeführt (Phero-Stab 550, Biotec-Fisher, Reiskirchen). Anschließend wurden die Banden in einem UV-Transilluminator (Image Master VDS, BioRad, München) dargestellt.

2.9. Herstellung von Zellysaten

Zur Analyse von Proteinsynthese und –aktivierung wurden Zellen zunächst auf 10 cm-Kulturschalen ausgesät und für 6 Tage kultiviert. Die Stimulation mit Paclitaxel (s. Kapitel 2.3.3) wurde für Ganzzell- und Kern-Zytoplasma-Lysen 2 Stunden und für Caspase-3-Lysen 18 Stunden durchgeführt. Bei zusätzlicher Nutzung von MAPK-Inhibitoren wurden diese 30 Minuten vor dem Paclitaxel zugegeben, bei alleiniger Nutzung der Inhibitoren wurden die Zellen 24 Stunden inkubiert. Nach der Lyse wurde die Konzentration der Proteine photometrisch bestimmt, um in den folgenden Western Blots von allen Proben gleiche Proteinmengen einzusetzen. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt.

Zunächst wurde das Medium von den Zellen abgenommen, dann wurden die Zellen vorsichtig in 1x PBS gewaschen und mit 800 µl 1x PBS mit Hilfe eines Zellschabers von der Kulturschale gelöst und in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Das nach kurzem Abzentrifugieren (Micro-Centrifuge II, neoLab, Heidelberg) erhaltene Pellet wurde nach Entfernen des Überstands je nach Methode im jeweiligen Lysepuffer resuspendiert.

2.9.1. Ganzzellyse

Bei dieser Art der Lyse werden die Zellen aufgeschlossen und alle enthaltenen Proteine in einem Schritt extrahiert.

Direkt vor der Nutzung wurden 1-2 ml 2x-Stammlösung des DLB (*Denaturing Lysis Buffer*) im Verhältnis 1:1 mit Ultra Pure Water verdünnt und 1% Phosphatase Inhibitor Cocktail II zugegeben. Das Zellpellet wurde in 50-100 µl des DLB-Puffers resuspendiert. Die Menge an Puffer richtete sich nach der Größe der Pellets.

Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C in einem Heizblock inkubiert (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg) bevor sie mit je 2 x 5 Impulsen Ultraschall (GM70 Sonicator, Bandelin, Berlin) lysiert wurden. Nicht lösliche Bestandteile wurden dann für 15 min bei 16000 g und 4 °C abzentrifugiert (Biofuge *fresco*, Heraeus, Osterode). Der so erhaltene Überstand enthielt die denaturierten Proteine der gesamten Zellen.

Tabelle 8: Zusammensetzung des 2x-DLB-Puffers (Ganzzelllyse)

| | |
|---------------------------|-------|
| TRIS (mit HCl auf pH 7,4) | 20 mM |
| SDS | 2% |

2.9.2. Kern-Zytoplasma-Lyse

Bei dieser Lysemethode werden die Zellkerne zunächst vom Zytoplasma getrennt. Beide Zellfraktionen werden danach einzeln lysiert, so dass sich Kern- und Plasmaproteine getrennt untersuchen lassen.

Direkt vor der Nutzung wurde dem Lysepuffer 1% Phosphatase Inhibitor Cocktail II zugegeben. Das Pellet wurde zunächst in 200 µl Lysepuffer gewaschen und erneut abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen je nach Größe der Pellets in 100-200 µl mit 0,2% Nonidet P40 versetztem Puffer resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis gelegt. Durch anschließende Zentrifugation (Biofuge *fresco*, Heraeus, Osterode) für 5 min bei 12000 g und 4 °C wurde das erschlossene Zytoplasma von den intakten Kernen getrennt.

Der Überstand (Zytoplasma) wurde in ein zweites steriles 1,5ml-Reaktionsgefäß pipettiert und dort mit 10%iger Natriumlaurylsulfat (SDS) -Lösung denaturiert. Die Menge an SDS betrug ein Zehntel des zuvor eingesetzten Lysepuffers. Die Zellkerne wurden in 1x DLB-Lysepuffer (s. Kapitel 2.9.1) mit 1% Phosphatase Inhibitor Cocktail II resuspendiert. Alle Proben wurden dann für 5 min bei 95 °C in einem Heizblock erhitzt (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg) und anschließend mit je 2 x 5 Impulsen Ultraschall (GM70 Sonicator, Bandelin, Berlin) lysiert. Nicht lösliche Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (Biofuge *fresco*, Heraeus, Osterode).

Tabelle 9: Zusammensetzung des Puffers für die Kern-Plasma-Lyse

| | |
|-----------------------------|--------|
| HEPES (mit NaOH auf pH 7,9) | 10 mM |
| KCl | 10 mM |
| MgCl ₂ | 1,5 mM |

2.9.3. Lyse für die Caspase-3-Aktivierung

Zur Untersuchung der Aktivität der Caspase-3 war ein spezieller Lysepuffer mit einem Cocktail aus Proteasehemmern erforderlich. Andernfalls können bei der Lyse freigesetzte Proteasen weitere Caspase-3-Moleküle aktivieren und so fälschlicherweise erhöhte Mengen hervorrufen.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Puffers zur Caspase-3-Lyse

| | |
|-----------------------------|-------|
| PIPES (mit NaOH auf pH 6,5) | 50 mM |
| EDTA | 2 mM |
| CHAPS | 0,1% |

Diesem Puffer wurden folgende Substanzen frisch zugesetzt: PMSF (1 mM), Leupeptin (20 µg/ml), DTT (5 mM), Aprotinin (10 µg/ml) und Pepstatin (10 µg/ml). Diese Stoffe wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Die Zellpellets wurden in 20-30 µl des Lysepuffers resuspendiert. Die Menge des Puffers richtete sich nach der Größe der Pellets. Anschließend wurden die Proben dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Um nicht lösliche Bestandteile zu entfernen, wurden die Proben für 15 Minuten bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert (Biofuge *fresco*, Heraeus, Osterode).

2.9.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

Um gleiche Proteinmengen in den Proben für die Western Blots zu erhalten, mussten in allen Lysaten die Proteinkonzentrationen bestimmt werden. Hierzu wurde 1:5 mit Aqua bd. verdünnter *Dye Reagent* verwendet. Dieser Farbstoff beruht auf der Proteinbestimmung nach Bradford, bei der sich das Maximum des Absorptionsspektrums des Farbstoffs Coomassie-Brilliantblau G250 bei der Bindung an Proteine von 465 nm auf 595 nm verändert (Bradford 1976).

Aus allen Lysaten wurden 2 µl entnommen und 1:30 in Aqua bd. verdünnt. 20 µl dieser Verdünnungen sowie 20 µl der Standards (Proteinstandard II, 0,1 mg/ml und 0,2 mg/ml in Aqua bd.) wurden je mit 980 µl des *Dye Reagent* in eine Küvette gegeben. Als Nullwert diente eine Küvette mit 20 µl Aqua bd. in 980 µl *Dye Reagent*. Alle Ansätze wurden kurz auf dem Vortexer gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Absorptionsmessung (U-2000, Hitachi, Wiesbaden) bei 595 nm.

Die Konzentration der Probe (c(Probe)) wurde nach folgender Formel aus der Extinktion der Probe (E(Probe)), der des Standards (E(Standard)) und der Konzentration des Standards (c(Standard)) berechnet:

$$c(\text{Probe}) = [E(\text{Probe}) \times c(\text{Standard})] / E(\text{Standard}) \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.10. Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei dieser Methode werden Proteine mit Natriumlaurylsulfat (SDS) denaturiert und negativ geladen. So können sie in einem Polyacrylamid-Gel, über dem eine Spannung liegt, nach ihrer Größe aufgetrennt werden. In dieser Arbeit wurden diskontinuierliche Gelsysteme verwendet, d.h. die Proteine durchliefen vor der Auftrennung (Trenngel) einen Gelabschnitt mit größeren Poren (Sammelgel). So wurden die Proteine am Übergang zu einer schmalen Bande komprimiert und die Auflösung der Banden im Trenngel erhöht.

Zum Gießen der Gele wurde das Kammerensystem MiniProtean3 Vertical PAGE chamber (BioRad, München) verwendet. Dadurch waren Breite (8,5 cm) und Dicke (1,5 mm) der Gele vorgegeben. Die Glasplatten zwischen denen das Gel gegossen wurde, wurden vor Benutzung sorgfältig mit warmem Wasser und anschließend mit 70% Ethanol gesäubert.

Zuerst wurden die ca. 6 cm hohen Trenngele gegossen. Dabei wurden je nach Größe des gesuchten Proteins verschiedene Konzentrationen von Acrylamid verwendet (s. Tabelle 11). Durch eine höhere Konzentration lassen sich engere Poren erreichen. Ammoniumpersulfat (APS) diente als Katalysator für die Polymerisierung, Tetramethylethylendiamin (TEMED) wurde zum Starten der Reaktion verwendet. Diese beiden Stoffe wurden erst unmittelbar vor dem Gießen zugegeben.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Trenngele (SDS-PAGE)

| | 15%-Gel (ca. 10-30 kDa) | 12%-Gel (ca. 30-60 kDa) | 10%-Gel (ab ca. 60 kDa) |
|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Acrylamid (30%) ¹ | 5,025 ml | 4 ml | 3,33 ml |
| Aqua bd. | 2,48 ml | 3,5 ml | 4,17 ml |
| Trenngelpuffer (4x) ² | 2,48 ml | 2,5 ml | 2,5 ml |
| APS (10%) ³ | 80 µl | 80 µl | 50 µl |
| TEMED | 9 µl | 9µl | 9µl |

¹ Acrylamid / Bis-Acrylamid im Verhältnis 37,5:1

² 1,5 M Tris (pH 8,8), 0,4% SDS

³ in Aqua bd., lichtgeschützt bei 4°C gelagert

Zur Begradigung der freien Oberkante des Gels wurden einige Milliliter Aqua bd. vorsichtig darauf pipettiert. Nach 15 bis 30 min war das Gel auspolymerisiert und das Wasser wurde vor dem Gießen des Sammelgels entfernt. In dieses wurde ein Kamm für 15 Taschen eingesetzt.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Sammelgele (SDS-PAGE)

| | |
|-----------------------------------|--------|
| Acrylamid (30%) ¹ | 670 µl |
| Aqua bd. | 2,3 ml |
| Sammelgelpuffer (4x) ² | 1 ml |
| APS (10%) ³ | 30 µl |
| TEMED | 9µl |

¹ *Acrylamid / Bis-Acrylamid im Verhältnis 37,5:1*

² *0,5 M Tris (pH 6,8), 0,4% SDS*

³ *in Aqua bd., lichtgeschützt bei 4°C gelagert*

Auch das Sammelgel war nach 15 bis 30 min auspolymerisiert. Aus den Ergebnissen der Proteinbestimmung wurde das Volumen für 20 µg Protein errechnet und mit Ultra Pure Water auf 8 µl aufgefüllt. In jede Probe wurden 2 µl 5x *Sample Buffer* zugegeben.

Tabelle 13: Zusammensetzung des 5x *Sample Buffer* (SDS-PAGE)

| | |
|-------------------|------------------|
| Tris (pH 6,8) | 312,5 mM |
| SDS | 10% |
| β-Mercaptoethanol | 10% |
| Glycerol | 50% |
| Bromphenolblau | Einige Kristalle |

Die Proben wurden zur Denaturierung der Proteine für 5 min bei 95 °C inkubiert (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg). Auch der Marker, mit dessen Hilfe später auf den Western Blots die Molekulargewichte abgeschätzt werden, wurde für 3 min bei 95 °C erhitzt. Je Gel wurden 5 µl Marker verwendet.

Aus den fertig polymerisierten Gelen wurde zunächst der Kamm entfernt, bevor sie in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt wurden. In die Reservoirs des Geräts wurde Elektrophoresepuffer eingefüllt (1:10 mit Aqua bd. aus der Stammlösung verdünnt). Die Taschen der Gele wurden mit einer Pipette mit Elektrophoresepuffer ausgewaschen.

Zunächst wurden für 30 min 15 mA je Gel angelegt (Power Supply 250 EX, Invitrogen, Karlsruhe). Danach lagen die Proteine als komprimierte Banden am Oberrand des Trenngels vor. Zur Auftrennung wurden dann 30 mA je Gel für 45 bis 75 min, je nach Größe des zu untersuchenden Proteins, angelegt.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Elektrophoresepuffer-Stammlösung (SDS-PAGE)

| | |
|---------------|--------|
| Tris (pH 8,3) | 0,25 M |
| Glycin | 2 M |
| SDS | 0,03 M |

2.11. Western Blot

Bei einem Western Blot werden die Proteine von einem Acrylamidgel auf eine Kunststoffmembran übertragen, auf der sie dann spezifisch mit Antikörpern nachgewiesen werden können. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern, wird diese zuvor mit einer Magermilchpulver-Lösung inkubiert. So wird die Proteinbindungskapazität der Membran gesättigt. Die primären Antikörper (pAK) werden aus Kaninchen oder Mäusen gewonnen und tragen möglichst spezifische Bindungsstellen für das nachzuweisende Protein. Die sekundären Antikörper (sAK) sind Immunglobuline gegen die pAK und gekoppelt mit einer Peroxidase. Dieses Enzym aktiviert anschließend eine chemilumineszierende Substanz und die Lumineszenz kann mit hochempfindlichen Filmen sichtbar gemacht werden.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Puffer für den Western Blot

| Anodenpuffer I | Anodenpuffer II | Kathodenpuffer |
|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| 30 mM Tris | 300 mM Tris | 25 mM Tris |
| 20% Methanol | 20% Methanol | 40 mM 6-Aminohexansäure |
| | | 0,01 % SDS |
| | | 20% Methanol |

Pro Blot wurden 15 Filterpapiere auf 9 x 6 cm zugeschnitten. Auch von der Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) wurde ein 9 x 6 cm Stück ausgeschnitten und für eine Minute in 100% Methanol aktiviert, dann in Aqua bd. gewaschen. Das Gel wurde aus der Elektrophoreseapparatur genommen, das Sammelgel entfernt und das Trenngel in Kathodenpuffer zwischengelagert.

Filterpapier, Membran und Gel wurden wie folgt gestapelt: 6 Filter mit Anodenpuffer I (s. Tabelle 15), 3 Filter mit Anodenpuffer II, PVDF-Membran (ebenfalls mit Anodenpuffer I), Gel (Lage auf der Membran markiert) und zuletzt 6 Filter mit Kathodenpuffer. Dabei wurde darauf geachtet, dass zwischen den Schichten keine Luftblasen zurückbleiben. Zuletzt wurde

der gesamte Stapel gewendet, da in der benutzten *semi-dry*-Blot-Apparatur (Pegasus, Phase, Lübeck) die Anode im Deckel liegt.

Tabelle 16: Zusammensetzung des TBST-Puffers (Western Blot)

| | |
|---------------|--------|
| Tris (pH 7,5) | 20 mM |
| NaCl | 137 mM |
| Tween 20 | 0,1% |

Zum Transfer der Proteine auf die Membran wurden $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 50 bis 65 min angelegt. Danach wurde die Membran beschriftet und in *Tris Buffered Saline*- Puffer mit Tween[®] 20 (TBST-Puffer) zwischengelagert. Die folgenden Arbeitsschritte fanden auf einem langsam laufenden Schüttler (Polymax 2040, Heidolph, Kehlheim) statt.

Zunächst wurden die Blots für 10 min in TBST gewaschen. Dann wurden sie für eine Stunde in *Blocking Solution* (BS, 4% Magermilchpulver in TBST) inkubiert. Nach der vollständigen Entfernung der BS wurden die primären Antikörper (s. Tabelle 17) zugegeben, die Reaktionsgefäße mit Frischhaltefolie vor dem Austrocknen geschützt und über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ auf einem Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die pAK-Lösung entfernt und die Blots mit TBST erst für 15 min, dann noch zweimal je 5 min gewaschen, um ungebundene AK zu entfernen. Anschließend wurde der sekundäre, Peroxidase-gekoppelte Antikörper (s. Tabelle 17) zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Blots erneut in TBST gewaschen (1x 15 min, 4 x je 5 min).

Für die Detektion wurde das ECL Plus Reagent Kit verwendet. Je Blot wurden $500 \text{ } \mu\text{l}$ der Lösung 1 mit $25 \text{ } \mu\text{l}$ der Lösung 2 kurz vor der Verwendung gemischt. Alle weiteren Schritte fanden in der Dunkelkammer statt. Überschüssiges TBST wurde von den Blots entfernt, die Membranen auf Frischhaltefolie gelegt und für 3 min mit der ECL-Lösung inkubiert. Dann wurde die Lösung entfernt und die Membran in einer Filmkassette fixiert. Die darauf platzierten Filme (Hyperfilm ECL) wurden je nach nachzuweisendem Protein unterschiedlich lange belichtet. Anschließend wurden sie in einer Entwicklungsmaschine (Curix 60, Agfa, Köln) entwickelt.

Tabelle 17: Liste der verwendeten Antikörper

| pAK | Herst. ¹ | Verdünnung und Puffer | sAK ² | Verdünnung und Puffer |
|-------------------|---------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|
| ATF-2 | SC | 1:500 in TBST | rabbit | 1:2000 in BS |
| Bcl-2 | SC | 1:3000 in 1% BS | mouse | 1:2000 in 2% BS |
| Beta-Actin | S | 1:5000 in TBST | mouse | 1:3000 in TBST |
| Bim | PH | 1:2000 in 2% BS | rabbit | 1:2000 in 2% BS |
| Caspase-3 | SC | 1:1000 in BS | rabbit | 1:6000 in BS |
| c-Jun | SC | 1:1000 in TBST | rabbit | 1:2000 in BS |
| cleaved Caspase-3 | CST | 1:1000 in BS | rabbit | 1:1000 in 2% BS |
| c-Myc | CST | 1:1000 in TBST | rabbit | 1:1000 TBST |
| Cyclin D1 | PH | 1:1000 in TBST | mouse | 1:3000 in 2% BS |
| Fas | SC | 1:1500 in 2% BS | rabbit | 1:5000 in 2% BS |
| Fas Ligand | SC | 1:1000 in TBST | rabbit | 1:2000 in 2% BS |
| JNK1 | PH | 1:1000 in TBST | mouse | 1:3000 in 1% BS |
| JNK2 | E | 1:5000 in TBST | rabbit | 1:3000 in 2% BS |
| Mdm2 | PH | 1:1000 in TBST | mouse | 1:3000 in 2% BS |
| MAP2K4 | CST | 1:1000 in TBST | rabbit | 1:2000 in 2% BS |
| MAP2K7 | CST | 1:1000 in BS | rabbit | 1:2000 in 2% BS |
| p21 | SC | 1:1000 in TBST | mouse | 1:2000 in 2% BS |
| p38 | SC | 1:1000 in BS | rabbit | 1:5000 in BS |
| p53 | SC | 1:1000 in TBST | rabbit | 1:2000 in BS |
| phospho-ATF-2 | CST | 1:1000 in TBST | rabbit | 1:2000 in BS |
| phospho-c-Jun | CST | 1:1000 in TBST | rabbit | 1:2000 in 2% BS |
| phospho-c-Myc | CST | 1:1000 in TBST | rabbit | 1:2000 in 2% BS |
| phospho-JNK | PR | 1:2000 in TBST | rabbit | 1:2000 in BS |
| phospho-MAP2K4 | NEB | 1:1000 in TBST | rabbit | 1:2000 in 2% BS |
| phospho-MAP2K7 | CST | 1:1000 in TBST | rabbit | 1:2000 in 2% BS |
| phospho-p38 | PR | 1:2000 in BS | rabbit | 1:2000 in BS |
| phospho-p53 | CST | 1:1000 in TBST | rabbit | 1:5000 in 1% BS |
| total JNK | CST | 1:1000 in TBST | rabbit | 1:2000 in 2% BS |

¹ Hersteller: CST/NEB: Cell Signaling Technology / New England Biolabs, Frankfurt a. M.; E: Epitomics, Hamburg, PH: BD Pharmingen, Heidelberg; PR: Promega, Mannheim; S: Sigma, München, SC: Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

² sekundäre Antikörper: anti-mouse (Amersham Biosciences, Freiburg), anti-rabbit (Cell Signaling Technology, Frankfurt a. M.)

2.11.1. Strippen von Western Blot Membranen

Das Strippen der Membranen diente dazu, einen Blot mit mehreren Antikörpern nacheinander zu verwenden, indem vorhandene Antikörper-Komplexe abgelöst werden.

Tabelle 18: Zusammensetzung der *Stripping Solution*

| | |
|-------------------|---------|
| Tris | 62,5 mM |
| SDS | 2% |
| β-Mercaptoethanol | 100 mM |

Die Blotmembranen wurden für 20 min bei 50 °C und 25 rpm in *Stripping Solution* auf einem Schüttler (Innova 4000, New Brunswick Scientific, Amsterdam, Niederlande) inkubiert. Dann wurden die Membranen zweimal für 10 min bei Raumtemperatur in TBST gewaschen und für eine Stunde mit Blocking Solution behandelt. Danach wurde ein neuer Primärantikörper appliziert.

2.11.2. Ponceau S – Färbung der Western Blot Membranen

Ponceau S ist ein Farbstoff, der Proteine auf PVDF-Membranen rot anfärbt. Daher wurde diese Färbung verwendet, um den Transfer der Proteine auf die Membranen zu belegen.

Die Membranen wurden dazu mit TBST gewaschen und anschließend für 20 min mit dem Farbstoff bedeckt. Danach wurden sie mit Aqua bd. gewaschen und zum Trocknen aufgehängt. Der Farbstoff wurde wiederverwendet.

2.12. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine vielseitige Methode zur Zählung und Differenzierung von Zellen. Die Zellen passieren einzeln einen Laser und streuen dessen Licht je nach Größe und Komplexität ihres Inhalts unterschiedlich stark. Zusätzlich lassen sich Fluoreszenz-basierte Untersuchungen durchführen um weitere Aspekte der Zellen, wie beispielsweise Oberflächenproteine oder DNA-Synthese, zu beurteilen.

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie verwendet um die Verteilung der Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu bestimmen. Dazu wurde die DNA in den Zellen mit dem Farbstoff Propidiumiodid markiert. Zellen in der G1-Phase enthalten den normalen diploiden Chromosomensatz ($2n/2C$), Zellen in der G2-Phase haben dagegen die S-Phase durchlaufen und ihre Chromosomen verdoppelt, daher tragen sie den Satz $2n/4C$, enthalten

also doppelt so viel DNA. Die DNA-Menge von Zellen in der S-Phase befindet sich folglich zwischen diesen Punkten.

Die nach der Passage ausgesäten Zellen wurden nach 24 Stunden mit 0,5%igem Nährmedium anstatt des Kulturmediums (s. Kapitel 2.3) versorgt. Es enthielt kein Pferdeserum und nur 1/10 des fetalen Kälberserums im Vergleich zum Kulturmedium. So wurde die Proliferation der Zellen gestoppt und damit die Zellzyklen synchronisiert (Rudkin *et al.* 1989). Nach 3 Tagen wurde wieder Vollmedium zugegeben und nach weiteren 3 Tagen erfolgte die Auswertung. Bei Experimenten mit Stimulation wurde das Paclitaxel 6 Stunden vor der Auswertung zugegeben (s. Kapitel 2.3.3).

Die Zellen wurden zuerst wie bei einer Passage abgelöst und zentrifugiert (s. Kapitel 2.3.1). Dann wurden sie jedoch in 1 ml Medium resuspendiert und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden sie bei 4 °C und 2000 x g für 8 min erneut zentrifugiert. Dann wurde das Medium entfernt und die Zellen in 500-1000 µl Propidiumiodid-Lösung (s. Tabelle 19) resuspendiert. Die Zellen wurden bis zur Auswertung lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Tabelle 19: Zusammensetzung der Propidiumiodid-Lösung (Durchflusszytometrie)

| | |
|----------------|----------|
| Propidiumiodid | 50 µg/ml |
| Natriumcitrat | 0,1% |
| Triton x-100 | 0,1% |

Die Zytometrie erfolgte mit einem Beckman Coulter Epics XL (Beckman Coulter, Krefeld) und der zugehörigen Software CellQuest. Zur Auswertung wurde die Software WinMDI (Scripps Research Institute, <http://facs.scripps.edu>) verwendet.

2.13. Statistische Auswertung

Alle Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt. Zur statistischen Analyse der Zählversuche wurde die Software GraphPad Prism (www.graphpad.com) verwendet. Zunächst wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet. Zur Testung auf statistische Signifikanz wurden Varianzanalysen (ANOVA) mit anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Der α -Fehler wurde auf 0,05 festgesetzt. Die Signifikanzniveaus wurden durch die Symbole * und # dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Identifikation von *MAP2K4 δ* , einer unbekanntem Spleißvariante von *MAP2K4*

Um den Einfluss von *MAP2K4* auf die MAPK-vermittelte Signaltransduktion in PC12-Zellen zu untersuchen, wurden PC12-Zellen stabil mit dem Expressionsvektor pEGFP transfiziert, der die kodierende Sequenz für *MAP2K4* enthielt. So sollte eine Überexpression von *MAP2K4* erreicht werden. Zunächst wurde dafür die *MAP2K4*-cDNA aus PC12-Zellen amplifiziert. Die Sequenzierung mehrerer Amplikons (GATC Biotech, Konstanz) ergab neben dem erwarteten Transkript (11 Exons, 1191 bp) eine bislang unbeschriebene Spleißvariante mit einem zusätzlichen Exon (12 Exons, 1224 bp).

Durch die Spleißvariante wird *MAP2K4* um 11 zusammenhängende Aminosäuren innerhalb der *D domain*, an der MAPK an die aktive *MAP2K4* binden, verlängert, bleibt ansonsten aber unverändert (s. Abbildung 1 und Abbildung 3). Die Position dieser Veränderung innerhalb des Proteins lässt einen Einfluss auf das Bindeverhalten und die Aktivität des Enzyms vermuten. Die Variante bekam den Namen *MAP2K4 δ* .

3.1.1. Nachweis der *MAP2K4 δ* -mRNA in verschiedenen Spezies

Um die Expression der Variante *MAP2K4 δ* außerhalb von PC12-Zellen zu belegen, wurden kleine Proben aus dem ZNS von Maus, Ratte und Mensch untersucht. Nach Isolierung der RNA und Umschreiben in cDNA wurden Primer erstellt, die teilweise innerhalb der eingefügten 33 Basen binden. So wurde eine Spezifität für *MAP2K4 δ* gegenüber der ansonsten gleich aufgebauten *MAP2K4* erreicht. Die so markierten Genabschnitte wurden per PCR vervielfacht und per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Mit Hilfe dieser spezifischen Primer konnten sowohl in PC12-Zellen als auch im ZNS von Ratte, Maus und Mensch beide Formen der *MAP2K4* nachgewiesen werden (s. Abbildung 4). Dabei wurden keine vollständigen Transkripte, sondern lediglich Teilstücke, die den sich unterscheidenden Abschnitt enthielten, amplifiziert. In PC12-Zellen und Rattengehirn fand sich das 289 bp große *MAP2K4*-Fragment genau so wie das 691 bp große *MAP2K4 δ* -Fragment. Auch im ZNS von Maus und Mensch lag das 349 bp große *MAP2K4*-Amplifikat neben dem 384 bp großen *MAP2K4 δ* -Amplifikat vor. Bei *MAP2K4 δ* des Menschen fiel ein gegenüber den restlichen Proben deutlich geringeres Signal auf.

3.2. Effekte von MAP2K4 und MAP2K4 δ unter unstimulierten Wachstumsbedingungen

3.2.1. Synthese und Funktionalität der endogenen MAP2K4 und MAP2K4 δ

Zu Beginn der Untersuchungen wurde in den stabil transfizierten PC12-Zelllinien die Menge und Funktionalität der exogenen MAP2K4 und MAP2K4 δ analysiert. Die für *MAP2K4* und *MAP2K4 δ* kodierenden Sequenzen liegen im pEGFP-Vektor gekoppelt an das eGFP-Gen vor. Bei der Expression dieser Konstrukte in PC12-Zellen entstehen somit Fusionsproteine aus MAP2K4 bzw. MAP2K4 δ (ca. 43 kDa) und eGFP (ca. 27 kDa), die sich im Western Blot unabhängig von den endogenen MAP2K4-Proteinen nachweisen lassen.

In beiden Zelllinien zeigte sich diese Bande des Fusionsproteins neben derjenigen für endogene MAP2K4 bzw. phospho-MAP2K4 (s. Abbildung 5). Die Stärke der Fusionsbande ließ im Vergleich zur Bande des endogenen Proteins darauf schließen, dass das Fusionsprotein in geringerer Menge vorlag. Wie erwartet fand sich das Signal des Fusionsproteins nicht in der Kontroll-Zellreihe mit leerem pEGFP-Vektor.

Die Funktionalität beider Proteine konnte mit dem Nachweis der phosphorylierten Form sowohl für das endogene Protein als auch für das Fusionsprotein belegt werden. Die Fluoreszenz des eGFP-Proteins ließ sich unter dem inversen Mikroskop nachweisen. Nach Selektion der transfizierten Zellen mit G418 zeigten sich ausschließlich signalgebende Zellen.

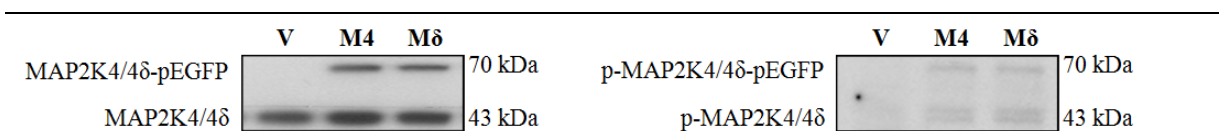


Abbildung 5: Synthese und Aktivierung von MAP2K4 und MAP2K4 δ

Western Blots aus Ganzzelllysaten von Leervektor-Zellen (V), *MAP2K4*-überexprimierenden Zellen (M4) und *MAP2K4 δ* -überexprimierenden Zellen (M δ) Antikörper: MAP2K4 (links) und phospho-MAP2K4 (rechts); Abbildung repräsentativ für 3 Versuche

3.2.2. Einfluss von *MAP2K4*-Spleißvarianten auf die zelluläre Morphologie

Unter lichtmikroskopischer Untersuchung zeigten alle 3 Zelllinien eine ähnliche Morphologie (s. Abbildung 6). Es fanden sich runde bis polygonale, teils auch spindelförmige Zellen von ähnlicher Größe. Diese wuchsen hauptsächlich in losen Verbänden mit wenigen einzeln liegenden Zellen. Eine Bildung von axonalen oder dendritischen Ausläufern kam nur

vereinzelt und in Ansätzen vor. Bei den mit *MAP2K4* transfizierten Zellen fiel auf, dass die Kulturen vermehrt Zelltrümmer enthielten.

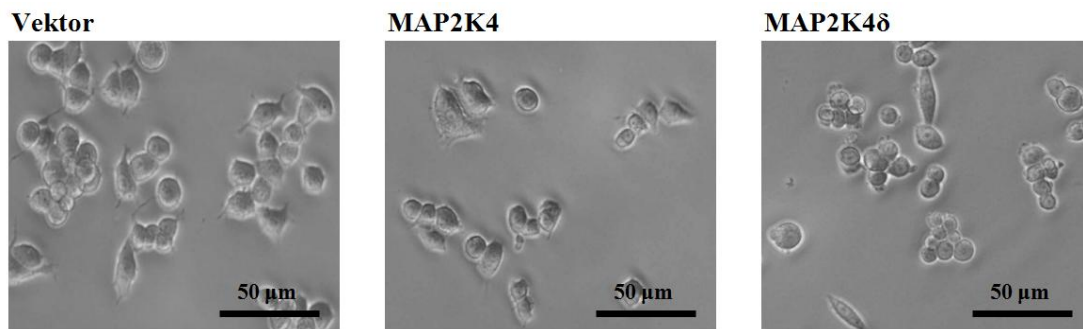


Abbildung 6: Morphologie der Zelllinien

Lichtmikroskopische Bilder der Zellkulturen zum gleichen Zeitpunkt nach der letzten Passage, unter identischen Bedingungen gehalten.

3.2.3. Unter basalen Wachstumsbedingungen werden Transkriptionsfaktoren durch MAP2K4-Spleißvarianten differenziell reguliert

Mit Hilfe von Western Blots wurde neben MAP2K4 und MAP2K4δ auch MAP2K7 untersucht, des Weiteren deren Zielenzyme JNK und p38. Aus der Gruppe der in diese Kaskade eingebundenen Transkriptionsfaktoren wurden c-Jun, ATF-2, c-Myc und p53 analysiert.

Für MAP2K4 zeigte sich, neben der erhöhten Proteinmenge aufgrund der exogenen *MAP2K4*- und *MAP2K4δ*-Expression, weder bei der absoluten Menge noch bei der Aktivierung ein deutlicher Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (s. Kapitel 3.2.1). Hingegen war die Menge von MAP2K7 in beiden transfizierten Zelllinien gegenüber der Kontrolle leicht vermindert (s. Abbildung 7). Bei der Aktivierung von MAP2K7 war dieser Unterschied noch deutlicher auszumachen. Vermehrte MAP2K4 - oder MAP2K4δ - Aktivität führte zu einer geringeren Phosphorylierung von MAP2K7.

Bei der Analyse der unmittelbaren *targets* von MAP2K4 ergaben sich zwischen transfizierten Zelllinien kaum Unterschiede. Beide Linien zeigten eine geringfügig vermehrte Phosphorylierung von p38 und JNK. Für JNK ließ sich auch eine geringe Zunahme der absoluten Menge der 54 kDa-Isoform nachweisen, die sich bei genauerer Untersuchung auf JNK2 zurückführen ließ. Der Gehalt von p38 wurde durch die Überexpression nicht beeinflusst.

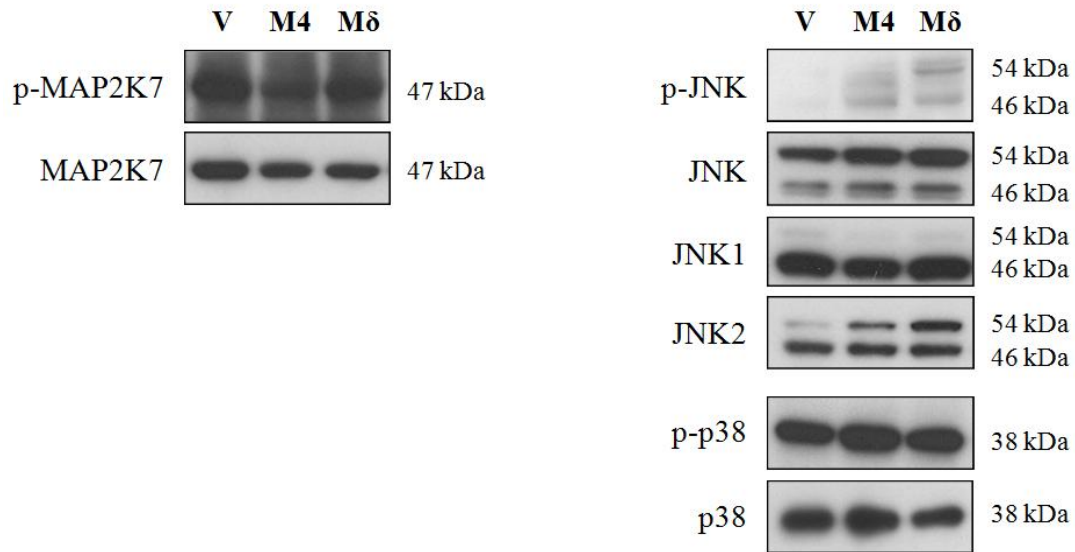


Abbildung 7: MAP2K7, JNK und p38 unter normalen Wachstumsbedingungen

Die Western Blots von Ganzzelllysaten von Vektor (V)-, MAP2K4 (M4)- und MAP2K4 δ (M δ)-transfizierten PC12-Zellen wurden zunächst mit Antikörpern gegen die phosphorylierten (p) Proteine geblottet, anschließend gestrippt und mit den Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Formen bzw. einzelne Isoformen inkubiert. Abbildung repräsentativ für je mindestens 5 unabhängige Experimente.

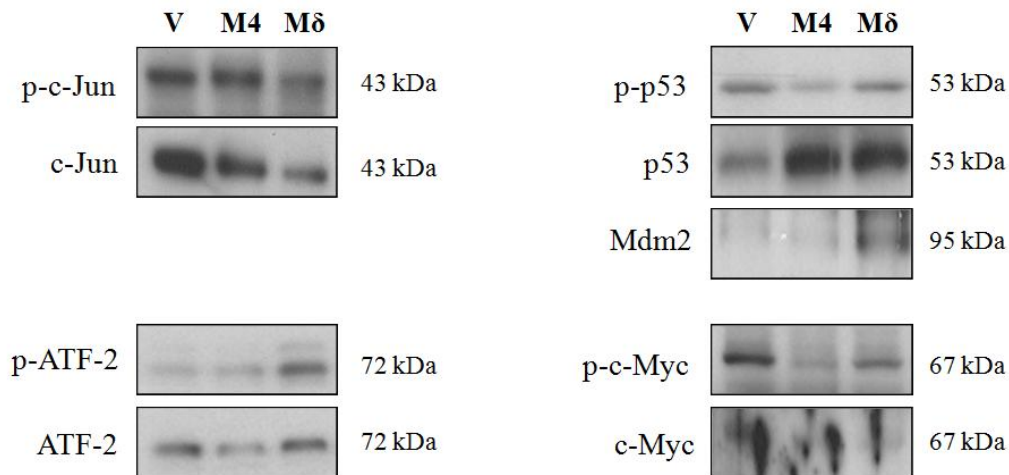


Abbildung 8: Transkriptionsfaktoren unter normalen Wachstumsbedingungen

Die Western Blots von Ganzzelllysaten von Vektor (V) -, MAP2K4 (M4) – und MAP2K4 δ (M δ) – transfizierten Zellen wurden zunächst mit Antikörpern gegen die phosphorylierten (p) Formen ausgewertet, dann gestrippt und mit Antikörpern gegen nicht-phosphorylierte Formen inkubiert. Abbildung repräsentativ für je mindestens 5 unabhängige Experimente.

Auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren waren deutlichere Unterschiede zwischen den Zelllinien nachweisbar. So fand sich bei der Analyse von c-Jun eine deutliche Verringerung der Aktivierung zu phospho-c-Jun in der *MAP2K4 δ* -Linie, die in der *MAP2K4*-Linie nicht nachweisbar war (s. Abbildung 8). Auch die basale Proteinmenge von c-Jun wurde reduziert, dies jedoch sowohl durch die bekannte als auch die unbeschriebene Spleißvariante von *MAP2K4*. Allerdings war auch hier eine nochmalige Reduktion der Proteinmenge durch *MAP2K4 δ* sichtbar.

Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ATF-2 dagegen wurde durch *MAP2K4 δ* verstärkt. Eine Differenz zwischen den Kontrollzellen und *MAP2K4*-transfizierten Zellen fand sich jedoch nicht. Die basale Menge an ATF-2 wurde ausschließlich durch die Überexpression von *MAP2K4* verringert.

Bei der Untersuchung des Tumorsuppressors p53 fiel in den *MAP2K4*-Zellen eine geringere Phosphorylierung zu p-p53 auf, während *MAP2K4 δ* -Zellen hier ein mit den Vektorzellen vergleichbares Niveau erreichten. Die Spiegel von nicht phosphoryliertem p53 waren dagegen in den Vektorzellen deutlich niedriger als in den *MAP2K4*- und *MAP2K4 δ* -Zellen. Die Ubiquitin-Ligase Mdm2, die p53 zum proteasomalen Abbau markiert, war in *MAP2K4 δ* -Zellen den anderen Linien gegenüber erhöht.

Das Protoonkogen c-Myc zeigte sich in den *MAP2K4*-transfizierten Zellen deutlich verringert. Während *MAP2K4 δ* -Zellen zwar einen höheren Spiegel erreichten, kamen auch sie nicht an das Niveau der Vektorzellen heran. Die Überexpression von *MAP2K4 δ* hatte auch einen Effekt auf die Phosphorylierung von c-Myc. Diese war zwar im Vergleich zu den *MAP2K4*-transfizierten Zellen erhöht, jedoch weiterhin geringer als in den Vektor-transfizierten Zellen.

Zusammenfassend fanden sich auf der Ebene der MAPK nur geringe durch die Überexpression ausgelöste Unterschiede in Aktivierung und Proteinmenge. Bei den Transkriptionsfaktoren zeigten sich dagegen deutliche Abweichungen. So aktivierte *MAP2K4* am ehesten c-Jun, unterdrückte aber die Phosphorylierung von ATF-2, p53 und c-Myc. Diese Effekte wurden durch *MAP2K4 δ* größtenteils umgekehrt. Es konnten aber auch für beide *MAP2K4*-Formen gleichsinnige Veränderungen, beispielsweise eine Reduktion der c-Myc-Aktivierung gegenüber den Leervektor-Zellen, festgestellt werden. Auch die nachweisbare Menge dieser Faktoren, insbesondere von p53 und c-Jun, wurde beeinflusst.

3.2.4. MAP2K4 beeinflusst die zelluläre Lokalisation der Transkriptionsfaktoren

Um mögliche Unterschiede bei der Verteilung aktivierter Faktoren zwischen Zytoplasma und ihrem primären Wirkort, dem Zellkern, zu analysieren, wurden Western Blots von getrennten Zellfraktionen durchgeführt.

Dabei zeigte sich in der Verteilung von ATF-2 ein in allen drei Zelllinien vergleichbar starkes Zellkernsignal, jedoch fand sich in den *MAP2K4 δ* -Zellen sowohl phosphoryliertes als auch nicht phosphoryliertes ATF-2 in kleinen Mengen auch im Zytoplasma (s. Abbildung 9).

Bei phospho-c-Myc zeigte sich ein solcher Unterscheid in der Verteilung nicht. In allen Zellen lag es fast ausschließlich im Zellkern vor. Lediglich in den *MAP2K4*-Zellen zeigte sich das Signal im Vergleich etwas abgeschwächt. Auffällig war jedoch eine weitere Bande für c-Myc in den Vektor- und *MAP2K4 δ* -Zellen, die ein etwas größeres Protein oder einen Proteinkomplex mit c-Myc im Zytoplasma andeutete.

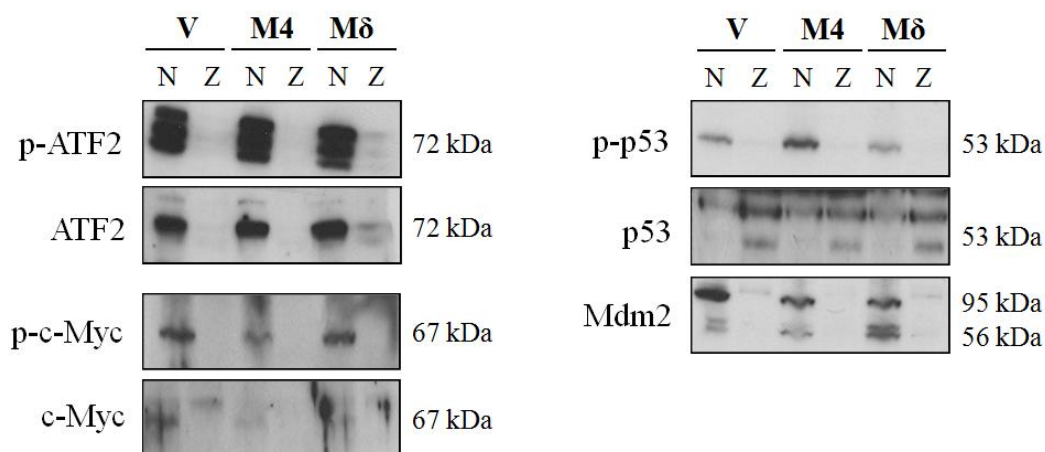


Abbildung 9: Intrazelluläre Verteilung der Transkriptionsfaktoren

Die Western Blots von Kern-Zytoplasma-Lysaten von Vektor (V) -, *MAP2K4* (M4) – und *MAP2K4 δ* (M δ) – transfizierten Zellen wurden zunächst mit Antikörpern gegen die phosphorylierten (p) Formen ausgewertet, dann gestrippt und mit Antikörpern gegen nicht-phosphorylierte Formen inkubiert. N = Nukleus, Z = Zytoplasma. Abbildung repräsentativ für je mindestens 5 unabhängige Experimente.

Signale für p53 fanden sich dagegen im Zytoplasma aller drei Zelllinien, kaum aber in den Zellkernen. Die phosphorylierte Form von p53 fand sich jedoch fast ausschließlich im Zellkern. Gleiches galt für den p53-Hemmer Mdm2, von dem auch bekannte kleinere Isoformen nachgewiesen werden konnten.

3.2.5. Die Regulation der Transkriptionsfaktoren wird durch die Aktivität der MAPK vermittelt

Da MAP2K4 als einzige MAP2K zwei MAPK aktivieren kann, wurde untersucht, ob ein Teil der beobachteten Effekte der Überexpression spezifisch über JNK oder p38 übertragen wurde. Dazu wurden die MAPK mit ihren pharmakologischen Antagonisten SP600125 (JNK-Hemmstoff) bzw. SB203580 (p38-Hemmstoff) für 24 Stunden gehemmt.

Für c-Jun zeigten sich bei JNK-Hemmung in allen drei Zellreihen ähnliche Effekte. Die intrazelluläre Konzentration wie auch die Aktivierung zu p-c-Jun wurde deutlich verringert. In den *MAP2K4*-Zellen waren beide Effekte jedoch weniger intensiv (s. Abbildung 10).

Die intrazelluläre Konzentration von ATF-2 war größtenteils JNK- und p38-unabhängig. Es zeigten sich allenfalls geringfügig erhöhte Proteinspiegel unter MAPK-Inhibition. Die Ausnahme bildeten die *MAP2K4 δ* -Zellen, in denen es unter p38-Hemmung zu einer Verringerung des ATF-2-Spiegels kam. Die Aktivierung von ATF-2 wurde in den *MAP2K4*-Zellen sowohl durch p38- als auch durch JNK-Hemmung reduziert, beide MAPK vermittelten also die Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu wurde die ATF-2-Phosphorylierung in *MAP2K4 δ* -Zellen durch die Hemmung der MAPK, insbesondere p38, verstärkt. Ähnliches Verhalten zeigten auch die Vektorzellen, hier war der Effekt aber bei JNK-Hemmung stärker. Bei der Untersuchung von c-Myc ergaben sich ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien. In Vektorzellen und *MAP2K4*-Zellen war die c-Myc-Proteinmenge unter p38-Hemmung reduziert, in *MAP2K4 δ* -Zellen jedoch deutlich erhöht. Die Inhibition von JNK dagegen beeinflusste den Proteinspiegel vor allem in den Vektorzellen positiv, während er in den anderen Zellen mit den Kontrollen vergleichbar war.

Die Phosphorylierung von c-Myc wurde in den Vektorzellen durch JNK-Hemmung hochreguliert, in *MAP2K4*- und *MAP2K4 δ* -Zellen aber kaum verändert. Hier zeigte vor allem p38 unterschiedliche Effekte: In *MAP2K4*-Zellen verringerte die p38-Hemmung die Aktivierung von c-Myc, in *MAP2K4 δ* -Zellen wurde sie verstärkt.

Für p53 zeigten sich unter MAPK-Hemmung in erster Linie Veränderungen der basalen Proteinmenge und weniger der Phosphorylierung zu p-p53. In Vektorzellen stiegen die Spiegel von p53 unter JNK-Hemmung stark an, während die p38-Hemmung keinen Effekt hatte. In *MAP2K4*-Zellen dagegen führten beide Inhibitoren zu einer Reduktion der p53-Proteinmenge, während *MAP2K4 δ* -Zellen keine Veränderungen auftraten.

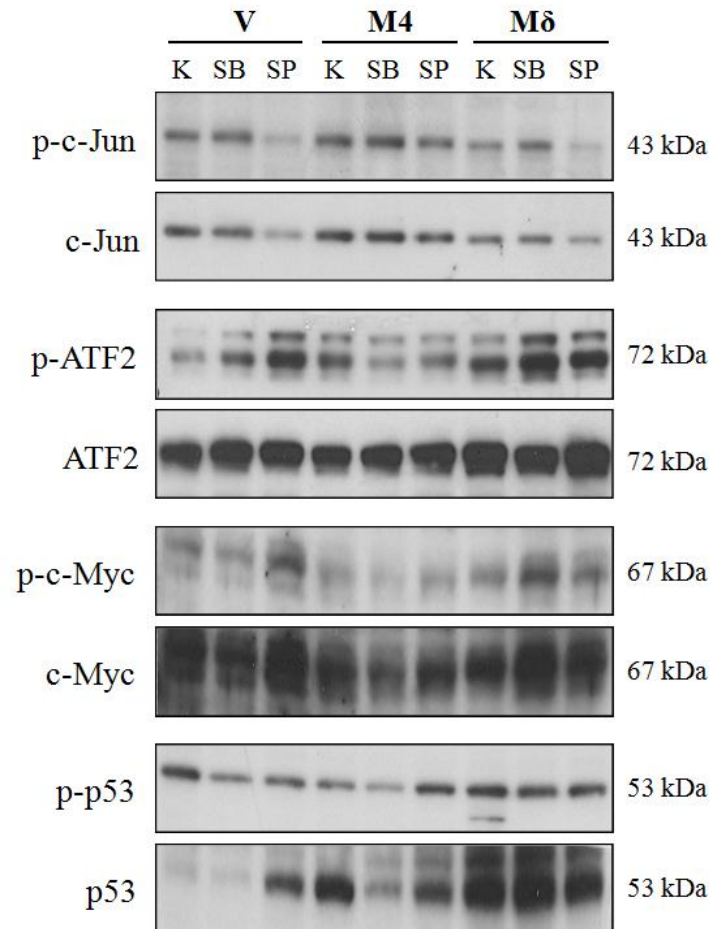


Abbildung 10: Transkriptionsfaktoren unter dem Einfluss von MAPK-Hemmern

Die Western Blots von Ganzzelllysaten von Vektor (V) -, *MAP2K4* (M4) – und *MAP2K4δ* (Mδ) – transfizierten Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit SB203580 (SB, p38-Antagonist) bzw. SP600125 (SP, JNK-Antagonist). Die Membranen wurden zunächst mit Antikörpern gegen die phosphorylierten (p) Formen ausgewertet, dann gestriipt und mit Antikörpern gegen nicht-phosphorylierte Formen inkubiert. K =Kontrolle ohne Inhibitor. Abbildung repräsentativ für je mindestens 5 unabhängige Experimente.

Die Phosphorylierung von p53 wurde in den Vektorzellen sowohl von p38 als auch von JNK reguliert. Durch beide Hemmstoffe verringerte sich hier die Aktivität. In *MAP2K4*-Zellen ließ p38-Hemmung den Spiegel von phospho-p53 geringfügig sinken, JNK-Hemmung erhöhte ihn. In Kontrast dazu hatte die MAPK-Inhibition in *MAP2K4δ* kaum.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Regulation durch MAPK in den verschiedenen Zellen sehr unterschiedlich ausfällt. Während sich für c-Jun wenige Unterschiede ergaben, zeigten die überexprimierenden Zellen bei Proteinmenge und Aktivierung von ATF-2, c-Myc und p53 deutliche Unterschiede verglichen mit den Vektorzellen und oftmals entgegengesetzte Effekte im direkten Vergleich von *MAP2K4* und *MAP2K4δ*. Dabei zeigten sich neben positiver Regulation durch MAPK, also eine Aktivitätsabnahme bei deren Hemmung,

oft auch erhöhte Proteinspiegel bzw. vermehrte aktivierende Phosphorylierungen unter der pharmakologischen Intervention. Die Überexpression von *MAP2K4* und *MAP2K4 δ* hatte also teils deutlich entgegengesetzte Einflüsse auf die Interaktion von MAPK und ihren Substraten.

3.2.6. *MAP2K4*-Spleißvarianten haben gegensätzliche Effekte auf die Anzahl lebender Zellen

Zur Charakterisierung des Wachstumsverhaltens wurden elektronische Zählungen der vitalen Zellen durchgeführt.

Die Überexpression von *MAP2K4* und *MAP2K4 δ* beeinflusste die Zellzahl deutlich. Im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie führte vermehrte *MAP2K4*-Expression zu einer Abnahme der Zellzahl um 35,5% (s. Abbildung 11). Bei vermehrter Expression von *MAP2K4 δ* wurde dieser Effekt umgekehrt: Die Zahl der lebenden Zellen stieg um 30,6% über das Niveau der Kontrollen. Somit erreichten Kulturen der *MAP2K4 δ* -Zelllinie bei gleichen Ausgangszahlen und gleichen Wachstumsbedingungen durchschnittlich eine annähernd doppelt so große Zahl vitaler Zellen wie die Kulturen der *MAP2K4*-transfizierten PC12-Zellen.

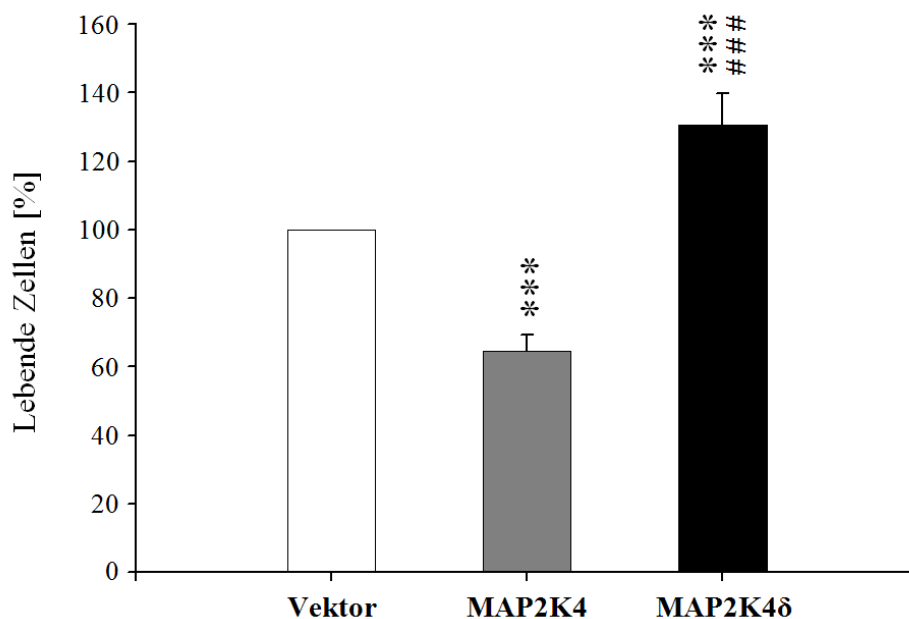


Abbildung 11: Viabilität der Zellen unter normalen Wachstumsbedingungen

Elektronische Zählung der lebenden Zellen in den Vektor-, *MAP2K4*- und *MAP2K4 δ* -PC12-Kulturen. Vektor = 100%. Alle Zellen wurden unter gleichen Bedingungen gehalten und nach gleichen Zeitintervallen ausgewertet. Abbildung repräsentativ für mindestens 5 unabhängige Experimente. ***: $p < 0,001$ gegen den Leervektor. ###: $p < 0,001$ gegen *MAP2K4*.

3.2.7. Beide *MAP2K4*-Spleißvarianten hemmen die intrinsische Apoptose

Zur genaueren Untersuchung der oben beschriebenen Unterschiede im Wachstumsverhalten der transfizierten Zellen wurden zunächst Western Blots zum Nachweis zentraler Regulatoren der Apoptose angefertigt.

Dabei zeigten *MAP2K4*- und *MAP2K4 δ* -transfizierte PC12-Zellen deutliche Unterschiede gegenüber den Vektorzellen (s. Abbildung 12). Die Proteinmenge des pro-apoptotischen Bim war in beiden Zelllinien stark verringert, während die des anti-apoptotischen Bcl-2 erhöht war.

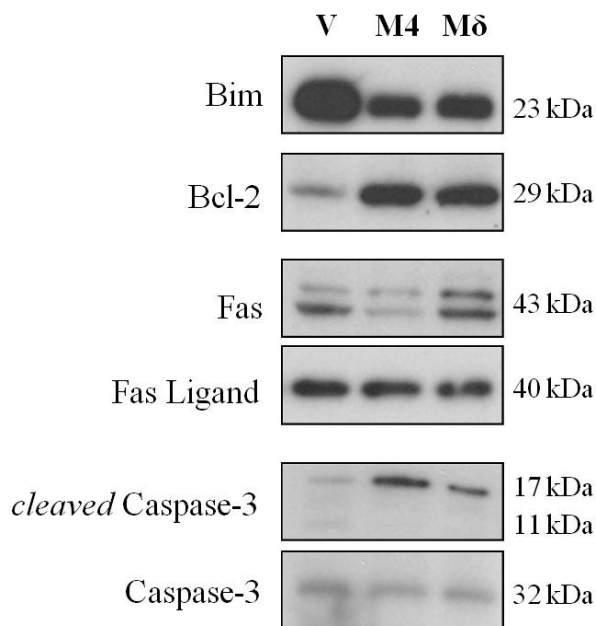


Abbildung 12: Apoptose-regulierende Proteine unter normalen Wachstumsbedingungen

Western Blots von Ganzzelllysaten bzw. Caspase-3-Lysaten von Vektor (V) -, *MAP2K4* (M4) – und *MAP2K4 δ* (M δ) – transfizierten Zellen. Bei der Darstellung der Caspase-3-Blots wurde zunächst gegen die aktive (*cleaved*) Form geblottet, dann wurde die Membran gestriipt und gegen die inaktive Form geblottet. Abbildung repräsentativ für je mindestens 5 unabhängige Experimente.

Der Fas-Rezeptor, als weiterer wichtiger Bestandteil der Apoptose, zeigte sich in *MAP2K4*-Zellen verringert, in *MAP2K4 δ* -Zellen vergleichbar mit den Vektorzellen. Die Spiegel seines Gegenstücks, des Fas Liganden, war dagegen in keiner der Zelllinien signifikant verändert.

Die aktive (*cleaved*) Form der Caspase-3 als weiterer Bestandteil der Apoptose-Kaskade war in den mit *MAP2K4*- und *MAP2K4 δ* - transfizierten Zellen vermehrt vorhanden. Die Menge von Caspase-3 in allen drei Zelllinien war jedoch vergleichbar hoch.

Insgesamt veränderten *MAP2K4* und *MAP2K4 δ* das Verhältnis von pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie zugunsten der anti-apoptotischen Faktoren. Zwischen den beiden Zelllinien bestand dabei jedoch kein Unterschied. Die Effektorcaspase 3

lag in den *MAP2K4*-überexprimierenden Zellen in deutlich größerem Umfang in seiner aktiven Form vor, was eine höhere Aktivität des Apoptose-Signalweges vermuten lässt. Im Gegensatz dazu fand sich in den *MAP2K4 δ* -Zellen vermehrt der Fas-Rezeptor.

3.2.8. Die Hemmung der Apoptose ist durch JNK-Aktivität vermittelt

Analog zu den Transkriptionsfaktoren wurde auch bei den Apoptose-regulierenden Faktoren der Einfluss pharmakologischer MAPK-Hemmung untersucht.

Dabei wurden sowohl Bim als auch Bcl-2 in allen drei Zelllinien durch JNK-Hemmung reduziert (s. Abbildung 13), so dass in diesen Zellen sowohl pro- als auch antiapoptotische Faktoren durch JNK vermehrt wurden. Bim wurde außerdem in *MAP2K4 δ* -Zellen durch p38 inhibiert. Dieser Effekt war nicht sehr deutlich, fand sich aber in den anderen Zelllinien nicht. Insgesamt waren die Effekte der MAPK-Hemmung auf die genannten Faktoren geringer als bei den untersuchten Transkriptionsfaktoren.

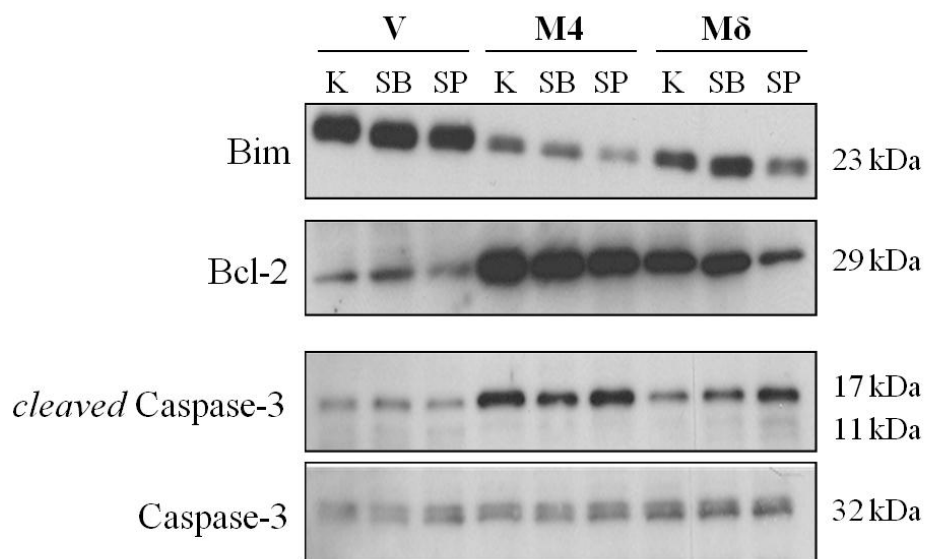


Abbildung 13: Apoptose-regulierende Proteine unter MAPK-Hemmung

Western Blots von Ganzzelllysaten von Vektor (V) -, *MAP2K4* (M4) – und *MAP2K4 δ* (M δ) – transfizierten Zellen. Zuvorige Inkubation mit SB203580 (SB, p38-Antagonist) bzw. SP600125 (SP, JNK-Antagonist) für 24 Stunden. K =Kontrolle ohne Inhibitor. Abbildung repräsentativ für je mindestens 5 unabhängige Experimente.

Die Proteinmenge von Caspase-3 wurde in keiner der Zellreihen durch MAPK-Inhibition beeinflusst. Die Aktivierung zu *cleaved* Caspase-3 dagegen wurde in *MAP2K4*-Zellen durch p38 gesteigert, in *MAP2K4 δ* -Zellen dagegen durch JNK reduziert. In diesem Zusammenhang

wirkte p38 also proapoptotisch in *MAP2K4*-Zellen, JNK dagegen antiapoptotisch in *MAP2K4 δ* -Zellen. In den Leervektor-Zellen gab es dagegen keinen Einfluss der MAPK auf die Menge der aktiven Caspase-3.

3.2.9. *MAP2K4*-Spleißvarianten haben entgegengesetzte Effekte auf die DNA-Synthese

Als Erklärung für die beschriebenen Unterschiede in der Viabilität der transfizierten Zellen kam auch eine veränderte Proliferation in Frage. Diese wurde durch Bestimmung der DNA-Synthese mit Hilfe von BrdU-Assays quantifiziert.

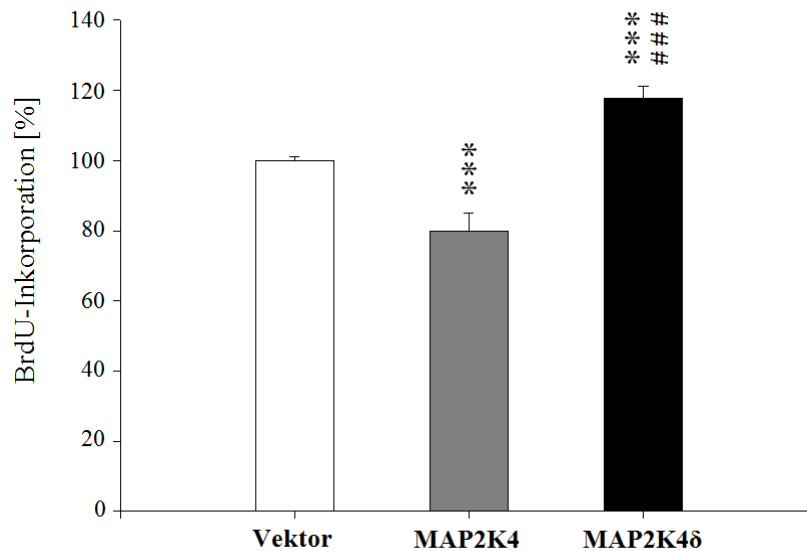


Abbildung 14: BrdU-Inkorporation unter normalen Wachstumsbedingungen

Kolorimetrischer Assay des BrdU-Einbaus in Vektor-, *MAP2K4*- und *MAP2K4 δ* - Zellen. Vektor = 100%. Alle Zellen wurden unter gleichen Bedingungen gehalten und nach gleichen Zeitintervallen ausgewertet. Abbildung repräsentativ für mindestens 5 unabhängige Experimente. ***: $p < 0,001$ gegen den Leervektor. ###: $p < 0,001$ gegen MAP2K4

Im Vergleich zu den Vektor-transfizierten Zellen führte vermehrte *MAP2K4*-Expression zu einer um 20,1% reduzierten DNA-Synthese (s. Abbildung 14). Bei vermehrter Expression von *MAP2K4 δ* wurde dieser Effekt umgekehrt und die BrdU-Inkorporation stieg deutlich über das Niveau der Kontrollen. Es ergab sich ein Zuwachs um 17,8%. Somit ergab sich zwischen den *MAP2K4*- und *MAP2K4 δ* - transfizierten Zellen relativ zur Kontrolle eine Differenz des DNA-Gehalts von ca. 37%. Passend zu den Veränderungen bei der Anzahl lebender Zellen (s. Kap. 3.2.6) reduzierte die Überexpression von *MAP2K4* also die Proliferation, während *MAP2K4 δ* sie deutlich steigerte.

3.2.10. *MAP2K4*-Spleißvarianten regulieren den G1/S-Checkpunkt des Zellzyklus

Zur genaueren Analyse der Abweichungen in der Proliferation wurden die intrazellulären Spiegel wichtiger Zellzyklusregulatoren bestimmt.

Der Zellzyklusinhibitor p21 zeigte die höchste Konzentration in den weniger proliferierenden *MAP2K4*-transfizierten Zellen (s. Abbildung 15 A). Im Vergleich dazu war die p21-Proteinmenge in Vektorzellen und *MAP2K4 δ* -transfizierten Zellen verringert. In den *MAP2K4*-Zellen war die Regulation außerdem stärker von JNK und p38 abhängig als in den beiden anderen Zelllinien. Unter Hemmung von p38 und, noch deutlicher, von JNK kam es zu einem Rückgang der p21-Spiegel bis auf das Niveau der Vektorzellen (s. Abbildung 15 B).

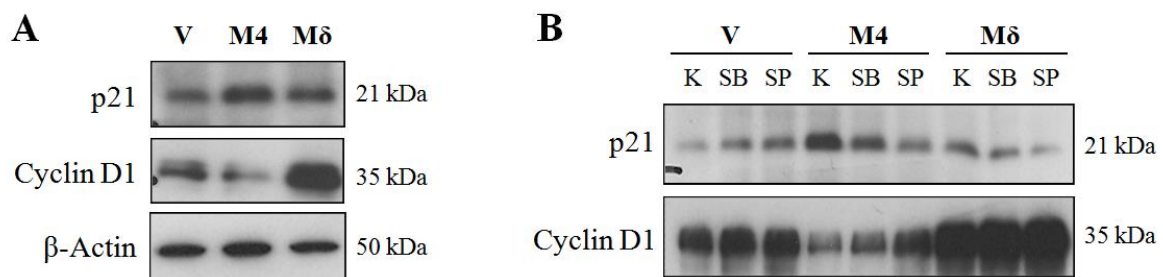


Abbildung 15: Zellzyklusregulatoren unter normalen Wachstumsbedingungen

A: Western Blot aus Ganzzelllysaten von Vektor (V) -, *MAP2K4* (M4) - und *MAP2K4 δ* (M δ) - Zellen mit β -Actin als Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge. B: Inkubation mit SB203580 (SB, p38-Antagonist) bzw. SP600125 (SP, JNK-Antagonist) für 24 Stunden. K = Kontrolle ohne Inhibitor. Abbildungen repräsentativ für mindestens 5 unabhängige Experimente.

Die Proteinmenge von Cyclin D1, dem Marker für den Übergang der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus, war dagegen in den schnell wachsenden *MAP2K4 δ* -Zellen stark vermehrt. Die *MAP2K4*-Zellen enthielten im Vergleich die kleinste Menge dieses Proteins. Auch hier zeigte sich nur in den *MAP2K4*-Zellen eine Abhängigkeit von den untersuchten MAPK. Während in Vektor- und *MAP2K4 δ* -Zellen keine Veränderung des Cyclin D1-Spiegels unter MAPK-Hemmung auftrat, zeigten *MAP2K4*-Zellen nach Inkubation mit dem JNK-Hemmstoff eine Zunahme dieses Proteins.

Zusammenfassend wurde also in den *MAP2K4*-transfizierten Zellen der Zellzyklus inhibiert, wobei p38 und JNK p21 induzierten und Cyclin D1 unterdrückten. In den *MAP2K4 δ* -transfizierten Zellen dagegen war das den Zyklus beschleunigende Cyclin D1 stark erhöht. Hier zeigte sich keine Abhängigkeit von p38 oder JNK.

3.2.11. Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus

Um die dargestellten Abweichungen der Proliferation genauer erfassen zu können, wurde die Verteilung der Zellen auf die einzelnen Phasen des Zellzyklus per Durchflusszytometrie mit Propidiumiodid-Markierung untersucht.

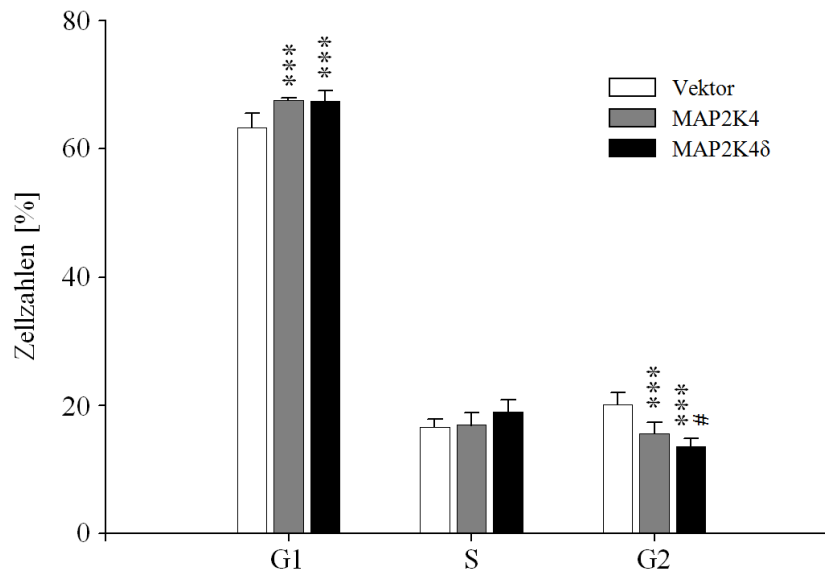


Abbildung 16: Zellzyklusphasen unter normalen Wachstumsbedingungen

Zellzahlen in % aller in die G1 -, S - und G2 - Phase fallenden Zellen der jeweiligen Kultur. Abbildung repräsentativ für mindestens 4 unabhängige Experimente. ***: $p < 0,001$ gegen den Vektor. #: $p < 0,05$ gegen MAP2K4

Sowohl *MAP2K4*- als auch *MAP2K4δ*-transfizierte Kulturen enthielten mehr Zellen in der G1-Phase und weniger in der G2-Phase als die Vektor-transfizierten Kulturen (s. Abbildung 16). Jeweils 67,5% der *MAP2K4*- und *MAP2K4δ*-Zellen befanden sich in der G1-Phase. In den Vektor-transfizierten Kulturen waren es dagegen 63,3%. Im direkten Vergleich zwischen *MAP2K4* und *MAP2K4δ* ergab sich kein Unterschied in der G1-Phase. In keiner der Kulturen fand sich eine statistisch signifikante Abweichung der Anzahl der Zellen in der S-Phase. Jeweils 16 bis 20% der Zellen fielen in diese Phase.

In den Vektorkulturen fand sich mit 20,2% der größte Anteil von G2-Zellen. Von den *MAP2K4*-transfizierten Zellen trugen 15,6% den verdoppelten Chromosomensatz, von den *MAP2K4δ*-transfizierten Zellen waren es mit 13,5% nochmals weniger.

Somit waren *MAP2K4*- und *MAP2K4δ*-Zellen verglichen mit Leervektor-Zellen vermehrt in der G1-Phase zu finden, während letztere sich vermehrt in der G2-Phase befanden.

3.2.12. Übersicht über die Ergebnisse unter basalen Wachstumsbedingungen

Tabelle 20: Zusammenfassung der Ergebnisse unter unstimulierten Bedingungen

| | | MAP2K4 | MAP2K4δ |
|----------------------------|------------------|--------|---------|
| Viabilität | | - | + |
| MAPK-Signalkaskade | | | |
| MAP2K4 (endogen) | Phosphorylierung | o | o |
| | Proteinmenge | o | o |
| MAP2K4 (exogen) | Phosphorylierung | o | o |
| | Proteinmenge | o | o |
| MAP2K7 | Phosphorylierung | - | - |
| | Proteinmenge | - | - |
| JNK | Phosphorylierung | + | + |
| | Proteinmenge | + | ++ |
| JNK 1 | Proteinmenge | o | o |
| JNK 2 | Proteinmenge | + | ++ |
| p38 | Phosphorylierung | + | + |
| | Proteinmenge | o | o |
| c-Jun | Phosphorylierung | o | - |
| | Proteinmenge | - | -- |
| ATF-2 | Phosphorylierung | o | + |
| | Proteinmenge | - | o |
| p53 | Phosphorylierung | - | o |
| | Proteinmenge | + | + |
| Mdm2 | Proteinmenge | o | + |
| c-Myc | Phosphorylierung | -- | - |
| | Proteinmenge | - | - |
| Apoptoseregulatoren | | | |
| Bim | | - | - |
| Bcl-2 | | + | + |
| Fas Rezeptor | | - | o |
| Fas Ligand | | o | o |
| <i>cleaved</i> Caspase-3 | | + | + |
| Caspase-3 | | o | o |
| DNA-Synthese | | - | + |
| Zellzyklus | | | |
| p21 | | + | o |
| Cyclin D1 | | - | + |
| Zellen in der G1-Phase | | + | + |
| Zellen in der S-Phase | | o | o |
| Zellen in der G2-Phase | | - | -- |

Relative Änderungen der einzelnen Zellreihen verglichen mit Leervektor-Zellen bei identischen Kultur- und Untersuchungsbedingungen. + = Zunahme, o = kein Unterschied, - = Abnahme. Doppelte Zeichen geben Unterschiede zwischen MAP2K4 und MAP2K4δ an.

Tabelle 21: Zusammenfassung der Effekte der MAPK

| | | Vektor | | MAP2K4 | | MAP2K4 δ | |
|----------------------------|------------------|--------|-----|--------|-----|-----------------|-----|
| | | p38 | JNK | p38 | JNK | p38 | JNK |
| MAPK-Signalkaskade | | | | | | | |
| c-Jun | Phosphorylierung | o | ++ | o | + | o | ++ |
| | Proteinmenge | o | ++ | o | + | o | ++ |
| ATF-2 | Phosphorylierung | - | -- | ++ | + | -- | - |
| | Proteinmenge | o | o | o | o | + | o |
| c-Myc | Phosphorylierung | o | - | + | o | - | o |
| | Proteinmenge | + | - | + | o | - | o |
| p53 | Phosphorylierung | + | + | + | - | o | o |
| | Proteinmenge | o | - | ++ | + | o | o |
| Apoptoseregulatoren | | | | | | | |
| Bim | | o | + | o | + | - | + |
| Bcl-2 | | o | + | o | + | o | + |
| <i>cleaved</i> Caspase-3 | | o | o | + | o | o | - |
| Caspase-3 | | o | o | o | o | o | o |
| Zellzyklus | | | | | | | |
| p21 | | o | o | + | ++ | o | o |
| Cyclin D1 | | o | o | o | - | o | o |

Wirkungen der MAPK, gezeigt durch MAPK-Hemmung, unter gleichen Kultur- und Untersuchungsbedingungen. + = Stimulation durch entsprechende MAPK, - = Hemmung durch entsprechende MAPK, o = keine Änderung. Doppelte Zeichen geben Unterschiede zwischen MAP2K4 und MAP2K4 δ an.

3.3. Effekte von MAP2K4 und MAP2K4 δ bei Stimulation mit Paclitaxel

3.3.1. Paclitaxel aktiviert die MAP2K4-JNK-Signalkaskade

Um die MAP2K4-vermittelte zelluläre Stressantwort über JNK zu untersuchen, wurde Paclitaxel als Stimulans verwendet. Zunächst wurden mit Hilfe von Konzentrations- und Zeitreihen an Vektor-transfizierten Zellen die optimalen Bedingungen für eine Stimulation der MAP2K4-JNK-Signalkaskaden untersucht.

Bereits bei einer Paclitaxel-Konzentration von 1 μ M zeigte sich eine deutlich verstärkte Aktivierung von MAP2K4, JNK und c-Jun (s. Abbildung 17 A), die sich bei MAP2K4, nicht aber bei JNK und c-Jun bis zu einer Konzentration von 5 μ M weiter steigerte. Ab einer Konzentration von 2,5 μ M kam es auch zu einer vermehrten Phosphorylierung von MAP2K7. Die Menge der genannten Proteine wurde, mit Ausnahme von c-Jun, das sich vermehrt fand, durch keine Konzentration signifikant verändert.

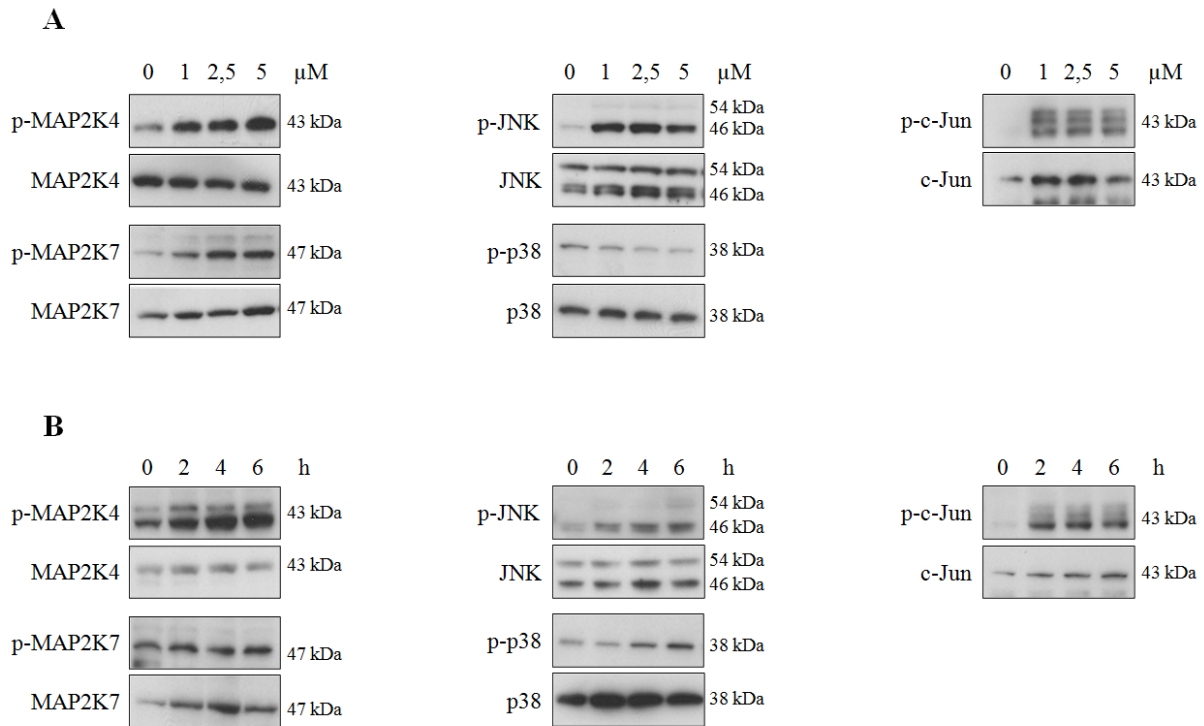


Abbildung 17: Konzentrations- und Zeitreihe der Paclitaxel-Stimulation

A: Western Blots von Ganzzelllysaten von Leervektor-transfizierten Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Paclitaxel in μM im Kulturmedium. Dauer der Paclitaxel-Inkubation 2 Stunden. **B:** Western Blots von Ganzzelllysaten von Leervektor-transfizierten mit verschiedenen langen Stimulationszeiten in Stunden (h). Paclitaxel-Konzentration im Medium $5 \mu\text{M}$. Die Membranen wurden nach der Auswertung mit gegen die phosphorylierten (p) Formen der Proteine gerichteten Antikörper gestrippt und dann gegen die nicht phosphorylierten Formen ausgewertet. Abbildungen repräsentativ für 4 unabhängige Experimente.

Bereits nach einer Stimulationsdauer von 2 Stunden war eine vermehrte Aktivierung von MAP2K4, JNK und c-Jun nachweisbar (s. Abbildung 17 B). Wie bei der Konzentrationsreihe zeigte sich auch hier mit verlängerter Dauer eine weitere Zunahme der MAP2K4-Aktivität, jedoch nicht der Aktivität von JNK und c-Jun. Nach 4-stündiger Stimulation war auch p38 vermehrt aktiv, die Aktivität von MAP2K7 dagegen zeigte keine zeitliche Zunahme. Die Menge der Proteine änderten sich in den ersten 6 Stunden nach Stimulation nicht.

Auffällig war eine bei steigender Paclitaxel-Konzentration verringerte Aktivierung von p38 nach zweistündiger Stimulation. In der Zeitreihe zeigte sich eine deutliche Latenz der p38-Phosphorylierung von 4 Stunden, während MAP2K4, JNK und c-Jun schon nach 2 Stunden eine gesteigerte Aktivierung vorwiesen.

In dieser Arbeit soll insbesondere die Achse MAP2K4-JNK nach Stimulation untersucht werden. Der verwendete Stimulus sollte daher diese beiden Faktoren möglichst spezifisch aktivieren. Obwohl beide MAP2K durch Paclitaxel aktiviert wurden, stieg die Menge von p-

MAP2K4 annähernd linear mit steigender Konzentration, während p-MAP2K7 ein Plateau erreichte. Die MAPK p38 reagierte kaum auf Paclitaxel, steigende Konzentrationen hemmten sogar die Aktivierung zu p-p38. Alles in allem stand die Signaltransduktion über MAP2K4 und JNK bei Paclitaxel-Konzentrationen von 5 μ M deutlich im Vordergrund. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich bei MAP2K7 keine zunehmende Aktivierung, bei p38 allenfalls eine minimale. Daher wurden für die weiteren Untersuchungen Konzentration von 5 μ M und eine Stimulationsdauer von mindestens 2 Stunden verwendet.

3.3.2. *MAP2K4* δ -Überexpression resultiert in einer geringeren Zahl lebender Zellen nach Paclitaxel-Stimulation

Im direkten Vergleich der drei stabil transfizierten Zelllinien wurde zuerst der Effekt einer 24-stündigen Paclitaxel-Stimulation auf das Überleben der Zellen gemessen. In allen drei Zelllinien kam es zu einem deutlichen Abfall der Zellzahl im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen.

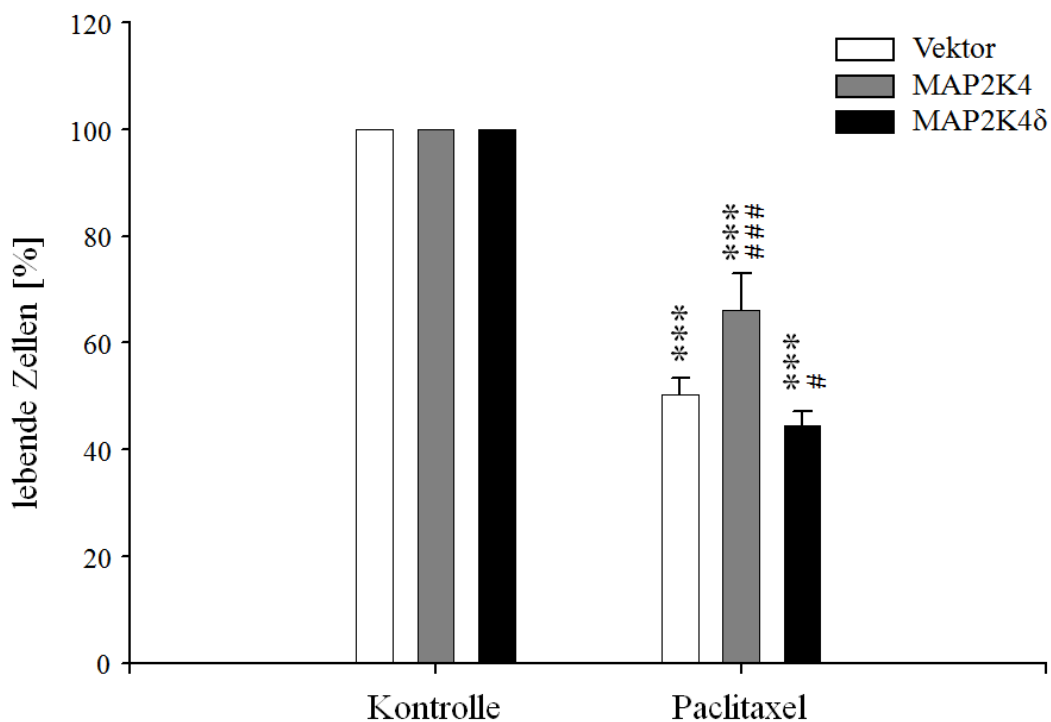


Abbildung 18: Viabilität der stabil transfizierten Zellen unter Stimulation

Elektronische Zählung der lebenden Zellen in den Vektor-, *MAP2K4*- und *MAP2K4* δ -Kulturen 24 Stunden nach Stimulation mit Paclitaxel (5 μ M). Jeweilige unstimulierte Kontrollen = 100%. Abbildung repräsentativ für mindestens 5 unabhängige Experimente. ***: $p < 0,001$ gegen die jeweilige Kontrolle, ###: $p < 0,001$ gegen den Leervektor, #: $p < 0,05$ gegen den Leervektor.

Die *MAP2K4*-transfizierten Zellen, die zuvor in unstimulierten Kulturen die kleinste Zellzahl gezeigt hatten, waren von dieser Abnahme am wenigsten betroffen. Im Vergleich zu unstimulierten Kontrollkulturen erreichten sie noch 66,1% der Zellzahl. Vektor- und *MAP2K4 δ* -transfizierte Zellkulturen dagegen enthielten nur 50,4 bzw. 44,6% der Zellzahl der jeweiligen unstimulierten Kontrollen.

Damit war die Zahl der lebenden Zellen nach Stimulation mit Paclitaxel für 24 Stunden in *MAP2K4*-transfizierten Zellen deutlich höher als in den anderen Kulturen. Im Gegensatz dazu war die Zahl der lebenden *MAP2K4 δ* -transfizierten Zellen gegenüber den anderen Zellreihen signifikant verringert. Diese Ergebnisse bilden einen starken Kontrast zu denen der unstimulierten Zellversuche, in denen *MAP2K4 δ* -Überexpression zu einer deutlich erhöhten Zellzahl führte, *MAP2K4*-Überexpression diese jedoch senkte.

3.3.3. Paclitaxel-Stimulation hat einen deutlichen Einfluss auf MAPK-assozierte Transkriptionsfaktoren

Um zu untersuchen, ob sich die Unterschiede in der Viabilität der Zelllinien nach Paclitaxel-Stimulation auch auf Ebene der Signaltransduktion nachvollziehen lassen, wurden MAP2K, MAPK und Transkriptionsfaktoren in den drei Zellreihen per Western Blot miteinander verglichen.

Die Phosphorylierung von MAP2K4 wurde durch die Stimulation nicht verändert (s. Abbildung 19). Unterschiede in der *MAP2K4*-Expression durch Stimulation zeigten sich ebenfalls nicht. Auch das exogene *MAP2K4 δ* -pEGFP-Fusionsprotein war in den entsprechend transfizierten Zellen in aktiviertem und nicht aktiviertem Zustand nachweisbar, wurde jedoch durch Stimulation nicht beeinflusst.

Bei der Analyse von MAP2K7 zeigte sich zum einen die bereits unter unstimulierten Bedingungen beobachtete verringerte Aktivierung bei *MAP2K4*-Überexpression. In allen drei Zellreihen kam es zu einer sehr geringen Zunahme der Aktivierung nach Paclitaxel-Inkubation. Die intrazelluläre Konzentration von MAP2K7 unterschied sich dagegen nicht.

Die Phosphorylierung von JNK wurde in allen Zellen durch die Stimulation verstärkt (s. Abbildung 19). Diese Aktivierung fand bei Überexpression von *MAP2K4* oder *MAP2K4 δ* vermehrt statt, zwischen diesen beiden Zelllinien war jedoch kein Unterschied festzustellen. Die Phosphorylierung betraf die 46 kDa-Variante ebenso wie die 54 kDa-Variante der JNK.

Die JNK-Menge dagegen wurde durch die Stimulation nicht moduliert, es zeigte sich lediglich die bereits beschriebene verringerte Proteinmenge in den Vektorzellen. Auch bei der

Analyse der Isoformen JNK1 und JNK2 zeigte sich kein Einfluss der Stimulation auf die Proteinmenge. Im Vergleich der Zelllinien bestätigte sich wiederum die schon unter normalen Wachstumsbedingungen beobachtete Zunahme der 54 kDa-Isoform von JNK2 bei Überexpression von *MAP2K4* oder *MAP2K4 δ* .

Sowohl die intrazelluläre Menge als auch Aktivierung von p38 schließlich zeigten kaum eine Reaktion auf die Stimulation. Eine Zunahme der Phosphorylierung war allenfalls minimal und im Vergleich der einzelnen Zelltypen ergaben sich keine Unterschiede.

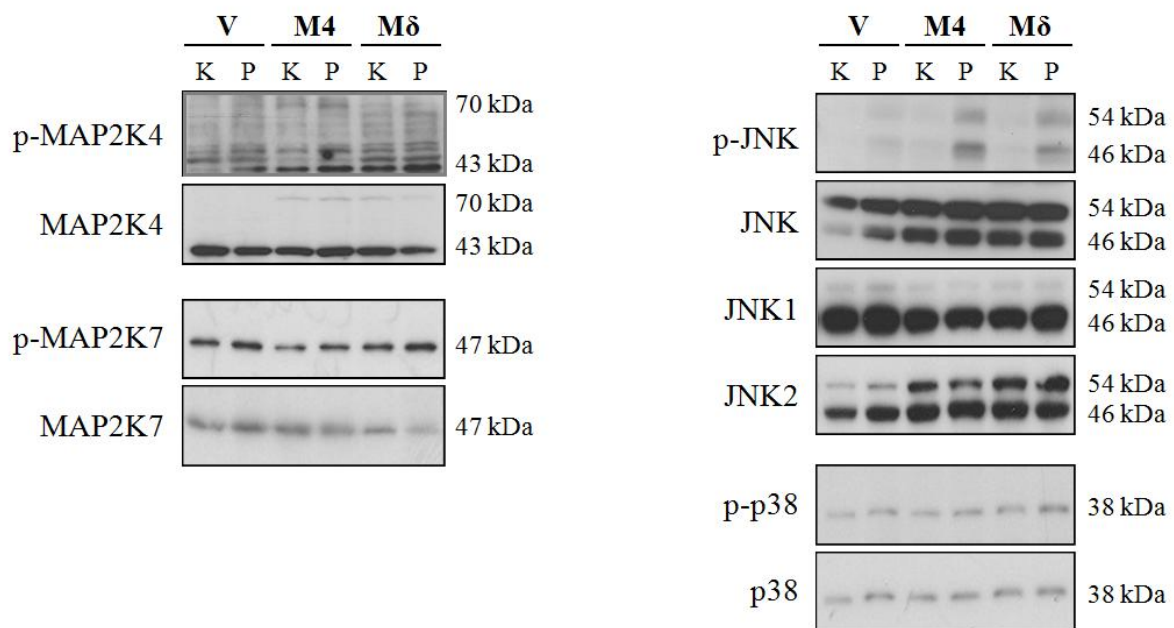


Abbildung 19: MAP2K und MAPK unter Stimulation

Die Western Blots von Ganzzelllysaten von Vektor (V)-, *MAP2K4* (M4)- und *MAP2K4 δ* (M δ)-transfizierten PC12-Zellen wurden zunächst mit Antikörpern gegen die phosphorylierten (p) Proteine geblottet, anschließend gestrippt und mit den Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Formen bzw. einzelne Isoformen inkubiert. K = Kontrollen, P = Stimulation mit Paclitaxel (5 μ M, 2 Stunden) Abbildung repräsentativ für je mindestens 5 unabhängige Experimente.

Der Transkriptionsfaktor c-Jun reagierte in allen Zellen stark auf die Paclitaxel-Stimulation (s. Abbildung 20). Dabei gingen vermehrte Proteinmenge und -phosphorylierung Hand in Hand. Beide Parameter wurden in *MAP2K4*-überexprimierenden Zellen besonders deutlich verstärkt. *MAP2K4 δ* -PC12 Zellen enthielten im unstimulierten Zustand die geringste Menge an c-Jun und p-c-Jun, erreichten aber nach Stimulation beinahe dieselben Niveaus wie die Kontrollzellen.

Auch ATF-2 wurde durch die Stimulation sowohl vermehrt als auch aktiviert. Die Phosphorylierung zu p-ATF-2 fand in allen Zellen in vergleichbarer Stärke statt. Jedoch waren sowohl Menge als auch Aktivierung in *MAP2K4 δ* -Zellen am stärksten ausgeprägt.

Die Menge von c-Myc unterschied sich zwischen den Zellreihen nicht, die Aktivierung hingegen schon. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen unter unstimulierten Bedingungen war die Aktivierung in den Leervektor-Zellen am deutlichsten und in *MAP2K4*-Zellen am geringsten. Paclitaxel hatte darauf jedoch in keiner der Zelllinien einen zusätzlichen Effekt.

Im Gegensatz zu c-Jun und ATF-2 wurde die Menge von p53 durch Paclitaxel in allen Zellen negativ reguliert. *MAP2K4*- und *MAP2K4 δ* -Überexpression führte dabei gegenüber den Vektorzellen zu einer höheren p53-Konzentration, sowohl mit als auch ohne Stimulation. Die Phosphorylierung von p53 wurde dagegen in Vektorzellen und *MAP2K4 δ* -Zellen durch Paclitaxel verstärkt. In *MAP2K4*-Zellen war dieser Effekt nicht zu beobachten.

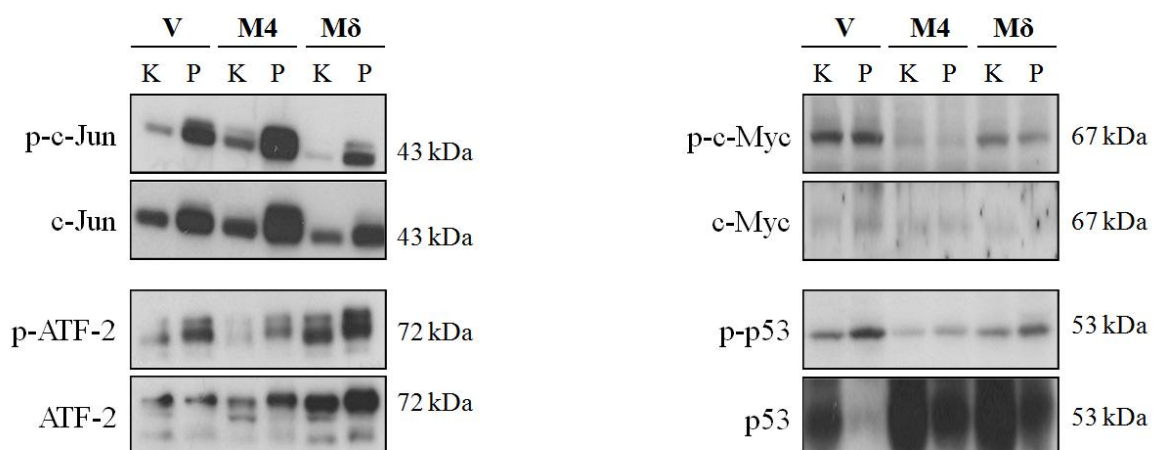


Abbildung 20: Transkriptionsfaktoren unter Paclitaxel-Stimulation

Die Western Blots von Ganzzelllysaten aus Vektor (V)-, *MAP2K4* (M4)- und *MAP2K4 δ* (M δ)-transfizierten PC12-Zellen wurden zunächst mit Antikörpern gegen die phosphorylierten (p) Proteine geblottet, anschließend gestrippt und mit den Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Formen bzw. einzelne Isoformen inkubiert. K = Kontrollen, P = Stimulation mit Paclitaxel (5 μ M, 2 Stunden) Abbildung repräsentativ für je mindestens 5 unabhängige Experimente.

Alles in allem zeigte die Stimulation mit Paclitaxel sehr unterschiedliche Effekte auf den verschiedenen Ebenen der MAPK-Signalkaskade. Die MAP2K und MAPK wurden nur wenig beeinflusst. Lediglich JNK erfuhr eine deutliche Aktivierung, die in den *MAP2K4*- und *MAP2K4 δ* -transfizierten Zellen gegenüber den Vektorzellen verstärkt war. Die MAPK p38 wurde von Paclitaxel kaum beeinflusst, wie bereits die Konzentrations- und Zeitreihen gezeigt hatten.

Für c-Jun und ATF-2 zeigten sich zusätzlich zu den schon beschriebenen Unterschieden zwischen den Zelllinien unter normalen Bedingungen eine deutliche Zunahme von Menge und Aktivierung nach Stimulation. Diese Steigerungen waren, von den unterschiedlichen Ausgangswerten ausgehend, weitgehend vergleichbar. Auch p53 zeigte eine Reaktion auf Paclitaxel. Es wurde in Vektor- und *MAP2K4 δ* -Zellen vermehrt phosphoryliert, in allen drei Linien gingen die intrazellulären Level von p53 unter Stimulation jedoch deutlich zurück. c-Myc zeigte im Gegensatz dazu keinerlei Reaktion auf Paclitaxel.

3.3.4. Paclitaxel führt zur Aktivierung der Apoptose

Aufgrund der durch Paclitaxel deutlich verringerten Zellzahlen war die Auswirkung der Stimulation auf den apoptotischen Prozess von Interesse.

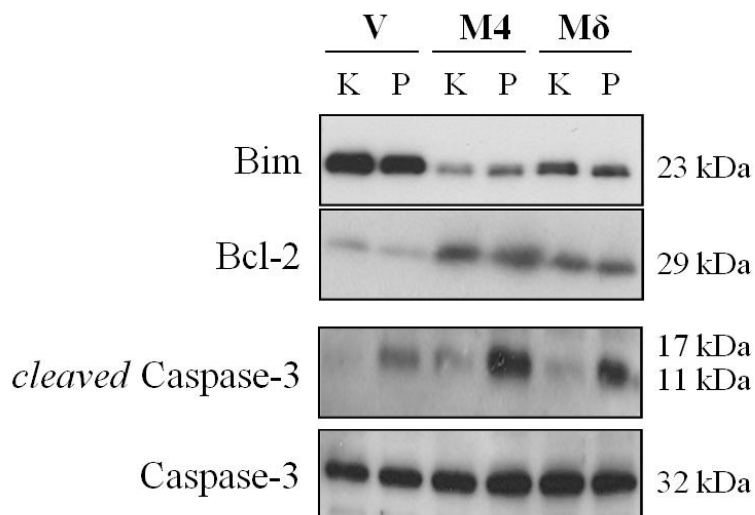


Abbildung 21: Apoptose-regulierende Faktoren unter Paclitaxel-Stimulation

Western Blots von Ganzzelllysaten bzw. Caspase-3-Lysaten aus Vektor (V) -, *MAP2K4* (M4) – und *MAP2K4 δ* (M δ) – transfizierten Zellen. Bei der Darstellung der Caspase-3-Blots wurde zunächst gegen die aktive (*cleaved*) Form geblottet, dann wurde die Membran gestrippt und gegen die inaktive Form geblottet. K = Kontrolle, P = Stimulation mit Paclitaxel (5 μ M) für 2 Stunden bzw. 18 Stunden für Caspase-3-Lyse. Abbildung repräsentativ für je mindestens 5 unabhängige Experimente.

Bim als proapoptisches Mitglied der Bcl-2-Familie wurde durch die Stimulation in seiner Konzentration nicht verändert (s. Abbildung 21). Gleiches galt für das antiapoptotische Bcl-2 und die Caspase-3. In allen Zellen wurde aber eine verstärkte Aktivierung zur *cleaved* Caspase-3 registriert. In Anbetracht der schon vor Stimulation unterschiedlich hohen Spiegel war die Zunahme in den Zellen vergleichbar. Im Endeffekt fanden sich die höchsten Spiegel

aktiver Caspase-3 in *MAP2K4*-transfizierten Zellen, gefolgt von *MAP2K4 δ* -Zellen, während die Spiegel in den Vektorzellen deutlich niedriger lagen.

3.3.5. Paclitaxel unterdrückt die zelluläre Proliferation

Wie zuvor bei der Untersuchung unstimulierter Zellen wurde auch unter Paclitaxel-Stimulation die DNA-Synthese durch BrdU-Assays quantifiziert.

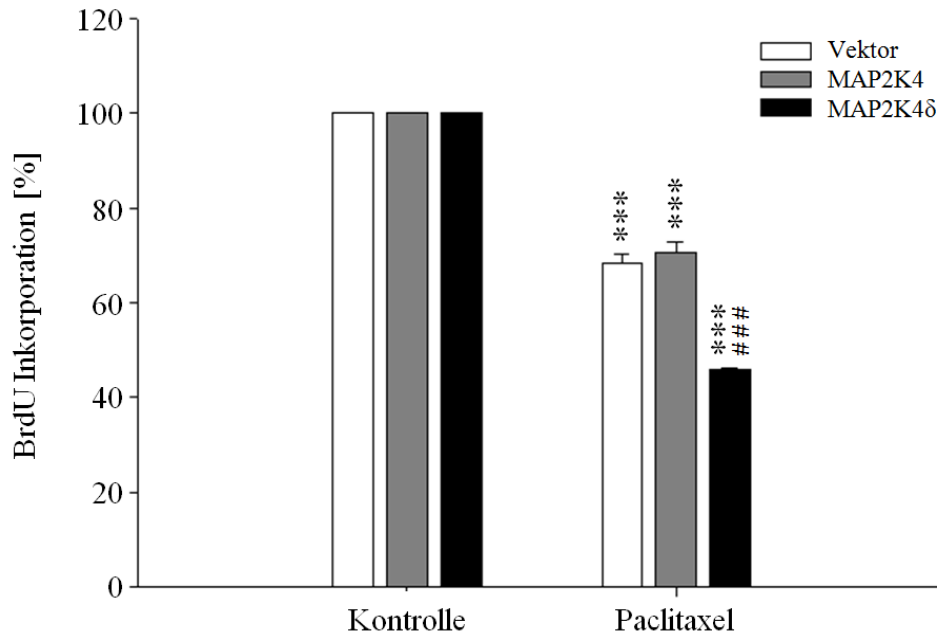


Abbildung 22: BrdU-Inkorporation und DNA-Synthese nach Stimulation

Kolorimetrischer Assay des BrdU-Einbaus in Vektor-, *MAP2K4*- und *MAP2K4 δ* -Zellen. Jeweilige unstimulierte Kontrolle = 100%. Alle Zellen wurden unter gleichen Bedingungen gehalten und nach gleichen Zeitintervallen ausgewertet. Stimulation mit Paclitaxel (5 μ M) für 18 Stunden. Abbildung repräsentativ für mindestens 5 unabhängige Experimente. ***: $p < 0,001$ gegen die jeweilige Kontrolle. ###: $p < 0,001$ gegen den stimulierten Leervektor.

Dabei zeigte sich in allen Kulturen eine deutliche Verminderung der DNA-Menge im Vergleich zu den jeweiligen unstimulierten Kulturen (s. Abbildung 22). Die Vektor-transfizierten Zellen erreichten 68,2% der Menge in den Kontroll-Kulturen, die *MAP2K4*-transfizierten Zellen 70,7%. In den *MAP2K4 δ* -transfizierten Kulturen war die DNA-Neusynthese mit 45,4% der Kontrollmenge am deutlichsten reduziert, auch im direkten Vergleich zu den stimulierten Leervektor-Zellen.

Auch die Zellzyklusregulatoren p21 und Cyclin D1 wurden nach Stimulation untersucht, um die oben genannten Unterschiede in der DNA-Synthese genauer zu analysieren. Als

gegensätzliche Regulatoren des G1/S-Checkpunkts haben beide einen Einfluss auf diesen essentiellen Prozess der S-Phase.

Die Inkubation mit Paclitaxel führte zu einer negativen Regulierung von p21 in allen drei Zelllinien (s. Abbildung 23). Ausgehend von unterschiedlichen p21-Spiegeln in unstimulierten Zellen war dieser Effekt in *MAP2K4*-Zellen am deutlichsten. Cyclin D1 wurde dagegen von Paclitaxel nicht beeinflusst.

Somit wurde zwar der Zellzyklus durch Paclitaxel beschleunigt, auf Grund der unterschiedlichen Zellzahlen nach Stimulation (s. Abbildung 18) lassen sich die BrdU-Daten aber nur gewichtet betrachten. Da *MAP2K4*-Zellen nach Stimulation die größte Menge p21 enthielten, erklärt sich hier Unterschied zwischen erhöhter Zellzahl und vergleichbarer DNA Synthese gegenüber den Kontrollzellen. Die *MAP2K4*-Zellen proliferierten also trotz Reduktion von p21 relativ am langsamsten.

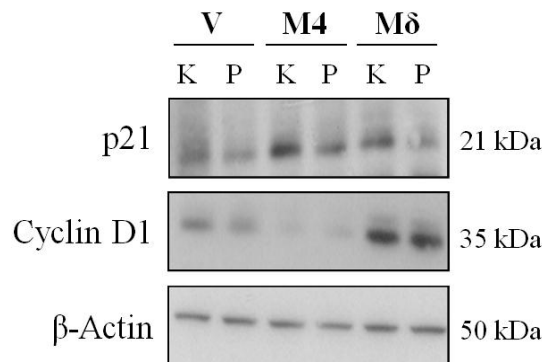


Abbildung 23: Zellzyklusproteine unter Stimulation

Western Blot aus Ganzzelllysaten von Vektor (V) -, *MAP2K4* (M4) – und *MAP2K4δ* (Mδ) –Zellen mit β-Actin als Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge. K = Kontrolle, P = Stimulation mit Paclitaxel (5 μM, 2 Stunden) Abbildung repräsentativ für mindestens 5 unabhängige Experimente.

3.3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse unter Paclitaxel-Stimulation

Tabelle 22: Zusammenfassung der Ergebnisse unter Stimulation

| | Vektor | MAP2K4 | MAP2K δ |
|---|--------|--------|----------------|
| Viabilität | - | - | - |
| % der unstimulierten Kontrollen | 50,4 | 66,1 | 44,6 |
| MAPK-Signalkaskade | | | |
| MAP2K4 Phosphorylierung (endogen) Proteinmenge | o | o | o |
| MAP2K4 Phosphorylierung (exogen) Proteinmenge | o | o | o |
| MAP2K7 Phosphorylierung Proteinmenge | + | + | + |
| JNK Phosphorylierung Proteinmenge | + | + | + |
| JNK 1 Proteinmenge | o | o | o |
| JNK 2 Proteinmenge | o | o | o |
| p38 Phosphorylierung Proteinmenge | o | o | o |
| c-Jun Phosphorylierung Proteinmenge | + | + | + |
| ATF-2 Phosphorylierung Proteinmenge | + | + | + |
| p53 Phosphorylierung Proteinmenge | + | o | + |
| c-Myc Phosphorylierung Proteinmenge | - | - | - |
| | o | o | o |
| | o | o | o |
| Apoptoseregulatoren | | | |
| Bim | o | o | o |
| Bcl-2 | o | o | o |
| <i>cleaved</i> Caspase-3 | + | + | + |
| Caspase-3 | o | o | o |
| DNA-Synthese | | | |
| % der unstimulierten Kontrollen | 68,2 | 70,7 | 45,4 |
| Zellzyklusregulatoren | | | |
| p21 | - | - | - |
| Cyclin D1 | o | o | o |

Veränderungen durch die Stimulation mit Paclitaxel, verglichen mit nicht stimulierten Kulturen der jeweils gleichen Zellen bei ansonsten identischen Kultur- und Untersuchungsbedingungen. + = Zunahme, o = kein Unterschied, - = Abnahme.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Signaltransduktion von MAP2K4 und der neu beschriebenen Spleißvariante MAP2K4 δ in neuronalen Zellen. Die Untersuchung von MAP2K4 hat in der Vergangenheit widersprüchliche Ergebnisse im Bezug auf die Regulation von Zelltod und Wachstum hervor gebracht (Übersicht bei Haeusgen *et al.* 2011a). Die Existenz unterschiedlicher Spleißvarianten von *MAP2K4* bietet einen bisher nicht untersuchten Erklärungsansatz für diese Diskrepanzen. Für die Untersuchung wurden beide Varianten stabil in Neuronen-ähnliche PC12-Zellen transfiziert und die Effekte der daraus resultierenden Überexpression analysiert.

4.1. Stabile Überexpression als Methode zur Untersuchung der Proteinfunktion

Grundsätzlich stehen zur Untersuchung der Funktion eines Proteins diverse Möglichkeiten zur Verfügung, jede mit eigenen Vor- und Nachteilen. Neben der hier eingesetzten Überexpression durch stabile Transfektion sind das *knockout*-Tiermodell, der Einsatz von RNA-Interferenz und die transiente Expression gängig.

Das *knockout* (*ko*)-Tiermodell bietet die Möglichkeit, die Rolle eines Gens direkt im lebenden Organismus unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. *MAP2K4-ko*-Mäuse sterben jedoch bereits *in utero* (Ganiatsas *et al.* 1998). Außerdem lassen sich die Auswirkungen von Spleißvarianten, wie hier MAP2K4 δ , an diesem Modell nicht untersuchen, da alle Varianten des Genprodukts vom *knockout* betroffen wären. Somit war diese Methode hier ungeeignet.

Eine neuere Methode bildet die sogenannte RNA-Interferenz, bei der kleine RNA-Moleküle in die Zellen transfiziert werden, um die Transkription eines Gens durch komplementäre Bindung an dessen mRNA selektiv zu unterdrücken (Cullen 2006). Auch diese Methode erlaubt eine sehr spezifische Untersuchung einzelner Gene mit geringer Beeinflussung der übrigen zellulären Funktionen. Wie der oben genannte *knockout* war auch ein selektiver *knockdown* einer Spleißvariante durch RNA-Interferenz in dieser Arbeit wegen des sehr kleinen Unterschieds von 33 Basen zwischen *MAP2K4* und *MAP2K4 δ* technisch nicht realisierbar. Zudem ist es schwierig, einen signifikanten *knockdown*, und damit einen eindeutigen Effekt, mit dieser Methode zu erreichen (Cullen 2006).

Bei der Überexpression durch Transfektion wird das zu analysierende Gen in einem Vektorplasmid in die Zellen transportiert (Klein und Assoian 2008). Das Resultat ist eine

vorübergehende Expression des Gens, die sogenannte transiente Überexpression. Der Inhalt des Vektors wird in vereinzelt Zellen zufällig in die nukleäre DNA integriert, wo er verbleibt und an Tochterzellen weitergegeben wird. Dieser Zustand wird stabile Transfektion genannt.

Die stabile Transfektion hat der transienten Transfektion gegenüber mehrere Vorteile. Zum einen ist der Transfektionsprozess in PC12-Zellen oft nur für einen geringen Teil der Zellen erfolgreich (Cazillis *et al.* 2004), so dass eine einmal etablierte stabile Zelllinie auf längere Sicht einen geringeren Aufwand bedeutet. Des Weiteren werden in die nukleäre DNA integrierte Gene dauerhafter und konstanter exprimiert, da die Zellen oft eine unterschiedliche Anzahl an Plasmiden aufnehmen, diese aber nur sehr selten in die nukleäre DNA inkorporieren. Beide Faktoren bedeuten eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse die mit stabil transfizierten Zellen produziert werden.

Alle genannten Methoden zur funktionellen Untersuchung eines Proteins haben eine reduzierte Aussagekraft im Bezug auf lebende Organismen, da sie dessen Regulationsmechanismen stören können. Beispielsweise kann das Einfügen oder Entfernen eines DNA-Abschnitts Effekte haben, die über das reine Fehlen oder die Vermehrung eines Gens hinaus gehen, indem epistatische Funktionen gestört werden (Crusio 2004). Die künstliche Reduktion oder Vermehrung der Menge eines Proteins kann das Gleichgewicht dieses Proteins mit seinen Regulatoren und Effektoren stören, so dass unphysiologische Wirkungen auftreten. Da in dieser Arbeit aber zelluläre Prozesse analysiert werden sollen, bietet der Ansatz der stabil transfizierten Zellkultur eine vergleichsweise einfache und wenig aufwändige Handhabung bei guter Vergleichbarkeit der Ergebnisse und, in diesem Fall, die Möglichkeit des direkten Vergleich der beiden Spleißvarianten von *MAP2K4*.

4.2. Das PC12-Zellsystem

Es gibt mehrere Möglichkeiten, neuronale Zellen in Kultur zu untersuchen. Grundsätzlich besteht bei jeder Zellkultur die Wahl zwischen frisch aus einem Organismus isolierten, sogenannten primären Zellen, und immortalisierten Zelllinien. Primäre Zellen verhalten sich den Zellen im lebenden Organismus sehr ähnlich, unterliegen aber einer limitierten Anzahl von möglichen Zellteilungen, so dass regelmäßig neue Zellen isoliert werden müssen. Immortalisierte Zellen dagegen sind meist aus Tumoren isoliert und haben potentiell eine unendliche Anzahl von Replikationen. Sie können sich wegen der zumindest teilweisen malignen Transformation jedoch anders verhalten als ihre physiologischen Gegenstücke. Die

hier verwendeten PC12-Zellen sind immortalisiert, besitzen jedoch funktionierende, induzierbare Signalwege im Bezug auf Zellzyklusregulation und Apoptose und sind daher ein valides Modell für neuronales Wachstum (Kashyap *et al.* 2010).

Für die Untersuchung zellulärer Prozesse haben immortalisierte Zellen weitere Vorteile. Sie bilden eine homogenere Population als primäre Zellen, besonders wenn über einen größeren Zeitraum geführte Experimente wiederholte Zellisolierungen nötig machen würden. PC12-Zellen zeigen ein für Tumorzellen vergleichsweise langsames Wachstum mit einer dementsprechend niedrigen Rate von Neumutationen und hoher genetischer Stabilität (Greene und Tischler 1976). Trotzdem wurden alle Kulturen in dieser Arbeit nur für den Zeitraum von maximal 20 Passagen verwendet, um in allen Experimenten genetisch möglichst ähnliche Zellen untersuchen zu können.

Durch die langjährige Arbeit mit PC12-Zellen ist außerdem ihre MAPK-Signalkaskade gut beschrieben. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass diese Zellen kein *JNK3* exprimieren (Mielke *et al.* 2000). Dagegen ist der in vielen Tumorzellen mutierte Tumorsuppressor p53 in PC12-Zellen nicht verändert (Fabian *et al.* 2006), was für die Untersuchung der eng mit Wachstum und Apoptose verbundenen MAPK relevant ist. Die Prozesse der Apoptose selbst sind ebenfalls vergleichsweise gut charakterisiert (Xia *et al.* 1995, Waetzig und Herdegen 2003a).

Um Artefakte durch Variation der Expression und sonstige Störfaktoren weiter zu minimieren, wurden die Experimente zum Einen parallel mit mehreren Zellklonen durchgeführt. Des Weiteren wurden auch die Kontrollzellen stabil mit dem Vektor transfiziert, um einen Einfluss der Transfektion auf die Zellen auszuschließen. Alle Zellen wurden außerdem regelmäßig lichtmikroskopisch auf die Expression der mit eGFP markierten exogenen Proteine überprüft. Auch die Western Blots mit einem Antikörper gegen MAP2K4 in den transfizierten Zellen bestätigten die Expression des MAP2K4-eGFP Fusionsproteins. Alle Experimente wurden zudem unabhängig von einander mindestens dreimal wiederholt.

4.3. Mögliche Effekte der Insertion in MAP2K4 δ

Der Unterschied der neu identifizierten Spleißvariante MAP2K4 δ zu MAP2K4 besteht in einer Insertion von elf Aminosäuren direkt N-terminal des als D-Domäne bezeichneten Abschnitts der Kinase (s. Abbildung 3, Seite 31). Diese Domäne dient als Bindestelle der MAPK an MAP2K4 (Ho *et al.* 2003). Es ist dabei wichtig, dass die einzelnen modularen Bestandteile der *D-site*, das basische Motiv (KRK - Lysin-Arginin-Lysin) und das

hydrophobe Motiv (LKL - Leucin-Lysin-Leucin), die beide für die Bindung wichtig sind, intakt bleiben. Passend dazu ist die grundlegende Funktion von MAP2K4, die Phosphorylierung von MAPK, in MAP2K4 δ erhalten.

Da auch viele andere mit MAPK interagierende Proteine sehr ähnlich aufgebaute Bindestellen besitzen, unter ihnen auch die hier untersuchten Transkriptionsfaktoren, sowie MAPK-Phosphatasen, wird vermutet, dass MAP2K und MAPK-Zielproteine um die Bindestelle der MAPK konkurrieren (Xia *et al.* 1998, Bardwell *et al.* 2009). Die Bindung von Proteinen an die *D-site* von MAP2K4 kann deren Lokalisation innerhalb der Zelle verändern (Tanoue und Nishida 2003). So wurde in zerebellären Neuronen gezeigt, dass MAP2K4 und JNK sich unter unstimulierten Bedingungen fast ausschließlich im Zytoplasma befanden und sich erst nach Stimulation in den Zellkern bewegten (Coffey *et al.* 2000).

Außerdem haben Gerüstproteine einen Einfluss auf die Organisation, und damit auch die Funktion, der MAPK-Module. Diese Proteine bringen Reaktionspartner innerhalb der Zelle in eine räumliche Nähe, um die Signalübertragung zu beschleunigen. Für eines der Gerüstproteine, JIP4/JLP, wurde gezeigt, dass es auch c-Myc binden kann, was ein Hinweis darauf ist, dass auch die nukleären Effektoren der MAPK in diese Komplexe eingebunden sein können (Lee *et al.* 2002).

Die direkte Nachbarschaft der eingefügten Aminosäuren in MAP2K4 δ zur ansonsten unveränderten D-Domäne lässt eine Beeinflussung der Bindung an MAPK oder Gerüstproteine möglich erscheinen. Dadurch könnten die MAP2K4-Spleißvarianten die Zusammensetzung der Signalosomen ändern und so Selektivität für einzelne MAPK vermitteln oder die Lokalisation von Effektoren beeinflussen und so die beobachteten Effekte auf die PC12-Zellen auslösen.

4.4. MAP2K4 und MAP2K4 δ regulieren die zelluläre Proliferation unter basalen Wachstumsbedingungen

Der auffälligste Unterschied zwischen *MAP2K4*- und *MAP2K4 δ* -überexprimierenden Zellen lag in der deutlichen Beeinflussung der Zellzahl. Während *MAP2K4* die Zellzahl reduzierte, wurde sie durch *MAP2K4 δ* gesteigert, so dass diese Zellen den *MAP2K4*-Zellen gegenüber beinahe die doppelte Anzahl erreichten. Die Überexpression der beiden Spleißvarianten resultierte in unterschiedlicher Signaltransduktion, beginnend mit den MAPK.

4.4.1. MAP2K4 und MAP2K4 δ aktivieren JNK und p38

Wie erwartet wurde JNK unter Überexpression beider Spleißvarianten verstärkt phosphoryliert. Die genaue Rolle von MAP2K4 in diesem Prozess ist jedoch nicht vollständig aufgeklärt und scheint von mehreren Faktoren abzuhängen. Weitgehende Einigkeit herrscht darüber, dass MAP2K4 bevorzugt einen Tyrosinrest im Aktivierungsmotiv von JNK phosphoryliert. Die zweite für die Aktivierung wichtige Seitenkette, ein Threoninrest, wird bevorzugt durch MAP2K7 modifiziert, kann aber auch durch MAP2K4 phosphoryliert werden (Lisnock *et al.* 2000, Wada *et al.* 2001). Beide MAP2K aktivieren JNK *in vitro*, der größte Effekt wird aber durch MAP2K4 und MAP2K7 in Kombination erzielt (Lawler *et al.* 1998). Die Relevanz von MAP2K4 für die Aktivierung von JNK ist vom untersuchten Zelltyp und vom verwendeten Stimulus abhängig. Allgemein wird MAP2K7 in den meisten Fällen als die Entscheidendere der beiden MAP2K angesehen, MAP2K4 ist jedoch für die vollständige Aktivierung von JNK nötig (Tournier *et al.* 2001, Asaoka und Nishina 2010).

Die semiquantitative Beurteilung der Western Blots zeigte, dass die Genprodukte der transfizierten *MAP2K4*-Spleißvarianten unter unstimulierten Bedingungen in ähnlichen Mengen wie ihre physiologischen Gegenstücke vorlagen. Die hierdurch hervorgerufene zusätzliche JNK-Aktivierung war nur geringfügig. Dies zeigt, dass die bloße Anwesenheit von MAP2K4 die Signalkaskade nicht vollständig aktiviert, was die bekannte Notwendigkeit eines Stimulus bestätigt. Somit ist in nicht stimulierten Zellen keine hohe MAPK-Aktivität zu erwarten, so dass auch kleine Veränderungen deutliche Effekte haben können. Des Weiteren war MAP2K7 in allen transfizierten Zellen reduziert, so dass der zweite wichtige JNK-Aktivator nicht seine volle Wirkung entfalten konnte.

Auffällig war eine Vermehrung der 54kDa-Spleißvariante von JNK2 unter *MAP2K4*-Überexpression, insbesondere durch MAP2K4 δ . Der Mechanismus dieser selektiven Beeinflussung einer einzelnen Spleißvariante konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht genauer untersucht werden, derselbe Effekt konnte aber für eine Spleißvariante von MAP2K7 gezeigt werden (Haeusgen *et al.* 2011b). Ursächlich ist eine Verstärkung der *JNK2*-Expression durch MAP2K4-aktivierte Transkription denkbar. Auch eine Stabilisierung von JNK auf Proteinebene ist möglich und birgt die Möglichkeit, dass MAP2K4 und MAP2K4 δ bevorzugt mit 54kDa-JNK2 interagieren und es so im Rahmen der Reaktionskomplexbildung vor Abbau schützen. Dies kann eine Folge der Insertion nahe der D-Domäne in MAP2K4 δ und daraus resultierender veränderter Proteinkomplexbildung sein. Die verschiedenen JNK-Spleißvarianten können in ihren Effekten auf die Zelle stark variieren, bis hin zu völlig

unterschiedlichen Entscheidungen über den Zelltod (Sabapathy *et al.* 2004, Ahmed und Milner 2009). Die Selektivität für die einzelnen JNK-Isoformen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen kann somit eine wichtige Rolle in der Erklärung der Wachstumsunterschiede darstellen.

Neben JNK wurde auch p38 verstärkt durch beide *MAP2K4*-Spleißvarianten phosphoryliert und wie bei JNK war auch hier der Zugewinn diskret. Dieses Ergebnis zeigt aber, dass *MAP2K4* in PC12-Zellen p38 aktivieren kann. Allgemein wird *MAP2K4* in dieser Funktion eine redundante Rolle zugeschrieben, da *MAP2K3* und *MAP2K6* die primären Aktivatoren von p38 sind (Enslin *et al.* 1998). In gewissen Zelltypen und bei bestimmten Stimuli kann *MAP2K4* die Aufgabe aber in Abwesenheit dieser beiden Kinasen übernehmen (Brancho *et al.* 2003, Kang *et al.* 2006). Eine Studie konnte *MAP2K4* auch eine nicht redundante Rolle bei der p38-abhängigen Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten zuschreiben (Wang *et al.* 2012). Die Frage nach der Redundanz von *MAP2K4* in PC12-Zellen kann mit den hier erhobenen Daten allerdings nicht beantwortet werden. Die belegte Aktivierung von p38 erweitert aber das Spektrum der *MAP2K4*-Signaltransduktion um p38-spezifische Effektoren.

4.4.2. Regulation der Aktivatorprotein-1-Aktivität durch *MAP2K4*-Spleißvarianten

Aktivatorprotein-1 (AP-1) ist ein zentraler Regulator der Genexpression und ein wichtiger Effektor aktivierter MAPK (Ameyar *et al.* 2003, Hess *et al.* 2004). Die Transkriptionsfaktoren c-Jun und ATF-2 gehören zur großen Gruppe der möglichen AP-1-Komponenten. Die Überexpression von *MAP2K4* und die nachfolgende JNK-Aktivierung veränderten die Menge von aktivem c-Jun oder ATF-2 nicht, ihre unphosphorylierten Formen lagen sogar in geringfügig reduzierter Menge vor. *MAP2K4 δ* dagegen reduzierte die Menge an c-Jun und führte zu vermehrter Phosphorylierung von ATF-2.

Da die Aktivierung der JNK-Signalkaskade und von AP-1 weitreichende zelluläre Konsequenzen bis hin zur Apoptose haben kann, ist eine engmaschige Kontrolle dieser Aktivierung, besonders unter normalen Wachstumsbedingungen, von großer Bedeutung. Als zentrale Maßnahme sind sowohl c-Jun als auch ATF-2 in nicht phosphorylierter Form fast vollständig inaktiv und werden erst nach Stimulation der MAPK-Kaskade aktiviert (Fuchs *et al.* 2000, Meng und Xia 2011). Diese Aktivierung fand in den PC12-Zellen nur für ATF-2 unter *MAP2K4 δ* -Überexpression statt, so dass AP-1-kontrollierte Transkription in diesem

Szenario vermutlich nur eine untergeordnete Rolle spielt. Somit reicht die *MAP2K4*-Überexpression alleine nicht für eine Aktivierung von AP-1 aus, was für ein funktionierendes Feedback-System unter unstimulierten Bedingungen spricht. *MAP2K4 δ* dagegen war in der Lage, die Aktivität von c-Jun und ATF-2 zu beeinflussen.

Auch die Kontrolle der AP-1-Proteinmenge ist für die Regulation wichtig. In einer Reihe von Publikationen zeigten Fuchs *et al.*, dass c-Jun unter nicht stimulierten Bedingungen durch Ubiquitinylierung zum Abbau markiert werden und dass dieser Prozess teilweise durch JNK vermittelt ist (Fuchs *et al.* 1997, Fuchs *et al.* 1998b, Fuchs *et al.* 2000). Diese Rolle wird jedoch eher inaktiver JNK zugeschrieben, die c-Jun bindet und Ubiquitinligasen rekrutiert (Lopez-Bergami *et al.* 2010). Da diese Funktion der MAPK unabhängig von ihrer Kinaseaktivität ist, wird sie in den hier vorgenommenen Versuchen mit MAPK-Hemmern nicht erfasst. Diese Versuche zeigen also einerseits, dass JNK auch in unstimulierten PC12-Zellen c-Jun aktiviert, sie maskieren aber die Effekte inaktiver JNK auf den Abbau von c-Jun. Auch aktive JNK kann aber über die Ubiquitinligase Itch zum Abbau von c-Jun beitragen, wobei dieser Effekt bisher nur in aktivierten T-Lymphozyten gezeigt werden konnte (Gao *et al.* 2004). Itch ist auch in den Abbau von *MAP2K4* involviert, und kann somit die Achse *MAP2K4*-JNK-c-Jun an mindestens zwei Stellen kontrollieren (Ahn und Kurie 2009). Somit ist Itch ein möglicher Effektor der erwähnten Kontrollmechanismen unter basalen Wachstumsbedingungen.

Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass die *MAP2K4*-Spleißvarianten den stabilisierenden Einfluss von aktiver JNK auf c-Jun reduzieren, z.B. durch Bindung der MAPK im Zytoplasma. Es ist aber auch ein vermehrter JNK-vermittelter Abbau denkbar. Interessanterweise konnte in Fibroblasten eine Isoform-spezifische Rolle für JNK2 im Abbau von c-Jun nachgewiesen werden (Sabapathy *et al.* 2004). Auch in den unstimulierten PC12-Zellen ging vermehrtes JNK2 mit verringertem c-Jun einher. Dieser Effekt war *MAP2K4*-abhängig und wurde durch *MAP2K4 δ* nochmals verstärkt. Eine genauere Untersuchung der Expression, Interaktion und Ubiquitinylierung von c-Jun könnte in einer zukünftigen Studie die Regulation von c-Jun in unstimulierten Zellen detaillierter aufklären. Alles in allem sorgen die genannten Mechanismen dafür, dass die Menge an aktivem c-Jun in nicht stimulierten Zellen eng kontrolliert wird. In den PC12-Zellen wird dies vor allem durch Reduktion der Proteinmenge erreicht und durch beide *MAP2K4*-Spleißvarianten vermittelt.

Im Gegensatz zu c-Jun wurde ATF-2 vor allem auf Ebene der Phosphorylierung durch JNK und p38 reguliert. Auffällig war, dass beide MAPK in den Vektorzellen und in den *MAP2K4 δ* -Zellen die Phosphorylierung von ATF-2 hemmten, sie in Verbindung mit

MAP2K4 aber förderten. Somit scheint MAP2K4 hier eine wichtigere Rolle zu spielen als bei der Aktivierung von c-Jun. Trotzdem erreichte ATF-2 in den *MAP2K4*-Zellen, ähnlich wie c-Jun, keine verstärkte Aktivierung. Dieser Widerspruch lässt sich durch die zellulären Kontrollmechanismen zumindest teilweise erklären, da aktiviertes ATF-2 zügig dem proteasomalen Abbau zugeführt wird (Fuchs *et al.* 2000).

In Verbindung mit MAP2K4 δ wurde hingegen eine leichte Vermehrung von aktivem ATF-2 festgestellt, obwohl JNK und p38 in diesen Zellen die Phosphorylierung von ATF-2 unterbinden. Möglicherweise spielt auch hier, wie bei c-Jun, eine nicht von der Kinaseaktivität der MAPK abhängige Funktion des Transkriptionsfaktors eine Rolle. Um diesen Widerspruch aufzulösen, sind weitere Untersuchungen der ATF-2-Regulation in PC12-Zellen nötig. So kann ATF-2 beispielsweise auch durch die dritte Gruppe der MAPK, ERK, aktiviert werden (Ouwens *et al.* 2002).

Zusammenfassend findet sich unter unstimulierten Wachstumsbedingungen außer einer geringfügigen Aktivierung von ATF-2 unter MAP2K4 δ keine vermehrte AP-1-Aktivität. Dieses Ergebnis zeigt, dass die untersuchten MAPK-Kaskaden auch in unstimulierten PC12-Zellen durch engmaschige Kontrollmechanismen in engen Grenzen gehalten werden.

4.4.3. Gegensätzliche Effekte von MAP2K4 und MAP2K4 δ auf die Zellzahl

Die Überexpression von *MAP2K4* resultierte in einer signifikanten Reduktion der PC12-Zellzahl, während transfiziertes *MAP2K4 δ* den entgegengesetzten Effekt hervorrief. Die Wirkung von MAP2K4 auf die Proliferation ist umstritten.

Eine antiproliferative Wirkung wurde in einigen Tumorzelllinien beobachtet. So führte die ektopische *MAP2K4*-Expression in Ovarialkarzinomzellen ebenfalls zu reduzierter Proliferation (Lotan *et al.* 2008). Da inaktivierende Mutationen und Verlust der Kinase in Malignomen relativ häufig sind, gilt MAP2K4 als potentieller Tumorsuppressor (Teng *et al.* 1997, Whitmarsh und Davis 2007). Des Weiteren kann MAP2K4 in mehreren Tumormodellen die Metastasierung unterdrücken (Yoshida *et al.* 1999, van der Griend *et al.* 2005, Cunningham *et al.* 2006). Es ist jedoch denkbar, dass die Rolle als Tumorsuppressor durch die Nähe zum *p53*-Gen überschätzt wird. So könnte der Verlust der chromosomalen Region, die diese beiden Gene enthält, durch Deletion des *p53*-Gens für die Tumorzelle vorteilhaft sein. Somit wäre der Verlust von *MAP2K4* ein Kollateralschaden, und trotz einer proliferativen Rolle vorteilhaft.

Belege für eine solche proliferative Rolle finden sich ebenfalls in der Literatur und stehen damit im Widerspruch zu den genannten Veröffentlichungen. Einige Arbeiten, in denen MAP2K4 die Tumorigenese fördert, oder sogar eine zentrale Rolle dabei einnimmt (Wang *et al.* 2004, Finegan und Tournier 2010), klassifizierten die Kinase als potentiell Onkogen. Da MAP2K4 also sowohl proliferativ als auch antiproliferativ wirken kann, scheint das zelluläre Umfeld für die Funktion ausschlaggebend zu sein. Dieses ist aber nicht nur zwischen verschiedenen Tumoren, sondern auch innerhalb jedes Tumors sehr variabel. Da die meisten Zelllinien aus Tumorzellen gewonnen werden, lassen sich Ergebnisse aus verschiedenen Zellsystemen nur mit Vorsicht vergleichen. In PC12-Zellen wurde der Zusammenhang zwischen MAPK und Proliferation bisher meist im Rahmen von mit NGF differenzierten Zellen untersucht. So ist MAP2K7 in differenzierten PC12-Zellen in der Lage, den Proliferationsstopp, der in dieser Situation eintritt, zu überwinden und JNK zu induzieren (Haeusgen *et al.* 2011b).

Alles in allem wurden gegensätzliche Effekte von MAP2K4 auf die zelluläre Proliferation beobachtet, die bis heute nicht vollständig aufgeklärt wurden. Die hier erstmals beschriebene Spleißvariante *MAP2K4 δ* bietet einen neuen Erklärungsansatz. Dabei zeigen beide Spleißvarianten teils gegensätzliche Einflüsse auf zentrale Regulationsmechanismen der zellulären Proliferation sowie der Apoptose.

4.4.4. Regulation der zellulären Proliferation durch MAP2K4 und MAP2K4 δ

In den PC12-Zellen ging die *MAP2K4*-Überexpression mit einer verringerten BrdU-Inkorporation und einer verringerten Anzahl an Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus einher, was insgesamt für eine Verlangsamung des Zellzyklus spricht. Die vermehrte Zellzahl in mit *MAP2K4 δ* transfizierten Zellen korrelierte dagegen mit erhöhter BrdU-Inkorporation. Diese Befunde sprechen dafür, dass die Spleißvarianten von MAP2K4 die Proliferation von PC12-Zellen differentiell regulieren.

Der Tumorsuppressor p53 nimmt eine zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation ein. Seine proliferationshemmende Wirkung wird hauptsächlich über die Proteinmenge reguliert. Das p53-Protein hat normalerweise nur eine kurze Halbwertszeit (Culmsee und Mattson 2005) und kann durch posttranslationale Modifizierung stabilisiert werden, was dann zur Akkumulation führt. Ein wichtiger Mechanismus ist dabei die Phosphorylierung, die an diversen Seitenketten des p53-Proteins, unter anderem durch JNK und p38 vermittelt, erfolgen kann (Fuchs *et al.* 1998a, Zhu *et al.* 2002, Übersicht bei Wu 2004).

In den PC12-Zellen stieg der intrazelluläre Spiegel von p53 nach Überexpression beider *MAP2K4*-Spleißvarianten an. Ein kinaseabhängiger Effekt von JNK oder p38 trat jedoch nur unter *MAP2K4*-Überexpression auf. Das in dieser Arbeit auf Phosphorylierung untersuchte Serin an Position 15 wurde mit MAPK-Aktivität nach zellulärem Stress in Verbindung gebracht. Dabei führte diese Modifikation zu einer Akkumulation von p53 und einem Proliferationsstopp bzw. zur Apoptose (Kim *et al.* 2002, Fuchs *et al.* 1998b), unter anderem in Neuronen (Zhu *et al.* 2002). Diese Modifikation wurde jedoch hier in keiner der Zelllinien vermehrt beobachtet. Da jedoch zahlreiche weitere Seitenketten von p53 durch MAPK phosphoryliert werden können, ist eine solche Interaktion nicht auszuschließen (Wu 2004).

Auch durch Verhinderung des Ubiquitin-abhängigen Abbaus kann JNK die p53-Menge erhöhen (Fuchs *et al.* 1998a). Dieser Mechanismus ist eine mögliche Erklärung der p53-Akkumulation in *MAP2K4 δ* -Zellen, die in diesen Zellen nicht von der Kinaseaktivität der MAPK abhängig war. Des Weiteren kann auch die oben beschriebene Reduktion von c-Jun eine Rolle spielen, da c-Jun die Expression von p53 unterdrücken kann (Eferl *et al.* 2003). Trotz dieser Unterschiede in der Regulation führte die erhöhte Expression beider *MAP2K4*-Spleißvarianten aber zu einer vergleichbaren Akkumulation von p53.

Ein weiterer zentraler Regulator des Zellzyklus, c-Myc, wurde sowohl durch *MAP2K4* als auch *MAP2K4 δ* reduziert. Auffällig war dabei, dass JNK in den Kontrollzellen einen hemmenden Einfluss auf c-Myc hatte, während die Überexpression beider Spleißvarianten diesen Effekt aufhob. Analog zu c-Jun und ATF-2 kann auch c-Myc JNK-vermittelt zum Abbau durch Ubiquitinylierung markiert werden (Alarcon-Vargas und Ronai 2004). In beiden überexprimierenden Zelllinien scheint dieser Effekt nicht durch die Kinaseaktivität von JNK vermittelt zu sein.

Im Widerspruch dazu steht eine Studie, die eine JNK-abhängige Induktion von c-Myc in T-ALL-Zellen zeigen konnte, die jedoch Ergebnis der atypischen Lokalisation von JNK im Nukleus sein kann (Cui *et al.* 2009). Hui *et al.* zeigten eine JNK-vermittelte Vermehrung von c-Myc in Hepatozyten, die jedoch nur von JNK1 abhängig war, wogegen das in der hier vorliegenden Arbeit vermehrte JNK2 diese Wirkung nicht hatte (Hui *et al.* 2008).

Im Gegensatz zu JNK hatte p38 je nach überexprimierter *MAP2K4*-Spleißvariante gegensätzliche Effekte – durch *MAP2K4* wurde die c-Myc Proteinmenge p38-abhängig vermehrt, durch *MAP2K4 δ* reduziert. Eine Induktion von c-Myc durch p38 wurde bereits beschrieben. Nach Rapamycin-Stimulation stabilisierte p38 indirekt die c-Myc-mRNA, so lange die Proteinkinase Akt inaktiv war. Nach Aktivierung von Akt wurde dieser Effekt umgekehrt (Chen *et al.* 2006, Marderosian *et al.* 2006). Ein ähnlicher Mechanismus wäre

auch für MAP2K4 denkbar. Dennoch war die Gesamtmenge von c-Myc in den *MAP2K4*-Zellen trotz des positiven Einflusses von p38 reduziert. Während die Kontrolle von c-Myc durch MAPK somit vom zellulären Umfeld abhängig ist, scheint in *MAP2K4*- oder *MAP2K4 δ* -überexprimierenden Zellen der Abbau von c-Myc durch JNK zu überwiegen.

Der Zellzyklusinhibitor p21 ist ein Effektor von p53, steht jedoch indirekt auch unter der Kontrolle von c-Myc. Durch Hemmung der Komplexe aus Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) verhindert p21 den Übertritt der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus. Passend zur reduzierten Zellzahl unter *MAP2K4*-Überexpression war in diesen Zellen vermehrt p21 nachweisbar, während die Menge in den *MAP2K4 δ* -Zellen unverändert blieb. Von den Mechanismen die zur Akkumulation von p21 führen können, ist die Induktion der *p21*-Transkription durch p53 der am besten untersuchte (el-Deiry *et al.* 1993, Shaulian und Karin 2002). Dieser Prozess kann durch c-Myc inhibiert werden (Seoane *et al.* 2002), so dass die in den *MAP2K4*-PC12-Zellen beobachtete Akkumulation von p53 und Inhibition von c-Myc hier synergistisch wirken. Diese beiden Faktoren traten aber auch nach Transfektion der Zellen mit *MAP2K4 δ* auf, ohne dass hier eine p21-Induktion zu beobachten war. Somit scheinen weitere Faktoren in die Regulation von p21 einbezogen zu sein.

Sowohl JNK als auch p38 können p21 direkt durch Phosphorylierung stabilisieren (Übersicht bei Kreis *et al.* 2015). So führte eine über MAP2K4 und p38 induzierte, p21-vermittelte Hemmung des Zellzyklus zu einer Verlangsamung der Metastasierung einer Ovarialkarzinom-Zelllinie *in vivo* (Lotan *et al.* 2008). Auch die Wachstumshemmung durch Inhibition von Selenoprotein W wird über MAP2K4, JNK2, p38 und p21 vermittelt (Hawkes und Alkan 2012). Tatsächlich phosphorylierten p38 und besonders JNK in den hier untersuchten Zellen p21, jedoch ausschließlich unter *MAP2K4*-Überexpression. Somit ruft nur MAP2K4, und nicht MAP2K4 δ , eine MAPK-vermittelte p21-Stabilisierung hervor, und erzeugt so die beobachtete Akkumulation.

Mit Cyclin D1 wurde ein weiterer wichtiger Regulator des G1/S-Checkpunkts des Zellzyklus durch die Überexpression beeinflusst. Im Gegensatz zu seinem Gegenspieler p21 ist die Akkumulation von Cyclin D1 für den Übergang in die S-Phase nötig (Matsuura *et al.* 2002), da es die Cyclin-abhängige Kinase 4 aktiviert (Coffey *et al.* 2000). Eine solche Akkumulation wurde unter der Überexpression von *MAP2K4 δ* beobachtet, nicht aber unter *MAP2K4*-Überexpression. In erster Linie ist die Menge von Cyclin D1 abhängig von mitogenen Faktoren, darunter insbesondere c-Myc (Klein und Assoian 2008). Dagegen kann p21 die Expression hemmen (Fritah *et al.* 2005), so dass in den *MAP2K4*-Zellen die Kombination aus c-Myc-Repression und p21-Akkumulation zur Reduktion von Cyclin D1 führt. In der Summe

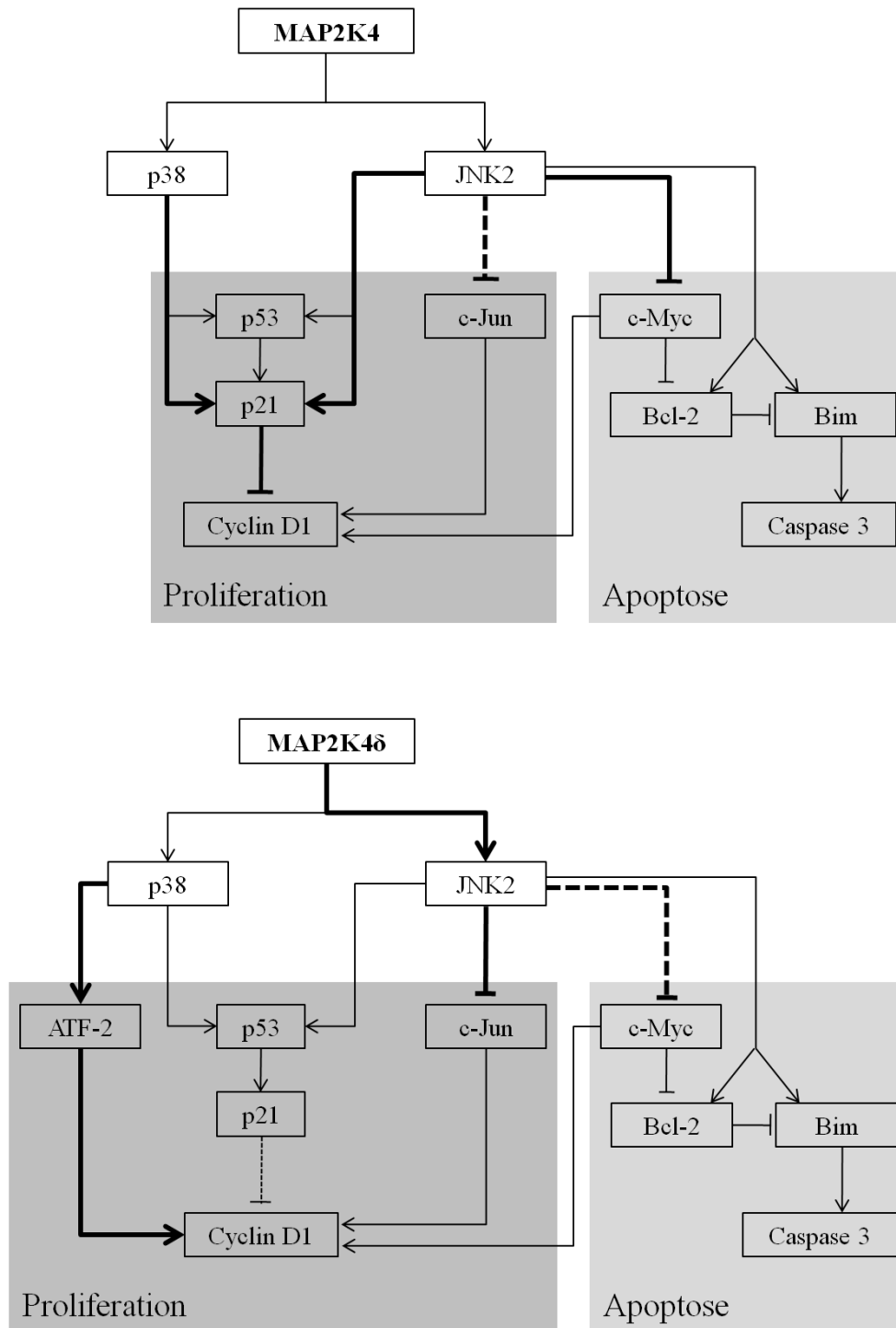


Abbildung 24: Schematisches Modell der MAP2K4-Signaltransduktion unter basalen Wachstumsbedingungen

Vereinfachte Zusammenfassung der molekularen Mechanismen in der Signalkaskade von MAP2K4 und MAP2K4δ. Pfeil: Stimulation, Querstrich: Hemmung. Dicke Linien markieren spezifische Effekte der Spleißvarianten. Unterbrochene Linien zeigen schwächere Effekte relativ zur jeweils anderen Spleißvariante an.

wird in diesen Zellen also der Übergang der Zellen in die S-Phase gehemmt. In den vermehrt proliferierenden *MAP2K4 δ* -Zellen dagegen fiel der hemmende Einfluss von p21 auf den Checkpunkt weg.

Die durchflusszytometrische Messung der Zellzyklusphasen zeigte keine signifikante Anreicherung der *MAP2K4 δ* -Zellen in fortgeschrittenen Zyklusphasen. Die Unterschiede zwischen den drei Zelllinien waren jedoch insgesamt eher gering und Zellen in G1 machten jeweils ca. 2/3 der Beobachtungen aus. Ein geringer Zuwachs an Zellen in der S-Phase unter *MAP2K4 δ* -Überexpression war vorhanden, jedoch nicht statistisch signifikant. Dies kann Folge der relativ kleinen Stichprobe sein. Dennoch ist die Diskrepanz der Ergebnisse von Zellzahl und Regulation einerseits und Durchflusszytometrie andererseits auffällig. Sie lässt sich möglicherweise auf die Kultivierung der Zellen in Mitogen-armem Medium zurückführen, das ausschließlich für die Durchflusszytometrie durchgeführt wurde.

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Modell der Zellzyklusregulation. MAP2K4 reduziert die Proliferation, indem p53 und p21 stabilisiert werden und parallel dazu c-Myc abgebaut wird. Beide Prozesse resultieren in einer Hemmung des G1/S-Übergangs. MAP2K4 δ dagegen hat keinen stabilisierenden Effekt auf p53 und p21, was zu einer erhöhten Proteinnmenge von Cyclin D1 und dem Passieren des Zellzyklus-Checkpunkts führt. Die beobachteten Veränderungen der DNA-Synthese bestätigen dieses Bild, so dass die differentielle Regulation der Proliferation durch die *MAP2K4*-Spleißvarianten wahrscheinlich die Hauptursache der stark unterschiedlichen Zellzahl darstellt. Abbildung 24 zeigt ein schematisches Übersichtsmodell über die molekulare Regulation. Dieser bisher nicht bekannte Mechanismus bietet eine Erklärung für die eingangs erwähnten widersprüchlichen Funktionen von MAP2K4 in Wachstum und Tumorigenese.

4.4.5. Regulation der Apoptose durch MAP2K4 und MAP2K4 δ

Die Regulation der Apoptose durch die beiden *MAP2K4*-Spleißvarianten fiel deutlich weniger differenziert aus als die der Proliferation. MAP2K4 und MAP2K4 δ führten beide zu einer vergleichbar starken Vermehrung des antiapoptotischen Faktors Bcl-2 und einer gleichzeitigen Reduktion des proapoptotischen Bim. Diese beiden Proteine stellen einen wichtigen Kontrollmechanismus des intrinsischen Weges der Apoptose dar, wobei Bim insbesondere als zentraler Aktivator der neuronalen Apoptose gilt (Becker *et al.* 2004). Bim wird durch Bcl-2 inaktiviert, so dass das Gleichgewicht dieser beiden Faktoren über das Ausmaß der Apoptose entscheidet (Bouillet und Strasser 2002). Eine Vermehrung von Bcl-2

und nachfolgende Reduktion von Bim hemmt den intrinsischen Weg der Apoptose über die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und die Aktivierung von Caspase-3. Die beobachteten Veränderungen sprechen also in beiden Zelllinien für eine Unterdrückung dieses Mechanismus.

Sowohl Bim als auch Bcl-2 stehen unter der Kontrolle von JNK und AP1. Insbesondere Bim wird als ein Effektor apoptotischen Wirkung von JNK betrachtet, da zum Einen seine Expression AP1-abhängig gesteigert werden kann (Whitfield *et al.* 2001, Hess *et al.* 2004) und zum Anderen seine Phosphorylierung durch JNK die apoptotische Aktivität steigert (Lei und Davis 2003, Becker *et al.* 2004). Auch in den hier untersuchten Zellen war Bim in allen drei Zelllinien von JNK abhängig, erreichte jedoch in den Leervektor-Zellen eine höhere intrazelluläre Konzentration.

Mit Bcl-2 wurde ein direkter Antagonist von Bim ebenfalls durch MAP2K4 und MAP2K4 δ induziert. Die Rolle der MAPK-Kaskade in der Regulation von Bcl-2 ist weniger eindeutig als die von Bim, einige Studien zeigen jedoch, dass auch Bcl-2 von JNK phosphoryliert werden kann. Es ist jedoch umstritten, ob diese Modifikation die Wirkung von Bcl-2 reduziert (Yamamoto *et al.* 1999) oder steigert (Deng *et al.* 2001). Die Menge von Bcl-2 wurde in allen drei PC12-Linien durch die Kinaseaktivität von JNK gesteigert. Die Expression wird zudem durch c-Myc reprimiert (Eischen *et al.* 2001), was die Möglichkeit eröffnet, dass die oben beschriebene deutliche Reduktion dieses Faktors durch die Überexpression von MAP2K4 und MAP2K4 δ ebenfalls einen Einfluss auf Bcl-2 hat. In diesem Erklärungsansatz haben beide MAP2K4-Spleißvarianten keinen direkten Effekt auf Bim und Bcl-2. Durch Repression von c-Myc fällt dieses jedoch als Inhibitor von Bcl-2 weg, wodurch sich das Bim-Bcl-2-Gleichgewicht wie beschrieben verändert und die intrinsische Apoptose inhibiert.

Die gemeinsame Endstrecke aller Apoptose-Signalwege ist die Aktivierung der Caspase-3 durch Proteolyse, auch ‚cleavage‘ genannt. Dieser Prozess konnte in beiden Zelllinien vermehrt beobachtet werden, was der oben erwähnten Unterdrückung der intrinsischen Apoptose widerspricht, zumal die Untersuchung von Fas, dem Aktivator der extrinsischen Apoptose, ebenfalls keine vermehrte Aktivität ergab. Möglicherweise wurde die Aktivierung der Apoptosekaskade durch einen Western Blot an einem Zeitpunkt nicht in vollem Umfang erfasst. Hier wäre der zeitliche Verlauf der einzelnen Proteinkonzentrationen in zukünftigen Versuchen ein wichtiger Parameter. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass MAP2K4 über einen weiteren Mechanismus auf die Caspase-Aktivierung Einfluss nimmt. Chang *et al.* konnten zeigen, dass JNK durch Aktivierung der Ubiquitinligase Itch den Caspasehemmer c-FLIP abbauen kann (Chang *et al.* 2006). Dieser Mechanismus wurde nach TNF α -Stimulation

beobachtet, zeigt aber, dass MAP2K4 und JNK auch ohne Veränderungen an Bim/Bcl-2 oder Fas die Menge an aktiver Caspase-3 beeinflussen können.

Insgesamt ist davon auszugehen, dass unter unstimulierten, basalen Wachstumsbedingungen nur in wenigen Zellen Apoptose ausgelöst wird (Aziz *et al.* 2013). Dies änderte sich in den PC12-Zellen durch Überexpression der MAP2K4-Spleißvarianten nicht. Ähnliches gilt für Untersuchungen der MAPK-Kaskade. Da der MAPK-Signalweg stark von exogenen Stimuli abhängig ist, um seine volle Aktivität zu erreichen, ist zu vermuten, dass ein proapoptotischer Effekt dieses Signalwegs unter basalen Bedingungen nur eine geringe Rolle spielt. Einige Schlüsse dazu können aus *MAP2K4-knockout* bzw. *-knockdown* Experimenten gezogen werden. So hatte der *knockout* von *MAP2K4* in einem Tumorigenesemodell der Haut keinen Einfluss auf die Anzahl apoptotischer Zellen (Finegan und Tournier 2010).

Eine Studie konnte zeigen, dass MAP2K4 in embryonalen Stammzellen unter unstimulierten Bedingungen antiproliferativ und proapoptotisch wirkt (Cazillis *et al.* 2004). Allerdings wurden die Zellen bis zur Konfluenz gezüchtet und auch abgelöste Zellen betrachtet. Letztere wurden in der hier vorliegenden Arbeit jedoch bewusst verworfen, da die Ablösung von der extrazellulären Matrix den zellulären Phänotyp ändern und Apoptose auslösen kann (Anoikis), so dass diese Ergebnisse nicht problemlos übertragbar sind. Diese Ergebnisse stellen allerdings eine mögliche Erklärung für die mehrfach beobachtete Unterdrückung von Metastasierung durch MAP2K4 dar (van der Griend *et al.* 2005, Lotan *et al.* 2008), denn das Überleben des Anoikis-Prozesses ist eine zentrale Voraussetzung für die erfolgreiche Kolonisierung eines entfernten Gewebes. Andererseits stellt die Stimulus-unabhängige Apoptose, wie sie bei Cazillis *et al.* beobachtet wurde, einen weiteren wichtigen Faktor der Gewebemöostase dar, so dass die Ablösung aus dem Zellverbund keine zwingende Voraussetzung für die Auslösung der Apoptose ist.

Alles in allem ist der Einfluss der Apoptose auf die Zellzahl unter diesen nicht stimulierten Wachstumsbedingungen also als eher gering anzusehen. Zwar spricht die Vermehrung von aktiver Caspase-3 durch beide *MAP2K4*-Spleißvarianten für eine verstärkte Apoptose, doch scheint die gesteigerte Proliferation in den *MAP2K4 δ* -Zellen den Effekt der Apoptose auf die Zellzahl mehr als auszugleichen. Unter *MAP2K4*-Überexpression ergänzt die Apoptose die reduzierte Proliferation, so dass beide Prozesse die reduzierte Zellzahl bedingen.

4.5. Signaltransduktion durch *MAP2K4*-Spleißvarianten nach Stimulation mit Paclitaxel

4.5.1. Effekte von Paclitaxel auf die MAPK-Signalkaskade in PC12-Zellen

Paclitaxel löste in den als Kontrollen eingesetzten PC12-Zellen eine Aktivierung von MAP2K4 und MAP2K7 aus. Bereits nach zwei Stunden kam es zur Phosphorylierung von JNK, insbesondere JNK1. Dagegen wurde p38 erst nach vier bis sechs Stunden aktiviert. Da aber die AP-1-Komponenten c-Jun und ATF-2 ebenfalls schon nach zwei Stunden aktiviert wurden, scheint JNK für die frühe Signaltransduktion, die durch Behandlung mit Paclitaxel ausgelöst wird, eine wichtigere Rolle zu spielen. Für beide MAPK wurde die Aktivierung durch Paclitaxel bereits belegt, für JNK explizit auch in PC12-Zellen (Deacon *et al.* 2003, Waetzig und Herdegen 2003b). Hingegen spielt p38 in einigen Modellen keine Rolle und wird durch Paclitaxel, wie auch hier beobachtet, weniger aktiviert als JNK (Yujiri *et al.* 1999, Srivastava *et al.* 1999). Dennoch kann auch die verzögerte Aktivität von p38 eine Rolle in den folgenden, zeitlich später ablaufenden Prozessen, wie z.B. der Aktivierung von Caspase-3, spielen.

Die Zahl viabler Zellen wurde durch die Behandlung mit 5 μ M Paclitaxel um die Hälfte reduziert. Die Aktivierung von Caspase-3 spricht dafür, dass Apoptose dabei eine wichtige Rolle spielt. Viele Ergebnisse sprechen für eine inaktivierende Phosphorylierung antiapoptotischer Faktoren als Auslöser der Apoptose (Wang *et al.* 1999, Yamamoto *et al.* 1999, Farhat *et al.* 2014, Matson und Stukenberg 2011). In dieser Arbeit konnte jedoch keine Reduktion von Bcl-2 gezeigt werden. Möglicherweise resultiert die Phosphorylierung von Bcl-2 nicht in dessen Abbau, so dass dieser Effekt nicht erfasst wurde. Diese Modifikation in wurde zudem in einigen Arbeiten nur mit Verzögerung beobachtet (Scatena *et al.* 1998), so dass sie in dieser Arbeit eventuell nach zwei Stunden nicht erfasst wurde. Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass die Inaktivierung von Bcl-2 nicht in allen Zelltypen erfolgt (Wang *et al.* 2000). Insbesondere konnten Figueroa-Masot *et al.* zeigen, dass kortikale Neuronen dieses Verhalten nicht zeigen und eine JNK-abhängige Apoptose ohne Beeinflussung von Bcl-2 ablaufen lassen (Figueroa-Masot *et al.* 2001). Des Weiteren kann auch ATF-2 in PC12-Zellen eine proapoptotische Wirkungen haben (Leppa *et al.* 2001), indem es nach Stimulation mit Paclitaxel an den Mitochondrien akkumuliert und die intrinsische Apoptose auslöst (Liu *et al.* 2015).

Außerdem ist der Zelltod nach Paclitaxel nicht ausschließlich durch Apoptose bedingt. Auch andere Varianten des programmierten Zelltodes sowie auch Nekrose können, insbesondere bei hohen Konzentrationen des Zytostatikums, ablaufen und somit die Zellzahl reduzieren, ohne Veränderungen an Bim, Bcl-2 oder Caspase-3 auszulösen (Sun *et al.* 2010, Yeung *et al.* 1999).

Ein weiteres auffälliges Resultat der Paclitaxel-Stimulation war die deutliche Reduktion der p53-Proteinmenge. Wie bereits weiter oben diskutiert, ist die Akkumulation der primäre Auslöser der p53-Aktivität, so dass dieses Protein bei der Auslösung des Zelltodes durch Paclitaxel in PC12-Zellen keine Rolle spielt. Es scheint zwei Faktoren zu geben, die in diesem Szenario über die Aktivierung von p53 entscheiden. Zum einen ist der Zelltyp zu nennen. In vielen, aber nicht allen, Tumorzelllinien wird p53 durch Paclitaxel induziert (Farhat *et al.* 2014), sogar in Tumoren die inaktivierende p53-Mutationen tragen (Wang *et al.* 2000). Zum Anderen ist die zelluläre Antwort von der Konzentration von Paclitaxel abhängig. Konzentrationen im nanomolaren Bereich führen eher zu einer p53-abhängigen Apoptose, während niedrige mikromolare Konzentrationen, wie die hier verwendeten 5 μ M, eher p53-unabhängig sind (Giannakakou *et al.* 2001).

In PC12-Zellen führt Paclitaxel also zu einer frühzeitigen Aktivierung von JNK durch MAP2K4 und MAP2K7 mit nachfolgender Aktivierung von c-Jun und ATF-2. Dagegen spielt p53 wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle. Die vermehrte Aktivierung von Caspase-3 spricht für vermehrt ablaufende Apoptose.

4.5.2. MAP2K4 und MAP2K4 δ vermitteln die JNK-Aktivierung als Antwort auf Paclitaxel

Die Überexpression beider *MAP2K4*-Spleißvarianten führte zu einer verstärkten Aktivierung von JNK nach Paclitaxel-Stimulation. Auch die Aktivierung von Caspase-3 wurde durch MAP2K4 und MAP2K4 δ verstärkt. In der Literatur gibt es widersprüchliche Ergebnisse zum Zusammenhang von MAP2K4 und Apoptose im Zusammenhang mit Paclitaxel. Srivastava *et al.* beobachteten das Ausbleiben der JNK-Aktivierung und der Apoptose in Brustkrebs-Zelllinien, die mit einer dominanten Kinase-inaktiven Form von *MAP2K4* transfiziert wurden. Dies spricht für eine wichtige Funktion von MAP2K4 in diesen Zellen (Srivastava *et al.* 1999). Gleichzeitig fanden Yamamoto *et al.*, dass MAP2K4 für denselben Prozess in T-Zellen keine Rolle spielte und die JNK-Aktivierung vor allem von MAP2K7 vermittelt wurde (Yamamoto *et al.* 1999). Da auch MAP2K7 in den PC12-Zellen von Paclitaxel aktiviert

wurde, lässt sich hier die relative Wichtigkeit der beiden MAP2K nur schwer feststellen. Die vermehrte Caspase-Aktivierung unter *MAP2K4*-Überexpression spricht aber dafür, dass die Kinase diesen Prozess zumindest teilweise kontrolliert.

Die Überexpression beider Spleißvarianten resultierte auf molekularer Ebene in weniger Unterschieden als dies noch unter basalen Wachstumsbedingungen der Fall war. Trotzdem hatten beide Spleißvarianten einen deutlichen Einfluss auf das Überleben der Zellen. Die Überexpression von *MAP2K4* resultierte in einer signifikant höheren Zahl lebender Zellen. Durch die Überexpression von *MAP2K4 δ* wurde die Zahl lebender Zellen jedoch gegenüber den Kontrollen nochmals reduziert. Da, wie bereits erwähnt, die Aktivierung der Apoptose durch beide Spleißvarianten in ähnlichem Maße verstärkt wurde, stellt sich die Frage, wie diese Unterschiede zustande kommen.

Bei der Analyse der Zellzahlen sollte das basale Wachstum berücksichtigt werden, da dieses die Ergebnisse der Stimulation überlagern kann. Ein zentraler Aspekt der Chemotherapie maligner Tumoren besteht in der Tatsache, dass die verwendeten Medikamente auf schnell proliferierende Zellen stärker wirken als auf langsam proliferierende oder ruhende Zellen. Dementsprechend lässt sich annehmen, dass die *MAP2K4*-Zellen weniger anfälliger gegen Paclitaxel waren als *MAP2K4 δ* -Zellen oder auch die Kontrollen. Ein Teil der relativ höheren Zellzahl unter *MAP2K4*-Überexpression könnte also das Resultat dieser unterschiedlichen Suszeptibilität sein. Dennoch deuten die Ergebnisse auch auf eine explizit veränderte Signaltransduktion hin, die zumindest teilweise durch MAP2K4 gesteuert wird.

Auffällig war, dass nur MAP2K4 zu einer weiteren Phosphorylierung von c-Jun führte, während MAP2K4 δ hier das Niveau der Vektorzellen erreichte. Auch die relativen Mengen von JNK1 und JNK2 waren nach Transfektion von *MAP2K4 δ* vergleichbar mit denen der Kontrollzellen, während *MAP2K4* die JNK1-Proteinmenge verringerte. Außerdem fiel auf, dass JNK2, das unter unstimulierten Bedingungen durch beide MAP2K4-Varianten vermehrt wurde, durch Paclitaxel nicht beeinflusst wurde. Somit scheint JNK1 für die Stressreaktion wichtiger zu sein als JNK2. Passend dazu senkte ein *JNK1-knockout* in Fibroblasten die Apoptoserate durch Paclitaxel, der *JNK2-knockout* jedoch nicht (Kolomeichuk *et al.* 2008). Also könnte die Reduktion von JNK1 in den *MAP2K4*-Zellen eine schützende Funktion darstellen, obwohl die Aktivierung zu pJNK insgesamt nicht reduziert wurde. Auch führte Paclitaxel in den *MAP2K4*-Zellen zu einer deutlichen Induktion von c-Jun. Obwohl aktiviertes c-Jun in neuronalen Zellen meist proapoptotisch wirkt, hat es auch andere Funktionen (Waetzig *et al.* 2006). Hinsichtlich seiner Rolle bei der Antwort der Zelle auf Paclitaxel gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Zwar kommt es meist zum auch hier

beobachteten Anstieg von c-Jun (Stone und Chambers 2000, Figueroa-Masot *et al.* 2001), für die Auslösung der Apoptose ist jedoch keine c-Jun-abhängige Transkription nötig (Kolomeichuk *et al.* 2008).

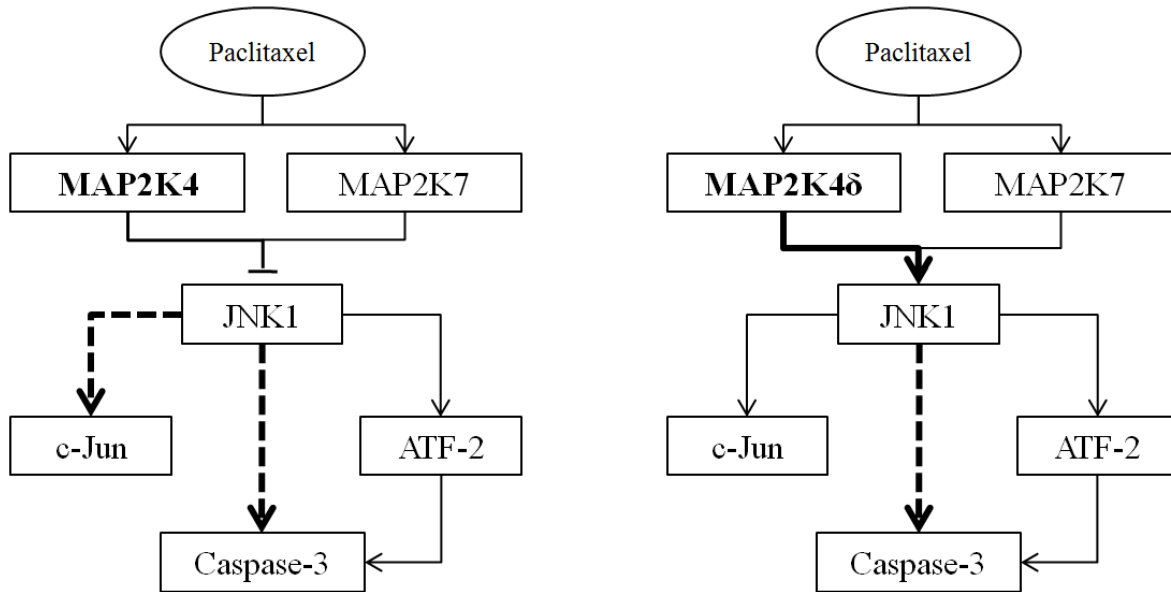


Abbildung 25: Schematisches Modell der Signaltransduktion durch *MAP2K4*-Spleißvarianten unter Paclitaxel-Stimulation

Zusammenfassung des hier vorgeschlagenen Modells der Signalkaskade nach Stimulation von PC12-Zellen mit Paclitaxel. Pfeilspitzen zeigen Aktivierung an, Querstriche stehen für eine Hemmung. Dicke Linien markieren Spleißvarianten-spezifische Effekte. Unterbrochene Linien zeigen unklare Zwischenschritte

Ein weiterer Unterscheid zwischen MAP2K4 und MAP2K4δ lag in der unterschiedlichen Regulation von p53. Nur unter *MAP2K4*-Überexpression konnte keine vermehrte Phosphorylierung von p53 am Serinrest an Position 15 nachgewiesen werden. Diese Modifikation kann von JNK und p38 katalysiert werden (Wu 2004). In Neuronen wird so bei hypoxischem Stress die Interaktion mit Mdm2 verhindert, was die Apoptose der Zellen zur Folge hatte (Zhu *et al.* 2002). Allerdings war in diesem Szenario p38 die primäre p53-aktivierende Kinase, die hier in den PC12-Zellen zum Zeitpunkt der p53-Phosphorylierung noch nicht aktiv war. In murinen Leberzellen unter oxidativem Stress war dagegen JNK der entscheidende Aktivator (Cheng *et al.* 2003). Da es aber noch weitere p53-Kinasen gibt, lässt sich der genaue Mechanismus mit den hier erhobenen Daten nicht mit letzter Gewissheit feststellen. Zusätzlich können weitere posttranslationale Modifikationen die Funktion von p53 beeinflussen, so beispielsweise die Acetylierung, wie sie von Kim *et al.* beobachtet wurde (Kim *et al.* 2013). Da, wie bereits erwähnt, die Rolle von p53 in der Apoptose nach Paclitaxel

nicht eindeutig geklärt ist (s. Kapitel 4.4.4), ist die Relevanz der Phosphorylierung im Rahmen dieser Arbeit kritisch zu sehen, zumal sie nicht zu einer Akkumulation von p53 führte.

Alles in allem lässt sich festhalten, dass beide *MAP2K4*-Spleißvarianten durch Paclitaxel aktiviert werden und Einfluss auf das Überleben der Zellen nehmen. Dabei prädisponierte die unter unstimulierten Bedingungen proliferative neue Spleißvariante *MAP2K4 δ* zum Zelltod während die antiproliferative *MAP2K4* davor schützte. Im Gegensatz zu unstimulierten Wachstumsbedingungen interagieren beide Spleißvarianten bei Anwesenheit von Paclitaxel bevorzugt mit JNK1 anstatt JNK2.

4.6. Ausblick

Diese Arbeit belegt erstmals die Existenz von *MAP2K4*-Spleißvarianten in neuronalen Zellen und zeigt auch, dass diese Spleißvarianten entscheidenden Einfluss auf die Proliferation und die zelluläre Antwort auf das Chemotherapeutikum Paclitaxel haben. Daraus ergibt sich ein neuer Erklärungsansatz für die pleiotropen Effekte der MAPK-Aktivierung, die in vielen Zellen beobachtet wurden.

In weiteren Studien sollte die intrazelluläre Verteilung der MAPK und *MAP2K*-Spleißvarianten untersucht werden. Auch die Bildung und Lokalisation von Reaktionskomplexen durch diese Proteine, und damit eine weitere Präzisierung der Signaltransduktion, ist von Interesse. Da gezeigt wurde, dass *MAP2K4* unter verschiedenen Bedingungen bestimmte JNK-Isoformen bevorzugen kann, sollte dieser Faktor berücksichtigt werden.

Um die widersprüchlichen Effekte von *MAP2K4* im Hinblick auf Tumorigenese mit diesem Modell zu überprüfen, können zunächst Tumorzelllinien auf die Expression der Spleißvarianten untersucht werden. In weiteren Schritten sollte die Expression auch in Gewebeproben analysiert und quantifiziert werden, beispielsweise durch quantitative PCR oder RNA-Sequenzierung.

Wegen der geringen strukturellen Unterschiede zwischen *MAP2K4* und *MAP2K4 δ* erscheint eine selektive pharmakologische Hemmung nur einer Spleißvariante zunächst schwierig. Neue molekularbiologische Methoden wie beispielsweise das *genome editing* könnten aber die Herstellung selektiver *knockout*-Zellen in Zukunft möglich machen, was weitere Untersuchungen dieses Signalweges ermöglichen würde. So könnte das Wissen um die Rolle von *MAP2K4* in der Tumorigenese und der Vermittlung der Nebenwirkungen der Paclitaxel-Therapie vertieft werden und neue Interventionsmöglichkeiten eröffnen.

5. Zusammenfassung

Die Signalkaskade der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ist ein wichtiger Mechanismus der zellulären Reaktion auf Wachstumsfaktoren und Stressoren. Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase 4 (MAP2K4) wird unter anderem durch ultraviolette Strahlung und das Zytostatikum Paclitaxel stimuliert und aktiviert ihrerseits die MAPK JNK und p38. Die Ergebnisse dieser Aktivierung können jedoch widersprüchlich sein. So gilt MAP2K4 als potentieller Tumorsuppressor, kann aber auch proliferativ wirken. In neuronalen Zellen löst diese Signalkaskade Apoptose aus, oder aber regenerative Funktionen übernehmen.

In dieser Arbeit wurde die Funktion von MAP2K4 in der neuronalen Zelllinie PC12 untersucht, indem das Gen durch stabile Transfektion überexprimiert wurde. Dabei wurde eine unbekannte Spleißvariante von MAP2K4 nachgewiesen, die den Namen MAP2K4 δ erhielt. Der Unterschied bestand in einer Insertion von elf Aminosäuren in direkter Nachbarschaft der MAPK-Bindestelle. Beide Varianten wurden im ZNS von Ratte, Maus und Mensch nachgewiesen.

Die Überexpression der MAP2K4-Spleißvarianten hatte gegensätzliche Effekte auf die Zellzahl. MAP2K4 reduzierte die Zahl lebender Zellen, während MAP2K4 δ diese erhöhte. Die Analyse der Veränderungen auf Proteinebene zeigte, dass diesen Unterschieden eine unterschiedliche Regulation des G1/S-Checkpoints des Zellzyklus zugrunde liegt.

MAP2K4 stabilisierte über JNK2 und p38 das Protein p21, einen der wichtigsten Inhibitoren dieses Checkpoints. Durch die gleichzeitige Hemmung von dessen Gegenspieler Cyclin D1 wird der Übergang der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus verhindert, so dass die Reduktion der Zellzahl ein Ergebnis von reduzierter Proliferation ist. Dies wird durch die Reduktion der DNA-Synthese in diesen Zellen bestätigt.

MAP2K4 δ -Überexpression dagegen führte nicht zur Stabilisierung von p21 und schwächte auch die Hemmung von c-Myc, einem entscheidenden proliferativen Transkriptionsfaktor, ab. Als Ergebnis kann Cyclin D1 akkumulieren wodurch die Zellen in die S-Phase übertreten. Beide Spleißvarianten aktivierten zwar geringfügig den intrinsischen Weg der Apoptose, ohne explizite Stimulation trat diese aber gegenüber der veränderten Proliferation in den Hintergrund.

Nach Stimulation der MAPK-Signalkaskade durch Paclitaxel zeigten die Spleißvarianten ebenfalls entgegengesetzte Effekte in Hinblick auf die Zellzahl. MAP2K4 wirkte protektiv,

indem es JNK1 hemmte und die Aktivierung der Caspasen verhinderte. MAP2K4 δ dagegen aktivierte JNK1 und Caspase-3, und löste so die Apoptose aus. Somit könnte eine Hemmung von MAP2K4 δ Neuronen vor den Nebenwirkungen einer Paclitaxel-Therapie schützen.

Insgesamt hatte MAP2K4 also unter physiologischen Bedingungen eine antiproliferative Wirkung, schützte die Zellen aber vor Paclitaxel-induzierter Apoptose. MAP2K4 δ dagegen steigerte die Proliferation der PC12-Zellen. Nach Zugabe von Paclitaxel trat jedoch verstärkt der programmierte Zelltod ein.

Diese Arbeit erweitert die MAPK-Signalkaskade um eine bisher unbekannte Spleißvariante von MAP2K4. Die Ergebnisse in PC12-Zellen zeigen, dass diese eine Erklärung der zuvor in der Literatur beschriebenen widersprüchlichen Effekte von MAP2K4 darstellen können. Eine weitere Analyse dieser Zusammenhänge kann zur Aufklärung der malignen Transformation von Zellen beitragen und neue Präventions- und Behandlungsmöglichkeiten erschließen.

6. Literaturverzeichnis

- Ahmed, S. U., Milner, J. (2009): Basal cancer cell survival involves JNK2 suppression of a novel JNK1/c-Jun/Bcl-3 apoptotic network. *PLoS One* 4, e7305.
- Ahn, N. G., Krebs, E. G. (1990): Evidence for an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade in Swiss 3T3 cells. Activation of serine peptide kinase activity by myelin basic protein kinases in vitro. *J Biol Chem* 265, 11495-11501.
- Ahn, Y. H., Kurie, J. M. (2009): MKK4/SEK1 is negatively regulated through a feedback loop involving the E3 ubiquitin ligase itch. *J Biol Chem* 284, 29399-29404.
- Al-Farsi, A., Ellis, P. M. (2014): Treatment paradigms for patients with metastatic non-small cell lung cancer, squamous lung cancer: first, second, and third-line. *Front Oncol* 4, 157.
- Alarcon-Vargas, D., Ronai, Z. (2004): c-Jun-NH2 kinase (JNK) contributes to the regulation of c-Myc protein stability. *J Biol Chem* 279, 5008-5016.
- Ameyar, M., Wisniewska, M., Weitzman, J. B. (2003): A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie* 85, 747-752.
- Asaoka, Y., Nishina, H. (2010): Diverse physiological functions of MKK4 and MKK7 during early embryogenesis. *J Biochem* 148, 393-401.
- Aziz, G., Odlo, K., Hansen, T. V., Paulsen, R. E., Mathisen, G. H. (2013): Combretastatin A-4 and structurally related triazole analogues induce caspase-3 and reactive oxygen species-dependent cell death in PC12 cells. *Eur J Pharmacol* 703, 25-32.
- Baas, P. W., Ahmad, F. J. (2013): Beyond taxol: microtubule-based treatment of disease and injury of the nervous system. *Brain* 136, 2937-2951.
- Bardwell, A. J., Frankson, E., Bardwell, L. (2009): Selectivity of docking sites in MAPK kinases. *J Biol Chem* 284, 13165-13173.
- Becker, E. B., Howell, J., Kodama, Y., Barker, P. A., Bonni, A. (2004): Characterization of the c-Jun N-terminal kinase-BimEL signaling pathway in neuronal apoptosis. *J Neurosci* 24, 8762-8770.
- Boldt, S., Weidle, U. H., Kolch, W. (2002): The role of MAPK pathways in the action of chemotherapeutic drugs. *Carcinogenesis* 23, 1831-1838.
- Bouillet, P., Strasser, A. (2002): BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 115, 1567-1574.

- Boulton, T. G., Yancopoulos, G. D., Gregory, J. S., Slaughter, C., Moomaw, C., Hsu, J., Cobb, M. H. (1990): An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249, 64-67.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brancho, D., Tanaka, N., Jaeschke, A., Ventura, J. J., Kelkar, N., Tanaka, Y., Kyuuma, M., Takeshita, T., Flavell, R. A., Davis, R. J. (2003): Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev* 17, 1969-1978.
- Cazillis, M., Bringuier, A. F., Delautier, D., Buisine, M., Bernuau, D., Gespach, C., Groyer, A. (2004): Disruption of MKK4 signaling reveals its tumor-suppressor role in embryonic stem cells. *Oncogene* 23, 4735-4744.
- Chang, L., Kamata, H., Solinas, G., Luo, J. L., Maeda, S., Venuprasad, K., Liu, Y. C., Karin, M. (2006): The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF α -induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* 124, 601-613.
- Chen, S., Qiong, Y., Gardner, D. G. (2006): A role for p38 mitogen-activated protein kinase and c-myc in endothelin-dependent rat aortic smooth muscle cell proliferation. *Hypertension* 47, 252-258.
- Cheng, W. H., Zheng, X., Quimby, F. R., Roneker, C. A., Lei, X. G. (2003): Low levels of glutathione peroxidase 1 activity in selenium-deficient mouse liver affect c-Jun N-terminal kinase activation and p53 phosphorylation on Ser-15 in pro-oxidant-induced apoptosis. *Biochem J* 370, 927-934.
- Coffey, E. T., Hongisto, V., Dickens, M., Davis, R. J., Courtney, M. J. (2000): Dual roles for c-Jun N-terminal kinase in developmental and stress responses in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 20, 7602-7613.
- Crusio, W. E. (2004): Flanking gene and genetic background problems in genetically manipulated mice. *Biol Psychiatry* 56, 381-385.
- Cuadrado, A., Nebreda, A. R. (2010): Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 429, 403-417.
- Cuenda, A. (2000): Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4). *Int J Biochem Cell Biol* 32, 581-587.

- Cui, J., Wang, Q., Wang, J., Lv, M., Zhu, N., Li, Y., Feng, J., Shen, B., Zhang, J. (2009): Basal c-Jun NH₂-terminal protein kinase activity is essential for survival and proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 8, 3214-3222.
- Cullen, B. R. (2006): Induction of stable RNA interference in mammalian cells. *Gene Ther* 13, 503-508.
- Culmsee, C., Mattson, M. P. (2005): p53 in neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 761-777.
- Cunningham, S. C., Gallmeier, E., Hucl, T., Dezentje, D. A., Calhoun, E. S., Falco, G., Abdelmohsen, K., Gorospe, M., Kern, S. E. (2006): Targeted deletion of MKK4 in cancer cells: a detrimental phenotype manifests as decreased experimental metastasis and suggests a counterweight to the evolution of tumor-suppressor loss. *Cancer Res* 66, 5560-5564.
- Davis, R. J. (1994): MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci* 19, 470-473.
- Deacon, K., Mistry, P., Chernoff, J., Blank, J. L., Patel, R. (2003): p38 Mitogen-activated protein kinase mediates cell death and p21-activated kinase mediates cell survival during chemotherapeutic drug-induced mitotic arrest. *Mol Biol Cell* 14, 2071-2087.
- Deng, X., Xiao, L., Lang, W., Gao, F., Ruvolo, P., May, W. S., Jr. (2001): Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *J Biol Chem* 276, 23681-23688.
- Derijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I. H., Han, J., Ulevitch, R. J., Davis, R. J. (1995): Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267, 682-685.
- Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O., Kolch, W. (2007): MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279-3290.
- Dong, C., Yang, D. D., Wysk, M., Whitmarsh, A. J., Davis, R. J., Flavell, R. A. (1998): Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* 282, 2092-2095.
- Eferl, R., Ricci, R., Kenner, L., Zenz, R., David, J. P., Rath, M., Wagner, E. F. (2003): Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell* 112, 181-192.
- Eischen, C. M., Woo, D., Roussel, M. F., Cleveland, J. L. (2001): Apoptosis triggered by Myc-induced suppression of Bcl-X(L) or Bcl-2 is bypassed during lymphomagenesis. *Mol Cell Biol* 21, 5063-5070.

- El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.
- Enslin, H., Raingeaud, J., Davis, R. J. (1998): Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem* 273, 1741-1748.
- Fabian, Z., Vecsernyes, M., Pap, M., Szeberenyi, J. (2006): The effects of a mutant p53 protein on the proliferation and differentiation of PC12 rat pheochromocytoma cells. *J Cell Biochem* 99, 1431-1441.
- Farhat, M., Poissonnier, A., Hamze, A., Ouk-Martin, C., Brion, J. D., Alami, M., Feuillard, J., Jayat-Vignoles, C. (2014): Reversion of apoptotic resistance of TP53-mutated Burkitt lymphoma B-cells to spindle poisons by exogenous activation of JNK and p38 MAP kinases. *Cell Death Dis* 5, e1201.
- Figueroa-Masot, X. A., Hetman, M., Higgins, M. J., Kokot, N., Xia, Z. (2001): Taxol induces apoptosis in cortical neurons by a mechanism independent of Bcl-2 phosphorylation. *J Neurosci* 21, 4657-4667.
- Finegan, K. G., Tournier, C. (2010): The mitogen-activated protein kinase kinase 4 has a pro-oncogenic role in skin cancer. *Cancer Res* 70, 5797-5806.
- Fritah, A., Saucier, C., Mester, J., Redeuilh, G., Sabbah, M. (2005): p21WAF1/CIP1 selectively controls the transcriptional activity of estrogen receptor alpha. *Mol Cell Biol* 25, 2419-2430.
- Fuchs, S. Y., Adler, V., Pincus, M. R., Ronai, Z. (1998a): MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10541-10546.
- Fuchs, S. Y., Fried, V. A., Ronai, Z. (1998b): Stress-activated kinases regulate protein stability. *Oncogene* 17, 1483-1490.
- Fuchs, S. Y., Tappin, I., Ronai, Z. (2000): Stability of the ATF2 transcription factor is regulated by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 275, 12560-12564.
- Fuchs, S. Y., Xie, B., Adler, V., Fried, V. A., Davis, R. J., Ronai, Z. (1997): c-Jun NH2-terminal kinases target the ubiquitination of their associated transcription factors. *J Biol Chem* 272, 32163-32168.
- Ganiatsas, S., Kwee, L., Fujiwara, Y., Perkins, A., Ikeda, T., Labow, M. A., Zon, L. I. (1998): SEK1 deficiency reveals mitogen-activated protein kinase cascade crossregulation and leads to abnormal hepatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6881-6886.

- Gao, M., Labuda, T., Xia, Y., Gallagher, E., Fang, D., Liu, Y. C., Karin, M. (2004): Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science* 306, 271-275.
- Giannakakou, P., Robey, R., Fojo, T., Blagosklonny, M. V. (2001): Low concentrations of paclitaxel induce cell type-dependent p53, p21 and G1/G2 arrest instead of mitotic arrest: molecular determinants of paclitaxel-induced cytotoxicity. *Oncogene* 20, 3806-3813.
- Greene, L. A., Tischler, A. S. (1976): Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2424-2428.
- Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Sluss, H. K., Derijard, B., Davis, R. J. (1996): Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* 15, 2760-2770.
- Haeusgen, W., Herdegen, T., Waetzig, V. (2010): Specific regulation of JNK signalling by the novel rat MKK7 γ 1 isoform. *Cell Signal* 22, 1761-1772.
- Haeusgen, W., Herdegen, T., Waetzig, V. (2011a): The bottleneck of JNK signaling: molecular and functional characteristics of MKK4 and MKK7. *Eur J Cell Biol* 90, 536-544.
- Haeusgen, W., Herdegen, T., Waetzig, V. (2011b): MKK7 γ 1 reverses nerve growth factor signals: proliferation and cell death instead of neuritogenesis and protection. *Cell Signal* 23, 1281-1290.
- Hawkes, W. C., Alkan, Z. (2012): Delayed cell cycle progression in selenoprotein W-depleted cells is regulated by a mitogen-activated protein kinase kinase 4-p38/c-Jun NH2-terminal kinase-p53 pathway. *J Biol Chem* 287, 27371-27379.
- Hess, J., Angel, P., Schorpp-Kistner, M. (2004): AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 117, 5965-5973.
- Ho, D. T., Bardwell, A. J., Abdollahi, M., Bardwell, L. (2003): A docking site in MKK4 mediates high affinity binding to JNK MAPKs and competes with similar docking sites in JNK substrates. *J Biol Chem* 278, 32662-32672.
- Hui, L., Zatloukal, K., Scheuch, H., Stepniak, E., Wagner, E. F. (2008): Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation. *J Clin Invest* 118, 3943-3953.
- Kang, Y. J., Seit-Nebi, A., Davis, R. J., Han, J. (2006): Multiple activation mechanisms of p38 α mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 281, 26225-26234.

- Kashyap, M. P., Singh, A. K., Siddiqui, M. A., Kumar, V., Tripathi, V. K., Khanna, V. K., Yadav, S., Jain, S. K., Pant, A. B. (2010): Caspase cascade regulated mitochondria mediated apoptosis in monocrotophos exposed PC12 cells. *Chem Res Toxicol* 23, 1663-1672.
- Kim, E. K., Choi, E. J. (2010): Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802, 396-405.
- Kim, J. H., Yoon, E. K., Chung, H. J., Park, S. Y., Hong, K. M., Lee, C. H., Lee, Y. S., Choi, K., Yang, Y., Kim, K., Kim, I. H. (2013): p53 acetylation enhances Taxol-induced apoptosis in human cancer cells. *Apoptosis* 18, 110-120.
- Kim, S. J., Hwang, S. G., Shin, D. Y., Kang, S. S., Chun, J. S. (2002): p38 kinase regulates nitric oxide-induced apoptosis of articular chondrocytes by accumulating p53 via NFkappa B-dependent transcription and stabilization by serine 15 phosphorylation. *J Biol Chem* 277, 33501-33508.
- Klein, E. A., Assoian, R. K. (2008): Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *J Cell Sci* 121, 3853-3857.
- Kolomeichuk, S. N., Terrano, D. T., Lyle, C. S., Sabapathy, K., Chambers, T. C. (2008): Distinct signaling pathways of microtubule inhibitors--vinblastine and Taxol induce JNK-dependent cell death but through AP-1-dependent and AP-1-independent mechanisms, respectively. *FEBS J* 275, 1889-1899.
- Kreis, N. N., Louwen, F., Yuan, J. (2015): Less understood issues: p21(Cip1) in mitosis and its therapeutic potential. *Oncogene* 34, 1758-1767.
- Kyriakis, J. M., Avruch, J. (2001): Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81, 807-869.
- Kyriakis, J. M., Avruch, J. (2012): Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev* 92, 689-737.
- Lawler, S., Cuenda, A., Goedert, M., Cohen, P. (1997): SKK4, a novel activator of stress-activated protein kinase-1 (SAPK1/JNK). *FEBS Lett* 414, 153-158.
- Lawler, S., Fleming, Y., Goedert, M., Cohen, P. (1998): Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Curr Biol* 8, 1387-1390.
- Lee, C. M., Onesime, D., Reddy, C. D., Dhanasekaran, N., Reddy, E. P. (2002): JLP: A scaffolding protein that tethers JNK/p38MAPK signaling modules and transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14189-14194.

- 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., Et Al. (1994): A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372, 739-746.
- Lee, J. K., Hwang, W. S., Lee, Y. D., Han, P. L. (1999): Dynamic expression of SEK1 suggests multiple roles of the gene during embryogenesis and in adult brain of mice. *Brain Res Mol Brain Res* 66, 133-140.
- Lei, K., Davis, R. J. (2003): JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2432-2437.
- Leppa, S., Eriksson, M., Saffrich, R., Ansorge, W., Bohmann, D. (2001): Complex functions of AP-1 transcription factors in differentiation and survival of PC12 cells. *Mol Cell Biol* 21, 4369-4378.
- Li, X., Macleod, R., Dunlop, A. J., Edwards, H. V., Advant, N., Gibson, L. C., Devine, N. M., Brown, K. M., Adams, D. R., Houslay, M. D., Baillie, G. S. (2009): A scanning peptide array approach uncovers association sites within the JNK/beta arrestin signalling complex. *FEBS Lett* 583, 3310-3316.
- Lin, A., Minden, A., Martinetto, H., Claret, F. X., Lange-Carter, C., Mercurio, F., Johnson, G. L., Karin, M. (1995): Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* 268, 286-290.
- Lisnock, J., Griffin, P., Calaycay, J., Frantz, B., Parsons, J., O'keefe, S. J., Lograsso, P. (2000): Activation of JNK3 alpha 1 requires both MKK4 and MKK7: kinetic characterization of in vitro phosphorylated JNK3 alpha 1. *Biochemistry* 39, 3141-3148.
- Liu, Z., Luo, Q., Guo, C. (2015): Bim and VDAC1 are hierarchically essential for mitochondrial ATF2 mediated cell death. *Cancer Cell Int* 15, 34.
- Lopez-Bergami, P., Lau, E., Ronai, Z. (2010): Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nat Rev Cancer* 10, 65-76.
- Lotan, T., Hickson, J., Souris, J., Huo, D., Taylor, J., Li, T., Otto, K., Yamada, S. D., Macleod, K., Rinker-Schaeffer, C. W. (2008): c-Jun NH2-terminal kinase activating kinase 1/mitogen-activated protein kinase kinase 4-mediated inhibition of SKOV3ip.1 ovarian cancer metastasis involves growth arrest and p21 up-regulation. *Cancer Res* 68, 2166-2175.

- Marderosian, M., Sharma, A., Funk, A. P., Vartanian, R., Masri, J., Jo, O. D., Gera, J. F. (2006): Tristetraprolin regulates Cyclin D1 and c-Myc mRNA stability in response to rapamycin in an Akt-dependent manner via p38 MAPK signaling. *Oncogene* 25, 6277-6290.
- Matson, D. R., Stukenberg, P. T. (2011): Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways. *Mol Interv* 11, 141-150.
- Matsuura, H., Nishitoh, H., Takeda, K., Matsuzawa, A., Amagasa, T., Ito, M., Yoshioka, K., Ichijo, H. (2002): Phosphorylation-dependent scaffolding role of JSAP1/JIP3 in the ASK1-JNK signaling pathway. A new mode of regulation of the MAP kinase cascade. *J Biol Chem* 277, 40703-40709.
- Meng, Q., Xia, Y. (2011): c-Jun, at the crossroad of the signaling network. *Protein Cell* 2, 889-898.
- Mielke, K., Damm, A., Yang, D. D., Herdegen, T. (2000): Selective expression of JNK isoforms and stress-specific JNK activity in different neural cell lines. *Brain Res Mol Brain Res* 75, 128-137.
- Moriguchi, T., Kawasaki, H., Matsuda, S., Gotoh, Y., Nishida, E. (1995): Evidence for multiple activators for stress-activated protein kinase/c-Jun amino-terminal kinases. Existence of novel activators. *J Biol Chem* 270, 12969-12972.
- Nakagawa, K., Sugahara, M., Yamasaki, T., Kajiho, H., Takahashi, S., Hirayama, J., Minami, Y., Ohta, Y., Watanabe, T., Hata, Y., Katada, T., Nishina, H. (2010): Filamin associates with stress signalling kinases MKK7 and MKK4 and regulates JNK activation. *Biochem J* 427, 237-245.
- Nishina, H., Bachmann, M., Oliveira-Dos-Santos, A. J., Koziaradzki, I., Fischer, K. D., Odermatt, B., Wakeham, A., Shahinian, A., Takimoto, H., Bernstein, A., Mak, T. W., Woodgett, J. R., Ohashi, P. S., Penninger, J. M. (1997a): Impaired CD28-mediated interleukin 2 production and proliferation in stress kinase SAPK/ERK1 kinase (SEK1)/mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4)-deficient T lymphocytes. *J Exp Med* 186, 941-953.
- Nishina, H., Fischer, K. D., Radvanyi, L., Shahinian, A., Hakem, R., Rubie, E. A., Bernstein, A., Mak, T. W., Woodgett, J. R., Penninger, J. M. (1997b): Stress-signalling kinase Sek1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3. *Nature* 385, 350-353.

- Ouwens, D. M., De Ruiter, N. D., Van Der Zon, G. C., Carter, A. P., Schouten, J., Van Der Burgt, C., Kooistra, K., Bos, J. L., Maassen, J. A., Van Dam, H. (2002): Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-Src-p38. *EMBO J* 21, 3782-3793.
- Pombo, C. M., Bonventre, J. V., Avruch, J., Woodgett, J. R., Kyriakis, J. M., Force, T. (1994): The stress-activated protein kinases are major c-Jun amino-terminal kinases activated by ischemia and reperfusion. *J Biol Chem* 269, 26546-26551.
- Rudkin, B. B., Lazarovici, P., Levi, B. Z., Abe, Y., Fujita, K., Guroff, G. (1989): Cell cycle-specific action of nerve growth factor in PC12 cells: differentiation without proliferation. *EMBO J* 8, 3319-3325.
- Sabapathy, K., Hochedlinger, K., Nam, S. Y., Bauer, A., Karin, M., Wagner, E. F. (2004): Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol Cell* 15, 713-725.
- Sanchez, I., Hughes, R. T., Mayer, B. J., Yee, K., Woodgett, J. R., Avruch, J., Kyriakis, J. M., Zon, L. I. (1994): Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* 372, 794-798.
- Scatena, C. D., Stewart, Z. A., Mays, D., Tang, L. J., Keefer, C. J., Leach, S. D., Pietenpol, J. A. (1998): Mitotic phosphorylation of Bcl-2 during normal cell cycle progression and Taxol-induced growth arrest. *J Biol Chem* 273, 30777-30784.
- Seoane, J., Le, H. V., Massague, J. (2002): Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 419, 729-734.
- Shaulian, E., Karin, M. (2002): AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4, E131-136.
- Srivastava, R. K., Mi, Q. S., Hardwick, J. M., Longo, D. L. (1999): Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3775-3780.
- Stone, A. A., Chambers, T. C. (2000): Microtubule inhibitors elicit differential effects on MAP kinase (JNK, ERK, and p38) signaling pathways in human KB-3 carcinoma cells. *Exp Cell Res* 254, 110-119.
- Suh, D. H., Kim, J. W., Kang, S., Kim, H. J., Lee, K. H. (2014): Major clinical research advances in gynecologic cancer in 2013. *J Gynecol Oncol* 25, 236-248.
- Sun, Q., Chen, T., Wang, X., Wei, X. (2010): Taxol induces paraptosis independent of both protein synthesis and MAPK pathway. *J Cell Physiol* 222, 421-432.

- Swat, W., Fujikawa, K., Ganiatsas, S., Yang, D., Xavier, R. J., Harris, N. L., Davidson, L., Ferrini, R., Davis, R. J., Labow, M. A., Flavell, R. A., Zon, L. I., Alt, F. W. (1998): SEK1/MKK4 is required for maintenance of a normal peripheral lymphoid compartment but not for lymphocyte development. *Immunity* 8, 625-634.
- Takekawa, M., Tatebayashi, K., Saito, H. (2005): Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinase kinases. *Mol Cell* 18, 295-306.
- Tanoue, T., Nishida, E. (2003): Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal* 15, 455-462.
- Teng, D. H., Perry, W. L., 3rd, Hogan, J. K., Baumgard, M., Bell, R., Berry, S., Davis, T., Frank, D., Frye, C., Hattier, T., Hu, R., Jammulapati, S., Janecki, T., Leavitt, A., Mitchell, J. T., Pero, R., Sexton, D., Schroeder, M., Su, P. H., Swedlund, B., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Bartel, P., Wong, A. K., Tavtigian, S. V., Et Al. (1997): Human mitogen-activated protein kinase kinase 4 as a candidate tumor suppressor. *Cancer Res* 57, 4177-4182.
- Tournier, C., Dong, C., Turner, T. K., Jones, S. N., Flavell, R. A., Davis, R. J. (2001): MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev* 15, 1419-1426.
- Tournier, C., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Barrett, T., Davis, R. J. (1999): The MKK7 gene encodes a group of c-Jun NH2-terminal kinase kinases. *Mol Cell Biol* 19, 1569-1581.
- Van Der Griend, D. J., Kocherginsky, M., Hickson, J. A., Stadler, W. M., Lin, A., Rinker-Schaefter, C. W. (2005): Suppression of metastatic colonization by the context-dependent activation of the c-Jun NH2-terminal kinase kinases JNKK1/MKK4 and MKK7. *Cancer Res* 65, 10984-10991.
- Wada, T., Nakagawa, K., Watanabe, T., Nishitai, G., Seo, J., Kishimoto, H., Kitagawa, D., Sasaki, T., Penninger, J. M., Nishina, H., Katada, T. (2001): Impaired synergistic activation of stress-activated protein kinase SAPK/JNK in mouse embryonic stem cells lacking SEK1/MKK4: different contribution of SEK2/MKK7 isoforms to the synergistic activation. *J Biol Chem* 276, 30892-30897.
- Waetzig, V., Herdegen, T. (2003a): The concerted signaling of ERK1/2 and JNKs is essential for PC12 cell neuritogenesis and converges at the level of target proteins. *Mol Cell Neurosci* 24, 238-249.

- Waetzig, V., Herdegen, T. (2003b): A single c-Jun N-terminal kinase isoform (JNK3-p54) is an effector in both neuronal differentiation and cell death. *J Biol Chem* 278, 567-572.
- Waetzig, V., Zhao, Y., Herdegen, T. (2006): The bright side of JNKs-Multitalented mediators in neuronal sprouting, brain development and nerve fiber regeneration. *Prog Neurobiol* 80, 84-97.
- Wang, J., Chen, L., Ko, C. I., Zhang, L., Puga, A., Xia, Y. (2012): Distinct signaling properties of mitogen-activated protein kinase kinases 4 (MKK4) and 7 (MKK7) in embryonic stem cell (ESC) differentiation. *J Biol Chem* 287, 2787-2797.
- Wang, L., Pan, Y., Dai, J. L. (2004): Evidence of MKK4 pro-oncogenic activity in breast and pancreatic tumors. *Oncogene* 23, 5978-5985.
- Wang, T. H., Popp, D. M., Wang, H. S., Saitoh, M., Mural, J. G., Henley, D. C., Ichijo, H., Wimalasena, J. (1999): Microtubule dysfunction induced by paclitaxel initiates apoptosis through both c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dependent and -independent pathways in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 274, 8208-8216.
- Wang, T. H., Wang, H. S., Ichijo, H., Giannakakou, P., Foster, J. S., Fojo, T., Wimalasena, J. (1998): Microtubule-interfering agents activate c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase through both Ras and apoptosis signal-regulating kinase pathways. *J Biol Chem* 273, 4928-4936.
- Wang, T. H., Wang, H. S., Soong, Y. K. (2000): Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* 88, 2619-2628.
- Weston, C. R., Davis, R. J. (2007): The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* 19, 142-149.
- Whitfield, J., Neame, S. J., Paquet, L., Bernard, O., Ham, J. (2001): Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron* 29, 629-643.
- Whitmarsh, A. J., Davis, R. J. (2007): Role of mitogen-activated protein kinase kinase 4 in cancer. *Oncogene* 26, 3172-3184.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., Johnson, G. L. (1999): Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79, 143-180.
- Wu, G. S. (2004): The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 3, 156-161.

- Xia, Y., Wu, Z., Su, B., Murray, B., Karin, M. (1998): JNKK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension. *Genes Dev* 12, 3369-3381.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J., Greenberg, M. E. (1995): Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331.
- Yamamoto, K., Ichijo, H., Korsmeyer, S. J. (1999): BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol* 19, 8469-8478.
- Yan, P., Dong, P., Li, Z. (2014): Second- versus first-generation drug-eluting stents for diabetic patients: a meta-analysis. *Arch Med Sci* 10, 213-221.
- Yang, D., Tournier, C., Wysl, M., Lu, H. T., Xu, J., Davis, R. J., Flavell, R. A. (1997): Targeted disruption of the MKK4 gene causes embryonic death, inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase activation, and defects in AP-1 transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3004-3009.
- Yashar, B. M., Kelley, C., Yee, K., Errede, B., Zon, L. I. (1993): Novel members of the mitogen-activated protein kinase activator family in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* 13, 5738-5748.
- Yeung, T. K., Germond, C., Chen, X., Wang, Z. (1999): The mode of action of taxol: apoptosis at low concentration and necrosis at high concentration. *Biochem Biophys Res Commun* 263, 398-404.
- Yoshida, B. A., Dubauskas, Z., Chekmareva, M. A., Christiano, T. R., Stadler, W. M., Rinker-Schaeffer, C. W. (1999): Mitogen-activated protein kinase kinase 4/stress-activated protein/Erk kinase 1 (MKK4/SEK1), a prostate cancer metastasis suppressor gene encoded by human chromosome 17. *Cancer Res* 59, 5483-5487.
- Yujiri, T., Fanger, G. R., Garrington, T. P., Schlesinger, T. K., Gibson, S., Johnson, G. L. (1999): MEK kinase 1 (MEKK1) transduces c-Jun NH2-terminal kinase activation in response to changes in the microtubule cytoskeleton. *J Biol Chem* 274, 12605-12610.
- Zanke, B. W., Rubie, E. A., Winnett, E., Chan, J., Randall, S., Parsons, M., Boudreau, K., Mcinnis, M., Yan, M., Templeton, D. J., Woodgett, J. R. (1996): Mammalian mitogen-activated protein kinase pathways are regulated through formation of specific kinase-activator complexes. *J Biol Chem* 271, 29876-29881.
- Zhu, Y., Mao, X. O., Sun, Y., Xia, Z., Greenberg, D. A. (2002): p38 Mitogen-activated protein kinase mediates hypoxic regulation of Mdm2 and p53 in neurons. *J Biol Chem* 277, 22909-22914.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Thomas Herdegen für das Überlassen des interessanten Themas, die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die stets konstruktive Kritik sowie die vielfältige weitere Unterstützung bedanken.

Ein besonderer Dank gebührt Dr. Wiebke Häusgen für die geduldige Einführung in die Kunst der Zellkultur und Durchflusszytometrie, vor allem aber für die hilfreichen, zeitaufwändigen Kommentare bei der Erstellung des Manuskripts.

Weiterer Dank gebührt PD Dr. rer. nat. Vicky Wätzig und Dr. med. Ruwen Böhm für hilfreiche Diskussionen und Hinweise sowie Irina Naujoks, Elke Schröder und Angela Schulz für die Einweisungen in die Laborarbeit. Vielen Dank an die gesamte Arbeitsgruppe für die offene und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Vielen Dank auch an die Sektion für Stammzell- und Immuntherapie des UKSH Kiel und speziell an Prof. Dr. Matthias Peipp für die Nutzung der Durchflusszytometrie.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Mitdoktoranden Janis Reinelt für die Kontaktherstellung zur Arbeitsgruppe und für das gemeinsame Erleben des Auf und Ab des Medizinstudiums mit paralleler Doktorarbeit danken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Leif Tüffers
Geburtsdatum: 02. 02. 1985, Berlin

Ausbildung

04. 2014 – 09. 2016 Masterstudiengang „Medical Life Sciences“ an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, angestrebter Abschluss: Master of Science
04. 2008 – 06. 2012: Studium der Humanmedizin, Klinischer Abschnitt, an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Abschluss: Staatsexamen (Note 1,5)
10. 2005 – 09. 2007: Studium der Humanmedizin, Vorklinischer Abschnitt, an der Philipps-Universität zu Marburg
1996 – 2004: Franz-Stock-Gymnasium Arnsberg, Abschluss: Abitur, bilingual in Deutsch und Englisch

Ärztliche Tätigkeit

02. 2013 – 03. 2014: Assistenzarzt in der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie an der Universitätsklinik Knappschafts-krankenhaus Bochum, Direktor: Prof. Dr. Michael Adamzik
03. 2011 - 01. 2012: Praktisches Jahr

Publikationen

Haeusgen, W., **Tueffers, L.**, Herdegen, T., Waetzig, V. (2014): Map2k4 δ – identification and functional characterization of a novel Map2k4 splice variant. *Biochem Biophys Acta* 1843, 875-884

Jansen, G., Mahrt, N., **Tueffers, L.**, Barbosa, C., Harjes, M., Adolph, G., Friedrichs, A., Kreinz-Weinreich, A., Rosenstiel, P., Schulenburg, H. (2016): Association between clinical antibiotic resistance and susceptibility of *Pseudomonas* in the cystic fibrosis lung. *Evol Med Public Health* 2016, 182-194