

Aus dem Bereich Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Regulation der Transkription des c-Fos- Gens durch Stimulus-responsive Proteinkinasen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes 2022

vorgelegt von Alisia Karoline Dalhäuser
geboren am 06.02.1998 in Böblingen

Inhalt

Tag der Promotion: 12.05.2023

Dekan: Prof. Dr. Michael Menger

Berichterstatter:

Prof. Dr. Gerald Thiel

Prof. Dr. Barbara Niemeyer

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungen.....	8
II. Zusammenfassung.....	13
III. Summary.....	15
1 Einleitung.....	17
1.1 Signaltransduktion.....	17
1.2 MAP-Kinase-Signalwege.....	17
1.2.1 MAP-Kinasen (mitogen-activated protein kinases).....	17
1.2.1.1 Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK1/2).....	19
1.2.1.2 C-Jun-N-terminal protein kinase (JNK).....	21
1.2.1.3 P38 Proteinkinasen.....	22
1.3 Transkriptionsfaktoren.....	23
1.3.1 AP-1 Transkriptionsfaktoren (Aktivator-Protein-1).....	23
1.3.2 Serum response factor (SRF).....	24
1.3.3 Ternary complex factors (TCF).....	25
1.3.4 Signal transducers and activators of transcription (STATs).....	26
1.4 Das c-fos Gen und die Expression von c-Fos.....	26
1.4.1 c-Fos.....	26
1.4.2 Das c-Fos-Gen.....	26
1.4.3 Der c-Fos-Promotor.....	27
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	28
2 Material und Methoden.....	31
2.1 Verwendete Geräte und Gebrauchsgegenstände.....	31
2.2 Chemikalien.....	32
2.3 Lösungen.....	34

Inhalt

2.3.1 DMEM (FCS 10 %)	34
2.3.2 DMEM-serumreduziert (FCS 0,05 %)	34
2.3.3 1x PBS	34
2.3.4 1x Trypsin/EDTA	34
2.3.5 2 x HBSS	35
2.3.6 Lösungen zur Messung der Luziferaseaktivität	35
2.3.7 4-Hydroxytamoxifen (4OHT)	35
2.4 Versuchsablauf	36
2.5 Plasmide zur Herstellung von Viren zum lentiviralen Gentransfer	37
2.5.1 Verpackungsplasmid Δ 8.91	37
2.5.2 Expressionsplasmid pCMV-G	38
2.5.3 Transferplasmide	38
2.5.3.1 pFUWG-basierte Plasmide	38
2.5.3.2 pLentiLox3.7-basierte Plasmide	39
2.5.4 Lentivirale Transfervektoren	40
2.5.5 Lentivirale Reporterplasmide	42
2.6 RNA-Interferenz durch lentiviral exprimierte shRNAs	43
2.7 Zelllinien	45
2.7.1 HEK293-TN	45
2.7.2 HEK293-T/17	45
2.7.3 HEK293- Δ B-RAF:ER	45
2.8 Zellkultur	46
2.9 Lentiviraler Gentransfer	46
2.9.1 Transfektion	46
2.9.2 Infektion	47
2.9.3 Viruslösungen	47
2.9.4 Serumreduktion	48
2.9.5 Stimulation	48
2.9.6 Zellernte	48

Inhalt

2.9.7 Zelllyse.....	48
2.10 Reportergenanalyse.....	49
2.10.1 Luziferaseassay.....	49
2.10.2 Proteinbestimmung mit dem Bicinchoninsäure (BCA) Assay.....	49
2.10.3 Bestimmung der relativen Luziferase-Aktivität.....	50
2.11 Statistik.....	50
3 Ergebnisse.....	53
3.1 Aktivierung der Proteinkinase ERK1/2 durch die Expression einer induzierbaren Mutante der Proteinkinase B-Raf.....	53
3.2 Die Aktivierung von <i>B-Raf</i> erhöht die Aktivität von AP-1 und SRF in HEK293- Δ B-Raf:ER-Zellen. .	54
3.3 Die ERK1/2-induzierte Aktivierung des c-Fos-Promotors benötigt die DNA-Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren TCF, SRF und AP-1.....	57
3.4 Aktivierung der MAPK JNK durch Expression der MEKK1-Mutante MEKK1 Δ	60
3.5 Die DNA-Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren SRF und TCF sind essenziell für die Aktivierung des c-Fos-Promotors durch JNK.....	62
3.6 Aktivierung der MAP-Kinase p38 durch die konstitutiv aktive Proteinkinase MKK6E.....	64
3.7 Die DNA-Bindestellen für SRF, TCF und AP-1 werden für die Aktivierung des c-Fos-Promotors durch p38 benötigt.....	66
4 Diskussion.....	69
Referenzen.....	LXXV
Publikation.....	LXXXV
Danksagung.....	LXXXVI
Lebenslauf.....	LXXXVII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aktivierung und biologische Funktion MAP-Kinasen Erk1/2, JNK und p38.....	18
Abbildung 2: Modulare Struktur von ERK1/2.....	20
Abbildung 3: Modulare Struktur von JNK.....	22
Abbildung 4: AP-1 Transkriptionsfaktorkomplex.....	24
Abbildung 5: Bildung des Ternären Komplexes.....	25
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Struktur de c-Fos Promotors.....	28
Abbildung 7: Versuchsablauf.....	36
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Struktur des Verpackungsplasmids Δ 8.91.....	37
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Struktur des Expressionsplasmids pCMV-G.....	38
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Struktur eines pFUW-basierten Transfervektors.....	39
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Struktur des pLL-Erk1/2- Plasmids.....	40
Abbildung 12: Prozessierung und Funktionsweise lentiviral eingebrachter shRNA.....	44
Abbildung 13: Struktur und Stimulation des Δ B-Raf:ER-Fusionsproteins.....	53
Abbildung 14: Die Aktivierung von B-Raf erhöht die AP-1-Aktivität in HEK293- Δ B-Raf:ER-Zellen.....	54
Abbildung 15: Die Aktivierung der B-Raf-Mutante Δ B-Raf:ER bewirkt eine Steigerung der SRE-abhängigen Transkription.....	55
Abbildung 16: Expression von ERK1/2-spezifischen shRNAs hemmen die Δ B-Raf:ER-induzierte Aktivierung des Egr1.SRE.luc-Reportergens.....	56
Abbildung 17: ERK1/2 abhängige Aktivierung des c-Fos-Promotors.....	58
Abbildung 18: Struktur und Funktion von MEKK1 Δ	60
Abbildung 19: MEKK1 Δ aktiviert JNK.....	61
Abbildung 20: Transkriptionsfaktorabhängige Aktivierung des c-Fos-Promotors durch JNK.....	63
Abbildung 21: Aktivierung von p38 durch MKK6E.....	65
Abbildung 22: Aktivierung des c-Fos-Promotors durch p38.....	67
Abbildung 23: Zusammenfassung der Ergebnisse.....	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Auflistung der verwendeten Transferplasmide und ihrer Funktion.....	40
Tabelle 2 Liste verwendeter Reporterplasmide und ihrer Funktion.....	42
Tabelle 3 Verdünnung der Viruslösungen.....	47

I. Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
S221A	Basenaustauschmutation Serin (S) gegen Alanin (A) an Stelle 221
Abb.	Abbildung
AP-1	Aktivatorprotein 1
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding protein
DMEM	Dulbeccos´ s modified Eagle medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
Elk	Ets Like-1 protein
Ets	E-twenty-six-domain Transkriptionsfaktor
ERK	Extracellular signal regulated kinase
et al.	et alli – und andere
FBJ-MSV	Finkel-Biskis-Jinkins Murine Sarcoma Virus
FCS	Fetal calf serum
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor

Regulation der Transkription des c-Fos-Gens durch Stimulus-responsive Proteinkinasen

h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HBSS	Hank´s balanced Salt Solution
HEK293	Human embryonic kidney - Zelllinie
hnRNA	heterogeneous nuclear RNA
IEG	Immeditate early gene
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
LTR	long terminal repeat
M	Molar
MAPK	mitogen activated protein kinase
MAP2K	mitogen activated protein kinase - kinase
MAP3K	mitogen activated protein kinase - kinase
MEM	Minimal Essential Medium
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
NEAA	Non-Essentia Amino Acids
nm	Nanometer
PBS	phosphate buffered saline – Phosphatgepufferte Salzlösung
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PK	Proteinkinase

Regulation der Transkription des c-Fos-Gens durch Stimulus-responsive Proteinkinasen

RNA	Ribonucleinsäure
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
vgl.	vergleiche
WPRE	Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element
RTK	Rezeptortyrosinkinase
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
ψ	Verpackungssignal

Regulation der Transkription des c-Fos-Gens durch Stimulus-responsive Proteinkinasen

Regulation der Transkription des c-Fos-Gens durch Stimulus-responsive Proteinkinasen

II. Zusammenfassung

Dem „basic region-leucine zipper“ (bZip) Protein c-Fos kommt bei der strengen Regulation wichtiger zellulärer Prozesse wie Wachstum und Proliferation eine bedeutende Rolle zu. c-Fos bildet Heterodimere mit anderen bZip-Proteinen, die als AP-1-Transkriptionsfaktorkomplexe aktiv werden. Die Expression des c-Fos-Gens wird durch komplexe Signalprozesse reguliert und gilt als Musterbeispiel für Signal-Aktivierte Transkription. Vielfältige extrazelluläre Signalmoleküle tragen zur Regulation der Expression von c-Fos bei, darunter Mitogene, Zytokine, Metabolite sowie Liganden von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Rezeptor-tyrosinkinasen. An der Steigerung der Transkription von c-Fos nach extrazellulärer Stimulation sind Stimulus-responsive Transkriptionsfaktoren beteiligt, die über konservierte DNA-Sequenzen an den proximalen c-Fos-Promotor binden. Unter den vielfältigen intrazellulären Signalmolekülen, die an der Regulation der Transkription von c-Fos beteiligt sind, kommt den Stimulus-responsiven MAP (*mitogen activated protein*) -Kinasen eine herausragende Bedeutung zu. In dieser Arbeit wurden die Effekte der MAP-Kinasen ERK1/2 (*extracellular signal-regulated protein kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal protein kinase*) und p38 auf die Transkription des c-Fos-Gens analysiert. MAP-Kinasen werden von MAP-Kinase-Kinasen (MAP2K) aktiviert, die nach zellulärer Stimulation ihrerseits von MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (MAP3K) aktiviert werden. Um zu untersuchen, ob die MAPK ERK1/2, JNK und p38 die Transkription von c-Fos über unterschiedliche Transkriptionsfaktoren aktivieren, wurden chromatin-integrierte Luziferase-Reportergene genutzt, die unter der Kontrolle von modifizierten c-Fos-Promotoren exprimiert wurden und inaktivierte DNA-Bindestellen für bestimmte Transkriptionsfaktoren enthielten. Um die MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 spezifisch zu aktivieren, wurden konstitutiv aktive oder chemisch aktivierbare Mutanten bestimmter MAP2K oder MAP3K exprimiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die DNA-Bindestellen für den *serum response factor* (SRF) und den *ternary complex factor* (TCF) essentiell für die Stimulation der Aktivität des c-Fos-Promotors unter dem Einfluss der MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 sind. Für die ERK1/2 und p38-induzierte Promotoraktivierung war zusätzlich eine intakte Bindestelle für AP-1-Transkriptionsfaktoren notwendig. Im Gegensatz dazu hatte eine Inaktivierung der DNA-Bindestelle für STAT keinen, oder nur einen marginalen Effekt. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die untersuchten MAP-Kinasen nicht über unterschiedliche Transkriptionsfaktoren und getrennte genetische Elemente auf den c-Fos-Promotor wirken. Eher wird die Aktivierung des c-Fos-Promotors durch alle drei MAP-Kinasen vornehmlich über das *serum response element* (SRE) und die Transkriptionsfaktoren SRF und TCF vermittelt.

Regulation der Transkription des c-Fos-Gens durch Stimulus-responsive Proteinkinasen

III. Summary

Cellular proliferation and growth are extensively regulated by a plethora of different signaling pathways. The basic region leucine zipper (bZIP) protein c-Fos plays a central role in the regulation of those processes. Together with other bZIP proteins, c-Fos forms heterodimers that constitute the AP-1 transcription factor complex. The expression of the c-Fos gene is highly regulated and has been indicated as a prime example for signal-activated gene induction. Numerous extracellular signaling molecules contribute to the regulation of c-Fos expression, including mitogens, cytokines, metabolites as well as ligands for receptor tyrosine kinases and G-protein coupled receptors. Signaling molecules activate the expression of c-Fos involving stimulus-responsive transcription factors that bind to distinct genetic elements of the c-Fos-promoter. Among the multitude of intracellular signaling molecules involved in the regulation of c-Fos expression, the stimulus-responsive MAP (mitogen activated protein) kinases are of major importance. Here, the effects of the MAP kinases ERK1/2 (extracellular signal-regulated protein kinase), JNK (c-Jun N-terminal protein kinase) and p38 protein kinase on transcription of the c-fos gene were investigated. MAP-kinases are directly activated by MAP-Kinase-Kinases (MAP2K), which in turn are activated by MAP-Kinase-Kinase-Kinases (MAP3K) following extracellular stimulation. To determine, whether ERK1/2, JNK and p38 induce the transcription of the c-Fos gene by activating similar or distinct transcription factors, chromatin-integrated c-Fos promoter-luciferase reporter genes containing inactivating point mutations of DNA binding sites for STAT, TCF, SRF and AP-1 transcription factors were used. Extracellular signal molecules may activate more than one protein kinase. To achieve a distinct activation of specific MAP-Kinases, we expressed constitutively active or specifically activatable mutants of MAP2- or MAP3-Kinases.

The results of this study show that the DNA binding sites for serum response factor (SRF) and ternary complex factor (TCF) essential for enhancing the c-Fos promoter activity under the influence of all three MAP kinases. Stimulation of the c-Fos promoter by ERK1/2 and p38 additionally required the DNA binding site for the transcription factor AP-1. In contrast, an inactivation of the DNA binding site for STAT had no or only a marginal effect on c-Fos promoter activity. In conclusion, the results show that MAP kinases do not stimulate the transcription of c-Fos by activating distinct transcription factors involving distinct genetic elements. Rather, all three analyzed protein kinases mainly target SRF and TCF proteins, and induce transcriptional activation of the c-Fos gene via the serum response element (SRE).

Regulation der Transkription des c-Fos-Gens durch Stimulus-responsive Proteinkinasen

1 Einleitung

1.1 *Signaltransduktion*

Die Kommunikation zwischen den verschiedenen Zellen eines Organismus ist eine grundlegende Voraussetzung für die Funktion komplexer biologischer Prozesse und ist Grundlage für die evolutionäre Entwicklung aller höheren Lebensformen. Die molekularen Mechanismen, die der feinen Abstimmung zwischen verschiedenen Zellen, Geweben und Organen und der Anpassung zellulärer Funktionen an die Bedingungen in ihrer Umwelt zugrunde liegen, sind vielfältig. Jedoch folgen sie einem grundlegenden Prinzip: Spezifische extrazelluläre Mediatoren können nur Zellen ansprechen, die den passenden Rezeptor tragen. Es resultiert die Aktivierung des Rezeptors der Zielzelle und darauf hin wird eine spezifische intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die zu einer biologischen Antwort der Zelle führt. Die Weiterleitung des Signals durch komplexe intrazelluläre Mediatorkaskaden bezeichnet man als Signaltransduktion. [84]

Die biologische Antwort auf die Aktivierung dieser Signalkaskaden kann etwa in der Anpassung von Stoffwechselprozessen bestehen, in der Einleitung des programmierten Zelltodes oder auf der Veränderung der Expression bestimmter Gene beruhen.

1.2 *MAP-Kinase-Signalwege*

1.2.1 **MAP-Kinasen (mitogen-activated protein kinases)**

Bei den MAP-Kinasen handelt es sich um eine Familie von Proteinkinasen, die in der Regulation verschiedenster zellulärer Prozesse eine zentrale Rolle einnehmen. Sie integrieren eine Fülle von Signalen und koordinieren Reaktions- und Anpassungsprozesse der Zellen. Darüber hinaus kommt ihnen eine herausragende Bedeutung bei der Sicherstellung physiologischer Stoffwechselfunktion, Differenzierung und Apoptose der Zellen zu. MAP-Kinasen finden sich in allen eukaryontischen Zellen, ihre strukturellen und regulatorischen Domänen sind von Hefezellen bis hin zu menschlichen Zellen konserviert. [17]

Regulation der Transkription des c-Fos-Gens durch Stimulus-responsive Proteinkinasen

Die MAP-Kinasen werden durch spezifische MAP-Kinase-Kinasen (MAP2K) phosphoryliert und aktiviert. Die MAP2K werden wiederum von MAP3K (MAP-Kinase-Kinase-Kinasen) phosphoryliert, deren Aktivierung ein Bestandteil der zellulären Reaktion auf verschiedene Stimuli ist. Eine große Anzahl von MAP3-Kinasen wird durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli aktiviert. Eine Fülle von Signalwegen konvergiert also in der Aktivierung einer bestimmten MAP-Kinase (vgl. Abb. 6).

Die Proteinkinasen JNK, p38 und ERK1/2 gehören zur Gruppe der konventionellen MAPK. Diese bestehen aus einer einzelnen Kinasedomäne, die von kurzen amino- und carboxyterminalen Domänen flankiert wird (vgl. Abb. 2,3) [66]. Die Struktur der MAPK ist durch zwei distinkte Elemente gekennzeichnet: Einem sogenannten „MAPK-insert“ von etwa 30 Aminosäuren zwischen den Helices α G und α H, sowie einer C-terminalen Extension, die sich auf den „C-lobe“ zurückfaltet [145]. Die Aktivierung der konventionellen MAP-Kinasen erfolgt über ein TxY-Motiv im Aktivierungssegment, das durch MAP-2-Kinasen dual phosphoryliert wird [66].

Dysregulationen der MAP-Kinase-Signalwege finden sich bei einer Vielzahl pathologischer Prozesse. MAP-Kinase-Signalwege spielen nicht nur bei der Tumorentwicklung eine Rolle, sondern können auch an der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen, entzündlichen Erkrankungen und vielen anderen Pathologien beteiligt sein.

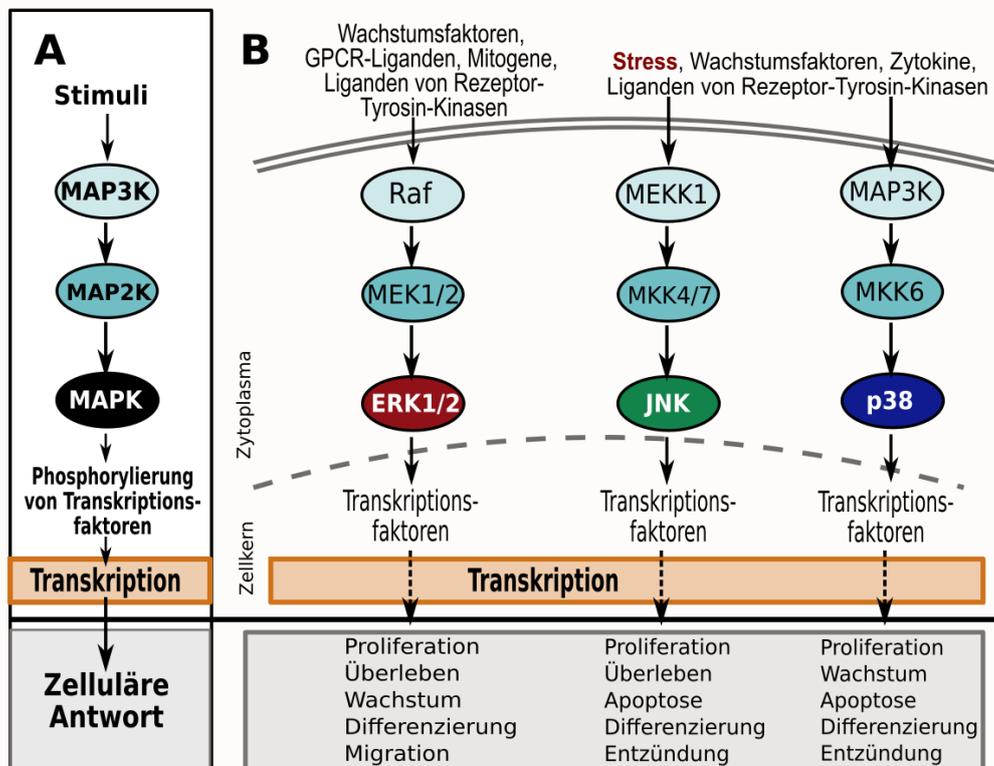


Abbildung 1 Aktivierung und biologische Funktion MAP-Kinasen Erk1/2, JNK und p38

Abb.1: (A) MAP-Kinase Signalwege. Eine Fülle von extrazellulären Stimuli kann eine Signalkaskade auslösen, die zur Aktivierung von MAP3-Kinasen führt. Die verschiedenen MAP3-Kinasen phosphorylieren und aktivieren jeweils eine kleinere Anzahl von MAP2-Kinasen, die wiederum spezifische MAP-Kinasen aktivieren. So konvergieren verschiedene Signale, wie Mitogene, Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Stress in der Aktivierung der MAP-Kinasen. Transkriptionsfaktoren sind wichtige Substrate der MAP-Kinasen. Durch die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren durch MAPK kommt es so zur Anpassung der Transkriptionsrate verschiedener Gene an die Situation der Zelle. **(B) Signalwege der MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38.** Den verschiedenen MAP-Kinasen sind spezifische MAP2-Kinasen und MAP-3-Kinasen vorgeschaltet. Auf der Ebene der MAP2-Kinasen wird ERK1/2 durch MEK1/2 aktiviert, JNK durch MKK4 und MKK7 und p38 beispielsweise durch die MAP2-Kinase MKK6. Verschiedene extrazelluläre und intrazelluläre Signale induzieren die MAP-Kinase Signalwege. So wird die Aktivierung von ERK1/2 vor allem durch Mitogene, Wachstumsfaktoren und Liganden von GPCR und Rezeptortyrosinkinasen ausgelöst, während JNK und p38 durch Stress, Zytokine, Wachstumsfaktoren und Liganden von Rezeptortyrosinkinasen aktiviert werden.

1.2.1.1 Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK1/2)

ERK1/2 sind MAP-Kinasen, die eine zentrale Rolle bei der Regulation eines breiten Spektrums von zellulären Funktionen einnehmen. Sie sind entscheidend an der Regulierung von Proliferation, Wachstum, Differenzierung, Überleben, Metabolismus und Zellmigration beteiligt. Diese Bandbreite an Funktionen wird durch ein umfangreiches Repertoire an Substraten ermöglicht, die kontextabhängig exprimiert werden können. Insgesamt lässt sich die Wirkung der ERK1/2-Kinasen als pro-proliferativ und antiapoptotisch charakterisieren [66]. Zudem spielen sie eine wichtige Rolle in verschiedenen Differenzierungsprozessen. In verschiedenen Zellarten können durch ERK1/2-Aktivierung unterschiedliche Prozesse ausgelöst werden [123].

Die Signalkaskade, die zur Aktivierung von ERK1/2 führt, wird vor allem durch Wachstumsfaktoren und Mitogene ausgelöst. Über Ras-GTP-asen kommt es zur Aktivierung von Raf-Kinasen, MAP3-Kinasen, deren wichtigste Substrate die MAP2-Kinasen MEK1 und MEK2 sind. Die aktivierten MAP2-Kinasen phosphorylieren und aktivieren schließlich ERK1/2 [23]. Aktiviert werden ERK1/2 durch die Phosphorylierung der Aminosäuren Thr185 und Tyr187 (ERK2) oder Thr202 und Tyr204 (ERK1), die als Aktivierungssegment (AS) in einem flexiblen loop eingebettet liegen [146]. Substrate von ERK1/2 verfügen über ein Pro-x-Ser oder ein Thr-Pro – Konsensusmotiv, die als Phosphorylierungsstellen fungieren. Daneben interagieren die ERK-Proteinkinasen über D-sites und F-sites mit ihren Substraten [91].

Regulation der Transkription des c-Fos-Gens durch Stimulus-responsive Proteinkinasen

ERK1/2 vermitteln die durch Mitogene ausgelöste Expression von *Immediate Early Genes* (IEG), die nach Stimulation der Zelle innerhalb weniger Minuten transkribiert werden. Der Serum-Response-Faktor (SRF) ist dabei der zentrale Transkriptionsfaktor [39]. ERK ist an der Aktivierung von SRF beteiligt, wobei ERK1/2 nicht direkt SRF phosphoryliert, sondern die Proteinkinase RSK aktiviert, die SRF phosphoryliert und aktiviert [98]. Die Hauptprodukte durch ERK-Aktivierung induzierter Transkription von IEGs sind die Transkriptionsfaktoren der Familien FOS, JUN und MYC [28,39,73]. ERK1/2 phosphorylieren zusätzlich Fos und JUN, wobei die Phosphorylierung die proteasomale Degradierung der Proteine verhindert, ihre DNA-Bindekapazität steigert und ihre Fähigkeit zur Transaktivierung fördert [71]. Daneben werden durch ERK Überlebenssignale in Reaktion auf Serumstimulation und RTK-Aktivierung vermittelt [8]. Der zusätzlichen pro-proliferativen Wirkung von ERK liegt vor allem die Förderung des Phasenübergangs von der G- zur S1-Phase zu Grunde [124].

Zellen, die sich in raschen Wachstumsprozessen befinden, benötigen große Mengen an Energie, wobei insbesondere gering differenzierte und schnell wachsende Zellen verstärkt auf die Glycolyse zurückgreifen. Dabei betreiben sie auch unter aeroben Bedingungen vergleichsweise weniger oxidative Phosphorylierung [30]. Auf Krebszellen bezogen bezeichnet man diesen, ursprünglich von Otto Warburg beschriebenen, Effekt als Warburg-Effekt [128]. Dieser Effekt spielt nun in Krebszellen eine bedeutenden Rolle, in denen eine aktivierende B-Raf oder K-Ras-Mutation vorliegt, die eine überschießende ERK-Aktivierung nach sich zieht. Mehrere Studien konnten zeigen, dass in Zellen mit B-Raf oder K-Ras-Mutationen ein erhöhter Glucoseverbrauch und eine vermehrte Produktion von Laktat auf Grund einer erhöhten Abhängigkeit von der Glycolyse vorliegt [50,107,114,140]. Stoffwechselprozesse normalisieren sich unter Therapie mit RAF- oder MEK-Inhibitoren [57,72,81,132].

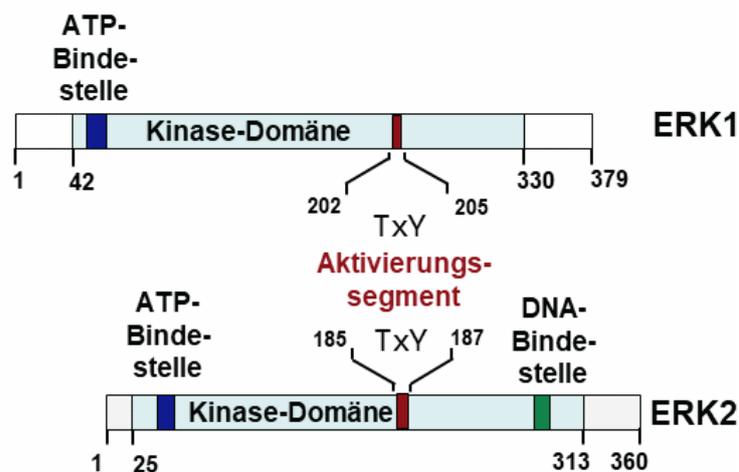


Abbildung 2 Modulare Struktur von ERK1/2

Abb. 2: Modulare Struktur der MAPK ERK1/2. Dargestellt sind Kinasedomäne, Aktivierungssegment und ATP-Bindestelle.

1.2.1.2 C-Jun-N-terminal protein kinase (JNK)

Auch bei der Proteinkinase JNK (*C-Jun-N-terminal protein kinase*) handelt es sich um eine MAP-Kinase. Als Serin/Threonin-Proteinkinase ist JNK an der Vermittlung einer Vielzahl essentieller zellulärer Prozesse beteiligt, etwa an Proliferation, Signaltransduktion von Überlebenssignalen, der Einleitung der Apoptose, an Differenzierungsprozessen und an der Vermittlung der Entzündungsreaktion [85,131]. Aktiviert wird JNK durch die Phosphorylierung der Aminosäuren Thr183 und Tyr185, die als Aktivierungssegment (AS) im flexiblen T-loop eingebettet liegen. Verantwortlich für die unmittelbare Aktivierung von JNK sind die MAP2-Kinasen MKK4 (SEK1) und MKK7, die wiederum in mehreren Isoformen vorkommen [29]. Ausgelöst wird die Aktivierung von JNK durch bestimmte, häufig pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 oder TNF α und verschiedene zelluläre Stressoren [131]. Scaffold-Proteine wie JIP1/2 potenzieren die JNK-Aktivierung, indem sie an der Signalkaskade beteiligte Kinasen günstig zueinander positionieren [130]. Die verschiedenen Isoformen von JNK werden von drei distinkten Genen kodiert (jnk1-3), wobei jnk3 vor allem in Gehirn, Herz und Testes aktiv ist, während jnk1 und jnk2 ubiquitär exprimiert werden [49]. JNK ist an der Regulation der Aktivität der Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie beteiligt und phosphoryliert die AP-1-Monomere c-Jun, JunB, JunD und ATF2 [57,110]. JNK kann sowohl an der Einleitung des programmierten Zelltods, als auch an der Vermittlung von Überlebenssignalen beteiligt sein. Die meisten JNK-aktivierenden Stimuli sind dabei allerdings nicht an der Induktion der Apoptose beteiligt [29]. Darüber hinaus kann die JNK-abhängige Einleitung der Apoptose durch die gleichzeitige Aktivität von Überlebenssignalen blockiert werden [135]. Ein entscheidender Faktor für die pro-apoptische Wirkung von JNK ist die Dauer der Aktivierung. So wird die Apoptose eingeleitet, wenn JNK dauerhaft aktiv ist, während eine transiente Aktivierung eher Überlebenssignale vermittelt. [71]

Fehlregulationen der durch JNK vermittelten Signalkaskade sind an verschiedenen pathologischen Prozessen beteiligt. So hat JNK Einfluss auf Prozesse bei Insulinresistenz, aber auch auf Autoimmunerkrankungen wie Diabetes Mellitus Typ1, beeinflusst Prozesse der Tumorgenese und spielt eine Rolle bei der Entstehung ischämischer Gewebeerkrankungen [131]. Für JNK sind einerseits onkogenetische Effekte beschrieben, andererseits kann der JNK-Signalweg auch tumorsupprimierend wirken [42,62,86]. Metabolisch kann JNK an der Ausbildung einer Insulinresistenz beteiligt sein. JNK phosphoryliert und inhibiert IRS-1 (*insulin receptor substrate-1*) und kann so die Signaltransduktion am Insulinrezeptor supprimieren [1,67]. Zusätzlich hat JNK auch entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung des Immunsystems, eine Depletion von JNK1 führt in Mäusen zu schweren T-Zell-Defekten [22]. Dabei scheint JNK beispielsweise für die Differenzierung von CD4⁺-T-Helferzellen notwendig zu sein und kontrollierend auf die Balance von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen einzuwirken [32,33].

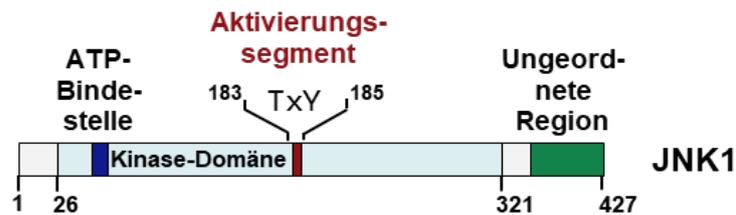


Abbildung 3 Modulare Struktur von JNK

Abb. 3: Modulare Struktur von JNK1. Gezeigt werden Kinasedomäne mit Aktivierungssegment, ATP-Bindestelle und die C-Terminale ungeordnete Region.

1.2.1.3 P38 Proteinkinasen

Bei p38 Proteinkinasen handelt es sich um Serin-Threonin-Kinasen der MAP-Kinase Familie. Im Gegensatz zur MAP-Kinase ERK1/2 werden p38-Proteinkinasen allerdings weniger durch Mitogene, sondern vorrangig durch Stress und proinflammatorische Signale aktiviert und werden daher, wie JNK, den Stress-aktivierten MAP-Kinasen zugerechnet. [17]

p38 Proteinkinasen sind an der zellulären Reaktion auf viele Arten von Stress beteiligt. Dazu zählen physiologische Vorgänge wie Differenzierung und Wachstum, aber auch pathologische Prozesse wie die Entwicklung von Tumoren. Ebenso vermittelt p38 Reaktionen auf Veränderungen in der Umgebung, die beispielsweise osmotischen, mechanischen und oxidativen Stress auslösen, sowie auf intrazellulären Stress, etwa bei DNA Schäden [17,24,25]. Prototypische Aktivatoren von p38 sind die proinflammatorischen Zytokine TNF, IL-6 und IL-1 β [17]. p38 Proteinkinasen integrieren Signale aus einer Vielzahl verschiedener Signalwege und sind an diversen biologischen Reaktionen beteiligt. Eine Fehlregulation der durch p38 regulierten Signalwege ist mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert. Fehlfunktionen von p38 wurden mit inflammatorischen Prozessen, Erkrankungen des Immunsystems und kanzerogenen Prozessen in Verbindung gebracht. [17]

Unmittelbar phosphoryliert werden p38-Proteinkinasen von den p38-spezifischen MAP2-Kinasen MKK3 und MKK6. Zusätzlich kann auch die MAP2-Kinase MKK4, die normalerweise JNK aktiviert, p38 aktivieren [11]. Die Aktivität von p38 wird streng reguliert, um die nachteiligen Effekte einer Überaktivierung zu umgehen. Terminiert wird das Signal vor allem durch Dephosphorylierung an der Aktivierungsstelle durch verschiedene Phosphatasen [17]. Daneben existieren negative Feedback-loops, etwa durch eine Einschränkung der Expression von MKK6 durch p38, die vor allem das Ausmaß der Aktivierung von p38 kontrollieren [3,17,21].

1.3 Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind DNA-bindende Proteine, die sequenz-spezifisch an die DNA binden und dadurch die Transkriptionsrate von Genen positiv oder negativ beeinflussen können. Sie binden über spezielle Bindungsmotive in Promotoren, Silencer-Elementen oder Enhancer-Elementen an die DNA. Die gebundenen Transkriptionsfaktoren gehen Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren und Enzymen wie der DNA-Polymerase ein. Transkriptionsfaktoren können auf der Basis verschiedener Merkmale eingeteilt werden. Aufgrund der Struktur ihrer DNA-bindenden Domäne unterscheidet man beispielsweise Transkriptionsfaktoren mit Leucin-Zipper-Motiven, Zink-Finger-Domänen, „helix-loop-helix“-Motiven, „helix-turn-helix“-Motiven und HMG-Box-Domänen [148]. Des Weiteren unterscheidet man auf Grund ihrer Funktionsweise generelle Transkriptionsfaktoren von regulatorischen Transkriptionsfaktoren. Die Verfügbarkeit genereller Transkriptionsfaktoren ist eine essentielle Voraussetzung für die Initiation der Transkription, während regulatorische Transkriptionsfaktoren für die differentielle Genexpression von Bedeutung sind. Sie können die Expressionsrate von Genen steigern, die kontinuierlich mit basaler Transkriptionsrate exprimiert werden. Regulatorische Transkriptionsfaktoren binden über sogenannte Response-Elemente an die DNA und werden durch regulatorische Signalkaskaden situativ aktiviert oder deaktiviert. [148]

1.3.1 AP-1 Transkriptionsfaktoren (Aktivator-Protein-1)

Bei den Proteinen der AP-1 Familie handelt es sich um Leucin-Zipper-Proteine, die über den Leucin-Zipper dimerisieren. Die Dimere werden als AP-1-Transkriptionsfaktoren aktiv. AP-1-Dimere entstehen aus Leucin-Zipper-Proteinen der Subfamilien JUN, FOS und ATF. AP-1 gilt als Musterbeispiel für regulatorische Transkriptionsfaktoren, die an vielfältigen biologischen Anpassungsprozessen nach Veränderungen in der Umgebung beteiligt sind. Die Dimere binden über die Konsensussequenz -TGACTCA- an DNA, die in den Promotorregionen verschiedener Zielgene konserviert ist und bewirken eine Veränderung der Transkriptionsrate. Dabei bilden FOS und ATF-Proteine Heterodimere mit JUN-Proteinen, während JUN-Proteine auch Homodimere bilden können. [78]

AP-1 ist an der Übersetzung von Stress oder auch der Rezeptorbindung von Wachstumsfaktoren, in eine Änderung der Transkriptionsrate bestimmter Gene beteiligt. AP-1 Transkriptionsfaktoren sind evolutionär stark konserviert und sind schon in Hefezellen für die transkriptionale Reaktion auf Stress von Bedeutung. Eine verstärkte Proliferation und damit auch eine Beteiligung an Tumorstadium, gehören zu den am besten untersuchten Wirkungen von AP-1, jedoch werden einigen AP-1-Komponenten auch Tumor-supprimierende Eigenschaften zugeschrieben. Zudem können AP-1 Transkriptionsfaktoren auch pro-apoptische Signale vermitteln. [126]

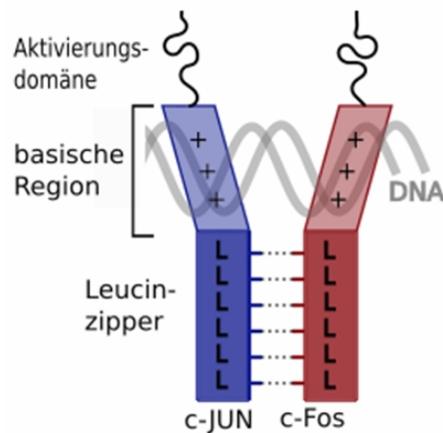


Abbildung 4 AP-1 Transkriptionsfaktorkomplex

Abb. 4: AP-1- Transkriptionsfaktorkomplex. Schematische Darstellung der DNA-Bindung des Dimers der Leucin-Zipper-Proteine c-Jun und c-Fos. Dargestellt sind die Dimerisierung von c-Jun und c-Fos über die hydrophoben Leucinreste der Dimerisierungsdomäne. Zudem sind die Aktivierungsdomänen von c-Jun und c-Fos, sowie die DNA-Bindung des Dimers über die basischen Regionen der beiden Proteine dargestellt. Der Komplex aus aktiviertem c-Jun und aktiviertem c-Fos wird als AP-1 Transkriptionsfaktor aktiv.

1.3.2 Serum response factor (SRF)

Bereits 1984 beschrieben Greenberg und Ziff, dass der Zusatz von Serum zum Zellmedium unmittelbar zu einer Stimulation der Transkription des c-Fos Genes führt [46]. Der dafür verantwortliche Transkriptionsfaktor wurde 1986 von Treisman beschrieben und als *serum response factor* (SRF) bezeichnet [121]. Bei SRF handelt es sich um einen regulatorischen Transkriptionsfaktor, der an der Induktion der Transkription verschiedener Zielgene nach zellulärer Stimulation, beispielsweise mit Wachstumsfaktoren, TNF α , TPA oder Faktoren die zur Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels führen, beteiligt ist [5,20,41,77,80]. SRF bindet in Form von Dimeren über ein DNA-Element innerhalb des sogenannten *Serum Response Elements*, die sogenannte CArG-Box, an die DNA. Über 30 Gene verfügen über ein SRE in ihrer Promoterregion, darunter vor allem *Immediate Early Genes* (IEG) wie c-Fos, neuronale Gene und Gene die für muskuläre Proteine kodieren. Viele der durch SRF regulierten Gene sind an der zellulären Reaktion auf die Stimulation mit Wachstumsfaktoren oder auf vorliegende Gewebeverletzungen beteiligt. [20]

Die Aktivierung der Transkription durch SRF erfolgt über zwei unterschiedliche Signalwege. Unter dem Einfluss der MAP-Kinase-Signalwege erfolgt die Transkriptionsaktivierung durch SRF in Abhängigkeit von Ternary Complex Factors (TCF). Dabei sind zur Signalweiterleitung sowohl die Aktivierung der TCF selbst, als auch ihre Bindung an SRF notwendig. Daneben existiert ein TCF-unabhängiger Signalweg, der nach Aktivierung von SRF über Rho-GTPasen aktiv wird. [60]

1.3.3 Ternary complex factors (TCF)

Bei den Ternary Complex Factors (TCF) handelt es sich um eine Subfamilie der E-twenty-six-domain (Ets) Transkriptionsfaktoren. Zu den TCF werden die Transkriptionsfaktoren Elk-1 (Ets Like-1 protein), Elk-3 und Elk-4 gezählt [15]. Proteine der Ets-Familie enthalten als gemeinsames Element eine 85 Aminosäuren umfassende „helix-turn-helix“ Domäne, die den Transkriptionsfaktoren erlaubt mit einem etwa 10 Basenpaare langen DNA-Erkennungssegment zu interagieren (zentrale Konsensussequenz 5'-GGAA/T-3'). Die Transkriptionsfaktoren der TCF-Subfamilie verbindet die Fähigkeit, einen ternären Komplex mit SRF-Dimeren zu bilden, der dann mit dem *Serum Response Element* (SRE) des c-Fos Promotors und den Promotoren anderer IEGs interagiert. Die Interaktion mit SRF erhöht dabei die Bindeaffinität der TCF an das c-Fos SRE [119]. Um eine effektive DNA-Bindung und Aktivierung des c-Fos-Promotors durch TCF zu erreichen, muss SRF bereits am SRE gebunden vorliegen [54].

Die TCF werden vornehmlich von MAP-Kinasen aktiviert und enthalten in ihrer Struktur alle drei eine phosphorylierungs-abhängige Aktivierungsdomäne [59]. Die verschiedenen TCF haben teilweise unterschiedliche Docking-Domänen für verschiedene MAP-Kinasen, was eine differentielle Integration verschiedener MAP-Kinase Signalwege in die Aktivierung der TCF erlaubt [15].

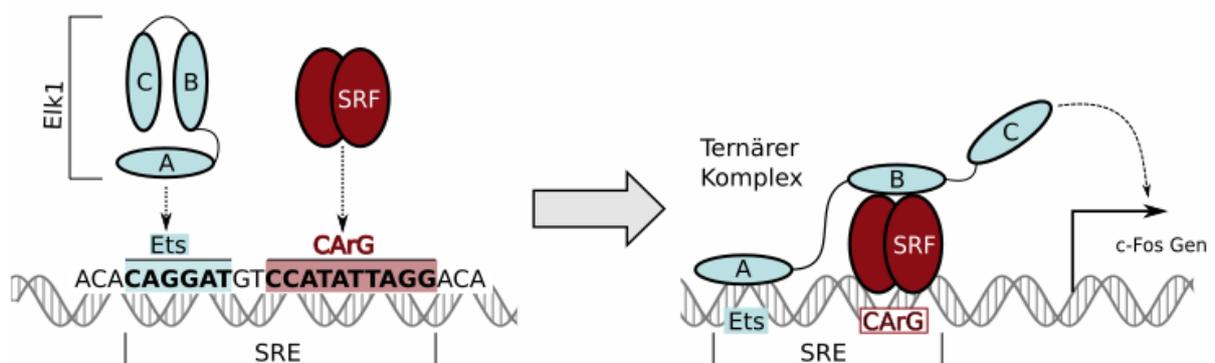


Abbildung 5 Bildung des Ternären Komplexes

Abb. 5: Schematische Darstellung der Bildung des Ternären Komplexes am SRE des c-Fos Promotors. Dargestellt sind das SRE des proximalen c-Fos-Promotors mit den Bindestellen für TCF (Ets) und SRF (CArG), sowie die Transkriptionsfaktoren Elk1 und SRF. SRF bindet in Form von Dimeren an die DNA. Elk 1 ist modular dargestellt, gezeigt sind die Domänen A, B und C. Die B-Domäne interagiert mit SRF, die A-Domäne dient der Interaktion mit der DNA-Bindestelle für Ets-Transkriptionsfaktoren. Abbildung modifiziert nach [15]

1.3.4 Signal transducers and activators of transcription (STATs)

Signal transducers and activators of transcription (STATs) sind regulatorische Transkriptionsfaktoren, die an der Vermittlung verschiedener biologischer Funktionen beteiligt sind. Sie vermitteln beispielsweise zelluläre Proliferation und Differenzierung, aber auch die Einleitung der Apoptose. STAT-Proteine werden vor allem von Januskinasen und MAP-Kinasen phosphoryliert und aktiviert, wodurch sie dimerisieren und in den Zellkern migrieren [64]. Die Aktivierung der STAT-Transkriptionsfaktoren wird durch Stimulation der Zellen mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren ausgelöst [43].

Zu den STAT-Proteinen zählen sieben Transkriptionsfaktoren. Sie binden über SIE-Promotorelemente (*c-sis-inducible element*) an die DNA. Obwohl die DNA-Bindeelemente von STAT eine relativ große Variabilität aufweisen, verfügen sie im Allgemeinen über die Konsensussequenz -TT(N)5AA-, wobei die Abstände zwischen den palindromischen TT—AA – Elementen Einfluss auf die Bindeaffinität der Transkriptionsfaktoren haben [108]. Konstitutive STAT-Aktivierung wurde in verschiedenen Tumorzelllinien beobachtet, in denen Tyrosinkinase-Signalwege überaktiv sind [43].

1.4 Das c-fos Gen und die Expression von c-Fos

1.4.1 c-Fos

Der Transkriptionsfaktor c-Fos ist ein *basic region leucine zipper* (bZip) – Protein und kann über seine basische Region an DNA binden. c-Fos bildet mit c-Jun, JunB oder JunD Heterodimere, die Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie (*Activating Protein 1*) darstellen (vgl. Abb 4). So kann c-Fos als Teil von Signalkaskaden wirksam werden, die extrazelluläre Signale in eine Anpassung der Genexpression übersetzen. c-Fos ist an der Regulation von Wachstumsprozessen, an der Osteoklastogenese, an der Haematopoese sowie an neuronaler Aktivierung, Exzitabilität und dem Überleben von Neuronen beteiligt [61,147].

1.4.2 Das c-Fos-Gen

Das c-fos-Gen war eines der ersten Protoonkogene, für das eine Beteiligung an der Regulation der Transkription anderer Gene nachgewiesen werden konnte. Das machte das c-Fos-Gen zum Gegenstand umfangreicher Forschungsbemühungen [31,56,97]. Es ist das humane Homolog zum viralen Onkogen v-fos, das 1982 von Curran und Tech in dem murinen Finkel-Biskis-Jinkins Sarkomavirus (FBJ-MSV) entdeckt wurde [26]. c-Fos ist, ebenso wie v-Fos, in der Lage in Fibroblastenzellen eine Transformation herbeizuführen .

Diverse Arbeiten beschäftigen sich mit dem onkogenetischen Potential von c-Fos und konnten zeigen, dass von c-Fos regulierte Gene an tumorgenetischen Prozessen beteiligt sind. c-Fos wurde etwa mit erhöhter Invasivität von Tumoren in Verbindung gebracht. Zudem konnte gezeigt werden, dass c-Fos in epithelialen Zellen einen Verlust der Polarität bewirken und die Differenzierung aus mesenchymalen Zellen stören kann. Das kann beispielsweise ein invasives und metastatisches Wachstum epithelialer Zellen der Brustdrüse auslösen [36,54]. c-Fos scheint zudem essentiell für das Wachstum bestimmter Brustkrebszellen zu sein [74]. Darüber hinaus kann Fos indirekt über die Induktion der DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 ein Gen-„Silencing“ von Tumorsuppressorgenen auslösen [6].

Trotz der beschriebenen protoonkogenen Wirkung von c-Fos konnte eine Überexpression von c-Fos bisher nicht eindeutig mit einer Tumorinduktion beim Menschen in Verbindung gebracht werden, was eventuell durch eine zusätzliche pro-apoptische Wirkung von c-Fos zu erklären ist [76,94]. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass c-Fos die Progression des Ovarialkarzinoms unterdrückt und eine Minderexpression von c-Fos konnte als negativer prognostischer Faktor bei Vorliegen eines Ovarialkarzinoms identifiziert werden [75,87].

1.4.3 Der c-Fos-Promotor

Die Transkription des c-Fos-Gens wird von einer Vielzahl extrazellulärer Signalmoleküle und Rezeptorliganden induziert [16]. Das c-Fos-Gen gilt daher als Musterbeispiel für Signal-aktivierte Gen-Induktion [105]. Die Transkription von c-Fos kann durch verschiedene extrazelluläre Signalmoleküle aktiviert werden, unter anderem durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und durch Liganden von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und Rezeptor-Tyrosinkinasen [35,45,45,53,118]. Darüber hinaus kann auch die Stimulation spannungsgesteuerter Ca²⁺-Kanäle und *transient receptor potential* (TRP) - Kanäle die Expression von c-Fos verstärken [70,103].

Der proximale c-Fos-Promotor enthält Bindestellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren. Der Transkriptionsfaktor STAT bindet an das *c-sis-inducible element* (SIE) [125]. *Ternary complex factors* (TCF) binden an eine DNA Sequenz, die typischerweise als Bindestelle für Ets-Transkriptionsfaktoren dient [54]. TCF enthalten in ihrer Struktur eine Ets-Sequenz, über die sie mit dem *Serum-Response-Element* (SRE) des Fos-Promotors interagieren. Der *Serum-Response-Factor* SRF bindet an TCF im Sinne eines ternären Komplexes und ist an dessen effektiver Bindung an den c-Fos-Promotor beteiligt [58]. Der *serum response factor* (SRF) selbst bindet an die Basensequenz der CArG-Box. Die CArG-Box und die Ets-Bindestelle bilden zusammen das sogenannte *serum response element* (SRE) [9]. Ein weiteres wichtiges, in der Sequenz des proximalen c-Fos-Promotor enthaltenes Element ist die Binde-

stelle für den Transkriptionsfaktor AP-1 (*Aktivator Protein 1*). Die verschiedenen AP-1-Dimere binden dann über die entsprechende Konsensussequenz an DNA-Promotoren [4].

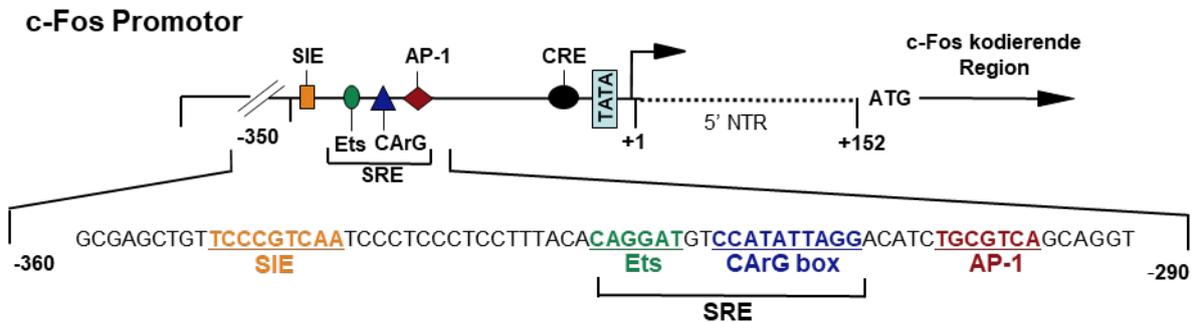


Abbildung 6 Modulare Struktur und Sequenz des proximalen c-Fos-Promotors

Abb. 6: Schematische Darstellung der Struktur des c-Fos Promotors. Dargestellt sind die Bindestellen für STAT (SIE), Ets und SRF (CArG) sowie AP-1 mit ihrer Basensequenz. Zusätzlich sind die Bindestelle für CREB (CRE), die 5'untranslated region (5'NTR) sowie der Beginn des c-Fos-Strukturgens schematisch dargestellt.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass Stimulus-responsive Proteinkinasen extrazelluläre Stimulation mit der konsekutiven Steigerung der Transkription von c-Fos verbinden. Extrazelluläre Stimuli bedingen typischerweise die Aktivierung mehrerer Kinasen und die Kinasen selbst aktivieren wiederum mehrere Transkriptionsfaktoren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu klären, ob die einzelnen MAP-Kinasen die Aktivierung des c-Fos-Promotor über distinkte Transkriptionsfaktoren auslösen, oder ob die verschiedenen MAP-Kinasen gemeinsame Transkriptionsfaktoren zur Induktion der Transkription von c-Fos nutzen.

Methodisch wurden dazu die MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 selektiv aktiviert. Unter dem Einfluss der einzelnen MAP-Kinasen wurden die Effekte von c-Fos-Promotor-Mutationen analysiert, die die DNA-Bindestellen bestimmter Transkriptionsfaktoren inaktivierten. Dies ermöglichte die Analyse der Bedeutung der verschiedenen Transkriptionsfaktoren für die Aktivierung der Transkription von c-Fos unter dem Einfluss der einzelnen MAP-Kinasen.

Regulation der Transkription des c-Fos-Gens durch Stimulus-responsive Proteinkinasen

2 Material und Methoden

2.1 *Verwendete Geräte und Gebrauchsgegenstände*

1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
96-Wells-Platte, transparent (Greiner)	bio-one, Frickenhausen
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Auflichtmikroskop	Helmut Hundt GmbH, Wetzlar
Autoklav	Schütt, Göttingen
Brutschrank	Thermo Fischer, Berlin
Druckfiltrationseinheit, steril (Sartolab P)	Sartorius, Göttingen
Einmal-Filter (0,22 µm bzw. 0,45µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Einmal-Spitzen (200 µl bzw. 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Einmal-Spritzen Injekt (10ml bzw. 20 ml)	Braun AG, Melsungen
Eismaschine	diverse Hersteller
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Küvetten (1,5 ml Halbmikro)	Brand, Wertheim
Labor-Zentrifugen-Röhrchen 15 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Labor-Zentrifugen-Röhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Luminometer ma	Berthold Detection Systems, Alaba- USA
Magnetrührer	KA Labortechnik, Staufen
Microplate Reader Infinite	M Nano Tecan, Männedorf CH
Millipore Wasseranlage	Milli Q Millipore, Milford USA
Neubauer Zählkammer (improved)	Roth, Karlsruhe
pH-Meter (inoLab pH 720)	WTW, Wellheim
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (10 µl, 20 µl, 200 µl bzw. 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg

Regulation der Transkription des c-Fos-Gens durch Stimulus-responsive Proteinkinasen

Pipetus®Akku	Hirschmann Laborgeräte, Heilbronn
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Sterilfilter (0,22µm bzw. 0,45 µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Tischzentrifuge (Biofuge®pico)	Heraeus, Hanau
Vortex-Mixer	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbäder, temperierbar	diverse Hersteller
Zellkulturflaschen (175 cm ² , XX)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschale Ø60 mm	Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschale Ø35 mm	Bio-one, Frickenhausen

2.2 Chemikalien

Adenosintriphosphat (ATP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
BCA Protein Kit	Interchim
Bacillol	VWR
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Chloroquin	Sigma-Aldrich, München
Coenzym A	Sigma-Aldrich, München
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	PAA, Marburg
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (EtOH)	Chemikalienlager UdS
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Glukose	Merck, Darmstadt
Glutamin	PAA, Marburg
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure	Roth, Karlsruhe (HEPES)
Chlorwasserstoff (HCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt

Material und Methoden

Luminol	Roth, Karlsruhe
Luziferin	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Magnesiumhydrogencarbonat (MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ x 5 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	Sigma-Aldrich, München
MEM Non-Essential Amino Acid Solution	Thermo Fischer (#11140)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Gibco Natriumpyruvat (100mM)	Fisher Scientific, Waltham USA
Penicillin/Streptomycin	PAA, Marburg
Hexadimethrin-Bromid (Polybren)	Sigma-Aldrich, München
Reporterlyspuffer (5x)	Promega, Mannheim
12- O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA)	Calbiochem, Darmstadt
Tricin	Merck, Darmstadt Tr

2.3 Lösungen

Im Folgenden werden die verwendeten Lösungen und Puffer dargestellt. Der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxid und Salzsäure eingestellt. Wenn nicht anders angegeben wurde destilliertes Wasser als Lösemittel verwendet.

2.3.1 DMEM (FCS 10 %)

Glukose	25 mM
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

2.3.2 DMEM-serumreduziert (FCS 0,05 %)

Glukose	25 mM
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

sterilfiltriert mit Druckfiltrationseinheit (Sartolab P)

2.3.3 1x PBS

NaCl	170 mM
KCl	3,35 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	4 mM
KH ₂ PO ₄	1,84 mM

pH 7,24

2.3.4 1x Trypsin/EDTA

Trypsin 0,25% (w/v)

EDTA 0,1% (w/v)

2.3.5 2 x HBSS

NaCl	274 mM
KCl	25 mM
Na ₂ HPO ₄	3,75 mM
Glukose	27,75 mM

HEPES 105 mM

pH 7,05-7,12

Sterilfiltration mit Sterilfilter (Ø0,22 µm)

2.3.6 Lösungen zur Messung der Luziferaseaktivität

Luciferase Assay Reagent

Tricin	22 mM
(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ x 5 H ₂ O	1,177 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,94 mM
EDTA	0,11 mM
DTT	36,3 mM
Coenzym A	297 µM
ATP	583 µM

pH 7,8

Luziferin 4,7 mM

Zur Luziferasemessung wurde eine Lösung aus 9 ml (Luciferase Assay Reagent) und 1 ml Luziferin verwendet.

2.3.7 4-Hydroxytamoxifen (4OHT)

Verwendet wurde eine Lösung in Ethanol:

2.4 Versuchsablauf

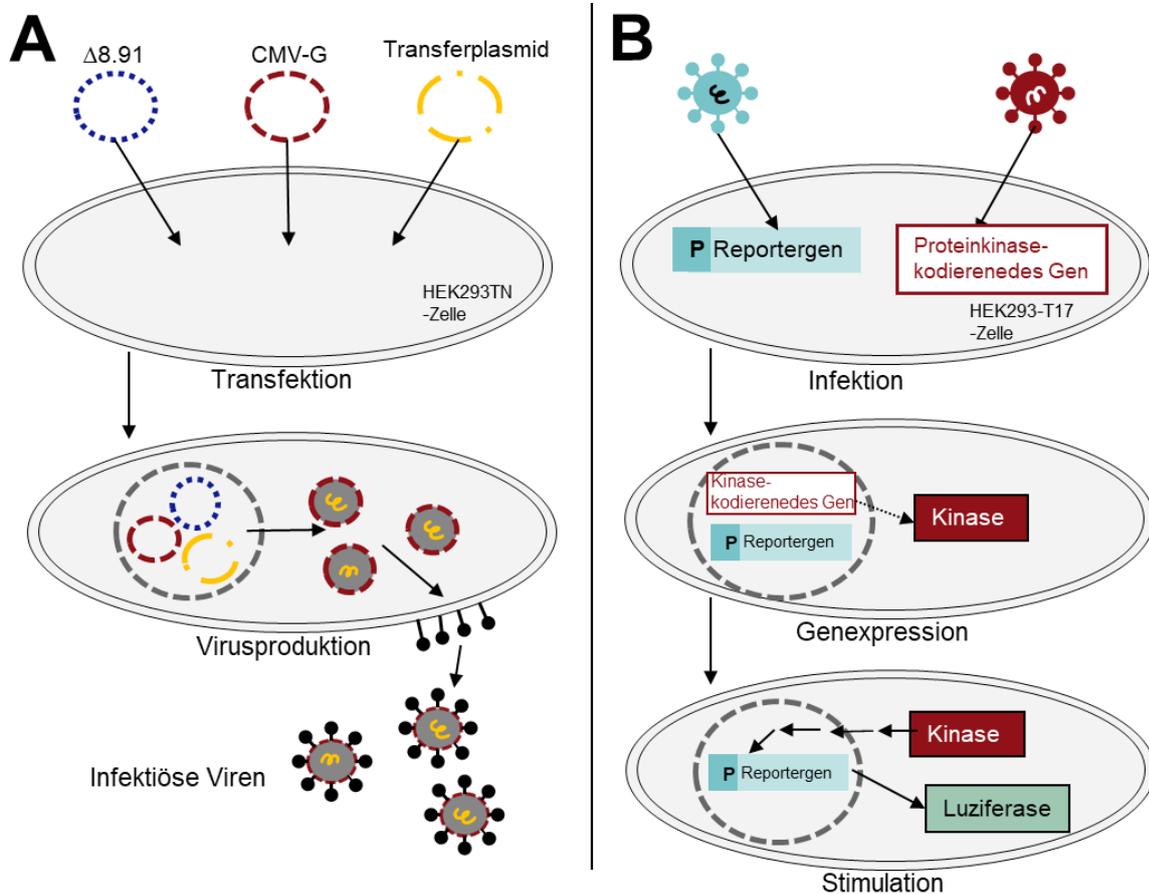


Abbildung 7 Versuchsablauf

Abb. 7: **(A)** Virusproduktion. Zunächst wurden mittels Calciumphosphat-Transfektion Plasmide in HEK293-TN Zellen eingebracht. Durch die gleichzeitige Transfektion von Plasmiden, die für virale Strukturproteine und Enzyme kodierten mit einem lentiviralen Transfervektor, wurden in den HEK293-TN-Zellen rekombinante Lentiviren generiert. Die Viren wurden von den Zellen abgegeben und konnten mit dem Zellmedium von den Zellkulturplatten abgeerntet werden. **(B)** Infektion. Die Viruslösungen wurden auf die ausplattierten Zielzellen gegeben. Die Lentiviren infizierten die Zielzellen und die genetische Information wurde in das Genom der Zielzellen integriert. Die Reporter gene enthielten das Luziferasegen unter Kontrolle einer zu untersuchenden Promotorsequenz. Der Grad der Promotoraktivierung konnte so über die Messung der Luziferaseaktivität quantifiziert werden. Zusätzlich wurden Gene in die Zellen eingebracht, die für regulatorische Proteine, wie beispielsweise Proteinkinasen, kodierten.

2.5 Plasmide zur Herstellung von Viren zum lentiviralen Gentransfer

Die rekombinanten Viren wurden folgendermaßen generiert: HEK293-TN-Zellen wurden mit drei Plasmiden transfiziert. Neben dem Plasmid mit dem jeweiligen lentiviralen Transfervektor wurden ein Verpackungsplasmid ($\Delta 8.91$) und ein Expressionsplasmid (pCMV-G) zur Transfektion eingesetzt. Dabei kodiert das Verpackungsplasmid ($\Delta 8.91$) für die Proteine gag, pol und rev des rekombinanten Lentivirus. Das Expressionsplasmid pCMV-G kodiert für das Hüllprotein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV), das die Infektion von Zellen verschiedener Typen durch die generierten Lentiviren ermöglichte. Nach der Transfektion mit den genannten Plasmiden wurden die HEK293/TN-Zellen für 72 Stunden inkubiert. Die Viren reicherten sich im Zellüberstand an, der dann abgenommen und zur Infektion von Zielzellen genutzt werden konnte.

2.5.1 Verpackungsplasmid $\Delta 8.91$

Das Verpackungsplasmid $\Delta 8.91$ dient dem Transfer der lentiviralen Gene gag, pol und rev. Proteine des viralen Kapsids werden von gag codiert, das pol-Gen codiert für die Reverse Transkriptase, die virale Integrase, eine Protease und eine RNase H [116]. Rev codiert für einen Proteinkomplex, der den Export ungespleißter RNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma unterstützt und damit eine effiziente Genexpression gewährleistet. Im Verpackungsplasmid wurden die lentiviralen LTR-Sequenzen deletiert und am 5'-Ende durch den starken Promotor/Enhancer-Komplex (IE) des Cytomegalo-Virus (CMV) ersetzt. Am 3'-Ende wurde ein Polyadenylierungssignal des Simian-Virus 40 (SV40pA) eingefügt [102].

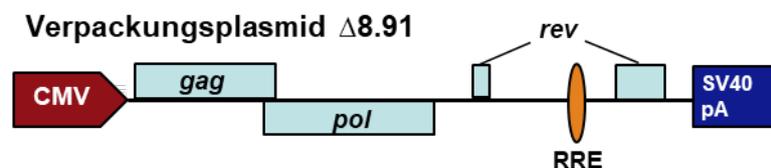


Abbildung 8 Schematische Darstellung der Struktur des Verpackungsplasmids $\Delta 8.91$

Abb. 8: Struktur des Verpackungsplasmids $\Delta 8.91$. Dargestellt sind die im Verpackungsplasmid $\Delta 8.91$ enthaltenen Gene gag, pol und rev. Gag codiert für Proteine des viralen Kapsides, pol für Enzyme wie die Reverse Transkriptase, die virale Integrase und eine RNase H. Das Genprodukt von rev, der „regulator of expression of virion proteins“, koordiniert den Export von RNA aus dem Zellkern und unterstützt so die Expression der eingebrachten Gene. Die Expression dieser Gene erfolgt unter Kontrolle des am 3'-Ende lokalisierten Promotor/Enhancer-Komplex (IE) des Cytomegalo-Virus (CMV).

2.5.2 Expressionsplasmid pCMV-G

Das Expressionsplasmid pCMV-G codiert für das Hüllprotein des VSV-Virus. Die Expression des Hüllproteins wurde durch den starken IE-Promotor/Enhancer Komplexes des Cytomegalovirus reguliert. VSV-G hat die Funktion, den engen Tropismus des HI-Virus zu erweitern und die Infektion eines breiteren Spektrums möglicher Zielzellen zu erreichen. Am 3'-Ende der pCMV-G-Plasmids befindet sich das Polyadenylierungssignal des Simian Virus 40 (Sv40pA) [102].

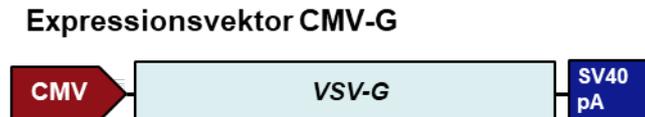


Abbildung 9 Schematische Darstellung der Struktur des Expressionsplasmids pCMV-G

Abb.9: Modulare Darstellung der Struktur des Expressionsplasmides pCMV-G. Dargestellt sind der IE-Promoter/Enhancer-Komplex des Cytomegalovirus, der die Expression des Hüllproteins kontrolliert, die Kodierregion für das Hüllprotein VSV-G und das Polyadenylierungssignal Sv40pA.

2.5.3 Transferplasmide

2.5.3.1 pFUWG-basierte Plasmide

Die zur Expression von Proteinen oder zur Integration von Reportergenen verwendeten Transferplasmide pFUW und pFW sind Varianten des pFUWG-Plasmids [72]. Im 5'-LTR der pFUWG-basierten Plasmide befindet sich ein „flap-element“ aus dem Genom von HIV-1, das über seine Beteiligung am Import des viralen Genoms in den Zellkern die Virustiter erhöht [144]. Die Plasmide enthalten zudem ein Verpackungssignal (Ψ), das durch das gag-Protein erkannt wird und die Verpackung der produzierten RNA in das VSV-Hüllprotein gewährleistet. Die Expression des Transfgens erfolgt unter Kontrolle eines humanen Ubiquitin-Promotors, der bei den pFW-Plasmiden entfernt wurde. Die pFW-Plasmide dienen der Analyse der Aktivität von Promotoren, die in diesen Vektoren die Transkription des Luziferasegens kontrollieren [34]. Die Transkriptionsrate des Luziferasegens ist damit abhängig von dem Aktivierungsgrad der transferierten Promotoren. Für eine erhöhte transkriptionale Aktivität sorgt das „wood-chuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element“ (WPRE) [72].

Im 3'-LTR der Transferplasmide befindet sich eine Δ U3-Deletion, die weitere Replikationszyklen der entstandenen Viren nach einer Infektionsrunde verhindert. Während der reversen Transkription wurde diese Deletion in das 5'-LTR transkribiert. Dadurch wurde das 5'-LTR transkriptionell inaktiv, so dass alleine der Ubiquitin-C-Promoter der pFUW-Plasmide oder der inserierte Promotor der pFW-Plasmide die Expression des Transfgens oder des Luziferasegens kontrollieren [116].

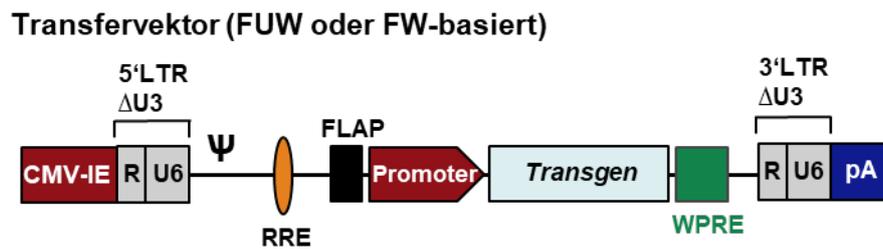


Abbildung 10 Schematische Darstellung der Struktur eines pFUW-basierten Transfervektors

Abb.10: Schematische Darstellung eines pFUW-basiererten Transfervektors. Die verschiedenen Transgene sind Tab.1 zu entnehmen. Dargestellt sind der humane Ubiquitin-Promoter, das Transgen, das „wood-chuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element“ (WPRE), die in den LTR enthaltenen $\Delta U3$ -Mutationen und das Verpackungssignal (Ψ). Abbildung modifiziert nach [102].

2.5.3.2 pLentiLox3.7-basierte Plasmide

Die Expression spezifischer „small-hairpin“ (sh)RNAs wurde ebenfalls mit rekombinanten Lentiviren durchgeführt.

Bei den shRNAs handelt es sich um kleine, regulatorische RNA-Moleküle, die sich durch ihre Haarnadelstruktur auszeichnen. Sie beteiligen sich über RNA-Interferenz am Abbau komplementärer mRNA-Moleküle (vgl. Abb. 12). Die Transfervektoren basieren auf dem pLL3.7-Plasmid [104]. Flankiert wurde das Plasmid von sogenannten self-inactivating (SIN) -LTRs, die verhindern, dass die LTRs des Plasmids die Transkription kontrollieren. So wird sichergestellt, dass nur die internen Promotoren Einfluss auf die transkriptionale Aktivität haben. Dieses Plasmid enthält einen U6-*small nuclear RNA*-Promotor der Maus, der die effiziente Transkription des folgenden, für spezifische shRNA codierenden DNA-Abschnitts ermöglicht. Daneben enthalten die Plasmide das EGFP-Gen unter Kontrolle des CMV-Promotors. Der U6-Promotor wurde direkt vor einer „Multiple Cloning Site“ (MCS) eingefügt, sodass hier DNA-Sequenzen eingefügt werden konnten, die für shRNAs kodierten (vgl. Abb. 10) [104].

Nach erfolgreichem lentiviralem Transfer dieses Expressionssystems in die Zielzellen, konnten so shRNA synthetisiert werden, die es ermöglichten, über die resultierende RNA-Interferenz „Loss of Function“-Phänotypen zu generieren [13].

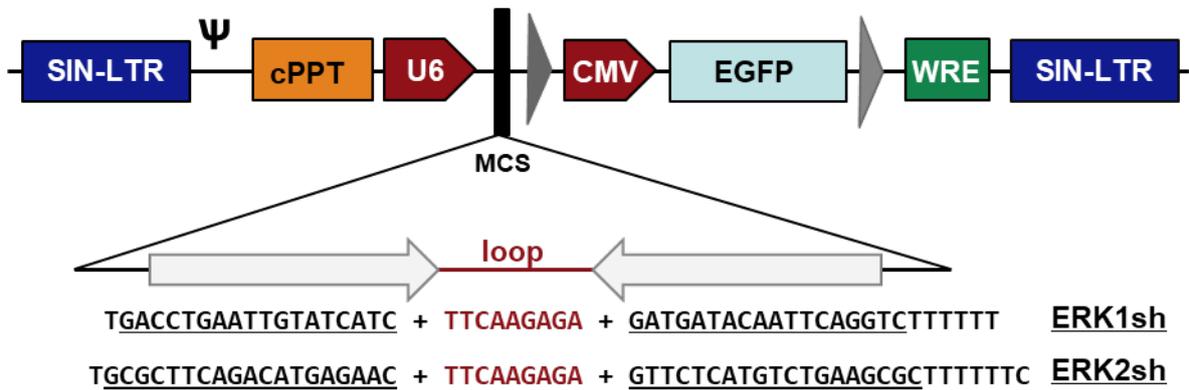


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Struktur des pLL-Erk1/2- Plasmids

Abb.11: Schematische Darstellung der Struktur des pLL.Erk1/2 Plasmids. Gezeigt ist der U6-Promotor der Maus, der die effiziente Expression der shRNA ermöglicht. Zusätzlich sind die am Multiple Cloning Site (MCS) eingefügten Sequenzen für gegen ERK1/2 kodierende mRNA gerichtete shRNA angegeben. Flankiert wird das Plasmid von sogenannten self-inactivating (SIN) -LTRs. Die pLL Plasmide kodieren neben einer shRNA, deren Expression durch den U6-Promotor der Maus kontrolliert wird, auch für EGFP. Das EGFP-Gen steht dabei unter Kontrolle des CMV-Promoters. Abbildung modifiziert nach [104].

2.5.4 Lentivirale Transfervektoren

In der Tabelle 1 sind einzelnen lentiviralen Transfervektoren aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 1 Auflistung der verwendeten Transferplasmide und ihrer Funktion

Plasmid	Funktion
pFUW-βGAL	Kodiert für β-Galactosidase, unter der Kontrolle des CMV Promoter/Enhancers. Dient als Kontrollvektor [65]. Der lentivirale Transfervektor HIV-7/β-gal war ein freundliches Geschenk von Jiing-Kuan Yee, Department of Virology, Beckman Research Institute, City of Hope, California, USA (Kowolik, Yee 2002). [65]
Plasmid	Funktion

pFUW-MEKK1Δ	Das Plasmid kodiert für MEKK1Δ, eine gekürzte Form der MAP3-Kinase MEK-Kinase 1 (mitogen-activated extracellular-signal-regulated kinase kinase kinase 1, MEKK1)[111].
pFUW-MKK6E	Das Plasmid kodiert für MKK6E eine konstitutiv aktive Mutante der MAPKK MKK6. [96,111]
pFUW-p38AF	Das Plasmid kodiert für p38AF, eine dominant negative Mutante der p38 Protein-Kinase. [27]
pFUW-JIP-1Δ	Das Plasmid kodiert für JIP1Δ, eine gekürzte Form von JIP-1 (mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1) [27]
pFUW-FLAG-SEK-AL	Das Plasmid kodiert für SEK-AL, eine dominant negative Mutante der Proteinkinase SEK-1. SEK-1 ist ein direkter Aktivator von JNK. [83]
pLL-3.7	Lentiviraler Transfervektor zur Expression einer shRNA unter Kontrolle des U6-Promotors [104].
pLL-Erk1	Lentiviraler Transfervektor zur Expression einer ERK1-spezifischen shRNA [55,69].
pLL-Erk2	Lentiviraler Transfervektor zur Expression einer ERK2-spezifischen shRNA [55,69].

2.5.5 Lentivirale Reporterplasmide

Die pFW-Plasmide leiten sich von den pFUWG-Plasmid ab [72]. Der zu analysierende Promotor ersetzte den Ubiquitin-Promotor, die Kodierregion für die Luziferase war an Stelle der Kodierregion für EGFP enthalten [100]. Die Messung der Luziferaseaktivität wurde zur Bestimmung der Promotoraktivität herangezogen.

Tabelle 2 Liste verwendeter Reporterplasmide und ihrer Funktion

Plasmid	Funktion
pFW-mc.fos.luc	Expression des Luziferasegens unter der Kontrolle des c-Fos-Promotors der Maus [103] -350 GCGAGCTGTT TCCCGTCAATC CCTCCCTCCTTTACA- CAGGATGT CCATATTAGGACATCTGCGTCAGCAGGT -290
pFW-mc.fos.luc Δ SIE	Expression des Luziferasegens unter der Kontrolle des murinen c-Fos-Promotors, in dem das <i>sis-inducable element</i> (SIE) mutiert wurde, so dass STAT-Transkriptionsfaktoren nicht mehr binden können. [103]
pFW-mc.fos.luc Δ Ets	Expression des Luziferasegens unter der Kontrolle des c-Fos-Promotors der Maus, in dem die Bindestelle für TCF durch Basenaustauschmutationen nicht funktionsfähig ist.[103]
pFW-mc.fos.luc Δ CrAG	Expression des Luziferasegens unter der Kontrolle des murinen c-Fos-Promotors. Die SRF-Bindungsstelle wurde mutiert und damit inaktiviert [103]
pFW-mc.fos.luc Δ AP-1	Expression des Luziferasegens unter der Kontrolle des c-fos-Promotors der Maus mit einer inaktivierten Bindestelle für AP-1 [103]
PFW-coll.luc	Expression des Luziferasegens unter Kontrolle des Promotors des menschlichen Collagenase-Promotors. Das Reportergen diente der Messung der AP-I-Aktivität [100]
PFW-Egr1.SRE.1.luc	Expression des Luziferasegens unter Kontrolle der Sequenz des humanen Egr.1-Promotors (-118 bis -68). [100] Das Egr.1.SRE.luc-Gen wiederum wurde zur Untersuchung der durch das SRE (<i>serum responsive element</i>) vermittelten Transkription genutzt.

2.6 RNA-Interferenz durch lentiviral exprimierte shRNAs

RNA-Interferenz ist ein evolutionär durch eine Vielzahl von Spezies konservierter Prozess des Gen-Silencings, der posttranskriptional stattfindet und durch kleine, regulatorische RNA-Moleküle vermittelt wird. Indem man ebensolche regulatorischen RNA-Moleküle in die Zelle einbringt, kann man sich die RNA-Interferenz zur Untersuchung der Gen-Funktion zu Nutze machen. Dabei lassen sich die Auswirkungen eines Funktionsverlustes bestimmter Proteine untersuchen, ohne dass auf kostspielige und aufwändige Versuche mit knockout-Mäusen zurückgegriffen werden muss. Durch die Nutzung von lentiviralen Vektoren, die zur Expression von *small-hairpin*-(sh)-RNA dienen, lassen sich so knock-down-Phänotypen generieren [7,14].

Nach der lentiviralen Infektion kommt es zur Integration der genetischen Information in das Chromatin der Zelle. Die Transkription der shRNA erfolgt unter Kontrolle des U6-*small nuclear RNA*-Promotors der Maus. Der Promotor rekrutiert eine RNA-Polymerase III und es kommt zur Transkription der shRNA-kodierenden Transkriptionseinheit [104,112]. Die shRNA-Moleküle konfigurieren sich mittels komplementärer Basenpaarung unter Aussparung der loop-Struktur (vgl Abb. 12) in der charakteristischen Haarnadel-Konfiguration. Bei shRNA handelt es sich um synthetische *micro*-(mi)RNA, deren loop-Struktur von der Endonuklease Dicer erkannt wird. Durch Dicer werden die shRNA-Moleküle geschnitten und so zu funktionalen *small-interfering*-(si)RNA-Molekülen prozessiert [47]. siRNA sind 21-25 BP lange, doppelsträngige RNA-Moleküle mit 2n 3'-Überhang und 5'-Phosphatterminus [142]. In Anwesenheit der siRNA formiert sich der *RNA-induced-silencing complex* (RISC) [51]. Nach ATP-abhängiger Aktivierung des RISC kommt es über die Helikase-Funktion des RISC zur Prozessierung der siRNA zum einsträngigen RNA-Molekül [52]. Die im RNA-Protein-Effektor-Nuklease-Komplex enthaltene siRNA dient der Erkennung der zu degradierenden mRNA, daneben weisen die Proteindomänen mehrere enzymatische Aktivitäten auf. Der Degradierung des Substrates dient die Endonuklease-Aktivität des RISC, die die durch die siRNA erkannte mRNA in der homologen Region schneidet [52]. So wird die Translation der Ziel-mRNA verhindert.

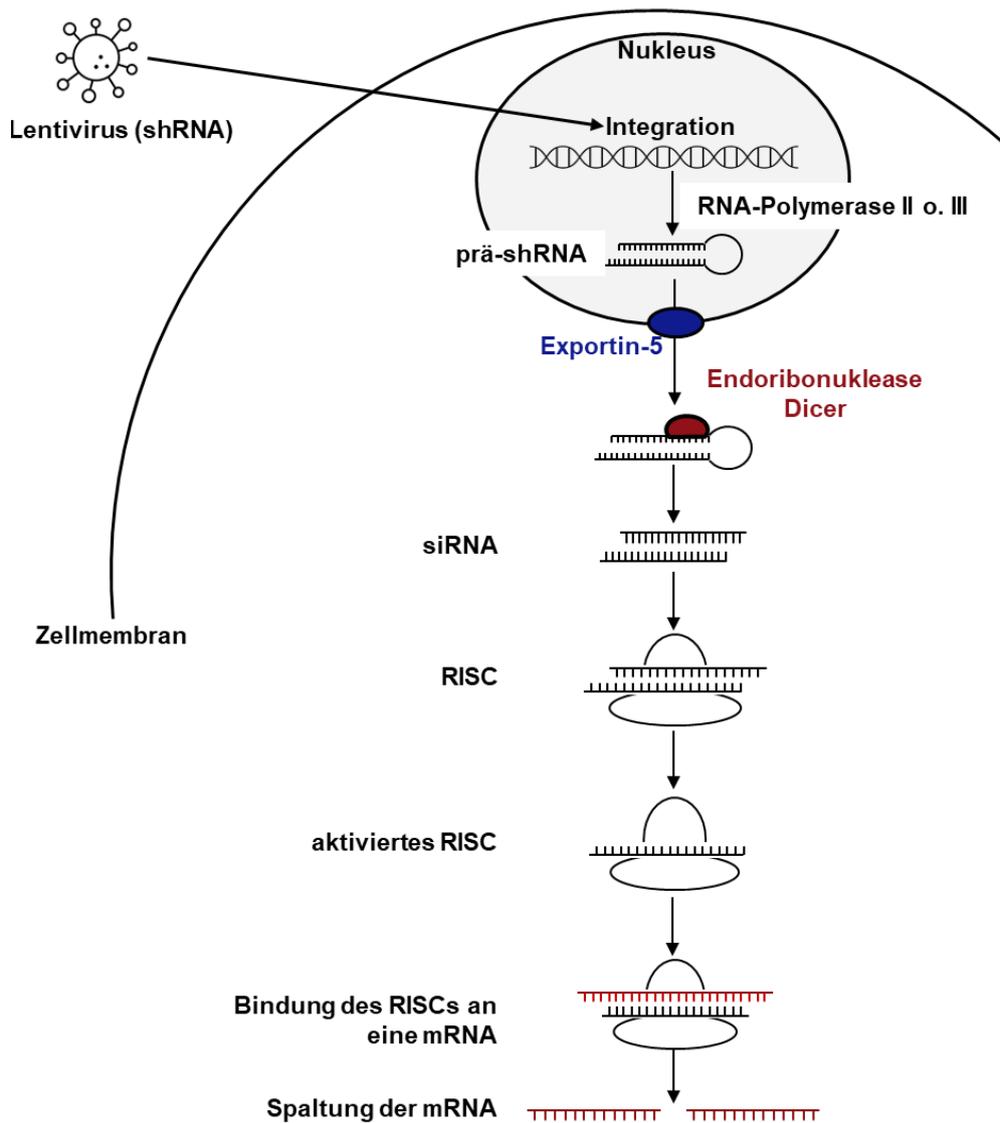


Abbildung 12 Prozessierung und Funktionsweise lentiviral eingebrachter shRNA

Abb. 12: RNA-Interferenz durch shRNA. Dargestellt ist die lentivirale Infektion der Zelle. Der Vektor bringt ein für eine shRNA codierendes Expressionssystem ein. Es kommt zur Transkription des entsprechenden DNA-Abschnitts. Die entstandenen shRNA wird durch Dicer prozessiert, dabei entsteht ein kleines, doppelsträngiges RNA-Molekül, eine funktionsfähige siRNA. In Anwesenheit der der entstandenen siRNA kommt es zur Bildung des RNA-induced-silencing Complex (RISC), der nach seiner Aktivierung die siRNA in einsträngiger Konfiguration enthält. Die siRNA erkennt eine komplementäre mRNA, die dann durch die enzymatisch aktiven Proteindomänen des RISC geschnitten und damit biologisch inaktiviert werden. So wird die Translation verhindert, was dem silencing des Ursprungsgen der mRNA gleichkommt. Abbildung mit freundlicher Genehmigung entnommen und modifiziert aus: Dissertation Helen Eriksson, Universität des Saarlandes (2022).

2.7 Zelllinien

2.7.1 HEK293-TN

HEK293-TN-Zellen sind menschliche embryonale Nierenzellen, die eine Mutante des Simian Virus 40 large T Antigen exprimieren. Diese genetische Modifikation ermöglicht eine verstärkte Replikation transfizierter Plasmide, die SV40 Replikationsstartsignale tragen [90]. Die Zellen wurden zur Transfektion und Virusproduktion verwendet.

2.7.2 HEK293-T/17

HEK293-T/17-Zellen sind HEK293 Zellen, die für besonders hohe Titer des SV40 large T Antigens und besonders gute Transfektabilität selektiert wurden. Sie wurden freundlicherweise von D. Baltimore, Rockefeller University, New York, USA zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden mit den generierten Lentiviren infiziert und integrierten die genetische Information des Virus in ihr Chromatin.

2.7.3 HEK293-ΔB-RAF:ER

HEK293-ΔB-RAF:ER-Zellen sind HEK293 Zellen, die konstitutiv ein Fusionsprotein aus der katalytischen CR3 Domäne der MAP3-Kinase B-Raf und der regulatorischen Domäne des Östrogenrezeptors exprimieren [2]. Steroidrezeptoren liegen im unstimulierten Zustand intrazellulär im Komplex mit Hitzeschockproteinen wie dem HSP90 vor [92]. Diese Bindung der Hitzeschockproteine verhindert im Falle des ΔB-Raf:ER Fusionsproteins die katalytische Aktivität der CR3 Domäne [99]. Die Verwendung eines veränderten Östrogenrezeptors (ER^{Tamoxifen Mutant}) erlaubt die Stimulation durch Tamoxifen und den Metaboliten 4-Hydroxytamoxifen (4OHT) [99]. Die Bindung von 4OHT bewirkt die Abdissoziation des HSP90 und führt so zur katalytischen Aktivierung des Fusionsproteins (vgl. Abb. 13) [92]. Raf ist Teil des ERK-Signalwegs.

2.8 Zellkultur

Die Zellen wurden unter Standardbedingungen von 37° C und 5% CO₂ in einem Inkubator in wasserdampfgesättigter Umgebung in 175cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Arbeiten an der Zellkultur erfolgten an der Sterilwerkbank.

Die Zellen wurden 3 mal wöchentlich umgesetzt. Dazu wurden die Zellen mit 2ml 1xPBS gewaschen und dann für 2 min mit 1x Trypsin/EDTA behandelt, um sie vom Boden der Zellkulturflaschen zu lösen. Die gelösten Zellen wurden mit DMEM+10%FCS resuspendiert und im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Wenn nach dem Passagieren Zellen für Transfektionen ausgesät oder zur Infektion verwendet wurden, erfolgte das Auszählen der gewünschten Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer.

2.9 Lentiviraler Gentransfer

2.9.1 Transfektion

Am Tag vor der Transfektion wurden $1,6 \cdot 10^6$ HEK293TN-Zellen in 60mm Zellkulturschalen ausgesät und bis zur Transfektion in 4ml DMEM+10%FCS inkubiert. Die Calciumphosphat-Transfektion erfolgte am folgenden Tag nach dem Wechsel des Mediums auf serumfreies DMEM, welches zur Verbesserung der Aufnahme der Calciumphosphat-Präzipitate in die Zellen mit 25µM Chloroquin versetzt wurde [12,90].

Um die Herstellung infektiöser Lentiviren zu ermöglichen, erfolgte eine parallele Transfektion mit 3 verschiedenen Plasmiden. Dazu wurde in einem PE-Rundbodengefäß ein Ansatz mit 5,5µg Verpackungsplasmid (Δ 8.91), 2,3µg Expressionsplasmid pCMV-G und 6,6µg des lentiviralen Transfervektors in 250µg H₂O_{MILLI} pro Zellkulturschale erstellt. Die Plasmidkonzentrationen wurden dazu photometrisch bei 260nm bestimmt. In einem zweiten Rundbodengefäß wurden pro Zellkulturschale 275µl 2xHBSS (pH 7,08) vorbereitet. Im nächsten Schritt wurde 27,5µl CaCl₂-Lösung (2,5M) pro Zellkulturschale zu dem Ansatz mit den Plasmiden gegeben. Mit einer Pasteurpipette wurde dieser Ansatz durchmischt, während mit einer zweiten Pasteurpipette simultan die HBSS-Lösung aufgesprudelt wurde. Dadurch wurde, beim folgenden, langsamen Hinzugeben der Plasmidlösung, eine ausreichende Durchmischung gewährleistet. Nach Zugabe der Plasmidlösung zum HBSS wurde mit beiden Pasteurpipetten für 10 Sekunden weiter gemischt. Jeweils 550µl des entstandenen Präzipitats wurden auf die Zellkulturplatten gegeben und die Zellen daraufhin für 12-14h inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt (Zellkulturmedium DMEM + 10% FCS + 2mM HEPES + 1 mM Na-Pyruvat + MEM NEAA, Endkonzentration der enthaltenen Aminosäuren je 0,1 mM). Nach dem Mediumwechsel wurden die Zellen für 48-72h inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Virusproduktion durch die HEK293-TN-Zellen.

2.9.2 Infektion

Während der Inkubationszeit wurden die gebildeten Viruspartikel von den Zellen in das Zellkulturmedium abgegeben [12,113]. Der Virusüberstand wurde mit Einmalspritzen abgenommen und durch einen 45µm Spritzenfilter filtriert, um eine Verschleppung virusproduzierender Zellen zu verhindern. Aus den abgenommenen Virusüberständen wurden je nach Versuchsplanung Viruslösungen hergestellt (vgl. Tabelle 3) und mit Polybren in einer Endkonzentration von 8 µg/ml versetzt. Die Zugabe von Polybren diente der Verbesserung der Virusinfektion der Zellen.

Die Herstellung der Viruslösungen erfolgte nach festen Verhältnissen in DMEM+10%FCS.

2.9.3 Viruslösungen

Tabelle 3 zeigt die Volumenverhältnisse der jeweils eingesetzten Virusüberstände bei der Herstellung der Viruslösungen.

Tabelle 3 Verdünnung der Viruslösungen

Transfergen	Verdünnung
Reportergen (pFWXX)	1:5
Kinasen (MKK6E, MEKK1Δ)	4:10
JIP /SEK-A1 /p38AF	4:10
shRNA (pLLXX)	3:1

Aus den Virusüberständen wurden in den angegebenen Verhältnissen Viruslösungen hergestellt. Dabei wurden für vier 35mm Zellkulturplatten jeweils 10 ml Viruslösung hergestellt. Dabei wurden 2ml der Lösung des Reportergen-tragenden Virus eingesetzt. Abhängig von der Versuchsplanung wurden für

Regulation der Transkription des c-Fos-Gens durch Stimulus-responsive Proteinkinasen

10ml Viruslösung zudem 4ml der Lösung des Kinase-kodierenden Vektors eingesetzt. Falls zur Durchführung des jeweiligen Experiments noch weitere Kinasen oder Kinase-assoziierte Proteine exprimiert werden sollten, wurden zusätzlich noch 4 ml der Lösungen der für JIP, SEK-AL oder p38AF kodierenden Viren zugegeben. Viruslösungen, die shRNA kodierende Viren enthielten wurden im Überschuss verwendet. Das entstandene Lösungsvolumen wurde mit DMEM mit 10%FCS auf 10ml pro vier 35mm Zellkulturschalen aufgefüllt.

Jeweils 2 ml der Viruslösungen wurden mit 250 000 Zellen, je nach geplantem Experiment HEK293-T17 oder HEK293- Δ BRAF:ER, auf 35mm Zellkulturschalen aufgebracht. Durch Zugabe der fertigen Viruslösungen erfolgte die Infektion der Zellen durch die Viren. Die Zellen wurden für 24 Stunden in den Viruslösungen inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Viruslösungen abgenommen, die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 2ml DMEM+10%FCS für weitere 24 Stunden kultiviert.

2.9.4 Serumreduktion

Am Folgetag erfolgte ein erneuter Mediumwechsel mit 2ml DMEM+0,05% pro Zellkulturschale. Durch diese Reduktion des Anteils an bovinem fötalen Serum wurde die Stimulation der Reportergene durch im FCS enthaltene Wachstumsfaktoren vermieden. Die Zellen wurden weitere 24 Stunden inkubiert.

2.9.5 Stimulation

Die HEK293- Δ B-Raf:ER-Zellen wurden am Tag nach der Serumreduktion mit 200nM 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) in serumreduziertem DMEM (0,05% FCS) stimuliert.

2.9.6 Zellernte

24 bis 48 Stunden nach der Serumreduktion wurden die Zellen 2-mal mit gekühltem (4°C) 1xPBS gewaschen, in 1ml gekühltem PBS mit einem Zellschaber geerntet und in 1,5ml Eppendorfgefäße überführt. Es folgten die Zentrifugation bei 13000rpm für 3 min und das Absaugen des Überstandes an PBS von den entstandenen Zellpellets. Die Zellpellets wurden entweder bei -20° gelagert oder direkt lysiert und analysiert.

2.9.7 Zellyse

Der mechanische und chemische Aufschluss der Zellen erfolgte in 1xRLBB (Reporter Lyse Puffer, Promega Mannheim, Cat. #E4030). Die Arbeiten mit den geernteten Zellen erfolgten auf Eis.

2.10 Reporteranalyse

Das verwendete Reportergen, das Luziferasegen, steht unter der Kontrolle verschiedener Promotoren. Durch Stimulation aktivierte Transkriptionsfaktoren binden an regulatorischen DNA-Sequenzen und führen zur verstärkten Expression des Luziferasegens. Dies ermöglicht über die Analyse der Luziferaseaktivität eine Quantifizierung der Promotoraktivierung.

So konnten Rückschlüsse auf die Aktivierung vorgeschalteter Signaltransduktionswege gezogen werden, die durch das Einbringen weiterer Transgene modifiziert wurden. Dadurch wurde die Untersuchung der Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren in An- und Abwesenheit bestimmter regulatorischer Proteine ermöglicht. Durch den Einsatz von mutierten, an Transkriptionsfaktor-Bindestellen deletierten Promotorsequenzen konnte die Bedeutung verschiedener Transkriptionsfaktoren an der Promotoraktivierung untersucht werden.

2.10.1 Luziferaseassay

In eine 96 Lochplatte (weiß) wurden zunächst 5 µl des Zelllysates in 1xRBS aufgetragen. In jedes Loch wurden 50 µl des Luziferase Assay Reagenz zugegeben. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte im Luminometer.

2.10.2 Proteinbestimmung mit dem Bicinchoninsäure (BCA) Assay

Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Luciferasewerten zu schaffen, wurden die gemessenen Luciferasewerte auf die Konzentration des Gesamtproteins in der jeweiligen Probe bezogen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde ein Bicinchoninsäure (BCA) Assay durchgeführt.

Dazu wurden je 12,5 µl des Zelllysates in eine weitere 96 Lochplatte (transparent) aufgetragen. Als Standardreihe wurde BSA mit den bekannten Proteinkonzentrationen von 0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 µg/ml aufgetragen. Anhand der gemessenen Absorptionen der Standardreihe wurde eine Eichgerade erstellt, die die Berechnung der Proteinkonzentrationen aus den gemessenen Werten ermöglichte. Zu jeder Probe wurden 100 µl BCA-Lösung, bestehend aus Lösung-A und -B im Verhältnis 1:50 gegeben. Die Proben wurden daraufhin für 30 min bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit konnte die zur späteren Absorptionmessung benötigte Farbreaktion stattfinden.

Die Proteinbestimmung erfolgt nach folgendem Prinzip: die in der BCA-Lösung enthaltenen Cu^{2+} -Ionen, werden in Reaktion mit Peptidbindungen zu Cu^{1+} reduziert, damit ist die Konzentration an Cu^{1+} proportional zur Proteinkonzentration der Probe. Cu^{1+} -Ionen bilden mit jeweils 2 Bicinchoninsäuremolekülen Komplexe, die als violetter Farbumschlag sichtbar werden. Somit ist der Grad des Farbumschlags proportional zum Proteingehalt. Die photometrische Messung bei 562 nm ermöglicht so die Bestimmung des Proteingehalts.

2.10.3 Bestimmung der relativen Luziferase-Aktivität

Zur Bestimmung der relativen Luziferase-Aktivität wurde der Quotient aus den Werten der Luziferaseaktivität und der Proteinbestimmung gebildet.

2.11 Statistik

Jeder Versuch wurde mindestens dreimal wiederholt. Es wurden jeweils 4 getrennte kultivierte Ansätze jedes Versuchs ausgewertet.

Die Durchführung der statistischen Analysen erfolgte mit dem Microsoft Excel Add-In WinSTAT (R. Fitch Software). Um normalverteilte Daten auf Irrtumswahrscheinlichkeit (p) zu testen, wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben angewandt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde in Abbildungen folgendermaßen angegeben: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), n.s. (nicht signifikant).

Regulation der Transkription des c-Fos-Gens durch Stimulus-responsive Proteinkinasen

3 Ergebnisse

3.1 Aktivierung der Proteinkinase ERK1/2 durch die Expression einer induzierbaren Mutante der Proteinkinase B-Raf

B-Raf ist eine MAP3-Kinase, die nach Aktivierung die MAP2-Kinase MEK phosphoryliert [88]. Um eine steuerbare Aktivierung von ERK1/2 zu gewährleisten wurde eine stimulierbare Mutante von B-Raf konstitutiv exprimiert. Bei der Mutante Δ B-Raf:ER handelt es sich um ein Fusionsprotein, bei dem die regulatorischen Domänen der Proteinkinase B-Raf deletiert sind. Stattdessen ist die katalytische Domäne des Proteins an die Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors gekoppelt. Im unstimulierten Zustand bindet das Hitzeschockprotein Hsp90 an die Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors und blockiert dadurch die katalytische Domäne von B-Raf. Die Nutzung von der Östrogenrezeptormutante ER^{Tamoxifen Mutant} ermöglichte es, durch Stimulation der Zellen mit 4-Hydroxytamoxifen eine Aktivierung der Kinaseaktivität von Δ B-Raf:ER zu erreichen [115,117]. Raf-Proteinkinasen haben ein schmales Substratspektrum, wobei die MAP2-Kinase MEK das beste Substrat darstellt [88,129]. Dies wurde durch eine „Microarray“-Analyse bestätigt, die zeigte, dass transkriptionale Aktivierung durch Raf fast vollständig von der Aktivierung von MEK abhängt [106]. MEK wiederum aktiviert die MAPK ERK1/2. Nach diesen Erkenntnissen werden die Funktionen der Raf-Proteinkinasen größtenteils durch die subsequente Aktivierung von MEK und ERK1/2 vermittelt.

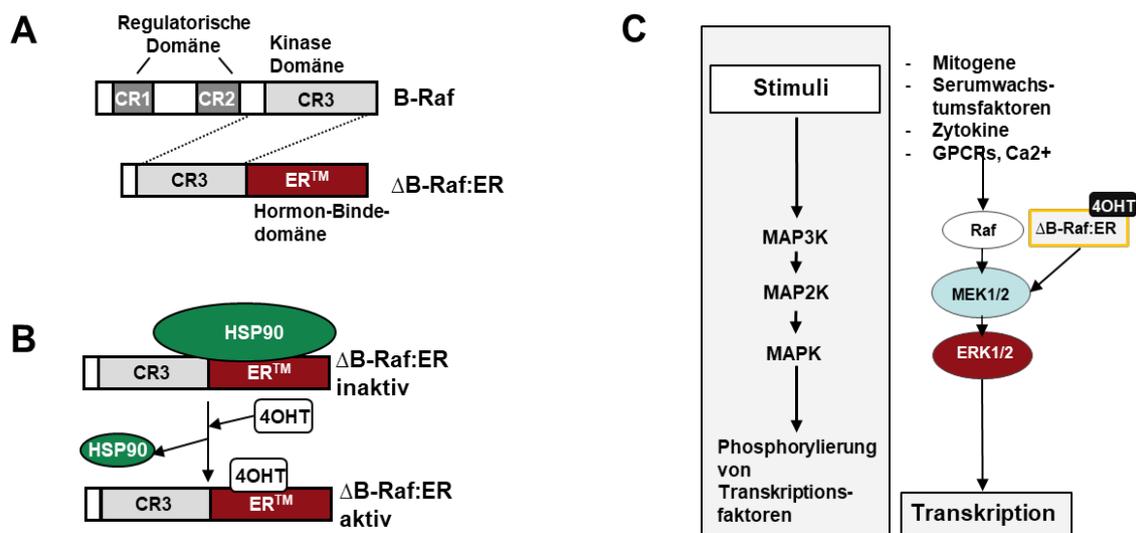


Abbildung 13 Struktur und Stimulation des Δ B-Raf:ER-Fusionsproteins

Abb. 13: Struktur und Funktionsweise des B-Raf-Fusionsproteins ΔB -Raf:ER. **(A)** Schematische Darstellung der Struktur der Proteinkinase B-Raf und der stimulus-responsiven Mutante ΔB -Raf:ER. ΔB -Raf:ER ist ein Fusionsprotein bestehend aus der katalytischen CR3-Domäne von B-Raf und der Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors (ER). **(B)** Aktivierung von ΔB -Raf:ER durch Stimulation mit 4-Hydroxytamoxifen. Abbildungen modifiziert nach [115] **(C)** Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 unter dem Einfluss von aktiviertem ΔB -Raf:ER. Dargestellt ist der Signalweg, der unter natürlichen Bedingungen zur Aktivierung von ERK1/2 führt. Rechteckig dargestellt ist aktiviertes ΔB -Raf:ER mit gebundenem 4-Hydroxytamoxifen (4OHT). Die Pfeile symbolisieren die Aktivierungswege, grau hinterlegt ist ein modellhafter MAP-Kinase Signalweg, der die Funktion der Signalproteine in der Signalkaskade verdeutlicht.

3.2 Die Aktivierung von B-Raf erhöht die Aktivität von AP-1 und SRF in HEK293- ΔB -Raf:ER-Zellen

Um die Spezifität der Aktivierung von B-Raf:ER zu zeigen, wurden mit Hilfe rekombinanter Lentiviren zwei verschiedene Reportergene in das Chromatin der Zellen integriert. Der beschriebene lentivirale Gentransfer ermöglichte die Integration der Reportergene in das Chromatin der Zellen. Das Reportergen coll.luc (vgl Abb.14A) diente der Detektion AP-1 Aktivität (Rössler et al., 2008). Das Egr.1.SRE.luc-Gen wiederum wurde zur Untersuchung der durch das SRE (*serum responsive element*) vermittelten Transkription genutzt [101]. Die Stimulation der B-Raf-Kinase-Mutante mit 250mM 4-Hydroxytamoxifen ergab eine 8,4 - fache Steigerung der AP-1 Aktivität (vgl Abb.14B). Dieses Ergebnis zeigte sich als signifikant auf dem ***-Niveau. Die SRE-abhängige Transkription wurde unter den gleichen Bedingungen etwa 2,5 fach erhöht (vgl Abb.15B).

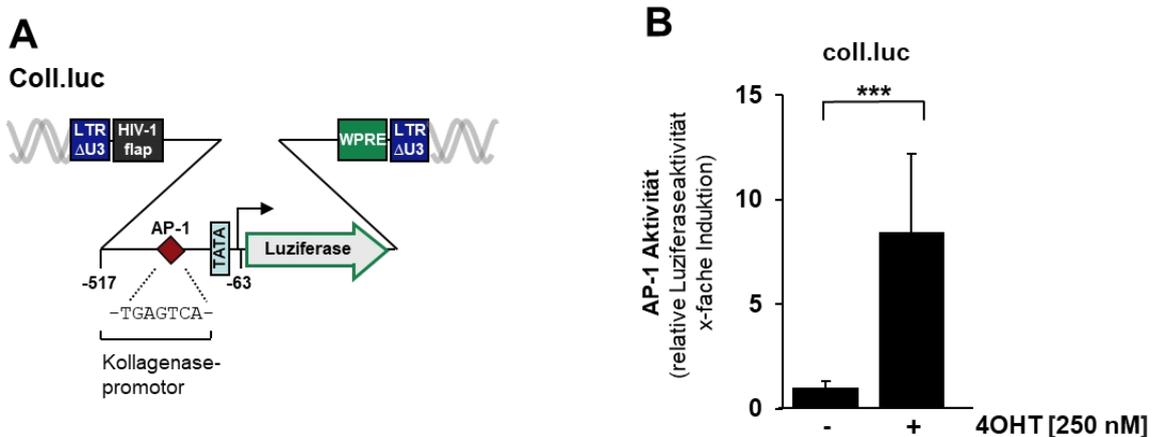


Abbildung 14 Die Aktivierung von ΔB -Raf:ER erhöht die AP-1-Aktivität in HEK293- ΔB -Raf:ER-Zellen

Abb. 14: Einfluss der Aktivierung von $\Delta B:Raf:ER$ auf die AP-1-Aktivität (A) Schematische Darstellung der Struktur eines Provirus, der ein Collagenase-Promotor/Luciferase-Reporter gen enthält. Collagenase-Promotor enthält eine Bindestelle für AP-1. Zusätzlich sind das woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE) und das HIV flap element abgebildet. Abbildung modifiziert nach [100] **(B)** HEK293- $\Delta B:Raf:ER$ Zellen wurden mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der das Coll.luc-Reporter gen enthält. Die Zellen wurden nach der Infektion für 24 Stunden in serumreduziertem Medium (0,05% FCS) kultiviert. Nach der Lyse der Zellen wurden Luciferaseaktivität und Proteinkonzentration gemessen und die relative Luciferaseaktivität wurde bestimmt. Dargestellt werden Ergebnisse \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten aus jeweils vier Ansätzen ($***P < 0,01$).

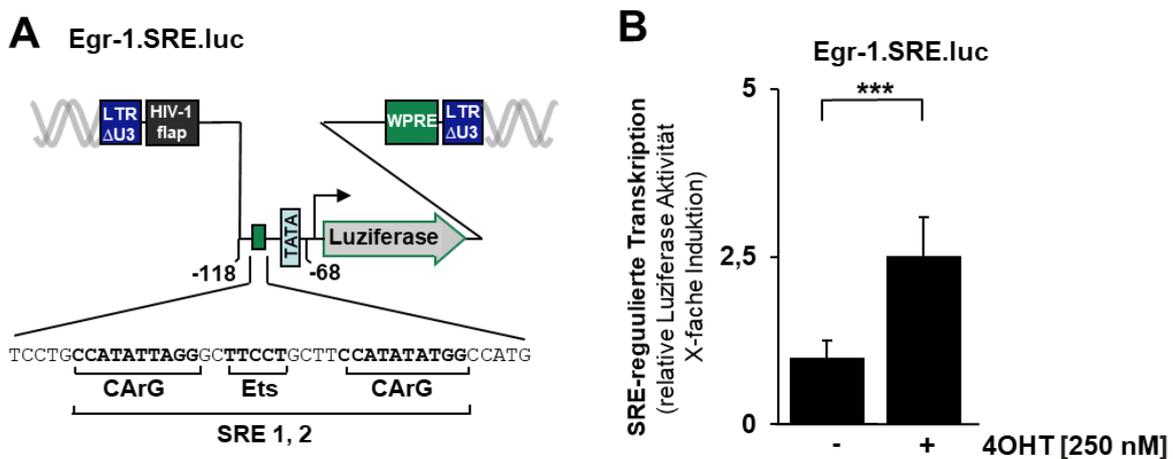


Abbildung 15 Die Aktivierung von $\Delta B:Raf:ER$ bewirkt eine Steigerung der SRE-abhängigen Transkription

Abb. 15: Aktivierung der SRE-abhängigen Transkription durch $\Delta B:Raf:ER$ (A) Schematische Darstellung eines Provirus, der das Reporter gen Egr1.SRE.luc enthält. Gezeigt ist die Sequenz des SRE mit einer Bindestelle für Ets-Transkriptionsfaktoren und zwei CArG-Elementen, die den Transkriptionsfaktor SRF binden. Egr1.SRE.luc diente der Messung der SRE-abhängigen Transkription. Abbildung modifiziert nach [100] **(B)** SRE-abhängige Transkriptionssteigerung unter Aktivierung von $\Delta B:Raf:ER$. Die Zellen wurden vor der Stimulation mit 250mM 4OHT für 24 Stunden in serumreduziertem Medium kultiviert. Die Zellen wurden lysiert und aus den Zellextrakten wurden Luciferaseaktivität und Proteinkonzentration gemessen. Die relative Luciferaseaktivität wurde bestimmt. Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils vier getrennt kultivierten Ansätzen wurden \pm SD dargestellt ($***P < 0,001$).

Nun war nachzuweisen, dass die gezeigte Steigerung der Aktivität der AP-1 - und SRE abhängigen Transkription spezifisch durch die Aktivierung von ERK1/2 verursacht worden war. Dazu wurden in Zellen, die das Coll.luc Reporter gen trugen, DNA-Sequenzen exprimiert, die für Erk1/2-mRNA spezifische shRNAs kodierte. Zur Expression der gewünschten shRNA wurden der lentivirale Transfervektor pLL3.7 (vgl Abb.11) genutzt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die durch Δ B-Raf:ER induzierte Steigerung der AP-1-Aktivität bei gleichzeitiger Expression von shRNA, die eine Degradierung von mRNA für Erk1/2 verursacht, signifikant reduziert wurde [69]. Die in Abb.16 dargestellten Daten zeigen nun zudem eine signifikante Reduktion der SRE-abhängigen Transkription in den Zellen, die ERK1- und ERK2 spezifische sh-RNAs exprimierten. Die durch Δ B-Raf:ER induzierte Steigerung der Transkription des Egr.1.SRE-Reporter gen war bei Expression der ERK1/2-spezifischen sh-RNAs um 57% geringer als in der Vergleichsprobe.

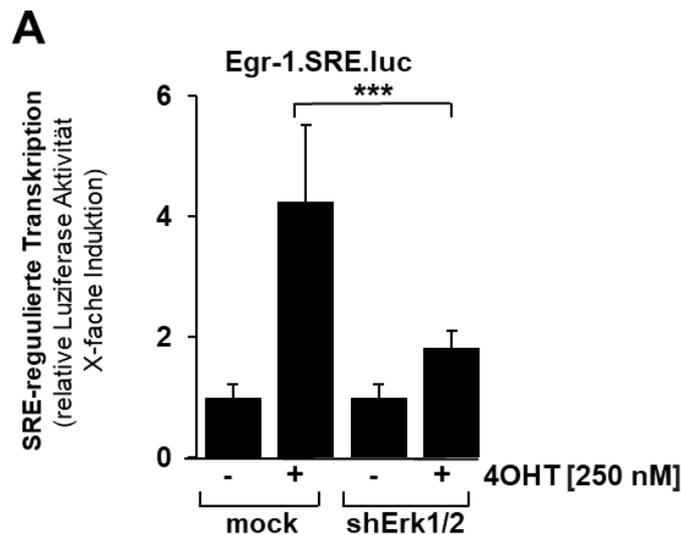


Abbildung 16 Expression von ERK1/2-spezifischen shRNAs hemmen die Δ B-Raf:ER-induzierte Aktivierung des Egr1.SRE.luc-Reporter gens

Abb. 16: HEK293- Δ B-Raf:ER-Zellen wurden mit einem Lentivirus infiziert, der für das Egr-1.SRE.luc-Reporter gen kodierte. Zusätzlich wurden die Zellen mit Lentiviren infiziert, die für ERK1- und Erk2-spezifische shRNA kodierte. Nach 24 stündiger Inkubation in serumreduziertem Medium (0,05% FCS) erfolgte die Stimulation mit 250mM 4OHT für weitere 24 Stunden. Die Zellen wurden aufgeschlossen und Luciferaseaktivität und Proteinkonzentration wurden bestimmt. Die Luciferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration bezogen. Ausgewertet wurden Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils vier getrennt kultivierten Ansätzen, das Ergebnis war auf dem ***-Niveau ($p < 0,001$) signifikant.

3.3 Die ERK1/2-induzierte Aktivierung des c-Fos-Promotors benötigt die DNA-Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren TCF, SRF und AP-1

Die Aktivierung von ERK1/2 führt zu verstärkter Transkription des c-Fos-Gens [120,132]. Um zu untersuchen, welche Elemente des c-Fos-Promotors in den Signaltransduktionsweg involviert sind, der die ERK1/2-Aktivierung mit der verstärkten Genexpression koppelt, wurde der Aktivierungsgrad der Transkription bei ERK1/2-Aktivierung unter Ausschaltung der DNA-Bindestellen verschiedener Transkriptionsfaktoren bestimmt. Es wurden Reporterplasmide in das Chromatin von HEK293- Δ B-RAF:ER-Zellen integriert, die das Luziferasegen unter Kontrolle des murinen c-Fos-Promotors exprimierten. Neben dem Wildtyp-Promotor wurden mutierte Formen des c-Fos-Promotors verwendet, die jeweils mehrere Punktmutationen in verschiedenen proximalen regulatorischen Elementen enthielten, wodurch die Bindung von Transkriptionsfaktoren an diese DNA-Elemente verhindert wurde. Die Abbildungen 17 A, C, E, G zeigen die Sequenz des proximalen c-Fos-Promotors mit den Sequenzen der Mutationen. Die Mutationen wurden am *c-sis-inducible element* (Δ SIE), der TCF DNA-Bindestelle (Δ Ets) sowie der Bindestellen für SRF (Δ CArG box) und AP-1 (Δ AP-1) eingebracht. Um Vergleichsproben zu generieren, wurde das Wildtyp-c-Fos-Reportergen neben jeweils einem der mutierten Reportergene in das Chromatin von HEK293- Δ B-Raf:ER-Zellen integriert. Die Zellen wurden nach der Infektion für 24 Stunden in serumreduziertem Medium kultiviert und danach mit 4OHT (250mM) stimuliert. Nach 24 stündiger Inkubation mit 250mM 4OHT wurde die relative Luziferaseaktivität wie beschrieben bestimmt. Die Aktivitäten unter Einsatz des Wildtyp c-Fos-Promotors wurden mit den Luziferaseaktivitäten bei Verwendung der Mutanten des Promotors verglichen.

Wie die graphische Darstellung der Ergebnisse in den Abbildungen 17 B, D, F, H zeigt, führten die Mutationen an den Bindestellen für TCF (Δ Ets), SRF (Δ CArG-box) und AP-1 (Δ AP-1) zu einer im Vergleich mit dem Wildtyp-Fos-Promotor signifikant geringeren Steigerung der Genexpression nach Stimulation des ERK1/2-Signalwegs. Die Transkriptionsrate zeigte sich für Δ Ets um etwa 70%, für Δ CArG um 80% reduziert. Die Ausschaltung der AP-1 Bindestelle führte zu einer Reduktion der Transkription um etwa 50%. Im Gegensatz dazu hatte die Mutation der STAT-DNA-Bindestelle (Δ SIE) keine Auswirkung auf die Aktivität des c-Fos-Promotors nach der Stimulation des ERK1/2-Signalwegs. Gegenüber der Aktivität des Wildtyp-c-Fos-Promotors zeigte sich keine signifikante Reduktion der Promotoraktivität.

Regulation der Transkription des c-Fos-Gens durch Stimulus-responsive Proteinkinasen

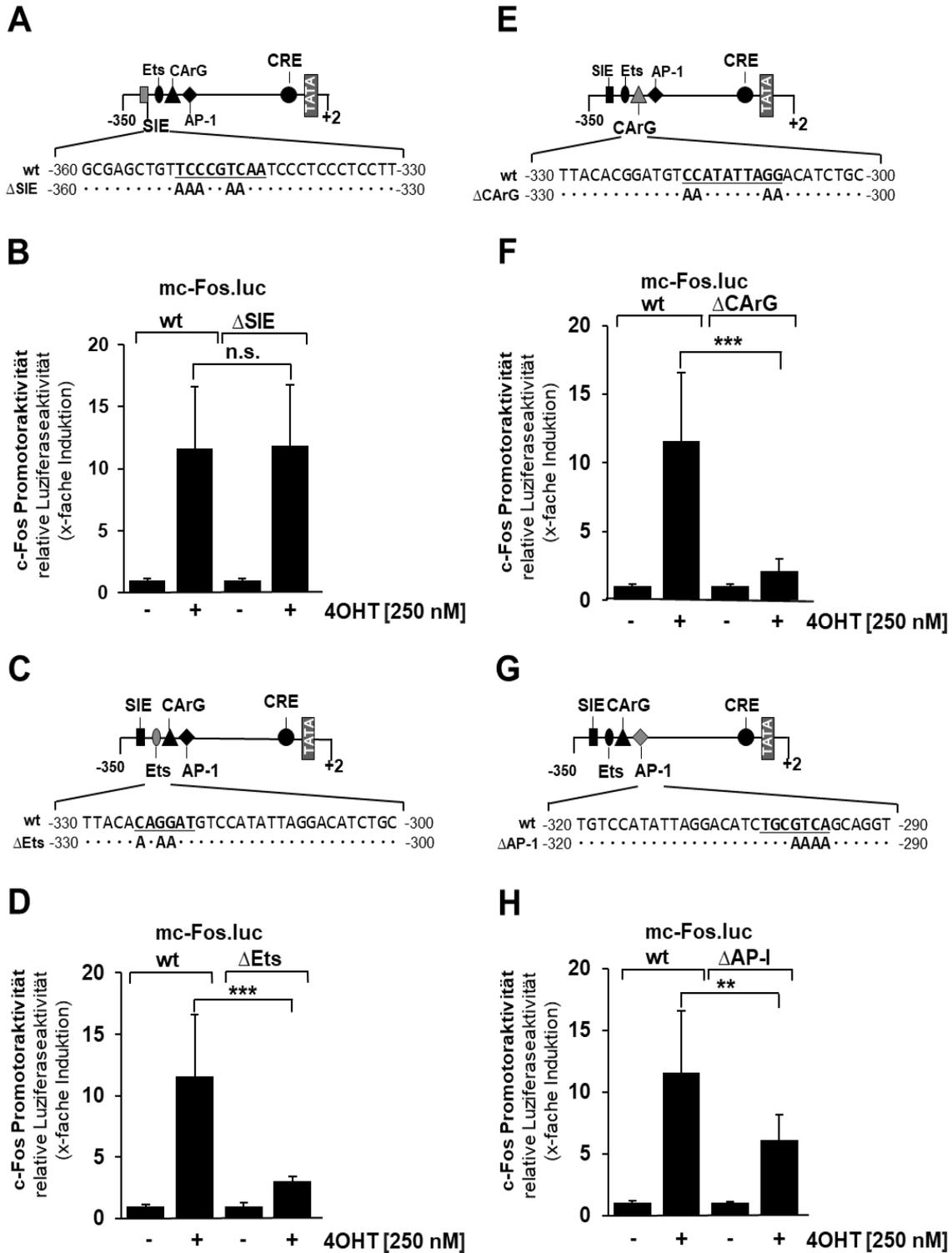


Abbildung 17 ERK1/2 abhängige Aktivierung des c-Fos-Promotors

Abb 17: ERK1/2 abhängige Aktivierung des c-Fos-Promotors. (A, C, E, G) Sequenz des c-Fos-Promotors. Die schematischen Darstellungen des proximalen c-Fos-Promotors zeigen die Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Stat (SIE), TCF (Ets), SRF und AP-1. Die dargestellten Punktmutationen dienen der Inaktivierung der jeweiligen Transkriptionsfaktor-Bindestellen. **(B, D, F, G)** HEK293 Δ B-Raf:ER-Zellen wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die ein Reporter gen unter Kontrolle des murinen c-Fos-Promotors enthielten (mc-Fos.luc). In davon getrennt kultivierten Ansätzen wurde die Aktivität von Reporter genen untersucht, die unter der Kontrolle eines mutierten c-Fos-Promotors standen. Mit Hilfe rekombinanter Lentiviren wurden die verschiedenen Reporter gene in das Chromatin von HEK293 Δ B-Raf:ER-Zellen integriert. Diese Reporter gene enthielten Promotoren, in deren Sequenz die Bindestellen für STAT (Δ SIE) **(B)**, TCF (Δ Ets) **(D)**, SRF (Δ CArG) **(F)** oder AP-1 (Δ AP-1) **(G)** inaktiviert worden waren. Nach der Infektion wurden die Zellen für 24 Stunden in serumreduziertem Medium kultiviert und danach für 24 Stunden mit 250mM 4OHT (250mM) in serumreduziertem Medium stimuliert. Dargestellt sind die Daten aus 3 unabhängigen Experimenten, die mit jeweils 4 getrennt kultivierten Ansätzen durchgeführt wurden +/- SD. Die auf die Proteinkonzentration bezogenen Durchschnittswerte der Luziferaseaktivitäten wurden mittels eines t-Testes für unabhängige Stichproben mit den Werten der Vergleichsproben, die den Wildtyp-Promotor enthielten, verglichen (** P 0.001; ** P 0.01; n.s., not significant).

3.4 Aktivierung der MAPK JNK durch Expression der MEKK1-Mutante MEKK1 Δ

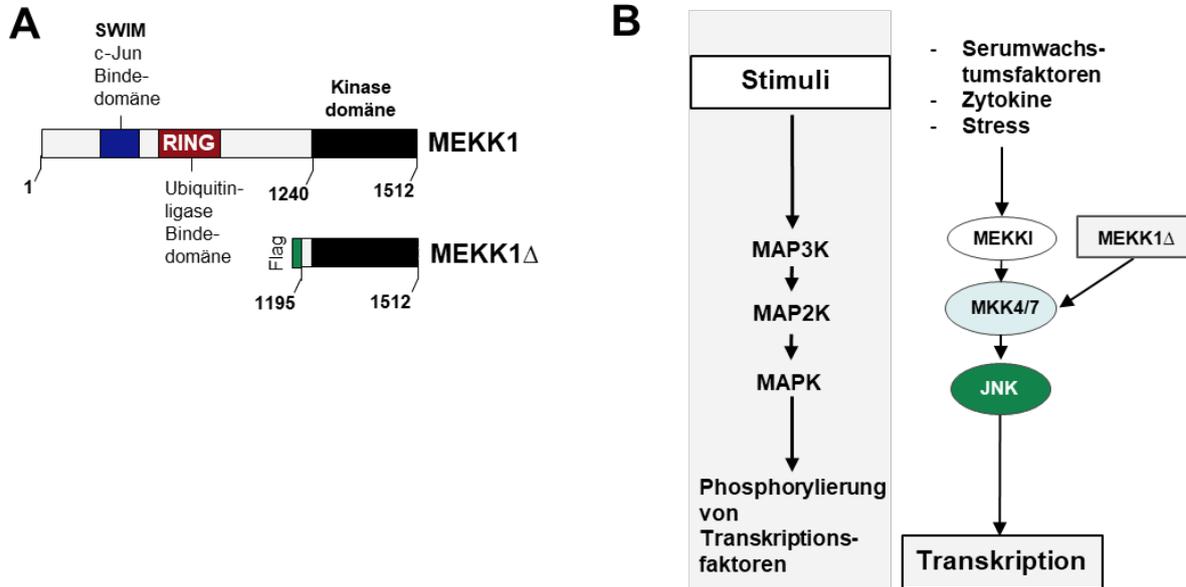


Abbildung 18 Struktur und Funktion von MEKK1 Δ

Abb.18: (A) Modulare Struktur von MEKK1 Δ . Bei MEKK1 Δ handelt es sich um eine gekürzte Form der Proteinkinase MEKK1, die deren C-terminale katalytische Domäne enthält. Die N-terminale regulatorische Region der Kinase wurde deletiert, um eine konstitutiv-aktive Mutante zu schaffen. (B) Aktivierung der MAP-Kinase JNK unter dem Einfluss von MEKK1 Δ . Dargestellt ist der Signalweg, der unter natürlichen Bedingungen zur Aktivierung von JNK führt. Rechteckig dargestellt ist die dauerhaft aktive MEKK1-Mutante MEKK1 Δ . Die Pfeile symbolisieren die Aktivierungswege, grau hinterlegt ist ein modellhafter MAP-Kinase Signalweg, der die Funktion der Signalproteine in der Signalkaskade verdeutlicht.

Auch die Aktivierung der MAPK JNK verstärkt die Expression von c-Fos [18,134]. Um JNK zu aktivieren wurde in HEK293-T17 Zellen eine gekürzte, konstitutiv aktive Mutante der MAP3-Kinase MEKK1 exprimiert [68]. Abbildung 18 zeigt die modulare Struktur der MEKK1-Mutante MEKK1 Δ . MEKK1 Δ besitzt die Kinasedomäne von MEKK1, während N-terminale regulatorische Elemente der Wildtypkinase deletiert sind. Die MAP3-Kinase MEKK1 ist ein starker Aktivator von JNK, während der Effekt auf die Aktivierung von ERK1/2 oder p38 als sehr gering oder fehlend nachgewiesen wurde [141]. Die Abbildungen 19B und 19D zeigen, dass die Expression von MEKK1 Δ zu einer Erhöhung der AP-1-Aktivität führt.

Um die Bedeutung von JNK in der Signalkaskade, über die MEKK1 die verstärkte AP-1-Aktivität vermittelt, nachzuweisen, wurde in HEK293-T17-Zellen neben MEKK1 Δ eine Mutante des „Scaffold“-Proteins JIP1 (*JNK-interacting protein-1*) exprimiert. Die Mutante (JIP1 Δ) verhindert durch Komplexbildung die Translokation von JNK in den Zellkern und damit die JNK-abhängige Aktivierung von Transkriptionsfaktoren [139]. In Zellen, die neben MEKK1 Δ auch JIP1 Δ exprimierten, war die resultierende AP-1-Aktivität um etwa 50% reduziert (Abb. 19B). Diese Beobachtung bestätigt, dass die beschriebene AP-1-Aktivierung nach Expression von MEKK1 Δ über JNK vermittelt worden war.

Um nun die Spezifität der JNK-Aktivierung unter dem Einfluss von MEKK1 Δ nachzuweisen, wurde in HEK293-T17-Zellen, die MEKK1 Δ exprimierten, eine dominant negative Mutante der MAP2-Kinase SEK1/MKK4 ko-exprimiert. Die Struktur der SEK1-Mutante SEK-AL wird in Abb. 19C schematisch dargestellt. SEK1 ist als direktes Substrat von MEKK1 essentieller Bestandteil der Signalweiterleitung nach der Aktivierung von MEKK1 [48]. Die verwendete Mutante, SEK-AL, wird durch zwei Punktmutationen in der Kinase-Domäne von SEK1, an Position 221 und 225, generiert. SEK-AL senkt die Aktivität von JNK und hat dabei auf die Aktivität von p38 keinen Einfluss [143]. Abbildung 19D zeigt, dass bei Ko-Expression von SEK-AL die MEKK1-induzierte AP-1-Aktivität um mehr als 60% reduziert war.

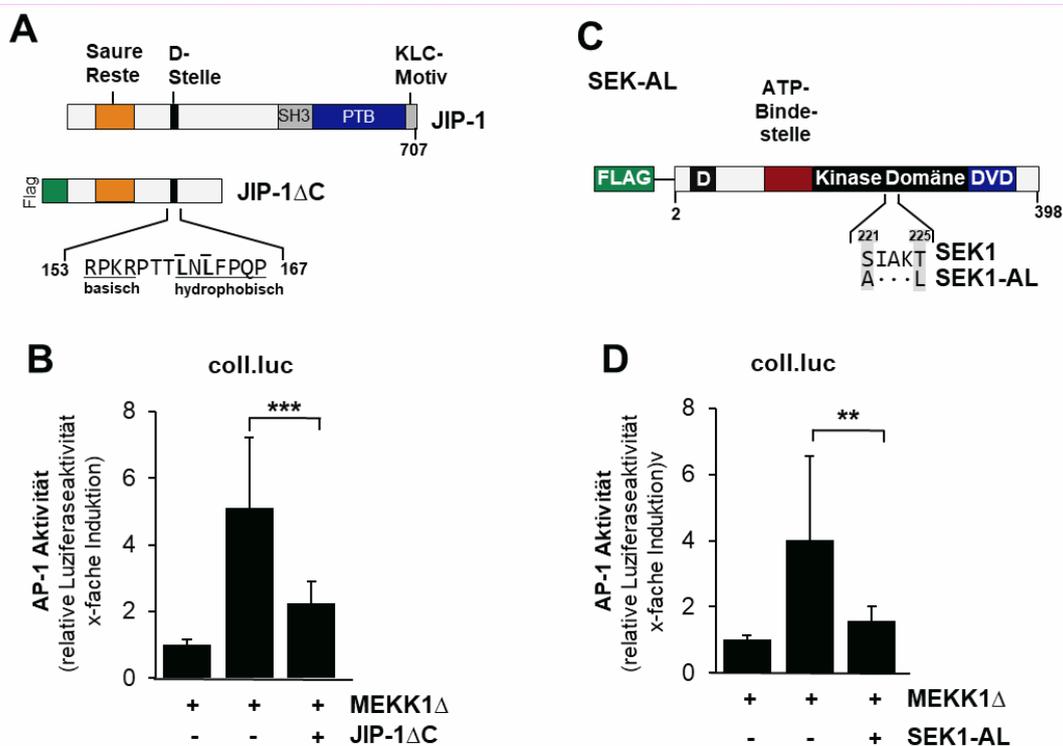


Abbildung 19 MEKK1 Δ aktiviert JNK

Abb. 19: (A) Struktur von JIP-1 und der gekürzten Mutante JIP-1 Δ C. Die „D-site“ ist für die Interaktion mit JNK verantwortlich und in JIP-1 Δ C konserviert. Zusätzlich zeigt die Abbildung N-terminal eine von sauren Resten dominierte Region (acidic) sowie die mutmaßliche SH3-Region, das phosphotyrosine-binding Motiv (PTB) und das C-terminale „kinesin light chain binding motif“ (KCL). (B) Durch Expression von JIP-1 Δ C kommt es zur Hemmung der MEKK1 Δ -induzierten Steigerung der AP-1 Aktivität. In HEK293-T17-Zellen wurden mittels rekombinanter Lentiviren das Coll.luc Reportergen, sowie die Kodierinformationen für MEKK1 Δ und JIP-1 Δ C eingebracht. Nach 48-stündiger Inkubation in serumreduziertem Medium wurde die JNK-abhängige AP-1-Aktivierung bestimmt. In die dargestellten Ergebnisse gingen Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils vier getrennt kultivierten Ansätzen ein. Die sichtbare Differenz zwischen den Daten aus den JIP-1 exprimierenden Zellen und Zellen die neben MEKK1 Δ β -Galaktosidase exprimierten, wurde mittels eines t-Tests für unabhängige Stichproben auf sein Signifikanzniveau geprüft (** $p < 0,01$). (C) Schematische Darstellung der Struktur von SEK-1 und seiner dominant-negativen Mutante SEK-AL. SEK-AL enthält die Mutationen S221A und T225L. (D) HEK293-T17-Zellen, die das Coll.luc Reportergen enthielten, wurden mit Lentiviren infiziert, die für MEKK1 Δ und SEK-AL kodierten. Die Zellen wurden nach 48-stündiger Inkubation in serumreduziertem Medium aufgeschlossen und es wurde die relative Luziferaseaktivität bestimmt. In die dargestellten Ergebnisse gingen Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils vier getrennt kultivierten Ansätzen ein. Der T-Test für unabhängige Stichproben ergab eine Signifikanz auf *** - Niveau. ($p < 0,001$).

3.5 Die DNA-Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren SRF und TCF sind essenziell für die Aktivierung des c-Fos-Promotors durch JNK

Um zu klären, welche Transkriptionsfaktoren an der JNK-abhängigen Aktivierung des c-Fos-Promotors beteiligt sind, wurden mittels lentiviralen Gentransfers Reportergene unter der Kontrolle des murinen c-Fos-Promotors in das Chromatin der HEK293-TN-Zellen integriert. Neben dem Wildtyp-Promotor wurden die in Abbildung 17 dargestellten Mutanten des proximalen c-Fos-Promotors verwendet. JNK wurde über die Expression von MEKK1 Δ aktiviert, in Kontrollexperimenten wurde stattdessen das β -Galaktosidase-Gen exprimiert.

Wie aus Abbildung 20 ersichtlich ist, zeigte sich bei Deletion der Bindestelle für SRF (Δ CArG-Box) die stärkste Reduktion der Reportergentranskription nach Expression von MEKK1 Δ . Die Aktivität der Transkription war mehr als 60% geringer als in Zellen, die das Reportergen unter Kontrolle des Wildtyp-Promotors enthielten. Die Deletion der Bindestelle für Ets-Transkriptionsfaktoren führte zur Reduktion der Promotoraktivierung um über 40%. Eine Mutation, die die Bindestelle für STAT inaktivierte, führte zu einer Reduktion der Transkriptionstrate um 30%. Im Gegensatz dazu hatte die Inaktivierung der Bindestelle für AP-1 keinen signifikanten Einfluss auf die transkriptionale Aktivität des Reportergens.

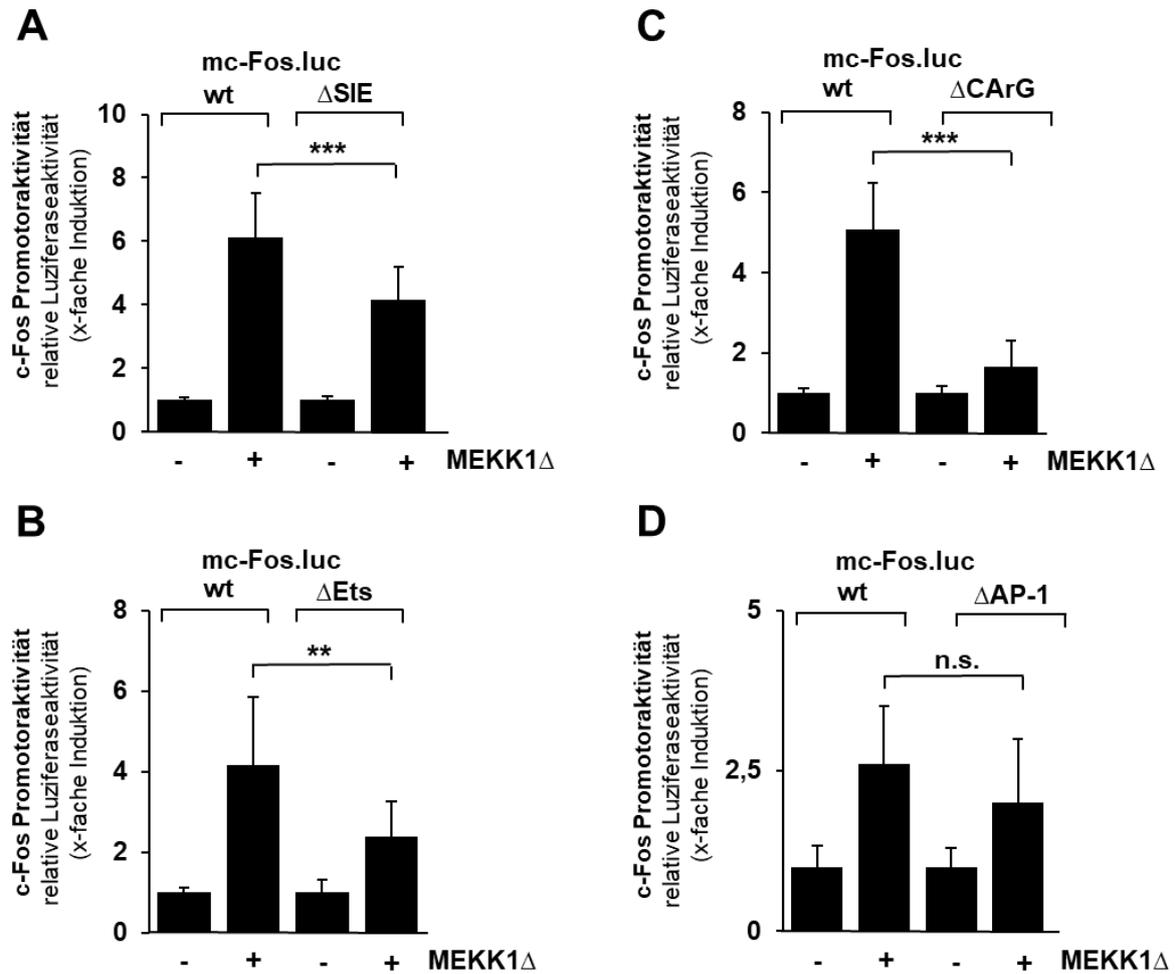


Abbildung 20 Transkriptionsfaktorabhängige Aktivierung des c-Fos-Promotors durch JNK

Abb. 20: Aktivierung des c-Fos-Promotors durch JNK. HEK293-T17-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die ein Reporterogen unter der Kontrolle des murinen Fos-Promotors (*mc-Fos.luc*) enthielten. Zusätzlich wurden mittels lentiviralen Gentransfers Reporterogene mit mutierten c-Fos-Promotoren in die Zellen eingebracht. In diesen Reporterogenen waren die Bindestellen für STAT (Δ STAT), TCF (Δ Ets), SRF (Δ CARG) oder AP-1 (Δ AP-1) inaktiviert. Eine effektive Stimulation der MAPK JNK wurde über die Infektion dieser Zellen mit einem Lentivirus erzielt, der für MEKK1 Δ kodierte. Als Kontrolle wurden Zellen genutzt, die β -Galaktosidase exprimierten. Die Zellen wurden für 48 Stunden in serumreduziertem Medium inkubiert. Es wurden Zellextrakte hergestellt und die relative Luziferaseaktivität wurde bestimmt. Die aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten mit je vier getrennt kultivierten Ansätzen generierten Daten sind +/-SD dargestellt. (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$; n.s. nicht signifikant)

3.6 Aktivierung der MAP-Kinase p38 durch die konstitutiv aktive Proteinkinase MKK6E

MKK6 ist eine MAP2-Kinase, die die MAP-Kinase p38 phosphoryliert und aktiviert [66]. Mittels rekombinanter Lentiviren wurde die MKK6-Mutante MKK6E in HEK293-T/17-Zellen exprimiert. MKK6E enthält zwei Punktmutationen in der Kinasedomäne, S207E und T211E (vgl. Abb. 21A). Durch das Einbringen der negativen Ladung an dieser Position ist MKK6E konstitutiv aktiv [96]. Ergebnisse bisheriger Forschung konnten zeigen, dass die Expression von MKK6E in Zellen zu einer Steigerung der Aktivität von AP-1 führt [68].

Zur Aktivierung der Proteinkinase p38 muss die Kinase am Threoninrest T180 und dem Tyrosinrest Y182 phosphoryliert werden [95]. Austauschmutationen dieser Basen zu Alanin und Phenylalanin (T180A und Y182F) generieren eine dominant negative Mutante von p38, p38AF (s. Abb. 21B) [27].

HEK293T/17-Zellen wurden mit einem Lentivirus infiziert, der das coll.luc-Reporter gen enthielt. Die Zellen wurden außerdem mit einem Lentivirus infiziert, der für MKK6E kodierte. Zusätzlich wurde mittels lentiviraler Infektion entweder p38AF oder β -Galactosidase als Kontrolle in den Zellen exprimiert. In Zellen, die neben MKK6E auch die dominant negative p38-Mutante p38AF exprimierten, war die AP1-Aktivität um etwa 45% vermindert (Abb. 21D). Dieses Ergebnis zeigt, dass die in MKK6E-exprimierenden Zellen beobachtete AP1-Aktivierung durch die MAP-Kinase p38 vermittelt wird.

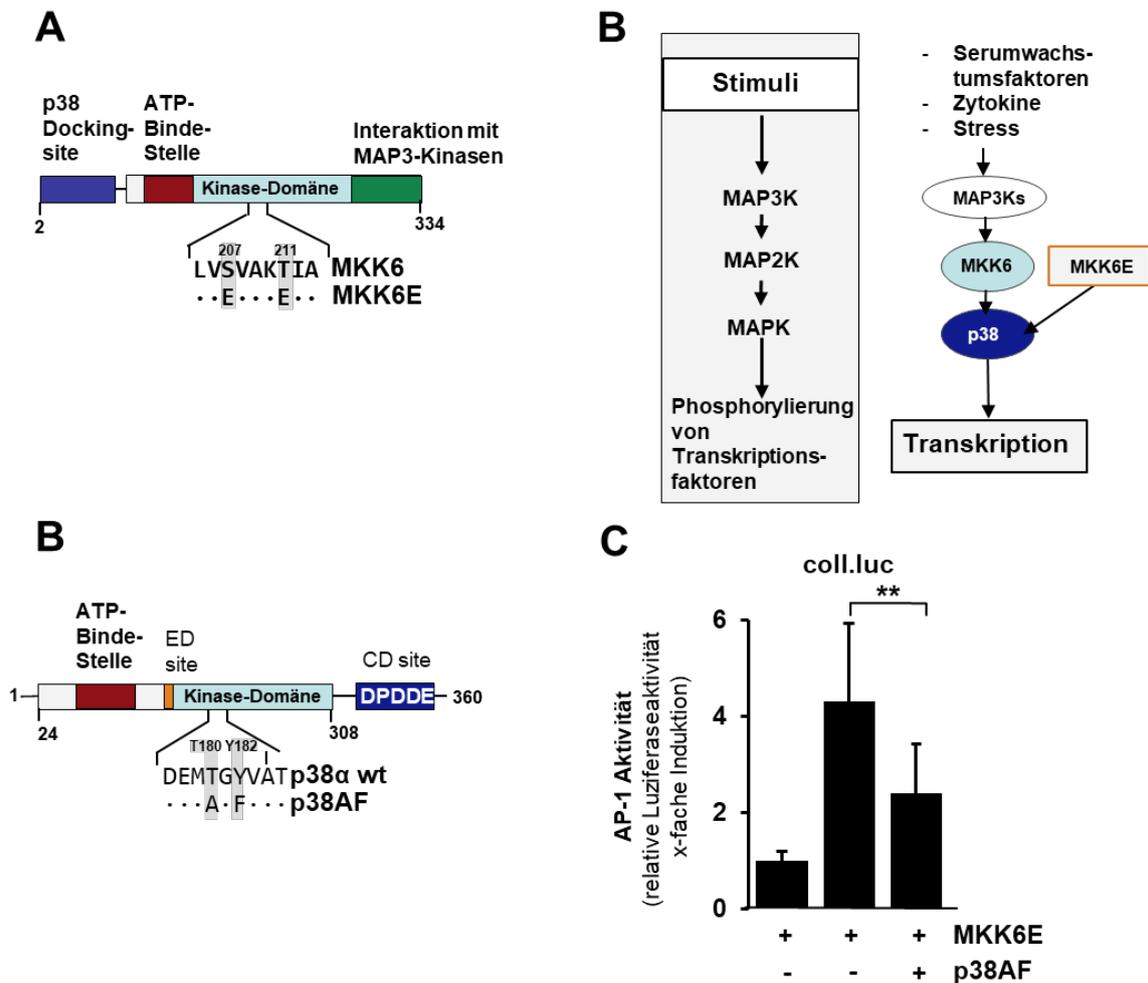


Abbildung 21 Aktivierung von p38 durch MKK6E

Abb. 21: Aktivierung von p38 durch MKK6E (A) Modulare Struktur von MKK6 und MKK6E. Die Abbildung zeigt die Sequenz der Kinasedomäne. Die in MKK6E mutierten Phosphoakzeptorstellen, sind angegeben (S207 und T211). Zusätzlich sind die ATP-Bindestelle und die Interaktionsdomänen für das Substrat p38 auf N-terminaler, sowie für MAP3-Kinasen auf C-terminaler Seite, dargestellt. (B) Schematische Darstellung der Struktur von p38 und der dominant negativen Mutante p38AF. Dargestellt sind die Bindestelle für ATP, die CD-Sequenz und die ED-Stelle. p38AF enthält in der Kinasedomäne zwei Mutationen, T180A und Y182F, wodurch eine dominant negative Mutante generiert werden konnte. (B) Aktivierung der MAP-Kinase JNK unter dem Einfluss von MEKK1Δ. Dargestellt ist der Signalweg, der unter natürlichen Bedingungen zur Aktivierung von JNK führt. Rechteckig dargestellt ist die dauerhaft aktive MEKK1-Mutante MEKK1Δ. Die Pfeile symbolisieren die Aktivierungswege, grau hinterlegt ist ein modellhafter MAP-Kinase Signalweg, der die Funktion der Signalproteine in der Signalkaskade verdeutlicht. (C) In HEK293T/17-Zellen die das coll.luc-Reportergen enthalten, werden mittels lentiviralen Gentransfers neben MKK6E zusätzlich p38AF oder β-Galactosidase als Kontrolle exprimiert. Die Zellen wurden nach 48 stündiger Inkubation in serumreduziertem Medium aufgeschlossen und wie beschrieben wurden Proteinkonzentration und Luziferaseaktivität gemessen. Die relative Luziferaseaktivität wurde bestimmt. Die aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten mit je vier getrennt kultivierten Ansätzen generierten Daten sind +/-SD dargestellt. (**p<0,01)

3.7 Die DNA-Bindestellen für SRF, TCF und AP-1 werden für die Aktivierung des c-Fos-Promotors durch p38 benötigt

Um die Proteinkinase p38 in HEK293T/17-Zellen effektiv zu aktivieren, wurde die konstitutiv-aktive MKK6-Mutante MKK6E in HEK293T/17-Zellen exprimiert. In diese Zellen wurden zusätzlich mittels lentiviralen Gentransfers zusätzlich Reportergene eingebracht, die das Luziferasegen unter Kontrolle des Wildtyp-Fos-Promotors oder einer der in Abbildung 17 dargestellten Mutanten des Promotors enthielten. Die Promotormutanten enthielten hierbei jeweils eine inaktivierende Mutation der Transkriptionsfaktor-Bindestellen für SRF, TCF, AP-1 oder STAT.

Wie Abbildung 22C zeigt, hatte die inaktivierende Mutation der CrAG-Box, die als Bindestelle für SRF fungiert, eine signifikante Reduktion der Stimulation der Reportergentranskription nach Aktivierung der Proteinkinase p38 zur Folge. Die Transkriptionsrate zeigte sich verglichen mit dem Wildtyp-Promotor um etwa 55% reduziert. Ebenso verursachte die Inaktivierung der Bindestelle für TCF, Δ Ets, eine signifikante Reduktion der transkriptionalen Aktivität des Reportergens (vgl. Abb. 22B). Die durch MKK6E induzierte Transkriptionsaktivierung war hier um mehr als 40% reduziert. Die Mutation der STAT-Bindestelle zeigte hingegen keinen signifikanten Effekt auf die p38-abhängigen Promotoraktivität (vgl. Abb. 22A), während eine Mutation der DNA-Bindestelle für AP-1 eine Reduktion der transkriptionalen Aktivität um etwa 20% bewirkte (vgl. Abb. 22D).

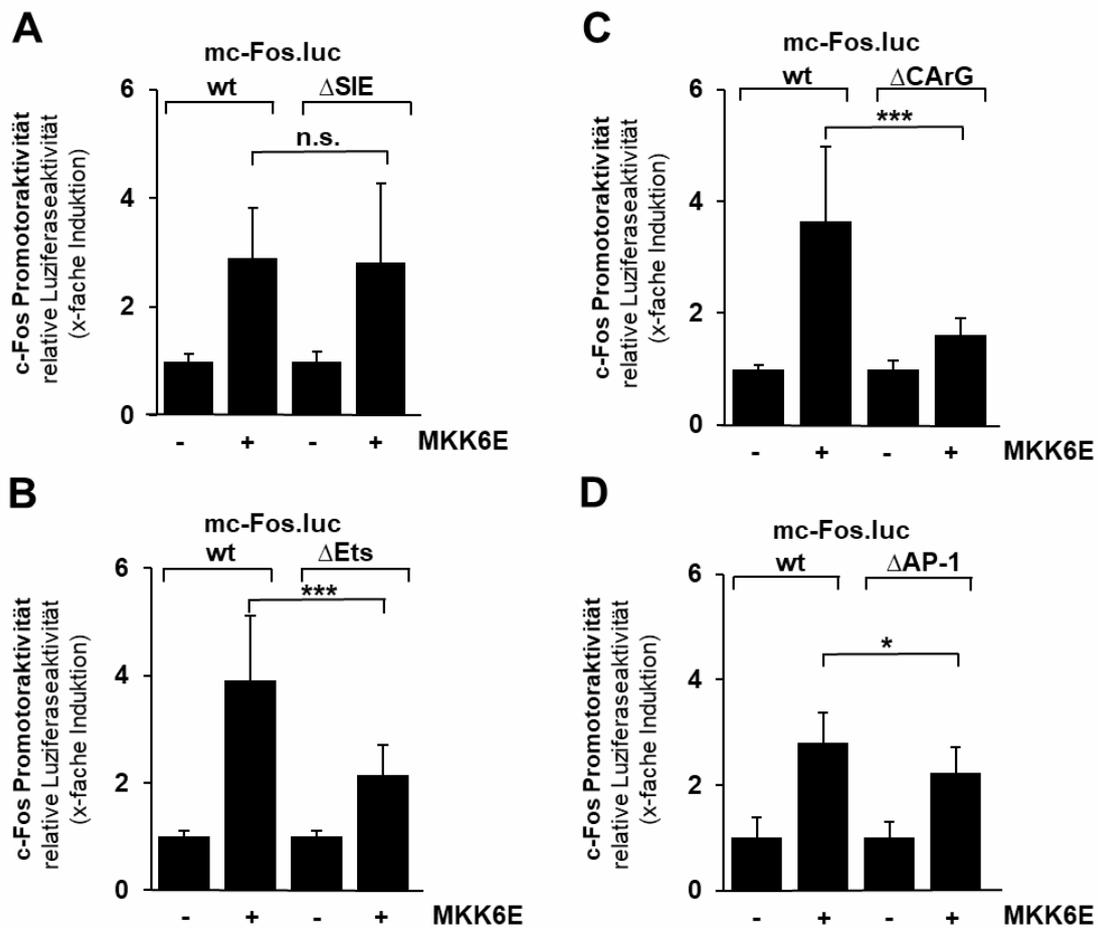


Abbildung 22 Aktivierung des c-Fos-Promotors durch p38

Abb. 22: Transkriptionsfaktorabhängige Aktivierung des c-Fos-Promotors durch p38. In HEK293-TN-Zellen wurde mittels lentiviralen Gentransfer ein Reporter gen unter der Kontrolle des murinen c-Fos-Promotors (mc-Fos.luc) eingebracht. Zusätzlich wurden Zellen mit Viren infiziert, die Reportergene mit den in Abbildung 17 beschriebenen, mutierten Formen des c-Fos-Promotors enthielten. In diesen Reportergenen waren die Bindestellen für STAT (Δ SIE), TCF (Δ Ets), SRF (Δ CARG) oder AP-1 (Δ AP-1) inaktiviert. Eine effektive Stimulation von p38 wurde über die Infektion dieser Zellen mit einem rekombinanten Lentivirus erreicht, der für MKK6E kodierte. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einem Lentivirus infiziert, der für β -Galaktosidase kodierte. Die Zellen wurden für 48 Stunden in serumreduziertem Medium inkubiert. Die Zellextrakte wurden wie beschrieben präpariert und die relative Luziferaseaktivität wurde bestimmt. Die aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten mit je vier getrennt kultivierten Experimenten generierten Daten sind +/-SD dargestellt. (** $p < 0,001$; * $p < 0,01$; * $p < 0,05$; n.s. Nicht signifikant)

Regulation der Transkription des c-Fos-Gens durch Stimulus-responsive Proteinkinasen

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation des c-Fos-Promotors durch MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 untersucht. Zu Beginn wurde die Forschungsfrage gestellt, ob die unterschiedlichen MAP-Kinasen jeweils über distinkte regulatorische DNA-Elemente des c-Fos-Promotors wirken, oder ob gemeinsame Promotorelemente für die Vermittlung der Signale der MAP-Kinasen verantwortlich sind.

Die Expression des c-Fos-Gens wird durch eine Vielzahl extrazellulärer Signale und intrazellulärer Kaskaden kontrolliert. Alleine in der Aktivierung der MAP-Kinasen konvergieren die Effekte vielfältiger Signalwege, ausgelöst durch verschiedene membranständige Rezeptortypen und extrazelluläre Signalen. Die Signale, die zur Aktivierung der einzelnen MAP-Kinasen führen, weisen sowohl Überschneidungen als auch Unterschiede auf. So wird die Aktivierung von ERK1/2 vor allem durch Mitogene, Rezeptortyrosinkinasen und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ausgelöst. Die MAP-Kinase p38 wird im Gegensatz dazu weniger durch Mitogene, sondern vornehmlich durch Zytokine und Stress aktiviert, sowie durch Endothelin, Thrombin und Glutamat über G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Auch JNK gehört zu den Stress-aktivierten MAP-Kinasen und wird neben verschiedenen Stress-Signalen vor allem durch inflammatorische Zytokine aktiviert.

Alle drei Klassen der MAP-Kinasen aktivieren Transkriptionsfaktoren, die den STAT-Proteinen zugeordnet werden, AP-1 Transkriptionsfaktoren sowie TCF-Transkriptionsfaktoren. Zudem führt die Aktivierung der MAP-Kinasen zur Aktivierung von SRF. Diese Transkriptionsfaktoren sind an der Regulation des c-Fos-Promotors beteiligt. Darüber hinaus ist die Regulation des c-Fos-Promotors durch Transkriptionsfaktoren kontextabhängig [53], was nahelegt, dass die Aktivierung des Promotors auch von Faktoren wie der nukleosomalen Architektur und dem Stoffwechselzustand der Zelle abhängt.

Um zu klären, ob die MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 die Transkription von c-Fos über die gleichen Transkriptionsfaktoren und die selben Promotorelemente regulieren, mussten die einzelnen MAP-Kinasen spezifisch aktiviert werden. Dazu wurden konstitutiv aktive Mutanten regulatorischer Proteinkinasen exprimiert, die als MAP2-Kinasen oder MAP3-Kinasen an der spezifischen Aktivierung einer bestimmten MAP-Kinase beteiligt sind. Zur Aktivierung von ERK1/2 wurde das Designerprotein Δ B-Raf:ER verwendet, in dem die Kinasedomäne der MAP3-Kinase B-Raf durch 4-Hydroxytamoxifen aktivierbar ist [117]. Frühere Forschungsergebnisse konnten zeigen, dass B-Raf die Transkription beinahe ausschließlich über die MAP2-Kinase MEK beeinflusst, die wiederum spezifisch ERK1/2 aktiviert [106]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen darüber hinaus, dass die Aktivierung von Δ B-Raf:ER sowohl die AP-1 induzierte Transkription, als auch die Transkription unter Kontrolle des SRE verstärkt. Zusätzlich konnte eine Reduktion der Promotoraktivität unter dem Einfluss von Δ B-Raf:ER beobachtet wer-

Regulation der Transkription des c-Fos-Gens durch Stimulus-responsive Proteinkinasen

den, wenn ERK1/2 durch die Expression spezifischer shRNA depletiert war. Diese Ergebnisse zeigen, dass Δ B-Raf:ER einerseits die Transkription effektiv aktiviert und andererseits die auf Transkriptionsebene beobachteten Effekte auf die subsequente Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 zurückzuführen sind.

Um JNK zu aktivieren wurde MEKK1 Δ , eine konstitutiv aktive Mutante der MAP3-Kinase MEKK1, exprimiert [68]. MEKK1 sorgt für eine spezifische Aktivierung des JNK Signalwegs [141]. Auch unter dem Einfluss von MEKK1 Δ kommt es zu einer Aktivitätssteigerung von AP-1, was auf eine effektive Aktivierung von JNK schließen lässt. Zusätzlich senkte die Expression der Mutante JIP1- Δ des JNK-Scaffold-Proteins JIP-1 die MEKK1 Δ -abhängige Steigerung der AP-1-Aktivität effektiv. JIP-1 Δ verhindert die Kerntranslokation von JNK und damit die JNK-abhängige Aktivierung von Transkriptionsfaktoren [139]. Diese Erkenntnisse zeigen die Bedeutung von JNK für die beobachtete Transkriptionssteigerung durch MEKK1 Δ . Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch die Anwesenheit von SEK-AL, einer dominant negativen Mutante der JNK-aktivierenden MAP2-Kinase SEK1 (MKK4), die AP-1 Aktivierung unter Einfluss von MEKK1 Δ effektiv senkt. Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse bisheriger Forschungsarbeiten, die zeigen konnten, dass eine inaktive SEK1/MKK4-Mutante die transkriptionelle Aktivität von AP-1 senkt [137]. Obwohl SEK1 (MKK4) unter bestimmten Bedingungen auch p38 aktivieren kann [11] konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass SEK-AL die Aktivität von p38 nicht beeinflusst [143]. Somit zeigen die hier dargestellten Ergebnisse, dass unter dem Einfluss von MEKK1 Δ die MAPK JNK effektiv und spezifisch aktiviert wird.

Um die MAP-Kinase p38 zu aktivieren wurde MKK6E, eine konstitutiv aktive Mutante der MAP2-Kinase MKK6, genutzt. Ergebnisse früherer Arbeiten zeigen, dass auch in Anwesenheit von MKK6E die Aktivität von AP-1 gesteigert ist [68]. Um auch für MKK6E nachzuweisen, dass die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren spezifisch durch p38 vermittelt wird, wurde p38AF als dominant negative Mutante der MAP-Kinase exprimiert. p38AF senkte die AP-1 Aktivität unter dem Einfluss von MKK6E, was zeigt, dass die transkriptionale Wirkung von MKK6E durch die MAP-Kinase p38 vermittelt wird. Somit konnte für die drei verwendeten Aktivierungssysteme eine effektive Aktivierung der Transkription und eine Spezifität für die jeweiligen MAP-Kinasen nachgewiesen werden.

Die untersuchten MAP-Kinasen selbst aktivieren Transkriptionsfaktoren, die an bestimmte Elemente des proximalen c-Fos-Promotors binden können und so die transkriptionale Aktivität des c-Fos-Gens modulieren. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Fragestellung, welche dieser regulatorischen DNA-Sequenzen an der Induktion der Transkription durch die einzelnen MAP-Kinasen beteiligt sind und ob die MAP-Kinasen gemeinsame oder distinkte Promotorelemente zur Signalweiterleitung nutzen. Untersucht wurden die Bindestellen für SRF, TCF, AP-1 und STAT. Das „*serum response element*“ (SRE) ent-

hält die DNA-Bindestellen für Ets-Transkriptionsfaktoren wie TCF und für SRF, die CARG-Box. Das SRE ist ein bedeutendes regulatorisches Element des c-Fos-Promotors, das die Signale verschiedener Stimuli integriert. So sind etwa die Signalwege nach der Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, TRP-Kanälen oder spannungsaktivierten Kalziumkanälen an der Transkriptionsaktivierung über SRF beteiligt [80,103,136]. Am SRE des c-Fos-Promotors bilden Dimere von SRF mit den TCF Elk1, Elk3 und Elk4 einen ternären Komplex. Über die Komplexbildung beeinflussen sich SRF und TCF gegenseitig in ihrer Wirkung am c-Fos-Promotor.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle drei betrachteten MAP-Kinasen eine intakte CARG-Box und damit eine intakte SRF-Bindung benötigen, um die Promotoraktivität des c-Fos-Promotors effektiv zu steigern. Eine Mutation, die die Bindestelle für SRF funktionsunfähig machte, reduzierte unter dem Einfluss aller drei MAP-Kinasen signifikant den Grad der Promotoraktivierung. Auch eine intakte DNA-Bindung von TCF war unter dem Einfluss aller drei betrachteten MAP-Kinasen relevant für die Steigerung transkriptionaler Aktivität des c-Fos-Gens. Somit konnte gezeigt werden, dass beide Transkriptionsfaktor-Bindestellen des SRE vorrangige Zielelemente der MAP-Kinase-Kaskaden darstellen. Insgesamt konnte bei Einsatz der Promotormutante mit zerstörter Bindestelle für SRF ein stärkerer Effekt auf die transkriptionale Aktivität des Reportergens beobachtet werden als bei Verwendung der Promotor-Mutante mit funktionsloser Bindestelle für TCF. Bei der Bewertung dieser Ergebnisse sollte jedoch bedacht werden, dass die TCF-Proteine nur mit dem SRE interagieren können, wenn SRF bereits an die CARG-Box gebunden ist [54]. Daher verhindert das Einbringen einer inaktivierenden Mutation an der CARG-Box nicht nur die Bindung von SRF, sondern kann auch die Bindung von TCF an das SRE negativ beeinflussen. Zusätzlich ist zu bemerken, dass die Rekrutierung von TCF an das SRE vermutlich über die Bindung von TCF an SRF erfolgt [35,45,103,119]. Daneben ist zu bemerken, dass die Proteinkinase p38 mit Hilfe des TCF-Proteins Elk-1 an den c-Fos-Promotor rekrutiert wird [36]. Die unter Ausschaltung der TCF-Bindestelle beobachteten Effekte sind also vermutlich zumindest zum Teil durch die beschriebenen Wechselwirkungen mit SRF erklärbar.

Neben dem SRE enthält der proximale c-Fos-Promotor auch eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor AP-1. Dieses DNA-Element ist essentiell für die Aktivierung des c-Fos-Gens durch EGF, Phorbol-Ester oder das Polyphenol Resveratrol [38,103]. Die Untersuchung der durch MAP-Kinasen induzierten Aktivierung des c-Fos-Promotors über AP-1 Transkriptionsfaktoren ergibt kein einheitliches Bild. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass alle drei Proteinkinasen eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 vermitteln. Das entspricht den Ergebnissen bereits publizierter Arbeiten [68,69,133]. Bei der Untersuchung des c-Fos-Promotors zeigte sich, dass eine intakte Bindestelle für AP-1 für die Promotoraktivierung durch die MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 benötigt wird. Beide Proteinkinasen stimulieren die c-Fos-Expression also über das SRE und die DNA-Bindestelle von AP-1. Das entspricht den Ergebnissen

Regulation der Transkription des c-Fos-Gens durch Stimulus-responsive Proteinkinasen

bereits publizierter Untersuchungen, die darstellen konnten, dass AP-1 und TCF an der ERK1/2-induzierten Aktivierung des c-Fos-Promotors in HeLa-Zellen beteiligt sind [127]. Im Gegensatz dazu hatte die Inaktivierung der DNA-Bindestelle für AP-1 keinen Effekt auf die Aktivität des c-Fos-Promotors nach Aktivierung von JNK.

Bei dem Protein c-Fos selbst handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor der AP-1 Familie, der als Heterodimer mit c-Jun, JUNB oder JUND die Transkription reguliert. Interessanterweise phosphoryliert die MAPK ERK1/2 auch c-Fos selbst, was in einer verstärkten Aktivität des Proteins resultiert [44,81]. ERK1/2 stimuliert also sowohl die Transkription als auch die Aktivität des c-Fos Proteins. Es ist anzumerken, dass die AP-1-DNA-Bindestelle von der AP-1-Konsensussequenz abweicht (5'-TGCGTCA-3' statt 5'-TGAGTCA-3'). Dieser Umstand könnte die Unterschiede in der AP-1 Sensibilität verschiedener Promotoren erklären.

Ein weiteres regulatorisches Element des proximalen c-Fos-Promotors ist die DNA-Bindestelle für Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie (SIE). Es konnte bereits herausgearbeitet werden, dass die Aktivierung des c-Fos-Promotors über STAT an der PDGF, EGF und IL-2 und IL-4 induzierten Steigerung der c-Fos-Expression beteiligt ist [40,109,125]. Chromatin-Immunoprecipitationsassays haben gezeigt, dass STAT3 schwach an den c-Fos-Promotor in IL-6-stimulierten HepG2-Zellen bindet [138]. Die hier vorgenommene Analyse der MAP-Kinase vermittelten Aktivierung des c-Fos-Promotors zeigte allerdings, dass die STAT-DNA-Bindestelle keinen Einfluss auf die Aktivierung der Transkription durch ERK1/2 und p38 hatte. Unter dem Einfluss von JNK zeigte sich bei Ausschaltung der Bindestelle für STAT ein geringer Effekt auf die Promotoraktivierung.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 die Transkription von c-Fos überwiegend über das SRE und SRF, sowie die Transkriptionsfaktoren SRF und die Transkriptionsfaktoren der TCF-Familie induzieren. Zudem kommt den AP-1 Transkriptionsfaktoren für die Steigerung der Transkriptionsrate von c-Fos unter dem Einfluss der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 eine gewisse Bedeutung zu. In Rückschau auf die ursprüngliche Forschungsfrage, ob die MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 den c-Fos-Promotor über distinkte Transkriptionsfaktoren aktivieren, kommt man auf Basis der ausgeführten Ergebnisse zu dem Schluss, dass diese Frage negativ zu beantworten ist. Die gesteigerte Expression von c-Fos unter dem Einfluss der aktivierten MAP-Kinasen wird also größtenteils über ein gemeinsames genetisches Element, das SRE, und die entsprechenden Transkriptionsfaktoren vermittelt. Die MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 nutzen also nicht streng getrennte Signalwege um die Transkription von c-Fos zu induzieren, sondern greifen viel mehr auf gemeinsame Signalmoleküle und die selben regulatorischen Promotor-Sequenzen zurück.

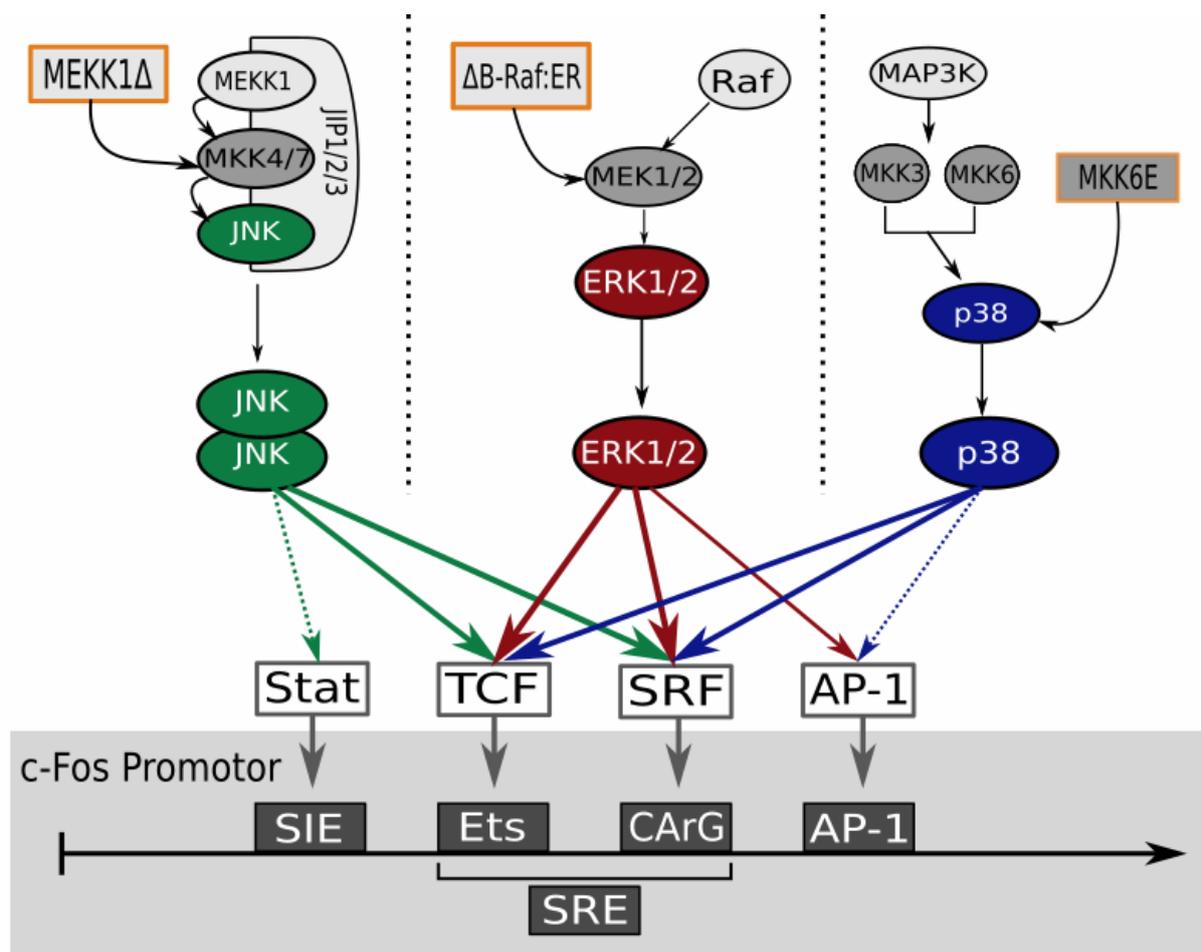


Abbildung 23 Zusammenfassung der Ergebnisse

Abb. 23: Zusammenfassung der Ergebnisse. Die Abbildung zeigt die differentielle Promotoraktivierung durch die durch die MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38. Die Pfeile symbolisieren die Signalwege, die unter Einfluss der, oval dargestellten, MAP-Kinasen die Promotoraktivierung induzieren. Schematisch dargestellt sind auch die Signalwege, die zur Aktivierung der MAP-Kinasen führen. Natürlich vorkommende MAP2- und MAP3-Kinasen sind oval, die als Aktivierungssysteme verwendeten Kinase-Mutanten MEKK1Δ, ΔBRAF:ER und MKK6E sind rechteckig und mit orangenem Rand dargestellt. Zusätzlich ist das Scaffold-Protein JIP abgebildet. Im unteren Teil der Abbildung befindet sich eine schematische Darstellung des proximalen c-Fos-Promotors. Die Transkriptionsfaktor-Bindestellen des Promotors sind ebenfalls kastenförmig dargestellt. Die Dicke der Pfeile zwischen den MAP-Kinasen und den Transkriptionsfaktoren symbolisiert die Effektstärke bei Deletion der jeweiligen Transkriptionsfaktor-Bindestelle.

Anhang

Referenzen

1. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF (2000) The c-Jun NH₂-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser307*. *J Biol Chem* 275:9047–9054
2. Alsarraj J, Vinson C, Han J, Thiel G (2005) Regulation of GTP cyclohydrolase I gene transcription by basic region leucine zipper transcription factors. *J Cell Biochem* 96:1003–20
3. Ambrosino C, Mace G, Galban S, Fritsch C, Vintersten K, Black E, Gorospe M, Nebreda AR (2003) Negative feedback regulation of MKK6 mRNA stability by p38 α mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 23:370–381
4. Angel P, Karin M (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072:129–157
5. Avantaggiati M, Natoli G, Balsano C, Chirillo P, Artini M, Marzio ED, Colleparado D, Levrero M (1993) The hepatitis B virus (HBV) pX transactivates the c-fos promoter through multiple cis-acting elements. *Oncogene*
6. Bakin AV, Curran T (1999) Role of DNA 5-methylcytosine transferase in cell transformation by fos. *Science* 283:387–390
7. Barton GM, Medzhitov R (2002) Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc Natl Acad Sci* 99:14943–14945
8. Berra E, Diaz-Meco MT, Moscat J (1998) The activation of p38 and apoptosis by the inhibition of Erk is antagonized by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem* 273:10792–10797
9. Bertolotto C, Ricci J-E, Luciano F, Mari B, Chambard J-C, Auberger P (2000) Cleavage of the Serum Response Factor during Death Receptor-induced Apoptosis Results in an Inhibition of the c-FOS Promoter Transcriptional Activity. *J Biol Chem* 275:12941–12947
10. Bode AM, Dong Z (2007) The functional contrariety of JNK. *Mol Carcinog* 46:591–598
11. Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, Ventura J-J, Kelkar N, Tanaka Y, Kyuuma M, Takeshita T, Flavell RA, Davis RJ (2003) Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev* 17:1969–1978
12. Brown LY, Dong W, Kantor B (2020) An Improved Protocol for the Production of Lentiviral Vectors. *STAR Protoc*
13. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002) A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science* 296:550–553
14. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002) Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2:243–247
15. Buchwalter G, Gross C, Wasylyk B (2004) Ets ternary complex transcription factors. *Gene* 324:1–14

16. Cahill MA, Janknecht R, Nordheim A (1995) Signal uptake by the c-fos serum response element. Birkhäuser, Boston, MA. URL: https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6837-3_2
17. Canovas B, Nebreda AR (2021) Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22:346–366
18. Cavigelli M, Dolfi F, Claret FX, Karin M (1995) Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO J* 14:5957–5964
19. Cavigelli M, Dolfi F, Claret FX, Karin M (1995) Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO J* 14:5957–5964
20. Chai J, Tarnawski AS (2002) Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc* 53:147–157
21. Cheung PCF, Campbell DG, Nebreda AR, Cohen P (2003) Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38alpha. *EMBO J* 22:5793–5805
22. Constant SL, Dong C, Yang DD, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA (2000) JNK1 is required for T cell-mediated immunity against *Leishmania major* infection. *J Immunol Baltim Md* 150:2671–2676
23. Crews CM, Erikson RL (1992) Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast *byr1* gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8205–8209
24. Cuadrado A, Nebreda AR (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 429:403–417
25. Cuenda A, Rousseau S (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1773:1358–1375
26. Curran T, Peters G, Van Beveren C, Teich NM, Verma IM (1982) FBJ murine osteosarcoma virus: identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA. *J Virol* 44:674–682
27. Dalhäuser A, Rössler OG, Thiel G (2022) Regulation of c-Fos gene transcription by stimulus-responsive protein kinases. *Gene* 821:146284
28. Dang CV (2012) MYC on the path to cancer. *Cell* 149:22–35
29. Davis RJ (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103:239–252
30. Dayton TL, Jacks T, Vander Heiden MG (2016) PKM2, cancer metabolism, and the road ahead. *EMBO Rep* 17:1721–1730
31. Distel RJ, Ro HS, Rosen BS, Groves DL, Spiegelman BM (1987) Nucleoprotein complexes that regulate gene expression in adipocyte differentiation: direct participation of c-fos. *Cell* 49:835–844
32. Dong C, Yang DD, Wysk M, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Flavell RA (1998) Defective T Cell Differentiation in the Absence of Jnk1. *Science*

33. Dong C, Yang DD, Tournier C, Whitmarsh AJ, Xu J, Davis RJ, Flavell RA (2000) JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. *Nature* 405:91–94
34. Ekici M, Keim A, Rössler OG, Hohl M, Thiel G (2012) Chromatin structure and expression of the AMPA receptor subunit Glur2 in human glioma cells: Major regulatory role of REST and Sp1. *J Cell Biochem* 113:528–543
35. Ely HA, Mellon PL, Coss D (2011) GnRH induces the c-Fos gene via phosphorylation of SRF by the calcium/calmodulin kinase II pathway. *Mol Endocrinol Baltim Md* 25:669–680
36. Ferreiro I, Barragan M, Gubern A, Ballestar E, Joaquin M, Posas F (2010) The p38 SAPK Is Recruited to Chromatin via Its Interaction with Transcription Factors. *J Biol Chem* 285:31819–31828
37. Fialka I, Schwarz H, Reichmann E, Oft M, Busslinger M, Beug H (1996) The estrogen-dependent c-JunER protein causes a reversible loss of mammary epithelial cell polarity involving a destabilization of adherens junctions. *J Cell Biol* 132:1115–1132
38. Fisch TM, Prywes R, Roeder R (1989) An AP1-binding site in the c-fos gene can mediate induction by epidermal growth factor and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Mol Cell Biol*
39. Fowler T, Sen R, Roy AL (2011) Regulation of primary response genes. *Mol Cell* 44:348–360
40. Fu XY, Zhang JJ (1993) Transcription factor p91 interacts with the epidermal growth factor receptor and mediates activation of the c-fos gene promoter. *Cell* 74:1135–1145
41. Fujii M, Tsuchiya H, Chuhjo T, Minamino T, Miyamoto K, Seiki M (1994) Serum response factor has functional roles both in indirect binding to the CArG box and in the transcriptional activation function of human T-cell leukemia virus type I Tax. *J Virol* 68:7275–7283
42. Gao Y, Tao J, Li MO, Zhang D, Chi H, Henegariu O, Kaeck SM, Davis RJ, Flavell RA, Yin Z (2005) JNK1 is essential for CD8+ T cell-mediated tumor immune surveillance. *J Immunol Baltim Md* 175:5783–5789
43. Garcia R, Jove R (1998) Activation of STAT Transcription Factors in Oncogenic Tyrosine Kinase Signaling. *J Biomed Sci* 5:79–85
44. Gilley R, March N, Cook S (2009) ERK1/2, but not ERK5, is necessary and sufficient for phosphorylation and activation of c-Fos. *Cell Signal* 21:969–77
45. Glidewell-Kenney CA, Trang C, Shao PP, Gutierrez-Reed N, Uzo-Okereke AM, Coss D, Mellon PL (2014) Neurokinin B Induces c-fos Transcription via Protein Kinase C and Activation of Serum Response Factor and Elk-1 in Immortalized GnRH Neurons. *Endocrinology* 155:3909–3919
46. Greenberg ME, Ziff EB (1984) Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 311:433–438
47. Gu S, Jin L, Zhang Y, Huang Y, Zhang F, Valdmanis PN, Kay MA (2012) The Loop Position of shRNAs and Pre-miRNAs Is Critical for the Accuracy of Dicer Processing In Vivo. *Cell* 151:900–911

48. Guan Z, Buckman SY, Pentland AP, Templeton DJ, Morrison AR (1998) Induction of Cyclooxygenase-2 by the Activated MEKK1 → SEK1/MKK4 → p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway *. *J Biol Chem* 273:12901–12908
49. Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Dérijard B, Davis RJ (1996) Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* 15:2760
50. Hall A, Meyle KD, Lange MK, Klima M, Sanderhoff M, Dahl C, Abildgaard C, Thorup K, Moghimi SM, Jensen PB, Bartek J, Guldberg P, Christensen C (2013) Dysfunctional oxidative phosphorylation makes malignant melanoma cells addicted to glycolysis driven by the (V600E)BRAF oncogene. *Oncotarget* 4:584–599
51. Hammond S, Bernstein E, Beach D, Hannon G (2000) Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296. *Nature* 404:293–6
52. Hannon GJ (2002) RNA interference. *Nature* 418:244–251
53. Hill CS, Treisman R (1995) Differential activation of c-fos promoter elements by serum, lysophosphatidic acid, G proteins and polypeptide growth factors. *EMBO J* 14:5037
54. Hipskind RA, Roa VN, Muller CGF, Raddy ESP, Nordheim A (1991) Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62TCF. *Nature* 354:531–534
55. Hong S-K, Yoon S, Moelling C, Arthan D, Park J-I (2009) Noncatalytic function of ERK1/2 can promote Raf/MEK/ERK-mediated growth arrest signaling. *J Biol Chem* 284:33006–33018
56. Hu E, Mueller E, Oliviero S, Papaioannou V, Johnson R, Spiegelman B (1994) Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and -independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes. *EMBO J*
57. Ip YT, Davis RJ (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10:205–219
58. Janknecht R, Nordheim A (1992) Elk-1 protein domains required for direct and SRF-assisted DNA-binding. *Nucleic Acids Res* 20:3317–3324
59. Janknecht R, Ernst WH, Pingoud V, Nordheim A (1993) Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *EMBO J* 12:5097–5104
60. Johansen F, Prywes R (1994) Two pathways for serum regulation of the c-fos serum response element require specific sequence elements and a minimal domain of serum response factor. *Mol Cell Biol*
61. Johnson RS, Spiegelman BM, Papaioannou V (1992) Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell* 71:577–586
62. Kennedy NJ, Davis RJ (2003) Role of JNK in tumor development. *Cell Cycle Georget Tex* 2:199–201
63. Kerr EM, Gaude E, Turrell FK, Frezza C, Martins CP (2016) Mutant Kras copy number defines metabolic reprogramming and therapeutic susceptibilities. *Nature* 531:110–113

64. Kim HS, Lee M-S (2007) STAT1 as a key modulator of cell death. *Cell Signal* 19:454–465
65. Kowolik CM, Yee J-K (2002) Preferential transduction of human hepatocytes with lentiviral vectors pseudotyped by Sendai virus F protein. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 5:762–769
66. Lavoie H, Gagnon J, Therrien M (2020) ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21:607–632
67. Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF (2003) c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Mediates Feedback Inhibition of the Insulin Signaling Cascade *. *J Biol Chem* 278:2896–2902
68. Lesch A, Hui X, Lipp P, Thiel G (2015) Transient Receptor Potential Melastatin-3 (TRPM3)–Induced Activation of AP-1 Requires Ca²⁺ Ions and the Transcription Factors c-Jun, ATF2, and Ternary Complex Factor. *Mol Pharmacol* 87:617–628
69. Lesch A, Rössler OG, Thiel G (2017) Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase, c-Jun N-Terminal Protein Kinase, and Calcineurin Regulate Transient Receptor Potential M3 (TRPM3) Induced Activation of AP-1. *J Cell Biochem* 118:2409–2419
70. Lesch A, Backes TM, Langfermann DS, Rössler OG, Laschke MW, Thiel G (2020) Ternary complex factor regulates pancreatic islet size and blood glucose homeostasis in transgenic mice. *Pharmacol Res* 159:104983
71. Lin A (2006) A Five-Year Itch in TNF- α Cytotoxicity: The Time Factor Determines JNK Action. *Dev Cell* 10:277–278
72. Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D (2002) Germline Transmission and Tissue-Specific Expression of Transgenes Delivered by Lentiviral Vectors. *Science* 295:868–872
73. 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
74. Lu C, Shen Q, DuPré E, Kim H, Hilsenbeck S, Brown PH (2005) cFos is critical for MCF-7 breast cancer cell growth. *Oncogene* 24:6516–6524
75. Mahner S, Baasch C, Schwarz J, Hein S, Wölber L, Jänicke F, Milde-Langosch K (2008) C-Fos expression is a molecular predictor of progression and survival in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 99:1269
76. Marti A, Jehn B, Costello E, Keon N, Ke G, Martin F, Jaggi R (1994) Protein kinase A and AP-1 (c-Fos/JunD) are induced during apoptosis of mouse mammary epithelial cells. *Oncogene* 9:1213–1223
77. McDonough PM, Hanford DS, Sprenkle AB, Mellon NR, Glembotski CC (1997) Collaborative roles for c-Jun N-terminal kinase, c-jun, serum response factor, and Sp1 in calcium-regulated myocardial gene expression. *J Biol Chem* 272:24046–24053
78. Milde-Langosch K (2005) The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 41:2449–2461
79. Miniotis MF, Arunan V, Eykyn T, Marais R, Workman P, Leach M, Belouche-Babari M (2013) MEK1/2 inhibition decreases lactate in BRAF-driven human cancer cells. *Cancer Res*

80. Misra RP, Bonni A, Miranti CK, Rivera VM, Sheng M, Greenberg ME (1994) L-type voltage-sensitive calcium channel activation stimulates gene expression by a serum response factor-dependent pathway. *J Biol Chem* 269:25483–25493
81. Monje P, Marinissen MJ, Gutkind JS (2003) Phosphorylation of the carboxyl-terminal transactivation domain of c-Fos by extracellular signal-regulated kinase mediates the transcriptional activation of AP-1 and cellular transformation induced by platelet-derived growth factor. *Mol Cell Biol* 23:7030–7043
82. Morrison DK (2012) MAP Kinase Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a011254
83. Müller I, Endo T, Thiel G (2010) Regulation of AP-1 Activity in Glucose-Stimulated Insulinoma Cells. *J Cell Biochem* 110:1481–1494
84. Müller-Newen G, Heinrich P, Hermanns H, Schaper F (2014) *Prinzipien zellulärer Kommunikation*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. URL: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-17972-3>
85. Murata T, Shinozuka Y, Obata Y, Yokoyama KK (2008) Phosphorylation of two eukaryotic transcription factors, Jun dimerization protein 2 and activation transcription factor 2, in *Escherichia coli* by Jun N-terminal kinase 1. *Anal Biochem* 376:115–121
86. Nateri AS, Spencer-Dene B, Behrens A (2005) Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development. *Nature* 437:281–285
87. Oliveira-Ferrer L, Rößler K, Haustein V, Schröder C, Wicklein D, Maltseva D, Khaustova N, Samatov T, Tonevitsky A, Mahner S, Jänicke F, Schumacher U, Milde-Langosch K (2014) c-FOS suppresses ovarian cancer progression by changing adhesion. *Br J Cancer* 110:753–763
88. O’Neill E, Kolch W (2004) Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *Br J Cancer* 90:283–288
89. Parmenter TJ, Kleinschmidt M, Kinross KM, Bond ST, Li J, Kaadige MR, Rao A, Sheppard KE, Hugo W, Pupo GM, Pearson RB, McGee SL, Long GV, Scolyer RA, Rzos H, Lo RS, Cullinane C, Ayer DE, Ribas A, Johnstone RW, Hicks RJ, McArthur GA (2014) Response of BRAF-mutant melanoma to BRAF inhibition is mediated by a network of transcriptional regulators of glycolysis. *Cancer Discov* 4:423–433
90. Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D (1993) Production of High-Titer Helper-Free Retroviruses by Transient Transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8392–8396
91. Peti W, Page R (2013) Molecular basis of MAP kinase regulation. *Protein Sci Publ Protein Soc* 22:1698–1710
92. Picard D (1993) Steroid-binding domains for regulating the functions of heterologous proteins in cis. *Trends Cell Biol* 3:278–280
93. Piechaczyk M, Blanchard J-M (1994) c-fos proto-oncogene regulation and function. *Crit Rev Oncol Hematol* 17:93–131
94. Preston GA, Lyon TT, Yin Y, Lang JE, Solomon G, Annab L, Srinivasan DG, Alcorta DA, Barrett JC (1996) Induction of apoptosis by c-Fos protein. *Mol Cell Biol* 16:211–218

95. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch R, Davis RJ (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 270:7420-7426. *J Biol Chem* 270:7420–7426
96. Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Dérijard B, Davis RJ (1996) MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 16:1247–1255
97. Rauscher FJ, Sambucetti LC, Curran T, Distel RJ, Spiegelman BM (1988) Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell* 52:471–480
98. Rivera VM, Miranti CK, Misra RP, Ginty DD, Chen RH, Blenis J, Greenberg ME (1993) A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity. *Mol Cell Biol* 13:6260
99. Rössler OG, Giehl KM, Thiel G (2004) Neuroprotection of immortalized hippocampal neurones by brain-derived neurotrophic factor and Raf-1 protein kinase: role of extracellular signal-regulated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Neurochem* 88:1240–1252
100. Rössler OG, Henss I, Thiel G (2008) Transcriptional response to muscarinic acetylcholine receptor stimulation: regulation of Egr-1 biosynthesis by ERK, Elk-1, MKP-1, and calcineurin in carbachol-stimulated human neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys* 470:93–102
101. Rössler OG, Thiel G (2009) Thrombin induces Egr-1 expression in fibroblasts involving elevation of the intracellular Ca²⁺ concentration, phosphorylation of ERK and activation of ternary complex factor. *BMC Mol Biol* 10:40
102. Rössler OG, Thiel G (2015) Regulation of Gene Transcription Following Stimulation of Gαq-Coupled Designer Receptors. *Des Recept Exclus Act Des Drugs* 49–60
103. Rubil S, Rössler OG, Thiel G (2016) CREB, AP-1, ternary complex factors and MAP kinases connect transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3) channel stimulation with increased c-Fos expression. *Br J Pharmacol* 173:305–318
104. Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Zhang M, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L (2003) A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33:401–406
105. Schuck S, Soloaga A, Schratt G, Arthur JSC, Nordheim A (2003) The kinase MSK1 is required for induction of c-fos by lysophosphatidic acid in mouse embryonic stem cells. *BMC Mol Biol* 4:6
106. Schulze A, Nicke B, Warne PH, Tomlinson S, Downward J (2004) The Transcriptional Response to Raf Activation Is Almost Completely Dependent on Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Activity and Shows a Major Autocrine Component. *Mol Biol Cell* 15:14
107. Scott DA, Richardson AD, Filipp FV, Knutzen CA, Chiang GG, Ronai ZA, Osterman AL, Smith JW (2011) Comparative Metabolic Flux Profiling of Melanoma Cell Lines: BEYOND THE WARBURG EFFECT*. *J Biol Chem* 286:42626–42634

108. Seidel HM, Milocco LH, Lamb P, Darnell JE, Stein RB, Rosen J (1995) Spacing of palindromic half sites as a determinant of selective STAT (signal transducers and activators of transcription) DNA binding and transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci* 92:3041–3045
109. Shibuya H, Kohu K, Yamada K, Barsoumian EL, Perlmutter RM, Taniguchi T (1994) Functional dissection of p56lck, a protein tyrosine kinase which mediates interleukin-2-induced activation of the c-fos gene. *Mol Cell Biol* 14:5812–5819
110. Smeal T, Binetruy B, Mercola DA, Birrer M, Karin M (1991) Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature* 354:494–496
111. Spohn D, Rössler O, Philipp S, Raubuch M, Kitajima S, Griesemer D, Hoth M, Thiel G (2010) Thapsigargin Induces Expression of Activating Transcription Factor 3 in Human Keratinocytes Involving Ca²⁺ Ions and c-Jun N-Terminal Protein Kinase. *Mol Pharmacol* 78:865–76
112. Stewart SA (2003) Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA* 9:493–501
113. Sundquist WI, Krausslich H-G (2012) HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006924–a006924
114. Tanner LB, Goglia AG, Wei MH, Sehgal T, Parsons LR, Park JO, White E, Toettcher JE, Rabinowitz JD (2018) Four Key Steps Control Glycolytic Flux in Mammalian Cells. *Cell Syst* 7:49–62.e8
115. Thiel G, Rössler O (2005) Rezeptor-Tyrosinkinase und intrazelluläre Signalkaskaden: Signaltransduktion. *Biol Unserer Zeit* 35:312–319
116. Thiel G, Rössler O (2007) Viren als Werkzeuge der Gentherapie. Wie aus einem Retrovirus ein Gentransfer-Vektor entsteht. *Biol Unserer Zeit* 37:241–248
117. Thiel G, Ekici M, Rössler OG (2009) Regulation of cellular proliferation, differentiation and cell death by activated Raf. *Cell Commun Signal* 7:1–9
118. Thiel G, Rössler OG (2011) Immediate-early transcriptional response to angiotensin II in human adrenocortical cells. *Endocrinology*
119. Thiel G, Rössler OG (2014) Resveratrol stimulates AP-1-regulated gene transcription. *Mol Nutr Food Res* 58:1402–1413
120. Thiel G, Rössler OG (2017) Resveratrol regulates gene transcription via activation of stimulus-responsive transcription factors. *Pharmacol Res* 117:166–176
121. Treisman R (1986) Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell* 46:567–574
122. Treisman R (1992) The serum response element. *Trends Biochem Sci* 17:423–426
123. Ünal EB, Uhlitz F, Blüthgen N (2017) A compendium of ERK targets. *FEBS Lett* 591:2607–2615

124. Voisin L, Saba-El-Leil MK, Julien C, Frémin C, Meloche S (2010) Genetic Demonstration of a Redundant Role of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 (ERK1) and ERK2 Mitogen-Activated Protein Kinases in Promoting Fibroblast Proliferation. *Mol Cell Biol* 30:2918–2932
125. Wagner BJ, Hayes TE, Hoban CJ, Cochran BH (1990) The SIF binding element confers sis/PDGF inducibility onto the c-fos promoter. *EMBO J* 9:4477–4484
126. Wagner EF (2001) AP-1 – Introductory remarks. *Oncogene* 20:2334–2335
127. Wang Y, Prywes R (2000) Activation of the c-fos enhancer by the erk MAP kinase pathway through two sequence elements: the c-fos AP-1 and p62TCF sites. *Oncogene* 19:1379–1385
128. Warburg O (1956) On the Origin of Cancer Cells. *Science* 309–314
129. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R (2004) The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:875–885
130. Weston CR, Davis RJ (2002) The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev* 12:14–21
131. Weston CR, Davis RJ (2007) The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* 19:142–149
132. Whitmarsh AJ, Shore P, Sharrocks AD, Davis RJ (1995) Integration of MAP Kinase Signal Transduction Pathways at the Serum Response Element. *Science* 269:403–407
133. Whitmarsh AJ, Davis RJ (1996) Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med Berl Ger* 74:589–607
134. Whitmarsh AJ, Yang SH, Su MS, Sharrocks AD, Davis RJ (1997) Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Mol Cell Biol* 17:2360–2371
135. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270:1326–1331
136. Xia Z, Dudek H, Miranti CK, Greenberg ME (1996) Calcium Influx via the NMDA Receptor Induces Immediate Early Gene Transcription by a MAP Kinase/ERK-Dependent Mechanism. *J Neurosci* 16:5425–5436
137. Yang D, Tournier C, Wysk M, Lu HT, Xu J, Davis RJ, Flavell RA (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
138. Yang E, Lerner L, Besser D, Darnell JE (2003) Independent and cooperative activation of chromosomal c-fos promoter by STAT3. *J Biol Chem* 278:15794–15799
139. Yasuda J, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sharma M, Davis RJ (1999) The JIP Group of Mitogen-Activated Protein Kinase Scaffold Proteins. *Mol Cell Biol* 19:7245–7254
140. Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis CA, Hua S, Chu GC, Fletcher-Sananikone E, Locasale JW, Son J, Zhang H, Colloff JL, Yan H, Wang W, Chen S, Viale A, Zheng H, Paik J, Lim C, Guimaraes AR, Martin ES, Chang J, Hezel AF, Perry SR, Hu J, Gan B, Xiao Y, Asara JM, Weissleder R, Wang YA, Chin

- L, Cantley LC, DePinho RA (2012) Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell* 149:656–670
141. Yujiri T, Sather S, Fanger GR, Johnson GL (1998) Role of MEKK1 in Cell Survival and Activation of JNK and ERK Pathways Defined by Targeted Gene Disruption. *Science* 282:1911–1914
 142. Zamore P, Tuschl T, Sharp P, Bartel D (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Univ Mass Med Sch Fac Publ* 101:25–33
 143. Zanke BW, Rubie EA, Winnett E, Chan J, Randall S, Parsons M, Boudreau K, McInnis M, Yan M, Templeton DJ, Woodgett JR (1996) Mammalian Mitogen-activated Protein Kinase Pathways Are Regulated through Formation of Specific Kinase-Activator Complexes *. *J Biol Chem* 271:29876–29881
 144. Zennou V, Petit C, Guetard D, Nerhbass U, Montagnier L, Charneau P (2000) HIV-1 Genome Nuclear Import Is Mediated by a Central DNA Flap. *Cell* 101:173–185
 145. Zhang F, Strand A, Robbins D, Cobb MH, Goldsmith EJ (1994) Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* 367:704–711
 146. Zhang J, Zhang F, Ebert D, Cobb MH, Goldsmith EJ (1995) Activity of the MAP kinase ERK2 is controlled by a flexible surface loop. *Struct Lond Engl* 3:299–307
 147. Zhang J, Zhang D, McQuade JS, Behbehani M, Tsien JZ, Xu M (2002) c-fos regulates neuronal excitability and survival. *Nat Genet* 30:416–420
 148. Transkriptionsfaktoren. URL: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/transkriptionsfaktoren/67279>

Publikation

Alisia K. Dalhäuser, Oliver G. Rössler, Gerald Thiel (2022):

Regulation of c-Fos gene transcription by stimulus-responsive protein kinases

Gene, Volume 821,146284, ISSN 0378-1119

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146284>

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben. Allen voran gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Gerald Thiel mein herzlicher Dank für die Bereitstellung meines Themas und die freundliche Betreuung meiner Arbeit.

Ich möchte mich auch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die großartige Arbeitsatmosphäre und die vielen konstruktiven Gespräche bedanken. Insbesondere danke ich Dr. Oliver Rößler, der mir immer mit großer Geduld mit Rat und Tat zur Seite stand. Mein besonderer Dank gilt auch Helen, Niko und Lars, die die gemeinsame Zeit im Labor auf vielfältige Weise geprägt und bereichert haben. Maxi und Daniel danke ich für ihre fachliche Unterstützung und Anleitung, für ihre Zeit und die vielen hilfreichen Ideen.

Meinen Eltern möchte ich an dieser Stelle für die Unterstützung während meines gesamten Studiums und während der Fertigstellung dieser Arbeit danken. Auch meinen Freund*innen möchte für die liebevolle Unterstützung danken. Johanna, Sarah, Nadine, Julia und Catherine, sowie allen anderen, die mich über die letzten Jahre begleitet haben, gilt mein herzlicher Dank. Ohne Euch alle wäre das nicht möglich gewesen.