

Regulation der Phosphorylierung des NF- κ B reprimierenden Faktors (NRF)

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biochemiker
Sascha Rother
geboren am 15.06.1979 in Bad Gandersheim

2008

Referentin:

**PD Dr. Mahtab Nourbakhsh
Institut für Pharmakologie
Medizinische Hochschule Hannover**

Korreferent:

**Prof. Dr. Jürgen Alves
Institut für Biophysikalische Chemie
Medizinische Hochschule Hannover**

Tag der Promotion:

07. August 2008

Zusammenfassung

Sowohl die Zielgene von Zytokinen, als auch Zytokingene selbst werden durch einen Verbund verschiedener Transkriptionsfaktoren reguliert, die vielfältige Kombinationsmöglichkeiten für eine differentielle Genaktivierung bieten. Eine wichtige Schaltstelle ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B, der an der Induktion einer Vielzahl proinflammatorischer Gene beteiligt ist. Dabei spielen sowohl posttranslationale Modifikationen (u.a. Phosphorylierung) durch aktivierte Kinasen (z.B. SAPK/JNK) eine wesentliche Rolle als auch die damit einhergehende Regulation der wechselseitigen Interaktion zwischen den einzelnen Bestandteilen der Transkriptionsmaschinerie. Der NF- κ B Reprimierende Faktor (NRF) ist ein konstitutiv phosphorylierter Transkriptionsfaktor und unterbindet die basale Expression der Zytokine IFN- β und IL-8, sowie die der Zytokin-induzierten iNOS (induzierbare NO-Synthase). Bei zellulärer Stimulation von Zellen durch Zytokine, wie IL-1, verliert NRF andererseits seine inhibitorische Wirkung und bekommt die Eigenschaft eines Koaktivators am IL-8 Promotor. Frühere Untersuchungen deuteten darauf hin, dass NRF nach Stimulation dephosphoryliert wird. Die Modulation der NRF-Aktivität stellt daher eine therapeutische Strategie für entzündliche Reaktionen dar, die primär durch Zytokine koordiniert werden.

Vor diesem Hintergrund wurde versucht, die Phosphorylierung von NRF im unstimulierten sowie im IL-1 bzw. Virus stimulierten Zustand zu kartieren. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Deletionsmutanten *in vitro* radioaktiv phosphoryliert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass NRF im nicht stimulierten Zustand innerhalb der Aminosäuren 1-112 sowie 390-486 phosphoryliert vorliegt und dass diese Bereiche ebenfalls das Ziel einer gesteigerten IL-1 abhängigen Phosphorylierung sind. Die IL-1 induzierte Phosphorylierung kann durch Zugabe eines JNK-Inhibitors spezifisch reduziert werden. Die Stimulation durch Virus (NDV) bewirkt langfristig eine Reduktion der Phosphorylierung. Dies unterstützt die Vermutung, dass die stimulationsabhängige unterschiedliche transkriptionelle Aktivität von NRF mit einer differentiellen Phosphorylierungskinetik korreliert. Weitergehende Untersuchungen mittels Phosphoaminosäureanalyse konnten zeigen, dass NRF Serin/Threonin phosphoryliert wird und dass besonders Serine für die IL-1 induzierte Phosphorylierung eine Rolle spielen. Die Phosphopeptidkartierung der phosphorylierten Bereiche ergab dabei Hinweise auf die Phosphorylierung der Serine 35, 106, 422 und 429. *In silico* Vorhersagen zusammen mit Mutationsstudien konnten eine Beteiligung an der IL-1 induzierten Phosphorylierung bestätigen. Die Deletion der Aminosäuren 421-429 bewirkte dabei mit 56% im unstimulierten Zustand bzw. mit 61% nach IL-1 Stimulation die größte Reduktion. Dies wirft die Frage nach der Funktion dieser Phosphorylierungsstellen auf, zumal frühere Untersuchungen zeigten, dass die Aminosäuren 1-389 für die transkriptionelle Aktivität von NRF hinreichend sind. Die Bemühungen, die Phosphorylierungsstellen mittels

biosynthetischer Markierung sowie durch massenspektrometrische Analyse *in vivo* zu verifizieren, blieben bislang leider erfolglos.

Dennoch wirft die in dieser Arbeit erzielte nahezu vollständige Kartierung ein neues Licht auf NRF und die mögliche Funktion seiner Phosphorylierung im Zusammenspiel mit anderen zellulären Komponenten. Diese wird in einem hypothetischen Modell abschließend vorgestellt.

Schlagwörter: NRF, NF- κ B, Proteinphosphorylierung

Abstract

Target genes of cytokines, as well as cytokine genes themselves, are regulated by an assembly of various transcription factors offering manyfold combinatorial possibilities for differential gene expression. The transcription factor NF- κ B has an important function in the induction of several pro-inflammatory genes. Posttranslational modifications, like protein phosphorylation by activated kinases (e.g. SAPK), are also crucial, as they mediate interactions between the single components of the transcription complex.

NF- κ B Repressing Factor (NRF) is a constitutively phosphorylated transcription factor and inhibits basal transcription of cytokine genes, like IFN- β and IL-8, as well as inducible NO synthase (iNOS). Following cellular stimulation by IL-1, NRF no longer inhibits but coactivates transcription at the IL-8 promoter. Earlier experiments indicated that NRF was dephosphorylated after cellular stimulation. As the modulation of NRF activity offers therapeutic strategies against inflammatory diseases impelled by cytokines, the aim of this study was to map the phosphorylation-sites of NRF in the presence and absence of stimuli. For this purpose several truncated NRF proteins were *in vitro* phosphorylated using radioactive labelling. Further investigation showed that phosphorylation in the basal state takes place in amino acids 1-112 and 390-486. These are also targets of IL-1 induced phosphorylation and phosphorylation can be partly inhibited by a JNK inhibitor. Stimulation with Virus, however, causes a long-term reduced phosphorylation of NRF, which emphasises the notion that stimulation-dependent transcriptional activity of NRF correlates with differential phosphorylation behaviour.

Phosphoamino-acid analysis further showed that NRF is constitutively phosphorylated on serine and threonine residues and that stimulation with IL-1 causes an increased phosphorylation on serines. Performing phosphopeptide mapping of the phosphorylation-prone segments serines 35, 106, 422 and 429 could be elucidated as potential targets. These were confirmed by using *in silico* predictions combined with mutational analysis. Thus the deletion of the amino acids 421-429 resulted in a 56% and 61% loss of constitutive and IL-1 induced phosphorylation respectively. As earlier studies showed that amino acids 1-389 are sufficient for transcriptional activity, the functional relevance of these findings is to be questioned. Alas, all efforts to verify phosphorylation-sites of NRF *in vivo* using biosynthetic labelling and mass spectrometry have unfortunately so far been futile.

Still this work sheds new light on the phosphorylation of NRF and its possible interaction with other cellular components which finally has been used to create a hypothetical model.

Key words: NRF, NF- κ B, protein phosphorylation

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Phosphorylierung von Proteinen	1
1.1.1 Proteinphosphorylierung – eine posttranslationale Modifikation	1
1.1.2 Regulation der Proteinphosphorylierung	1
1.2 Proteinphosphorylierung und Signaltransduktion	2
1.2.1 Phosphorylierungsspezifische Protein-Protein-Interaktionen	2
1.3 Analysemethoden der Proteinphosphorylierung	3
1.3.1 Proteinbiochemie	3
1.3.2 Massenspektrometrie	3
1.3.3 <i>In silico</i>	4
1.4 Regulation der Transkription	4
1.4.1 Allgemeines	4
1.4.2 Kommunikation zwischen Zytosol und Zellkern	5
1.4.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)	6
1.4.3.1 MAPK-Kaskaden	6
1.4.3.2 Regulation der Aktivität und Substratspezifität der MAPK	6
1.4.3.3 MAPK als Transkriptionsfaktoren	8
1.4.4 Der Nukleäre Faktor- (NF-) κ B	8
1.4.4.1 Die Familie der NF- κ B-Transkriptionsfaktoren	8
1.4.4.2 Aktivierung und Regulation von p65 NF- κ B	9
1.4.4.3 Interaktion von NF- κ B mit anderen Transkriptionsfaktoren	10
1.5 Der NF-κB reprimierende Faktor in der Expression proinflammatorischer und antiviraler Gene	10
1.5.1 Prozesse der Entzündung und der unspezifischen Immunantwort	10
1.5.2 Die IL-1 vermittelte IL-8 Expression	11
1.5.3 Die Infektion durch Viren induziert die Interferonexpression	11
1.5.4 Der NF- κ B reprimierende Faktor (NRF)	13
1.6 Fragestellung	14

2. Ergebnisse	15
2.1 Proteinphosphorylierung im zellfreien System	15
2.1.1 Radiometrischer Kinaseassay	15
2.1.2 Phosphorylierung der GST-Domäne	16
2.2 Phosphorylierung von GST-NRF-Fusionsproteinen	17
2.2.1 Klonierung der NRF-Deletionsmutanten und Herstellung der GST-Fusionsproteine in <i>E. coli</i>	18
2.2.2 Zeitliche Kinetik der Phosphorylierung von NRF	19
2.2.3 Phosphorylierung von NRF-Deletionsmutanten durch Kernlysate unstimulierter HeLa-Zellen	21
2.2.4 Phosphoaminosäureanalyse (PAA) der basalen Phosphorylierung von NRF	24
2.3 Zytokin regulierte Phosphorylierung von NRF	28
2.3.1 IL-1 β Stimulation von HeLa-Zellen	28
2.3.2 Kontrolle der Signalinduktion durch Messung der IL-1 regulierten JNK-Aktivität an einem GST-Jun-Fusionsprotein	30
2.3.3 IL-1 abhängige Phosphorylierung der NRF-Deletionsmutanten	32
2.3.3.1 Phosphorylierung von NRF1-449	32
2.3.3.2 Phosphoaminosäureanalyse der IL-1 abhängigen Phosphorylierung von NRF1-449	34
2.3.3.3 Phosphorylierung von NRF1-112	38
2.3.3.4 Phosphorylierung von NRF112-449	39
2.3.3.5 Phosphorylierung von NRF390-486	41
2.3.3.6 Phosphorylierung von NRF447-690	43
2.3.4 IL-1 induzierte Phosphorylierung durch Kernlysate aus HEK-293R1-Zellen	45
2.4 Regulation der NRF-Phosphorylierung nach Virusinfektion	48
2.4.1 Infektion von HeLa-Zellen mit dem Newcastle Disease Virus (NDV)	49
2.4.2 NDV abhängige Phosphorylierung von NRF1-449	50
2.4.3 NDV abhängige Phosphorylierung von NRF390-486	52
2.5 Phosphopeptidkartierung nach <i>in vitro</i> Phosphorylierung (<i>Phosphopeptide Mapping</i>) in Abhängigkeit einer IL-1 Stimulation	54
2.5.1 Phosphopeptidkartierung von NRF1-112	54

2.5.2 Phosphopeptidkartierung von NRF112-449	58
2.6 Identifikation phosphorylierter Aminosäuren in NRF	60
2.6.1 Eingrenzung der zu untersuchenden Aminosäuren durch Computer gestützte Vorhersageprogramme (<i>in silico</i>)	60
2.6.2 Phosphorylierung der Doppelmutante S35/T36/A (STA)	63
2.6.3 Phosphorylierung der Dreifachmutante Y97/Y100/S106/A (Mu1)	66
2.6.4 Phosphorylierung der Deletionsmutante delta 421-429 (delta1)	68
2.7 Inhibition der Phosphorylierung von NRF im zellfreien System	70
2.7.1 Phosphorylierung unter Zusatz von Inhibitoren der Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK)	70
2.8 Untersuchungen zur <i>in vivo</i> Phosphorylierung	72
2.8.1 Biosynthetische Markierung von überexprimiertem NRF-Strep Fusionsprotein mit ³² P-Orthophosphat	72
2.8.2 Massenspektrometrische Untersuchungen zur Phosphorylierung von überexprimiertem NRF-Strep Fusionsprotein	76
2.8.2.1 Affinitätsaufreinigung von NRF-Strep durch das One-STrEP™-System (IBA)	76
2.8.2.2 Präparation von NRF-Strep durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	79
2.8.2.3 Untersuchung der NRF-Strep Proteingelbande auf potenzielle Phosphorylierungsstellen mittels MALDI-TOF-MS und nLC-ESI-MS/MS	80
3. Diskussion	83
3.1 Vorwort	83
3.2 Phosphorylierung von NRF im zellfreien System	83
3.2.1 Das GST-Fusionssystem und die Aufreinigung der GST-NRF Fusionsproteine	83
3.2.2 Das GST-Fusionssystem im <i>in vitro</i> Kinasezymtest (<i>Kinase assay</i>)	84
3.3 Konstitutive Phosphorylierung von NRF	85
3.3.1 Reproduzierbarkeit der <i>in vitro</i> Phosphorylierung	85
3.3.2 Basale Phosphorylierung von NRF im Bereich der Aminosäuren 1-112 und 390-486	86
3.3.3 Basale Serin- und Threonin-Phosphorylierung von NRF	87

3.4 Phosphorylierung von NRF in Abhängigkeit zellulärer Stimulation durch Zytokine bzw. Virus	88
3.4.1 IL-1 β abhängige Phosphorylierung der NRF-Deletionsmutanten	88
3.4.2 Vergleich der IL-1 induzierten Phosphorylierung durch Kernlysate aus HEK-293R1-Zellen	90
3.4.3 Serinphosphorylierung von NRF1-449 nach IL-1 Stimulation	91
3.4.4 Phosphopeptidkartierung von NRF	92
3.4.4.1 Etablierung der Phosphopeptidkartierung	92
3.4.4.2 Phosphopeptidkartierung von NRF1-112	92
3.4.4.3 Phosphopeptidkartierung von NRF112-449	93
3.4.5 Phosphorylierung von NRF-1-449 und NRF390-486 nach Stimulation durch NDV	94
3.5 Untersuchung der vorhergesagten Phosphorylierungsstellen in den NRF-Mutanten STA, Mu1 und delta1	96
3.5.1 Ergebnisse der <i>in silico</i> Vorhersagen	96
3.5.2 Untersuchung der Alaninmutanten STA und Mu1 sowie der Deletionsmutante delta1	97
3.6 Reduktion der IL-1 induzierten Phosphorylierung durch den JNK-Inhibitor SP600125	98
3.7 <i>In vivo</i> Phosphorylierung von NRF	99
3.7.1 Radioaktive Markierung von NRF-Strep	99
3.7.2 Massenspektrometrische Analyse von NRF-Strep	100
3.8 Die Phosphorylierung von NRF im zellulären Zusammenhang – ein Modell	100
4. Material und Methoden	104
4.1 Material	104
4.1.1 Chemikalien	104
4.1.2 Gebrauchsfertige Lösungen, Reagenzien und Anwendungspakete (Kits)	106
4.1.3 Stamm- und Gebrauchslösungen/Puffer	107
4.1.4 DNA- und Proteinstandards	110
4.1.5 Proteine, Enzyme und Zytokine	110
4.1.6 Kulturmedien und –agar	111

4.1.7 Zelllinien, Bakterienstämme und Viren	111
4.1.8 Plasmide und Oligonukleotide (Primer)	112
4.1.9 Verbrauchsmaterial	113
4.1.10 Geräte	114
4.1.11 Computersoftware	116
4.2 Methoden	117
4.2.1 Arbeiten mit humanen Zelllinien	117
4.2.1.1 Kultivierung von HeLa- und HEK-Zellen	117
4.2.1.2 Lagerung von HeLa- und HEK-Zellen	117
4.2.1.3 Transfektion von HeLa ACC 57-Zellen	117
4.2.1.4 Stimulation von HeLa- und HEK-Zellen	118
4.2.1.5 Biosynthetische Markierung von HeLa ACC 57-Zellen mit ³² P-ortho- Phosphorsäure	118
4.2.1.6 Fraktionierte Zellyse von HeLa B und HEK 293R1-Zellen zur Präparation der Kernfraktion	119
4.2.1.7 Gesamtzellyse von HeLa ACC 57-Zellen zur Aufreinigung von überexprimiertem NRF-Strep-Protein	119
4.2.2 Arbeiten mit Bakterien (<i>Escherichia coli</i>)	120
4.2.2.1 Lagerung und Kultivierung	120
4.2.2.2 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA (Hitzeschock-Methode)	120
4.2.2.3 IPTG-Induktion von <i>E. coli</i> BL21 zur Produktion rekombinater GST- Fusionsproteine	121
4.2.3 Arbeiten mit DNA	122
4.2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (XL1-Blue)	122
4.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	123
4.2.3.3 Elektrophoretische Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese	123
4.2.3.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	123
4.2.3.5 Restriktionsschnitte	123
4.2.3.6 Ligation	124
4.2.3.7 <i>In vitro</i> Mutagenese	124
4.2.3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	125
4.2.3.9 Klonierungsstrategien der verwendeten Plasmide	126

4.2.3.9.1 Klonierung der Plasmide pGST-NRF1-449, pGST-NRF1-449Mu1 und pGST-NRF112-449	126
4.2.3.9.2 Klonierung des Plasmids pGST-NRF1-389	128
4.2.3.9.3 Klonierung des Plasmids pGST-NRF447-690	129
4.2.3.9.4 Klonierung des Plasmids pGST-NRF390-690	130
4.2.3.9.5 Klonierung des Plasmids pGST-NRF390-486	131
4.2.3.9.6 Klonierung des Plasmids pNRF2722Strep	132
4.2.4 Arbeiten mit Proteinen	133
4.2.4.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	133
4.2.4.2 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen	133
4.2.4.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	133
4.2.4.4 Elektrophoretischer Membrantransfer von Proteinen (Western Blot, semi-dry)	134
4.2.4.5 Proteinfärbungen	135
4.2.4.6 Nachweis von NRF-Strep	135
4.2.4.7 Präparation rekombinanter GST-NRF-Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i> BL21	136
4.2.4.8 Präparation von überexprimiertem NRF-Strep aus HeLa-Zellen	136
4.2.4.9 <i>In vitro</i> Phosphorylierung von GST-NRF-Fusionsproteinen (Kinase-Assay)	137
4.2.4.10 Phosphoaminosäureanalyse	137
4.2.4.11 Phosphopeptidkartierung (Phosphopeptide Mapping)	138
4.2.4.12 Massenspektrometrische (MS) Untersuchung der Proteinphosphorylierung	139
4.2.5 Computer-gestützte (<i>in silico</i>) Vorhersage von Phosphorylierungsstellen	139
5. Literaturverzeichnis	140
Abkürzungen	vii
Lebenslauf	
Liste der Publikationen	
Selbstständigkeitserklärung	
Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

% (w/v)	Prozent Gewicht/Vol. (<i>percent weight/volume</i>): Prozentangabe; der Zahlenwert der Masse des eingewogenen Stoffes in g beträgt den angegebenen Prozentsatz des Volumens des Lösungsmittels
% (v/v)	Prozent Vol./Vol. (<i>percent volume/volume</i>): Prozentsangabe; der Zahlenwert des Volumens des betreffenden Stoffes beträgt den angegebenen Prozentsatz des Lösungsmittelvolumens
A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Amp (Amp ^R)	Ampicillin (~Resistenz)
AP-1	Aktivierendes Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ARD	Aktive Repressionsdomäne
ATF-2	Aktivierender Transkriptionsfaktor 2
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine serum albumin</i>)
C	Cytosin
ca.	zirka
CDK	Cyclin abhängige Kinase(n)
CK	Caseinkinase
CMV	Cytomegalovirus
cpm	Pulse pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CREB	cAMP responsives Element (CRE) bindendes Protein
CTD	Carboxyterminale Domäne
CTP	Cytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotid (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
dpm	Zerfälle pro minute (<i>desintegrations per minute</i>)
ds	doppelsträngig (<i>double-stranded</i>)
DTT	Dithiothreitol

EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth-factor</i>)
ERK	Extrazellulärsignal-regulierte Kinase
FBP-11	Formin bindendes Protein 11
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf-serum</i>)
G	Guanin
ggf.	gegebenenfalls
GSK-3	Glycogensynthase-Kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
HDAC	Histon-Deacetylase
HIV	Humanes Immunodefizienzvirus
i.A.	im Allgemeinen
IFN	Interferon
I κ B	Inhibitor κ B
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
<i>in silico</i>	'im Silizium' (Computer basiert)
IRF	IFN regulierender Faktor
JNK	Jun-N-terminale Kinase
kb	Kiobase(n), entspricht 1000 bp (Basenpaaren)
LB	Luria-Bertani
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MKK	MAPK Kinase
NDV	Newcastle Disease Virus
NEMO	NF- κ B essential modifier
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NRE	Negatives regulatorisches Element
NRF	NF- κ B reprimierender Faktor
OD _x	Optische Dichte (Extinktion) bei x nm
p	Plasmid
P	Prolin
P _i	(anorganisches) Phosphat

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pS	Phosphoserin
pT	Phosphothreonin
pY	Phosphotyrosin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
Pol.	Polymerase
PTEFb	Positiver Transkriptions-Elongations-Faktor
RHD	Rel-Homologie Domäne
(m) RNA	(messenger) Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAP	RNA-Polymerase
RT	Raumtemperatur (25°C)
s.	siehe
SAPK	Stress aktivierte Proteinkinase
s.o./s.u.	siehe oben/unten
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
SH2/-3	Src-Homologie Domäne 2/3
ss	einzelsträngig (<i>single-stranded</i>)
SV	Sendai Virus
T	Thymin bzw. Threonin
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	TRIS gepufferte Kochsalzlösung
TLR	Toll ähnlicher Rezeptor (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF	Tumornekrose-Faktor
tTA	Tetracyclin kontrollierter Transaktivator
TTP	Thymidintriphosphat
u.a.	unter anderem
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel

Verwendete Einheiten (in SI-Basiseinheiten)

°C	Grad Celsius, $^{\circ}\text{C} = (x+273,15) \text{ K}$
Da	Dalton, $1 \text{ Da} = 1,66 \times 10^{-27} \text{ kg}$
g	Gramm, $1 \text{ g} = 10^{-3} \text{ kg}$
g	Erdbeschleunigung, $1 \times g = 9.81 \text{ m/s}^2$
l	Liter, $1 \text{ l} = 10^{-3} \text{ m}^3$
M	Molar, $1 \text{ M} = 1 \text{ mol/l} = 10^3 \text{ mol/m}^3$
U	unit; Einheit der enzymatischen Aktivität, Definition abhängig von der katalysierten Reaktion
Upm	Umdrehungen pro Minute (rpm), $1 \text{ Upm} = 1/60 \text{ s}^{-1}$
V	Volt, $1 \text{ V} = 1 \text{ kg m}^2 / (\text{s}^3 \text{ A})$

1. Einleitung

1.1 Die Phosphorylierung von Proteinen

1.1.1 Proteinphosphorylierung – eine posttranslationale Modifikation

Die Lebensäußerung einer Zelle basiert auf der Gesamtheit ihrer Proteine, dem Proteom. Die Aktivität der einzelnen Proteine, ihre Stabilität, Zelllokalisierung sowie Protein-Protein-Interaktionen sind dabei fortwährenden Änderungen unterworfen, die in Anpassung der Zelle an die jeweilige Funktion, den physiologischen Zustand sowie extrazelluläre Reize erfolgen.

Posttranslationale Modifikationen der Proteine fungieren dabei als wesentliche Kontrollmechanismen, da sie keine primäre *de novo* Proteinsynthese erfordern [Hunter & Karin, 1992]. Vor allem die Proteinphosphorylierung hat sich aufgrund ihrer Schnelligkeit als verbreitetes Steuerelement in diversen Zellfunktionen erwiesen. Betont wird dies durch die Tatsache, dass ca. 30% aller zellulären Proteine phosphoryliert vorliegen. Fehlregulationen der Proteinphosphorylierung sind eine der Hauptursachen diverser Krankheiten des Immunsystems sowie der Krebsentstehung [Cohen, 2000].

1.1.2 Regulation der Proteinphosphorylierung

Bei der Proteinphosphorylierung wird die γ -Phosphatgruppe von ATP (GTP) durch Proteinkinasen (Kinasen) auf eine Hydroxyaminosäure (Serin, Threonin und Tyrosin) des Proteins übertragen. Im humanen Genom kodieren 518 bekannte Gene für Kinasen verschiedener Familien [Manning *et al.*, 2002]. Alle Kinasen besitzen homologe und konservierte Domänen zur Bindung des Kosubstrates ATP sowie zweiwertiger Metallionen (Mg^{2+}) [Johnson *et al.*, 1998]. Im Gegensatz gibt es sequentielle und damit strukturelle Unterschiede im katalytischen Zentrum der Kinasen, die, unabhängig von der Umgebung der modifizierten Aminosäure im Substrat, entweder die Phosphorylierung der β -Hydroxyaminosäuren Serin und Threonin oder des aromatischen Tyrosins erlauben. Entsprechend lassen sich Kinasen Serin-/Threonin spezifischen bzw. Tyrosin spezifischen Familien zuordnen [Taylor *et al.*, 1995].

Daneben existiert eine dritte Familie von Kinasen, die in Bezug auf die modifizierte Aminosäure eine duale Spezifität zeigen. Die strukturellen Voraussetzungen im katalytischen Zentrum sowie die physiologische Relevanz im Hinblick auf die jeweiligen Substrate sind nicht vollständig geklärt [Lindberg *et al.*, 1992]. Jedoch ist die Bedeutung der dual-spezifischen Kinasen innerhalb von Kinasekaskaden und ihre Beteiligung an der zellulären Signalleitung gesichert (1.3.4 ff.) [Dhanasekaran & Reddy, 1998].

Phosphoproteinphosphatasen (Phosphatasen) dephosphorylieren die jeweiligen Phosphoproteine und üben damit eine wesentliche Kontrollfunktion aus. Zusammen bewirken Kinasen und Phosphatasen die Einstellung eines dynamischen Gleichgewichts zwischen der phosphorylierten und nicht phosphorylierten Form eines Proteins (**Abb. 1.1**), wobei ihre eigene Aktivität selbst durch (De-) Phosphorylierung reguliert wird. Die Reversibilität der Modifikation ermöglicht so die Vernetzung unterschiedlicher Regelkreise innerhalb der Zelle.

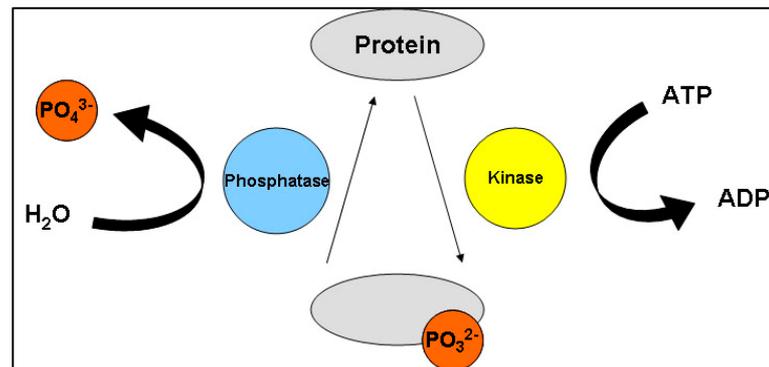


Abb. 1.1 Kinasen und Phosphatasen vermitteln ein Gleichgewicht zwischen der phosphorylierten und nicht phosphorylierten Form eines Proteins

1.2 Proteinphosphorylierung und Signaltransduktion

Zellen reagieren auf äußere Veränderungen mit einer Anpassung der Genexpression. Die Übertragung eines extrazellulären Reizes über die Zellmembran und seine Weiterleitung innerhalb der Zelle in den Zellkern zur Geninduktion bezeichnet man als Signaltransduktion. Die Phosphorylierung von Proteinen wurde als essentieller Regulationsmechanismus dieser Prozesse identifiziert.

1.2.1 Phosphorylierungsspezifische Protein-Protein-Interaktionen

Die Signalübertragung erfordert konzertierte sowie sequentielle Protein-Protein-Interaktionen, die größtenteils phosphorylierungsabhängig vermittelt werden. Die Bindung extrazellulärer Signalmoleküle an membrangebundene Rezeptoren bewirkt deren Dimerisierung und Autophosphorylierung an Tyrosinen sowie die sukzessive Rekrutierung oligomerer Adapterproteine. Rezeptoren ohne intrinsische Kinaseaktivität bilden binäre Komplexe mit zytosolischen Tyrosinkinasen [Hunter, 2000]. Adapterproteine enthalten Phosphotyrosin bindende Domänen, die eine wesentliche molekulare Grundlage der Signalweiterleitung innerhalb der Zelle bilden [Pawson & Gish, 1992]. Entsprechend existieren Domänen sowie Proteine, die modulartig phosphorylierte Serine bzw. Threonine erkennen und binden, z.B. WW-

Domänen [Lu *et al.*, 1999] und 14-3-3 Proteine [Fu *et al.*, 2000]. Protein-Protein-Interaktionen erhöhen die lokale Proteinkonzentration und tragen auf diese Weise zu einer effizienteren Weiterleitung des Signals innerhalb der Zelle bei. Gleichzeitig ermöglichen sie sowohl die Spezifität der Signalübertragung als auch die Integration verschiedener Signale in einer Zellantwort [Pawson & Nash, 2000].

1.3 Analysemethoden der Proteinphosphorylierung

Die Bedeutung der Phosphorylierung von Proteinen hat zur Entwicklung unterschiedlicher Methoden geführt, um diese zu charakterisieren. Diese lassen sich drei Kategorien zuordnen: der Protein(bio-)chemie, massenspektrometrischen Verfahren sowie Computer gestützten Vorhersagen (*in silico*) [Hjerrild & Gammeltoft, 2006]).

1.3.1 Proteinbiochemie

Die klassische proteinchemische Strategie in der Vergangenheit war die radioaktive Markierung der Proteine *in vivo* durch Verwendung von ^{32}P -*ortho*-Phosphorsäure bzw. *in vitro* mittels Kinasen und γ - ^{32}P -ATP. Darauf aufbauend lassen sich weitere Analysen durchführen (z.B. Phosphoaminosäureanalyse, 2D-Phosphopeptidkartierung, Edman-Sequenzierung). Trotz des nachteiligen Einsatzes teilweise größerer Mengen radioaktiver Substanzen hat die Sensitivität dieser Methoden zu ihrem Bestehen beigetragen [Loyet *et al.*, 2005]. Ergänzend sind immunbiochemische Charakterisierungen mittels phosphospezifischer Antikörper sowie die Aminosäure-spezifische Mutagenese hinzu gekommen. Die Entwicklung spezifischer Kinaseinhibitoren hat weitere Möglichkeiten geschaffen [Hjerrild & Gammeltoft, 2006; English & Cobb, 2002].

1.3.2 Massenspektrometrie

Ein wesentlicher Nachteil sämtlicher proteinchemischer Methoden ist der damit verbundene zeitliche und experimentelle Aufwand. Deshalb existiert das Bestreben Hochdurchsatz-Verfahren zur Analyse von Proteinphosphorylierung (und anderen posttranslationalen Modifikationen) zu etablieren. Die Massenspektrometrie ist ein solches Verfahren und wird inzwischen auf der Proteomebene angewandt [Mann *et al.*, 2002; Ptacek & Snyder, 2006]. Sie ermöglicht mittels Fragmentierung der Proteine nicht nur den Nachweis der Phosphorylierung, sondern durch Subfragmentierung auch die genaue Zuordnung zu einzelnen Aminosäuren. Dies hat zur Verbreitung der Methode in den letzten Jahrzehnten geführt [Loyet *et al.*, 2005]. Dennoch machen die geringe Stöchiometrie zellulärer Phosphorylierung, die häufige Ionisationssuppression phosphorylierter Peptide sowie mögliche β -Eliminierungen an

phosphorylierten Serinen und Threoninen die Detektion technisch anspruchsvoll [Mann *et al.*, 2002]. Dies und die finanziellen Kosten massenspektrometrischer Ausrüstungen tragen dazu bei, dass den klassischen Methoden noch immer eine grundlegende experimentelle Bedeutung zukommt [Loyet *et al.*, 2005].

1.3.3 *In silico*

Die dritte Säule der Aufklärung von Phosphorylierung wird auch als „*in silico*“ Methode bezeichnet, da sie auf der Verwendung Computer gestützter Programme beruht. Bedingt durch Mutationsanalysen und die Charakterisierung zahlreicher Substrate von Kinasen wurden Datenbanken erstellt, die eine immer größer werdende Zahl verschiedener Kinasefamilien einbeziehen. Die Nutzung dieser Datenbanken sowie weiterer experimenteller Ansätze [Obenauer *et al.*, 2003] ermöglicht den Programmen (mathematischen Algorithmen) die Vorhersage potenzieller Phosphorylierungsstellen, indem die Aminosäuresequenz des potenziellen Substrates mit experimentellen bzw. theoretischen Konsensusmotiven der entsprechenden Kinasen verglichen und ein jeweiliger *Score* errechnet wird. In jüngster Zeit ist auch die Zahl der verfügbaren Programme sprunghaft angestiegen und erlaubt vergleichende Untersuchungen [Hjerrild & Gammeltoft, 2006]. Doch nicht nur die Vorhersage der Phosphorylierung allein ist wichtig. Erst die Kenntnis der Funktion z.B. phosphorylierter Motive als Protein-Protein-Interaktionsmodule ermöglicht die Einordnung der posttranslationalen Modifikation in den zellulären Kontext [Punternvoll *et al.*, 2003]. So lassen sich komplette Netzwerke zellulärer Phosphorylierungen und phosphorylierungsabhängiger Interaktionen erstellen. Zwar bedürfen sämtliche Vorhersagen einer experimentellen Validierung. Dennoch können sie experimentelle Vorhaben gezielter gestalten und experimentelle Befunde besser in den zellulären Kontext einordnen helfen. So werden sich die Methoden zur Aufklärung von Proteinphosphorylierung auch in der nahen Zukunft aus allen drei genannten Säulen zusammensetzen [Hjerrild *et al.*, 2004].

1.4 Regulation der Transkription

1.4.1 Allgemeines

Die Transkription ist der erste Schritt im Prozess der Genexpression und unterliegt einer strikten Regulation. Als Steuerungsmodule der Gene dienen Promotoren. Dabei handelt es sich um funktionelle Abschnitte der nicht kodierenden Sequenz, an die Transkriptionsfaktoren binden. Dabei beeinflussen Transkriptionsfaktoren durch Kontrolle der Genpromotoren positiv oder

negativ die Transkription. Die Kontrolle über Transkriptionsfaktoren wird über zwei wesentliche Mechanismen gesteuert, ihre subzelluläre Lokalisation sowie durch Phosphorylierung.

Das Genom weist darüber hinaus eine höhere Organisation auf und ist durch seine Histon-Chromatin-Struktur komprimiert. Die Transkription erfordert die räumliche Zugänglichkeit des jeweiligen Locus und eine damit einhergehende Remodulierung des Chromatins. Alle diese Prozesse werden durch konzertierte bzw. sequentielle posttranslationale Modifikationen der Histone beeinflusst.

1.4.2 Kommunikation zwischen Zytosol und Zellkern

Eine wesentliche Schwierigkeit für die Weiterleitung des Signals in der eukaryontischen Zelle besteht in der Trennung des Transkriptionslokus vom Zytosol mittels einer Kernmembran. Dies hat zur Entwicklung unterschiedlicher Strategien geführt [Karin & Hunter, 1995]. Eine Variante ist eine Kaskade einander aktivierender Proteinkinasen. Deren terminales Glied kann in den Nukleus translozieren und dort durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren die Genexpression induzieren. Realisiert ist diese Möglichkeit in der Familie der eukaryontischen Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) (**Abb. 1.2**, links). Alternativ können Transkriptionsfaktoren zytosolisch gebunden sein und nach Aktivierung einer Translokation unterliegen. Eine zentrale Familie von Transkriptionsfaktoren ist die der NF κ B-Proteine (**Abb. 1.2**, rechts). Beide Prozesse sind abhängig von vorhergehenden Phosphorylierungen.

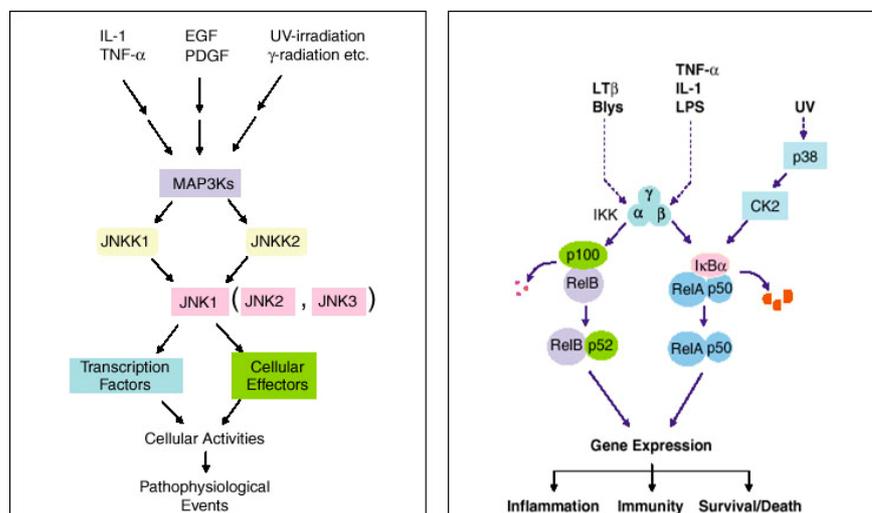


Abb. 1.2 Kinasekaskaden und Zytosol-ständige Transkriptionsfaktoren bilden verschiedene Wege des Informationstransfers in den Zellkern (aus: Liu & Lin, 2007)

Die folgenden Abschnitte befassen sich im Detail mit der Funktion der MAPK und NFκB-Proteine in der transkriptionellen Regulation.

1.4.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

1.4.3.1 MAPK-Kaskaden

MAPK sind eine Familie von Prolin-gerichteten Serin-/Threoninkinasen, die in Abhängigkeit unterschiedlicher extrazellulärer Reize, wie z.B. Zytokine, Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und auf diese Weise die Genexpression induzieren [Turjanski *et al.*, 2007]. Die Phosphorylierung erfolgt häufig in deren transaktivierender Domäne (TAD) [Tanos *et al.*, 2005], wodurch einerseits die Bindung an die entsprechenden Promotorelemente oder aber an weitere Transkriptionsfaktoren verstärkt wird. Sie sind beteiligt an Prozessen wie der Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und der Entzündung [Weston & Davis, 2002]. MAPK werden in nahezu allen eukaryontischen Organismen und Zelltypen exprimiert und bilden hierarchische Kaskaden dreier aktivierender Kinasen [Qi & Elion, 2005]. Die MAPK aktivierenden Kinasen werden MAPK Kinasen (MKK, MAP2K) genannt. Die in Säugern wesentlichen MKK-MAPK-Module sind: MEK1/2-Extrazellulärsignal-regulierte Kinase (ERK) 1/2, MKK4/7-Jun-N-terminale Kinase (JNK), MKK3/4/6-p38 MAPK und MEK5-ERK5 [Johnson & Lapadat, 2002]. Im Gegensatz zu den Modulen bestehend aus MKK und MAPK können die viele der über 20 MAP3K mehr als eine MKK aktivieren, was eine Kreuzkommunikation (*cross-talk*) sowie eine Signalintegration zwischen unterschiedlichen Signalwegen ermöglicht [Dhanasekaran & Johnson, 2007].

Tendenziell werden stress- und entzündungsvermittelte Zellreaktionen durch JNK und p38 MAPK vermittelt, während ERKs regulierend auf Zellwachstum und andere mitogene Prozesse einwirken [Davis, 2000; Bardwell, 2006].

1.4.3.2 Regulation der Aktivität und Substratspezifität der MAPK

MAPK werden durch duale Phosphorylierung eines konservierten TXY-Motivs innerhalb der Aktivierungsschleife (*activation loop*) aktiviert. Threonin und Tyrosin werden durch eine variable Aminosäure (X) getrennt, die jeweils charakteristisch für die Untergruppe der MAPK ist. ERKs enthalten an dieser Stelle Glutaminsäure, JNKs Prolin, während die p38 MAPK Isoformen Glycin enthalten [Pearson *et al.*, 2001].

Das minimale, durch MAPK phosphorylierte Konsensusmotiv, besteht aus der Sequenz S/TP. Da dieses Motiv sehr häufig in Proteinen vorkommt, enthalten physiologische Substrate zusätzliche Motive, die mit der Kinase interagieren [Biondi & Nebreda, 2003]. Solche Motive

wurden ebenfalls in MKKs identifiziert. In beiden Fällen binden diese Motive an Domänen außerhalb des katalytischen Zentrums der MAPK und erhöhen die Effizienz der Phosphorylierung sowie die Substratspezifität (**Abb. 1.3**) [Bardwell, 2006].

Der wesentliche Wirkmechanismus der MAPK ist ihre subzelluläre Lokalisation und die damit einhergehende Phosphorylierung potenzieller Substrate [Ebisuya *et al.*, 2005]. So translozieren aktivierte JNK sowie p38 MAPK in den Zellkern und aktivieren durch Phosphorylierung Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und ATF-2. Die durch MAPK induzierte zelluläre Antwort wird durch weitere verschiedene Faktoren beeinflusst. So bilden Gerüstproteine (*scaffolds*) durch Rekrutierung weiterer Komponenten eines Signalweges eine räumliche Steuerung der Signalverarbeitung [Morrison & Davis, 2003]. Ferner begrenzt die Induktion von MAPK spezifischen Phosphatasen zeitlich die Aktivierung eines Signalweges [Saxena & Mustelin, 2000; Owens & Keyse, 2007]. Die Regulation der Aktivierung von MAPK ist aus zwei Gründen essentiell: Sie kann einerseits Einfluss auf die physiologische Wirkung nehmen [Marshall *et al.*, 1995]. Ferner kann die Fehlregulation zur Entstehung diverser pathologischer Zustände führen [Dhanasekaran & Johnson, 2007].

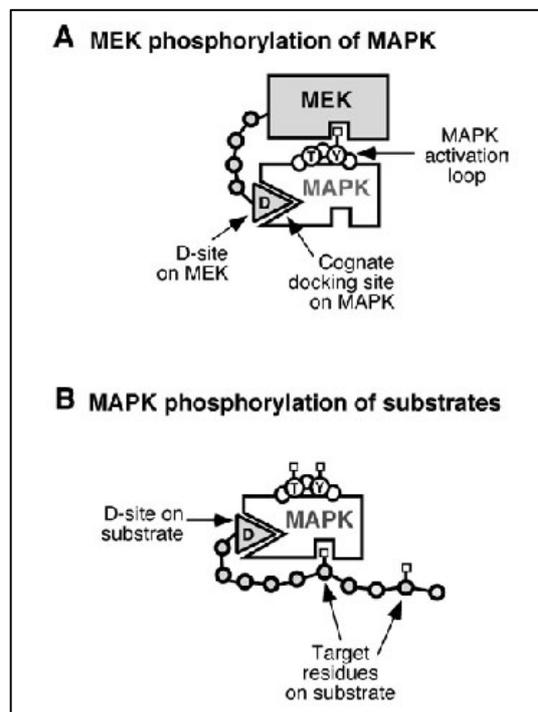


Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Interaktion zwischen MAPK mit der aktivierenden MKK (MEK) (A) bzw. ihrem Substrat (B) durch ein gemeinsames Interaktionsmotiv (*D-site*) (aus: Bardwell, 2006)

1.4.3.3 MAPK als Transkriptionsfaktoren

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass MAPK nicht allein zwischen Zytosol und Zellkern translozieren und die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren vermitteln. Vielmehr sind sie durch die direkte oder indirekte Aktivierung von Histonacetylasen bzw. -kinasen in die Remodulierung des Chromatins involviert [Kawasaki *et al.*, 2000; Soloaga *et al.*, 2003]. Darüber hinaus konnten Studien mittels Chromatin-Immünpräzipitation zeigen, dass MAPK wie p38 an aktiv transkribierte Gene binden [Vicent *et al.*, 2006]. Dies legt nahe, dass auch MAPK Transkriptionsfaktor-ähnliche Funktionen zukommen könnten.

1.4.4 Der Nukleäre Faktor- (NF-) κ B

1.4.4.1 Die Familie der NF- κ B-Transkriptionsfaktoren

Eine zentrale Gruppe von Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität wesentlich von ihrer subzellulären Distribution (Zytosol/Kern) abhängt, ist die Familie der NF- κ B-Proteine. NF- κ B wurde durch Bindung an ein die Transkription verstärkendes Element (*Enhancer*) des Ig-k-leichte-Kette Gens identifiziert. Inzwischen sind mehr als 100 Gene bekannt, die mittels κ B-Elementen NF- κ B abhängig reguliert werden [Pahl, 1999]. Besonders während der Entzündung exprimierte Gene werden durch NF- κ B induziert [Hoffmann & Baltimore, 2006], ferner wurden diverse Funktionen im angeborenen und adaptiven Immunsystem in Säugern demonstriert [Hayden *et al.*, 2006].

Die Proteine der NF- κ B Familie können in zwei Untergruppen unterteilt werden, die der eigentlichen NF- κ B Proteine sowie die der Rel Proteine. Zu den NF- κ B Proteinen zählen p100 und p105, die C-terminale selbst-inhibierende Ankyrin-Repeats enthalten. Durch begrenzte Proteolyse oder aber unvollständige Translation entstehen die kürzeren DNA bindenden Formen p52 bzw. p50 [Gilmore, 2006]. Die Untergruppe der Rel Proteine besteht aus c-Rel, RelB und RelA (p65 NF- κ B). Diese enthalten eine C-terminale transaktivierende Domäne (TAD). Sowohl NF- κ B als auch Rel Proteine weisen eine hoch konservierte N-terminale Domäne auf, die Rel Homologie Domäne (RHD). Diese dient der Bindung an DNA, der Protein-Dimerisierung, der Inhibitorbindung und enthält ein Kernlokalisierungssignal [Huxford *et al.*, 1999].

Aktives NF- κ B existiert in der Zelle in Form von Heterodimeren bzw. Homodimeren der Proteine beider Untergruppen, wobei nur ein Teil aller möglichen Dimere DNA binden und die Transkription aktivieren kann. Das p65-p50 Heterodimer (p65 NF- κ B) ist eines der am meisten untersuchten NF- κ B Dimere und kommt in vielen Zelltypen am häufigsten vor [Hoffmann *et al.*, 2006]. Es spielt ferner eine zentrale Rolle in der Rezeptor vermittelten Signaltransduktion. Daher wird im Folgenden auf seine Aktivierung und Regulation näher eingegangen.

1.4.4.2 Aktivierung und Regulation von p65 NF- κ B

Es existieren im Wesentlichen drei Wege der Aktivierung von NF- κ B und seiner Translokation in den Zellkern. Dieser Abschnitt wird sich auf den sogenannten klassischen (kanonischen) Signalweg konzentrieren, da dieser zum einen in der Aktivierung von p65 NF- κ B resultiert und ferner den Rezeptor vermittelten Signalweg der NF- κ B Aktivierung darstellt, der in der Entzündung und der unspezifischen Immunantwort beteiligt ist (**Abb. 1.4**).

Im basalen Zustand wird p65 NF- κ B durch das Inhibitor- κ B Protein- α (I κ B- α) hauptsächlich aus dem Zellkern ins Zytosol exportiert. Ein zentraler Schritt in der Aktivierung von NF- κ B ist die Phosphorylierung von I κ B- α durch die I κ B-Kinase (IKK), gefolgt von seiner Polyubiquitylierung. Dies bedingt die 26S-proteasomale Degradation und ermöglicht die Translokation von NF- κ B in den Zellkern. IKK ist eine Serin-/Threoninkinase und besteht aus den katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β sowie dem regulatorischen Gerüstprotein NEMO (*NF- κ B essential modifier*), wobei in der Übertragung proinflammatorischer Signale vorwiegend IKK β und NEMO von Bedeutung sind [Scheidereit, 2006].

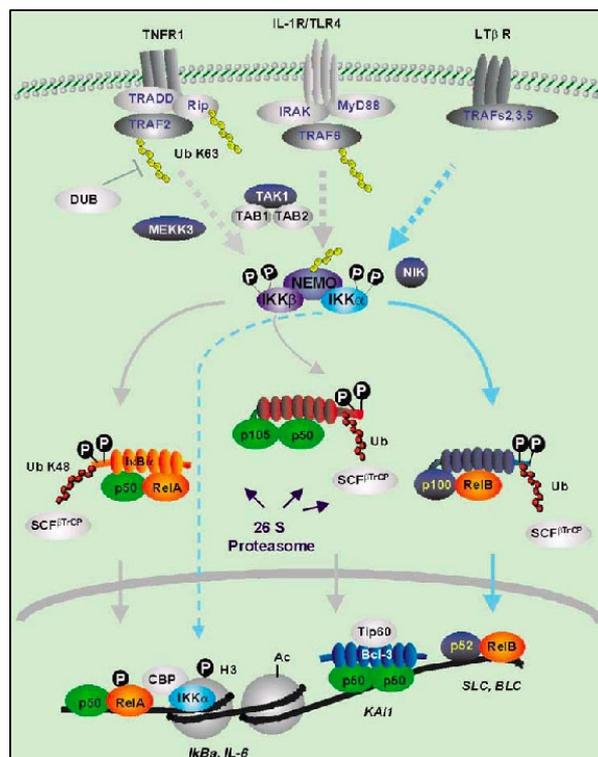


Abb. 1.4 Aktivierung des Kanonischen NF- κ B Signalwegs durch Rezeptoren der TNFR1- und IL-1R/TLR-Familie (grau) (aus: Scheidereit, 2006)

IKK wird selbst durch übergeordnete IKK-Kinasen sowie durch nicht-degradative Polyubiquitinierung aktiviert und stellt das konvergierende Element des NF- κ B Signalwegs dar [Haydn & Gosh, 2004; Chen, 2005]. Die Aktivität von NF- κ B wird nicht allein durch die Translokation in den Zellkern bestimmt – posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen, Acetylierungen sowie Ubiquitinierungen von RelA modulieren die Aktivität von NF- κ B in Abhängigkeit diverser Stimuli [Perkins, 2006].

Neben der Aktivierung des NF- κ B Signalweges existieren mehrere Mechanismen die NF- κ B vermittelte Geninduktion inhibieren und terminieren. Letzteres wird primär durch eine negativ-autoregulatorische Induktion der I κ B- α Expression erzielt, das den Rücktransport von p65 in das Zytosol bewirkt [Haydn & Gosh, 2004]. NF- κ B, I κ B und IKK werden aufgrund der zahlreichen Regulationsmechanismen zusammen als NF- κ B Modul bezeichnet [Hoffmann *et al.*, 2006]. Es ermöglicht der Zelle in Abhängigkeit der Qualität und Dauer des extrazellulären Reizes individuell die Aktivierung von NF- κ B und die damit verbundene Geninduktion zu regulieren [Werner *et al.*, 2005]. Dies ist insofern von Bedeutung, als eine Fehlregulation im NF- κ B Signalweg nachweislich zur Krebsentstehung und pathologischer Inflammation beitragen kann [Karin *et al.*, 2002; Viatour *et al.*, 2005].

1.4.4.3 Interaktion von NF- κ B mit anderen Transkriptionsfaktoren

Für die Aktivierung der Genexpression ist die Interaktion von NF- κ B mit seinen Promotorelementen allein nicht ausreichend. Vielmehr hat sich gezeigt, dass die Interaktion von NF- κ B mit weiteren Transkriptionsfaktoren (z.B. Aktivatorprotein-1 (AP-1), cAMP responsives Element bindendes Protein (CREB)) essentiellen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation ausübt. Deren Rekrutierung wird durch jeweils andere Enhancer- oder Promotorelemente initiiert [Ogawa *et al.*, 2005]. Die Interaktion zwischen NF- κ B und diesen Koaktivatoren bzw. –repressoren kann zusätzlich durch posttranslationale Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen moduliert werden [Perkins, 2006].

Einen derartigen Transkriptionsfaktor stellt der NF- κ B reprimierende Faktor (NRF) dar, der in der Regulation proinflammatorischer sowie antiviraler Gene eine entscheidende Funktion ausübt.

1.5 Der NF- κ B reprimierende Faktor in der Expression proinflammatorischer und antiviraler Gene

1.5.1 Prozesse der Entzündung und der unspezifischen Immunantwort

Infektionen sowie Verletzungen von Gewebe vermitteln Entzündungsreaktionen. Diese resultieren in der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-(IL-)1 und

Chemokinen wie IL-8 [Barksby *et al.*, 2007; Baggiolini & Clark-Lewis, 1992]. Die Infektion durch Viren verursacht darüber hinaus die Produktion antiviraler Zytokine der Interferonfamilie (IFN) [Sen, 2001]. Allen Reaktionen gemeinsam ist ihre unspezifische Ausrichtung gegenüber dem Verursacher, so dass sie zur unspezifischen Immunantwort gezählt werden.

Die Expression von IL-8 und IFN sowie die regulatorische Funktion des Transkriptionsfaktors NRF werden in den folgenden Abschnitten behandelt.

1.5.2 Die IL-1 vermittelte IL-8 Expression

Die IL-1 Zytokine (IL-1 α , - β und IL-1Ra) sind wesentliche Induktoren der Expression von Chemokinen [Barksby *et al.*, 2007] und steigern die Bildung von IL-8 um mehr als das 100-fache [Hoffmann *et al.*, 2002]. IL-8 wirkt chemotaktisch auf neutrophile Zellen und weist zusätzliche Funktionen in der Angiogenese, der Tumorentwicklung und weiteren zellulären Prozessen auf [Baggiolini & Clark-Lewis, 1992].

Der erste wesentliche Schritt in der IL-1 vermittelten Signaltransduktion sind die Bindung von IL-1 an den IL-1 Rezeptor (IL-1R). Dies führt zur Dimerisierung mit dem IL-1R akzessorischen Protein (IL-1Ra) und der Rekrutierung von Adapterproteinen der TRAF-Familie (TRAF 6). Sukzessiv erfolgt eine Aktivierung zweier MAPK-Signalwege, JNK und p38 MAPK, sowie die Aktivierung der IKK, was zur Freisetzung und Translokation von NF- κ B führt.

Während JNK Transkriptionsfaktoren wie AP-1 phosphoryliert und aktiviert, üben p38 MAPK und durch sie aktivierte Kinasen (z.B. MK2) einen stabilisierenden Einfluss auf die *IL-8* mRNA aus [Holtmann *et al.*, 1999]. Alle Mechanismen agieren konzertierend zusammen und bewirken eine gesteigerte IL-8 Genexpression (**Abb. 1.5**). Jüngere Untersuchungen haben gezeigt, dass ein weiterer Mechanismus existiert, der für die maximale Transkription von *IL-8* notwendig ist [Nourbakhsh *et al.*, 2001] (siehe Abschnitt 1.3.4).

1.5.3 Die Infektion durch Viren induziert die Interferonexpression

Interferone sind eine Familie von Zytokinen, die nachweislich die Virusreplikation inhibieren. Sie werden in Säugerzellen als Antwort auf eine virale Infektion gebildet und initiieren in nicht infizierten Zellen diverse antivirale Prozesse. Darüber hinaus beeinflussen sie die Expression verschiedener Gene des Zellwachstums und der Zellphysiologie [Sen, 2001].

In Säugern existieren zwei Subtypen von Interferonen (Typ I und II), wobei es 14-20 IFN- α Gene und ein IFN- β Gen gibt (beide Typ I). IFN- γ (Typ II) wird ebenfalls durch ein Gen kodiert [Vilcek & Sen, 1996]. IFN- β ist das dominierende Interferon in Säugern und wird durch zahlreiche nicht-hematopoietische Zellen gebildet [Sen, 2001].

Die Induktion von IFN- β und anderen Interferonen erfolgt primär durch virale Komponenten wie z.B. doppel- und einzelsträngige RNA (dsRNA, ssRNA), die vom Virus in die Zelle eingeschleust werden bzw. bei seiner Replikation entstehen. Beide Nukleinsäuren werden durch Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR) erkannt und resultieren in der Aktivierung mehrerer Signalwege. Das in dieser Arbeit verwendete Newcastle-Disease-Virus (NDV) gehört zu den Paramyxoviren. Diese Virusfamilie besitzt ein umhülltes Kapsid und eine einzelsträngige negativ polarisierte RNA ((-)ssRNA) [Nagai *et al.*, 1989]. Wie Lund *et al.* zeigen konnten, wird diese durch den Toll-ähnlichen Rezeptor 7 (TLR-7) in Zellen erkannt und bewirkt die Expression verschiedener Zytokine [Lund *et al.*, 2007]. Zusätzliche zelluläre Komponenten basieren auf dem Erkennen doppelsträngiger RNA (dsRNA) und führen zur Phosphorylierung und Aktivierung mehrerer Transkriptionsfaktoren [Servant *et al.*, 2002]. So bindet TLR-3 bei viraler Replikation entstehende dsRNA und aktiviert NF- κ B [Alexopoulou *et al.*, 2001] (**Abb. 1.6**).

Der IFN- β Promotor verfügt über positive regulatorische Elemente (PRDs), PRDI, -II und -IV, die jeweils von den Transkriptionsfaktoren IRF-3, NF- κ B und ATF-2 gebunden werden [Sen, 2001]. Die Wirkung dieser Bindung ist kooperativ und verursacht die Rekrutierung eines transkriptionsverstärkenden Komplexes (*enhanceosome*). Die Regulation des IFN- β Promotors wird darüber hinaus durch einen Transkriptionsfaktor vermittelten Mechanismus negativ beeinflusst, der die Genexpression im basalen Zustand unterdrückt [Nourbakhsh & Hauser, 1999].

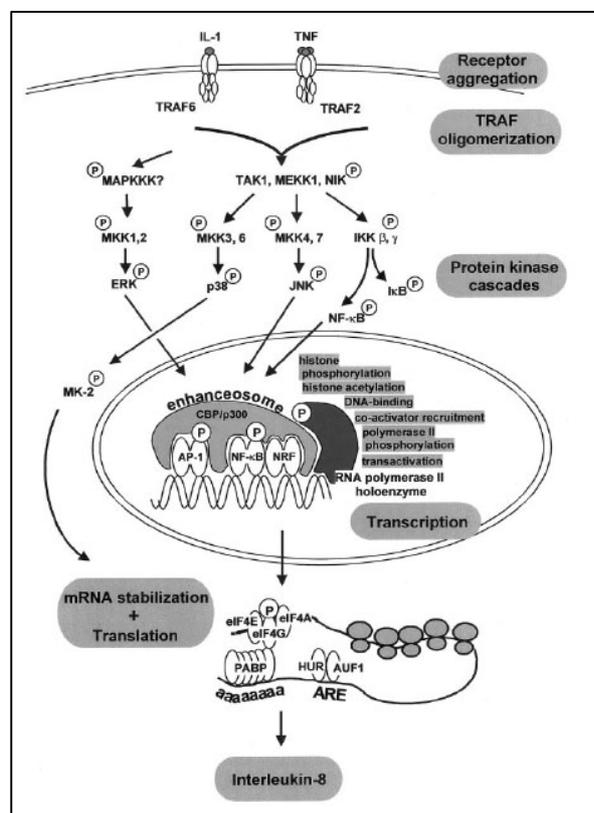


Abb. 1.5 Schematische Darstellung der IL-1 induzierten IL-8 Genexpression und der beteiligten Signalwege (aus: Hoffmann *et al.*, 2002)

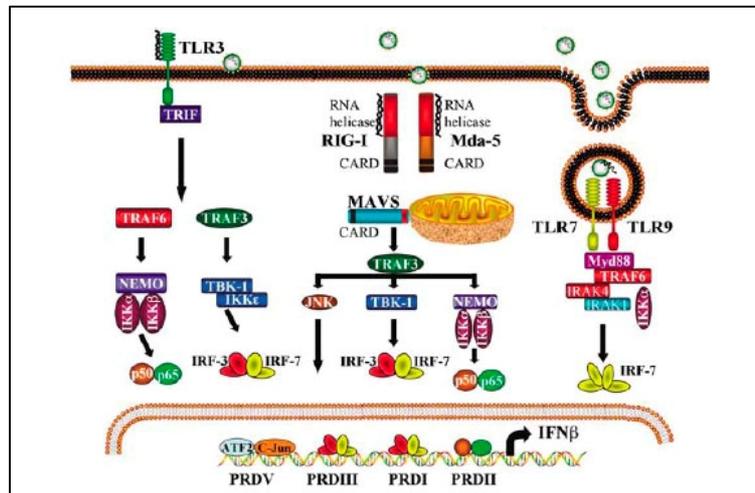


Abb. 1.6 Schematische Darstellung der Nukleinsäure vermittelten Induktion von IFN- β nach Virusinfektion (aus: Hiscott *et al.*, 2006)

1.5.4 Der NF- κ B reprimierende Faktor (NRF)

NRF ist ein ca. 77 kDa schwerer, humaner Transkriptionsfaktor und ist in den Nukleoli der Zelle lokalisiert [Niedick *et al.*, 2004]. Es wird ubiquitär exprimiert. Es existieren darüber hinaus homologe Proteine im Rind sowie in der Maus.

NRF wurde zunächst als ein nukleäres Protein identifiziert, welches an ein negativ-regulatorisches Element (NRE) innerhalb des Promotors des IFN- β Gens bindet [Nourbakhsh *et al.*, 1993]. Die Bindung von NRF an das NRE bewirkt eine konstitutive Repression der IFN- β Expression [Nourbakhsh & Hauser, 1999]. NREs wurden auch in den Promotoren von *IL-8* und *iNOS* identifiziert. NRF bindet diese und übt positionsunabhängig seine regulatorische Funktion gegenüber den NF- κ B Bindungsstellen aus [Nourbakhsh & Hauser, 1997; Nourbakhsh *et al.*, 2000]. Während die Expression von *iNOS* und *IL-8* beide konstitutiv reprimiert werden, bewirkt NRF in Abhängigkeit von IL-1 eine Koaktivierung der *IL-8* Expression [Nourbakhsh *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 2002]. NRF wirkt darüber hinaus regulatorisch auf die Transkriptionselongation am Long-Terminal-Repeat (LTR) des HI-Virus [Dreikhausen *et al.*, 2005].

Während frühere Studien gezeigt hatten, dass NRF mit mehreren bakteriell exprimierten NF- κ B Proteinen interagiert [Nourbakhsh & Hauser, 1999], konnte inzwischen nur eine Interaktion mit p65 bestätigt werden. Diese Interaktion ist für alle beschriebenen Funktionen essentiell und erfolgt über eine minimale Interaktionsdomäne, mittels derer NRF an die RHD von NF- κ B bindet

[Bartels, 2006]. Im Gegensatz zu den *in vitro* beschriebenen Funktionen von NRF erwies sich die Deletion der kodierenden Sequenz des murinen NRF-Gens als nicht pathologisch oder lethal [Froese *et al.*, 2006], was auf eine mögliche Kompensation durch weitere Proteine und/oder zusätzliche regulatorische Mechanismen auf der Ebene des Organismus hindeutet.

1.6 Fragestellung

Die bisherigen Arbeiten haben gezeigt, dass NRF auf transkriptioneller Ebene die Expression verschiedener, an Entzündungsprozessen und dem unspezifischen Immunsystem beteiligter Gene wie IL-8 und IFN- β reguliert. Die Transkription dieser Gene wird im basalen Zustand strikt inhibiert und ihre Aktivierung bedarf der kooperativen Interaktion mehrerer Transkriptionsfaktoren. Die Phosphorylierung dieser Proteine durch aktivierte Kinasen nimmt dabei wesentlichen Einfluss auf die Dauer und die Spezifität der zellulären Reaktion. NRF steuert dabei stimulationsspezifisch nicht nur die basale Repression und induzierte Derepression (IFN- β), sondern wirkt im Fall von IL-8 auch koaktivierend.

Jüngere Daten lassen darauf schliessen, dass NRF einer konstitutiven Phosphorylierung unterliegt und nach Virusinfektion dephosphoryliert wird [Niedick, 2000]. In der vorliegenden Arbeit soll *in vitro* sowie *in vivo* untersucht werden, welche Domänen von NRF phosphoryliert vorliegen und welche Aminosäuren modifiziert werden. Darüber hinaus soll geklärt werden, inwiefern die Phosphorylierung von NRF in Abhängigkeit einer Stimulation durch Zytokine (IL-1) bzw. einer Virusinfektion (NDV) einer Regulation unterliegt. Es wird erwartet, dass Unterschiede im Phosphorylierungsprofil mit dem promotorspezifischen Verhalten von NRF korrelieren. Die Analyse der Proteinphosphorylierung würde somit zu einem tieferen Verständnis der transkriptionellen Feinregulation in der Genexpression beitragen.

2. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit fokussiert auf die Regulation und Kinetik der Phosphorylierung von NRF. Dazu wurde zunächst im zellfreien System ein basales Phosphorylierungsprofil anhand rekombinant exprimierter Deletions- und Alaninmutanten erstellt. Darüber hinaus wurde verfolgt, wie sich die Phosphorylierung nach Stimulation durch Zytokine (IL-1 β) sowie nach Virusinfektion (NDV) ändert und ob Inhibitoren der MAPK-Familie diese modulieren. Aufbauend auf diesen *in vitro*-Studien, so genannten Kinaseassays, wurde der Phosphoaminosäuregehalt von NRF im basalen sowie im stimulierten Zustand gemessen. Zusätzlich wurde eine Methode zur 2D-Phosphopeptidkartierung (Phosphopeptide Mapping) etabliert. Ergänzend wurde die Phosphorylierung von NRF *in vivo* mittels biosynthetischer Markierung sowie massenspektrometrisch untersucht.

2.1 Proteinphosphorylierung im zellfreien System

Der *in vitro*-Kinaseenzymtest (Kinaseassay, *engl. kinase assay*) beruht auf der Inkubation eines exogenen Proteinsubstrates (oder Peptids) mit Mg-ATP (bei Tyrosinkinasen auch Mn-ATP) sowie der die Kinaseaktivität enthaltenden Probe. Diese Probe kann ein rohes Zelllysate (auch Zellfraktionen), aber auch eine bereits teilweise oder vollständig aufgereinigte Kinase sein.

Die Messung des Substratumsatzes kann zum einen direkt durch Detektion des phosphorylierten Proteins erfolgen. Dies geschieht durch Einsatz von radioaktiv markiertem ATP mit anschließender Autoradiographie oder durch Immunfärbung unter Verwendung phosphospezifischer Antikörper. Im Gegensatz zu den Enzymtests vieler physiologisch relevanter Enzyme, die eine Echtzeitmessung der enzymatischen Aktivität ermöglichen, handelt es in diesem Fall um eine Endpunktbestimmung. D.h. die enzymatische Reaktion wird nach einer definierten Reaktionszeit abgestoppt und die umgesetzte Substratmenge kann quantitativ bestimmt werden.

2.1.1 Radiometrischer Kinaseassay

Die radiometrische Analyse der Proteinphosphorylierung bedient sich der Modifikation des Proteinsubstrates mittels einer Radionuklid markierten Sonde – in diesem Fall γ -³²P ATP – und der Detektion des phosphorylierten Substrats mittels Autoradiographie. Trotz nachteiliger Strahlenbelastung zeichnet sich der radiometrische Kinaseassay durch seine hohe Sensitivität aus, was besonders im Fall eines ineffizienten Substratumsatzes von Vorteil ist. Darüber hinaus erlaubt die Messung des radioaktiv markierten Substrats im Szintillationszähler oder aber die

densitometrische Auswertung von Autoradiographien eine quantitative Analyse der Proteinphosphorylierung.

Beim radiometrischen Kinaseassay handelt es sich um eine Endpunktbestimmung, d.h. die Phosphorylierungsreaktion wird nach einer definierten Zeit abgestoppt. Üblicherweise geschieht dies durch Zugabe von Auftragspuffer und anschließendem Aufkochen. Mittels einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) erfolgt dann die Auftrennung des phosphorylierten Substratproteins von seiner Kinase (siehe Abschnitt 4).

Im praktischen Rahmen dieser Arbeit wurde als Quelle der Kinaseaktivität die Kernfraktion von HeLa-Zellen verwendet. Aufgrund der zahlreichen endogenen Kinasesubstrate war in Anbetracht des zu erwartenden Hintergrundes an zellulären Phosphoproteinen obiges Vorgehen nicht zweckmäßig. Die Fusion von NRF mit der Glutathion-S-transferase (GST) Domäne erlaubte es, das Protein nach der Phosphorylierung aus dem Reaktionsansatz aufzureinigen und somit den Hintergrund zu reduzieren. Wie **Abb. 2.1** veranschaulicht, bindet das Fusionsprotein mittels seiner GST-Domäne an die mit Glutathion (GSH) modifizierte Oberfläche der Sepharosematrix (**A**). Vorheriges Äquilibrieren der Matrix mit EDTA haltigem Puffer (Quenchpuffer) inhibiert die Kinaseaktivität durch Chelatierung der Magnesiumionen. Extensives Waschen entfernt unspezifisch gebundene Proteine, der Hintergrund wird reduziert (**B**). Durch Aufkochen in PAGE-Auftragspuffer werden die Proteine eluiert (**C**).

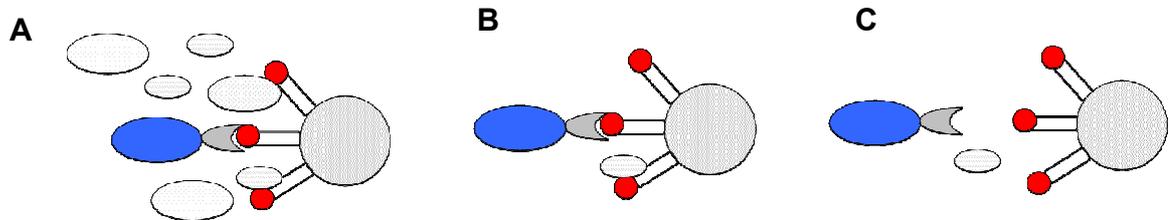


Abb. 2.1 Dreistufige Aufreinigung des GST-NRF-Fusionsproteins (blau) nach der Phosphorylierung.

Die Bindung erfolgt über die GST-Domäne (grau) des Fusionsproteins an die Glutathion (rot) modifizierte Oberfläche der Sepharose (A). In einem zweiten Schritt wird durch mehrfaches Waschen der Hintergrund unspezifisch gebundener Phosphoproteine reduziert (B). Zuletzt wird das Fusionsprotein durch Aufkochen eluiert (C).

2.1.2 Phosphorylierung der GST-Domäne

Die Verwendung eines Fusionsproteins ist jedoch insofern problematisch, als ein Einfluss der fusionierten Domäne auf das Verhalten des Substratproteins bzw. eine Eigenphosphorylierung der Domäne nicht ausgeschlossen werden kann. Um auszuschließen, dass die GST-Domäne selbst durch die Kernfraktion von HeLa-Zellen phosphoryliert wird, wurde zunächst rekombinant

produzierte GST-Domäne (26 kDa) zusammen mit Kinasepuffer, ATP, γ - ^{32}P ATP und Kernlysate unstimulierter HeLa-Zellen für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach Aufreinigung mittels GSH-Sepharose erfolgte die Auftrennung durch eine denaturierende PAGE. Nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue (CBB) und Trocknung des Gels wurde die Phosphorylierung mittels Exposition gegen einen Radioaktivfilm (Kodak X-Omat) detektiert. Wie **Abb. 2.2** zeigt, konnte selbst nach Überexposition keine Phosphorylierung der GST-Domäne durch Kernlysate unstimulierter HeLa-Zellen detektiert werden.

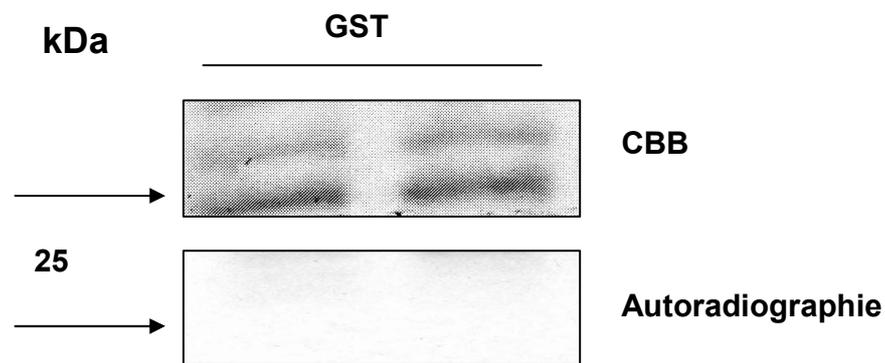


Abb. 2.2: Radiometrischer Kinaseassay mit Kernlysate aus unstimulierten HeLa-Zellen und rekombinater GST-Domäne (26 kDa).

Die CBB-Färbung des Gels zeigte die Proteinbanden bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 25 kDa. Durch Autoradiographie bei -80°C für 75h ließ sich keine Phosphorylierung feststellen. Als MW-Standard diente Protean-Plus Dual Color von BioRad.

2.2 Phosphorylierung von GST-NRF-Fusionsproteinen im zellfreien System

Um ein Phosphorylierungsprofil im nicht stimulierten Zustand näher zu charakterisieren, wurden zunächst verschiedene Deletionsmutanten erstellt. Dabei wurden auch Daten einer Kartierung mittels eines Peptid-Kinaseassays einbezogen, die Hinweise auf definierte Bereiche starker Phosphorylierung innerhalb der Primärstruktur von NRF erbrachten (nicht gezeigt). Im Folgenden wurden zunächst verschiedene Konstrukte auf der Basis des pGEX4T-2 Plasmids (Amersham) und verschiedenen Bereichen der für NRF kodierenden Sequenz des Vektors pBKLS-NRF hergestellt, die eine Synthese rekombinater GST-NRF-Fusionsproteine (Deletionsmutanten) in Bakterien (*E. coli* BL21) erlaubten.

2.2.1 Klonierung der NRF-Deletionsmutanten und Herstellung der GST-Fusionsproteine in *E. coli*

Als Edukte standen die Plasmide pGEX4T-2 (Amersham) als Zielvektor sowie das Plasmid pBLKS-NRF zur Verfügung. Letzteres verfügt über eine Ampicillinresistenz (Amp). Der Zielvektor pGEX-4T-2 (Amersham) kodiert für eine GST-Domäne, an die sich in 3'-Richtung eine multiple Klonierungsstelle (MKS) anschließt. Die Transkription steht unter der Kontrolle eines IPTG responsiven *tac*-Promotors sowie eines *lacI^q* Gens, dessen Produkt in Abwesenheit von IPTG die Transkription inhibiert. Das Plasmid verfügt für die Erhaltung in Bakterien über eine Ampicillinresistenz sowie einen bakteriellen Replikationsursprung (pBR322 ori). Die Plasmide sind in **Abb. 2.3** dargestellt.

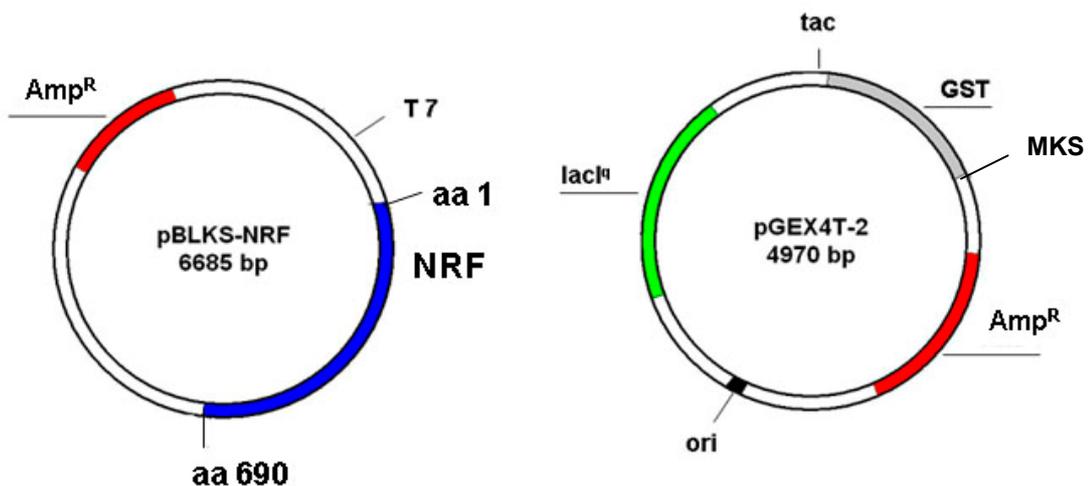


Abb. 2.3 Ausgangsplasmide pBLKS-NRF und pGEX-4T-2 für die Herstellung N-terminaler GST-NRF-Fusionsproteine

Beide Plasmide verfügen über eine Ampicillinresistenz (Amp^R, rot). Die für das vollständige NRF kodierende Sequenz ist in blau dargestellt. Der Zielvektor pGEX-4T-2 (Amersham) erlaubt über die MKS die Klonierung kodierender Sequenzen C-terminal zur GST-Domäne (grau).

Ausgehend von der vollständigen NRF-Sequenz wurden folgende Deletionsmutanten als GST-Fusionsproteine hergestellt: NRF1-112, NRF1-389, NRF1-449, sowie, jeweils komplementär dazu, NRF112-449, NRF390-486, NRF390-690 und NRF447-690 (siehe **Abb. 2.4**). Die ausführlichen Klonierungsschemata befinden sich in Abschnitt 4.2.3.9 ff.

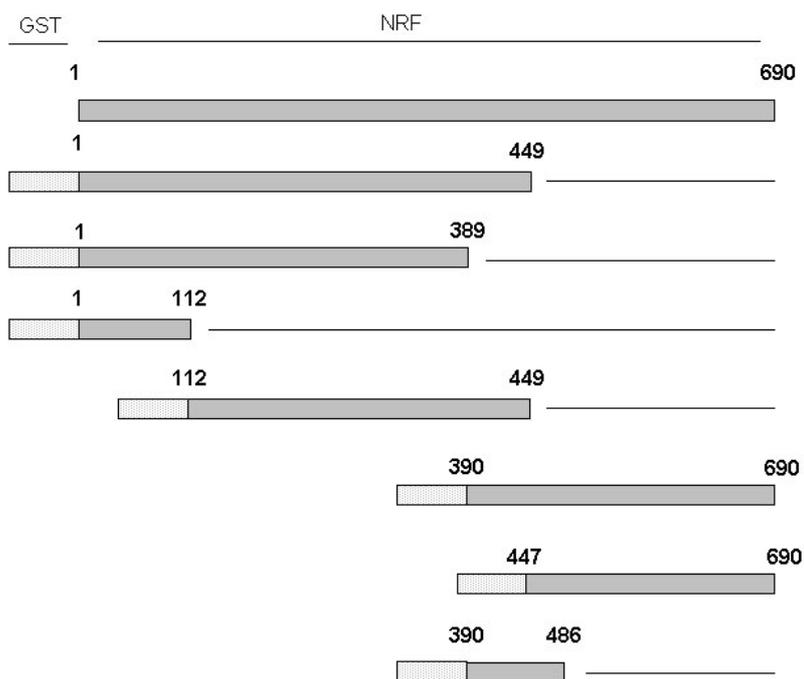


Abb. 2.4 Übersicht der verwendeten GST-NRF-Fusionsproteine

Die Abbildung zeigt die GST-NRF-Fusionsproteine in linearer Darstellung. Die GST-Domäne ist dabei hellgrau gehalten, während die jeweiligen Abschnitte der Aminosäuresequenz von NRF dunkelgrau dargestellt sind. Die Zahlen geben Anfangs- und Endamino-säure an. Die Nummerierung orientiert sich dabei an der vollständigen Primärstruktur.

2.2.2 Zeitliche Kinetik der Phosphorylierung von NRF

Die Phosphorylierung von Proteinsubstraten im zellfreien System ist potenziell artefaktanfällig aufgrund der Substratpromiskuität vieler Kinasen außerhalb physiologischer Bedingungen.

Im Fall einer spezifischen Interaktion sollte der Phosphateinbau in das Proteinsubstrat möglichst rasch erfolgen. Um diesen Aspekt zu überprüfen, wurde rekombinantes GST-NRF-Fusionsprotein (GST-NRF1-449) zusammen mit Kinasepuffer, ATP, γ - ^{32}P ATP und Kernlysat unstimulierter HeLa-Zellen in parallelen Ansätzen inkubiert. Die Reaktion wurde jeweils nach unterschiedlicher Zeitdauer abgestoppt (siehe 2.3). Nach Aufreinigung und denaturierender PAGE, gefolgt von CBB-Färbung und Trocknung des Gels wurde die Phosphorylierung mittels Autoradiographie (16h, -80°C) detektiert. **Abb. 2.5** veranschaulicht die Zunahme der Substratphosphorylierung mit fortdauernder Reaktionszeit. Dabei zeigte sich, dass bereits nach fünf Minuten eine deutliche Phosphorylierung eintrat, die stetig zunahm und nach ca. 45 Minuten eine Sättigung erreichte (**Abb. 2.6**). Dagegen ließ sich für den Fall der Nullkontrolle erst nach Überexposition eine sehr geringe Phosphorylierung detektieren (nicht gezeigt). Dies ist insofern von Bedeutung, als der im Ansatz für die Bindung an die GSH-Sepharose verwendete

Quenchpuffer die Reaktion definiert abstoppen sollte. Die dennoch vorhandene Substratphosphorylierung könnte einerseits darauf zurückzuführen sein, dass die Reaktion nicht schnell genug abgestoppt werden konnte. Andererseits wäre es denkbar, dass die Konzentration an EDTA nicht groß genug war, um die Kinaseaktivität vollständig zu inhibieren. Bedingt durch die für die Detektion notwendige Überexposition kann diese Durchlässigkeit jedoch vernachlässigt werden, so lange die Dauer der Autoradiographie kurz genug ist.

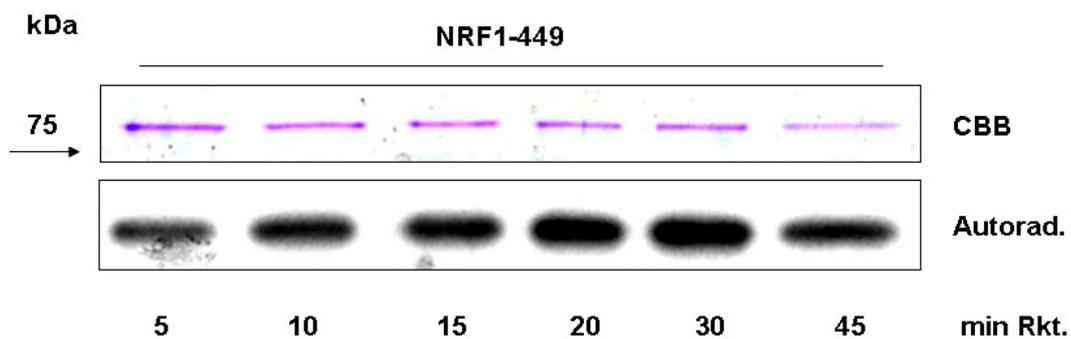


Abb. 2.5 Zeitliche Kinetik der Phosphorylierung von GST-NRF1-449 durch Kernlysat unstimulierter HeLa-Zellen

Die Inkubation gleicher Mengen von rekombinatem GST-NRF1-449 mit Kernlysate aus unstimulierten HeLa-Zellen zeigte eine Zunahme der Phosphorylierung mit fortwährender Reaktionsdauer. Dabei war bereits nach fünf Minuten die Phosphorylierung deutlich detektierbar. Das Gel wurde zum Vergleich der Proteinmengen CBB gefärbt und nach dem Trocknen für 16 Stunden bei -80°C gegen einen Röntgenfilm (Kodak, X-Omat) exponiert.

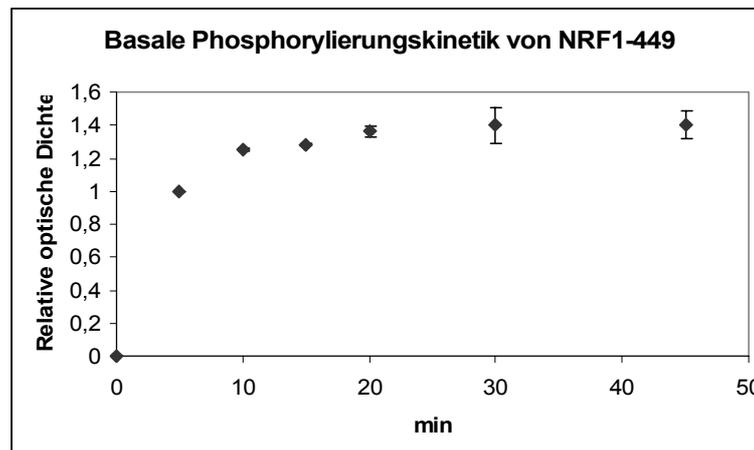


Abb. 2.6 Densitometrische Bestimmung der zeitlichen Kinetik der basalen Phosphorylierung von NRF1-449

Aufgetragen ist die relative optische Dichte der Exponatbanden als Maß für die Substratphosphorylierung in Abhängigkeit der Reaktionsdauer. Die Dichte der einzelnen Banden wurde mit Hilfe des Programms *Image J 1.38x* (W. Rasband, National Institutes for Health, USA) ausgewertet und auf den kleinsten Wert normiert. Dieser wurde gleich eins gesetzt. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, beobachtet man in den ersten zehn Minuten einen starken Anstieg, während nach ca. 45 Minuten eine Sättigung eintritt.

Für die weiteren Analysen im zellfreien System wurde eine Reaktionsdauer von 30 Minuten eingehalten.

2.2.3 Phosphorylierung von NRF-Deletionsmutanten durch Kernlysate unstimulierter HeLa-Zellen

Die in *E. coli* (BL21) produzierten und an GSH-Sepharose aufgereinigten und eluierten Fusionsproteine wurden mittels denaturierender PAGE charakterisiert. In parallelen Ansätzen wurden die verschiedenen Deletionsmutanten unter Zusatz von Kinasepuffer, ATP und γ - ^{32}P ATP mit Kernlysate aus unstimulierten HeLa-Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Proteine erneut an GSH-Sepharose aufgereinigt. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Proteine durch Aufkochen in Auftragspuffer eluiert und mittels denaturierender PAGE aufgetrennt. Nach CBB-Färbung und Trocknen des Gels wurde die Substratphosphorylierung durch Autoradiographie detektiert.

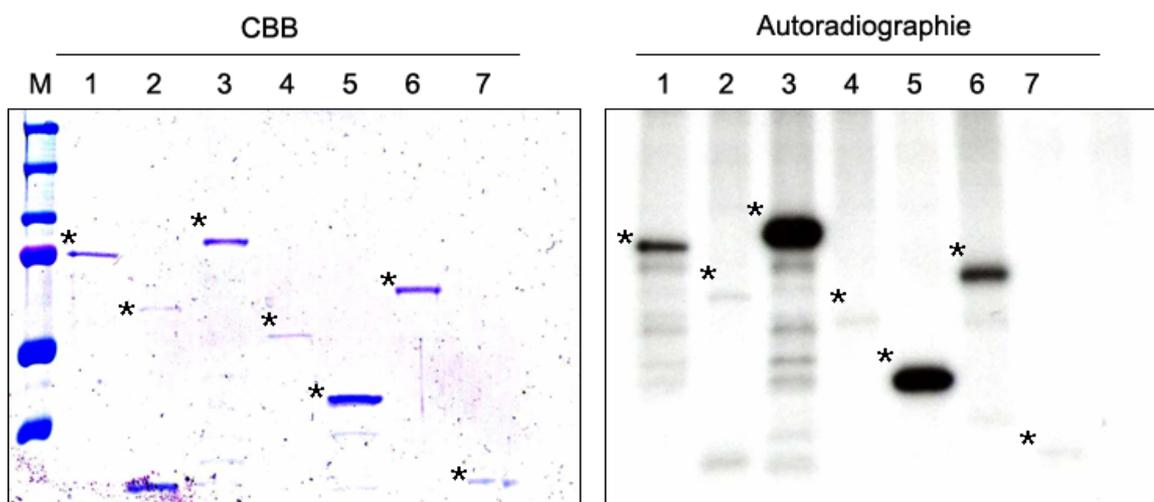


Abb. 2.7 Basales Phosphorylierungsprofil von NRF

GST-Fusionsproteine (markiert durch Asterisken) bestehend aus einer N-terminalen GST-Domäne und verschiedenen Abschnitten der Primärstruktur von NRF wurden durch Kernlysate unstimulierter HeLa-Zellen phosphoryliert und nach Aufreinigung an GSH-Sepharose mittels denaturierender PAGE aufgetrennt. Die Proben wurden komplett aufgetragen (v.l.n.r.): 1-389 (1), 390-690 (2), 1-449 (3), 447-690 (4), 1-112 (5), 112-449 (6), 390-486 (7). Als MW-Standard diente Protean-Plus Dual Color, BioRad. Die Detektion der Substratphosphorylierung geschah durch Autoradiographie für 65 Stunden bei -80°C .

Abb. 2.7 zeigt repräsentativ für zwei unabhängige Experimente die basale Phosphorylierung der einzelnen NRF-Deletionsmutanten. Diese wurden, wie in der Autoradiographie zu sehen, in Anhängigkeit des Aminosäurebereichs von NRF unterschiedlich stark phosphoryliert. Eine eindeutige Aussage wurde zunächst jedoch durch die in der CBB-Färbung sichtbaren

Abweichungen der Proteinmengen erschwert. Um die einzelnen Mutanten abzugleichen und gleichzeitig auch eine Quantifizierung zu ermöglichen, wurden die CBB gefärbten Proteinbanden sowie deren autoradiographische Signale mittels des Programms *ImageJ 1.38x* (W. Rasband, National Institutes of Health, USA) ausgewertet. Dies geschah durch zweidimensionale densitometrische Berechnung der Signalfächen für die Autoradiographie sowie die CBB-Färbung. Die aus der Multiplikation der eindimensionalen Flächen jeweils resultierenden Signalvolumina (**Abb. 2.8**) wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Auf diese Weise wurden die aus der Autoradiographie erhaltenen Signale auf die jeweiligen Proteinmengen normiert und untereinander vergleichbar gemacht (**Abb. 2.9**). So lässt sich trotz der in **Abb. 2.8** widergespiegelten Abweichungen der Proteinmengen ein reproduzierbares Phosphorylierungsprofil erkennen.

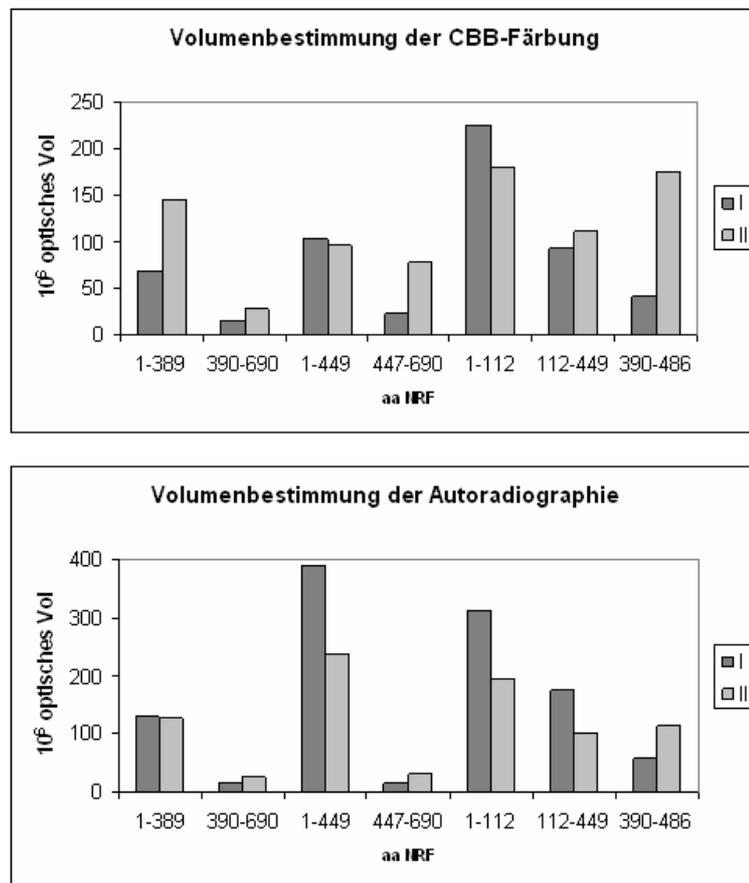


Abb. 2.8 Zusammenfassende Darstellung der Signalvolumina der CBB-Färbung (oben) sowie der Autoradiographie (unten) aus zwei unabhängigen Experimenten (I, II). Die densitometrische Auswertung wurde unter Verwendung von *ImageJ 1.38x* (W. Rasband, National Institutes of Health, USA) durchgeführt.

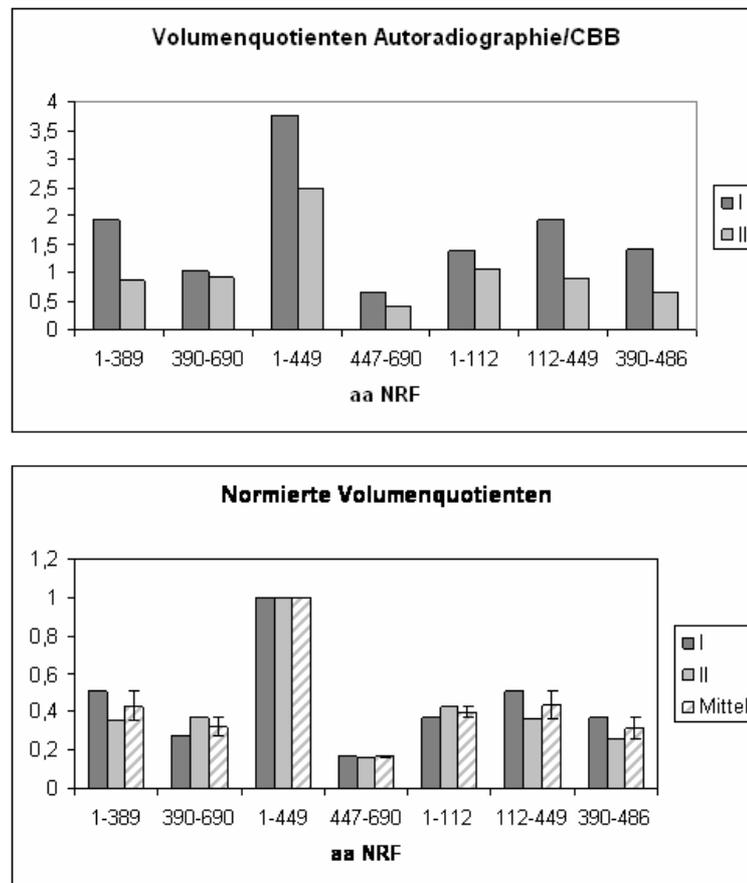


Abb. 2.9 Zusammenfassung der Volumenquotienten aus Signalvolumina der Autoradiographie sowie CBB-Färbung

Aus den densitometrischen Signalflächen der Autoradiographie sowie der CBB-Färbung wurden Quotienten gebildet und anschließend auf den größten Wert (NRF1-449) normiert. Dieser wurde gleich eins gesetzt. Aus zwei unabhängigen Experimenten (I, II) wurden die Mittelwerte errechnet.

Wie **Abb. 2.9** deutlich zeigt, wurde NRF1-449 – bezogen auf seine Proteinmenge – am stärksten phosphoryliert. Im Folgenden wurden die Quotienten aller Deletionsmutanten darauf normiert, so dass dieser gleich eins gesetzt wurde. Eine C-terminale Verkürzung von NRF1-449 zu NRF1-389 resultierte dabei in einer Reduzierung der Phosphorylierung um mehr als 50%. Eine weitere Verkürzung des C-Terminus (NRF1-112) zeigte keine zusätzliche Reduktion. Die Analyse des zu NRF 1-112 komplementären Aminosäurebereichs von 112-449 ergab eine im Vergleich zu NRF1-112 und 1-389 annähernd gleiche Signalintensität, was vermuten lässt, dass sich in diesem Bereich von NRF weitere konstitutive Phosphorylierungsstellen befinden.

Diese Vermutung wurde durch die Analyse der C-terminalen und zu NRF1-389 und NRF1-449 komplementären Bereiche der Aminosäuren von 390-690 sowie 447-690 bestärkt und konkretisiert. So wies der zu NRF1-389 komplementäre Bereich von 390-690 eine vergleichbare

Signalintensität auf, die bei N-terminaler Verkürzung (447-690) auf ca. 50% reduziert wurde. Das den deletierten Bereich umfassende Fusionsprotein (NRF390-486) dagegen zeigte eine den Bereichen 390-690 sowie 112-449 vergleichbare Phosphorylierung. Diese Ergebnisse sprechen für weitere Phosphorylierungsstellen im Bereich der Aminosäuren 390-486, der bisher nicht kartiert wurde.

2.2.4 Phosphoaminosäureanalyse (PAA) der basalen Phosphorylierung von NRF

Nachdem ein basales Phosphorylierungsprofil von NRF anhand von Deletionsmutanten erstellt wurde, stellte sich die Frage, welche Hydroxyaminosäuren in NRF basal phosphoryliert vorliegen und ob diese homogen über die Primärstruktur verteilt sind.

Eine für diesen Zweck geeignete, sehr sensitive Methode ist die radiometrische Phosphoaminosäureanalyse (PAA) mittels Dünnschichtelektrophorese, die in **Abb. 2.10** schematisch dargestellt ist [van der Geer & Hunter, 1994].

Im Gegensatz zu phosphorylierungsspezifischen Antikörpern, die – vor allem im Fall von Phosphoserin gerichteten Antikörpern – unspezifische Signale produzieren können, werden die Phosphoaminosäuren direkt nachgewiesen. Die Methode ist darüber hinaus sehr sensitiv, so dass im allgemeinen bereits wenige Zerfälle pro Minute (dpm) an radioaktivem Material für eine Analyse ausreichend sind. Bedingt durch die sauren Lysebedingungen ist die PAA jedoch ungeeignet für den Nachweis geringer Mengen an Phosphotyrosin, da dieses in besonderem Maße degradationsanfällig ist. Die Möglichkeit einer alternativen alkalischen Lyse wurde aufgrund der unerlässlichen und zeitaufwendigen Aufarbeitung der Proben nicht aufgegriffen.

Für die Analyse wurden die NRF-Deletionsmutanten der Aminosäuren 1-112, 112-449, 1-449 und 447-690 *in vitro* mit $1\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP phosphoryliert und nach Aufreinigung über GSH-Sepharose mittels denaturierender PAGE aufgetrennt. Durch Autoradiographie wurden die Proteine sichtbar gemacht (**Abb. 2.11 a**). Die Proteinbanden wurden aus dem nicht getrockneten Gel ausgeschnitten und in 6 N Salzsäure bei 110°C hydrolysiert. Das freigesetzte Gemisch aus Phosphat, Phosphoaminosäuren und Phosphopeptiden wurde nach Evaporation der Salzsäure und Aufnahme in Elektrophoresepuffer auf Zellulose beschichtete Dünnschichtchromatographieplatten aufgetropft und elektrophoretisch in zwei Dimensionen aufgetrennt (**Abb. 2.11 b**). Die Position der Phosphohydroxyaminosäuren wurde durch Zusatz von Phosphoserin, -threonin und -tyrosin zur Probe und anschließender Ninhydrinfärbung visualisiert. Die Detektion der Phosphoaminosäuren geschah mittels Autoradiographie.

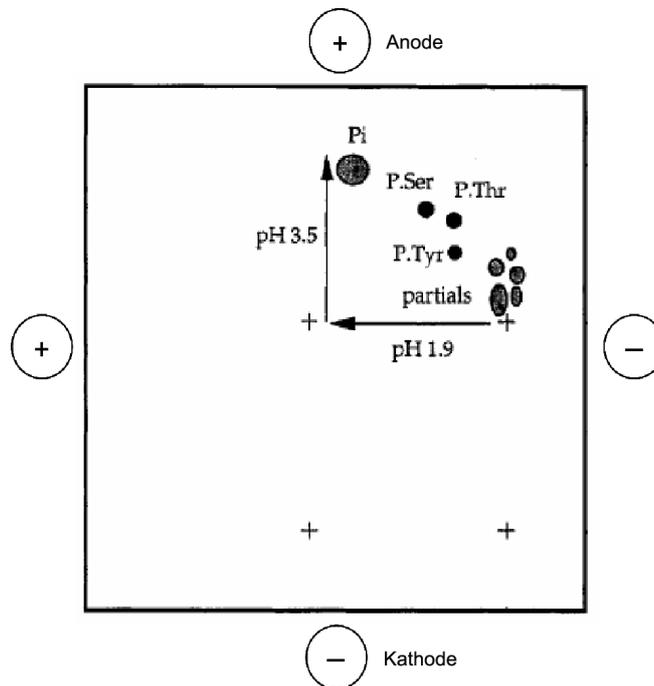


Abb. 2.10 Schematische Darstellung einer Dünnschichtelektrophorese (TLE) für die Phosphoaminosäureanalyse.

Pro Platte können vier Proben parallel aufgetragen werden (Auftragungspunkte durch Kreuze markiert). Die Elektrophorese erfolgt in zwei Dimensionen bei pH 1,9 und 3,5. Dabei wird die Probe in freies Phosphat (Pi), die Phosphoaminosäuren (P.Ser, P.Thr, P.Tyr) sowie unvollständig hydrolysiertem Protein (*partials*) aufgetrennt. Die Wanderung erfolgt dabei in Richtung der jeweiligen Anode. Durch Zusatz eines Phosphoaminosäure-Standards kann die spätere Position mittels Ninhydrinfärbung sichtbar gemacht werden. Die Detektion der radioaktiv markierten Phosphoaminosäuren geschieht mittels Autoradiographie.

Wie **Abb. 2.11 a** veranschaulicht, wurde auch in diesem Experiment der Aminosäurebereich von 1-449 stark phosphoryliert, während NRF447-690 nur eine geringe Phosphorylierung aufwies. Bedingt durch den Einsatz von $1\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP während der Kinasereaktion war die Phosphorylierung bereits nach 30 Minuten detektierbar.

Abb. 2.11 b zeigt das Ergebnis der PAA nach Autoradiographie. Daraus wird deutlich, dass der Phosphoaminosäuregehalt von NRF entlang seiner Primärstruktur heterogen verteilt ist. Während die Aminosäurebereiche von 112-449 (**2**) sowie von 447-690 (**4**) in der PAA einen deutlichen Überschuss an Phosphoserin (pS) zeigten, wies NRF1-112 einen im Vergleich zu Phosphoserin höheren Anteil an Phosphothreonin (pT) auf. Dieses fand sich in dem die Bereiche 1-112 und 112-449 umfassenden NRF1-449 wieder, in dem jedoch das Verhältnis von Phosphoserin zu Phosphothreonin umgekehrt wurde. Die Autoradiographie lieferte auch nach Überexposition in keiner der Deletionsmutanten einen Hinweis auf vorhandenes Phosphotyrosin.

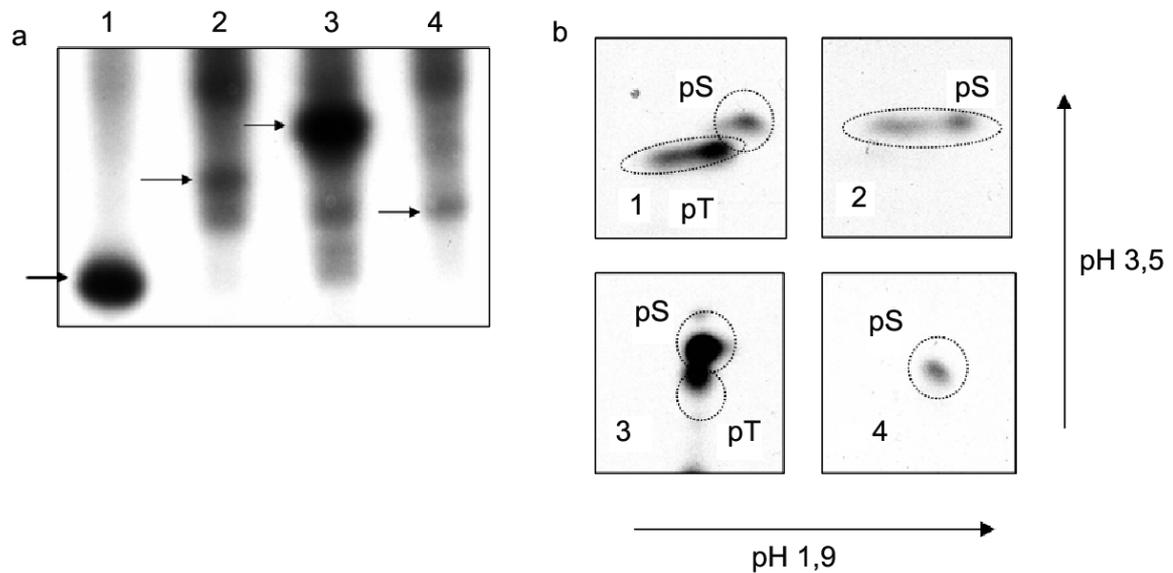


Abb. 2.11 Phosphoaminosäureanalyse der NRF-Deletionsmutanten 1-112 (1), 112-449 (2), 1-449 (3) und 447-690 (4). Diese wurden *in vitro* phosphoryliert und nach Aufreinigung an GSH-Sepharose, gefolgt von denaturierender PAGE mittels Autoradiographie für 30 Minuten bei -80°C detektiert (a). Pfeile markieren die jeweilige Position. Nach saurer Hydrolyse wurden die Proben auf Zellulose beschichteten Kunststoffolien (Merck) einer zweidimensionalen Dünnschichtelektrophorese unterzogen. **Abb. 2.11 b** zeigt die Phosphoaminosäuren präsentierenden Ausschnitte. Die Detektion geschah mittels Autoradiographie für 65 Stunden bei RT. Kreise markieren die durch Ninhydrin visualisierten Positionen der Aminosäuren aus dem Standard.

Für eine Quantifizierung wurden die Ninhydrin gefärbten Phosphoaminosäuren aus der Dünnschichtfolie ausgeschnitten und unter Zusatz von Szintillatorflüssigkeit im Szintillationszähler gemessen. Die korrespondierenden Zerfälle/Minute wurden für jede Deletionsmutante summiert und die Dpm-Werte für die einzelnen Phosphoaminosäuren dazu in Relation gesetzt. **Abb. 2.12** fasst die Resultate der Messungen als Mittelwerte zusammen. Wie veranschaulicht wird, zeigte NRF1-112 mit 67,9% Phosphothreonin einen ca. 2,5-fachen Gehalt gegenüber Phosphoserin, während in NRF112-449 der Gehalt an Phosphoserin mit annähernd 84% überwog. Dies ist insofern interessant, als sich in der Deletionsmutante NRF1-449, die faktisch die Aminosäurebereiche beider Proteine umfasst, der Phosphothreonin Gehalt als prozentual erheblich geringer erwies als in der Summe der Proteine. Anscheinend wird der Einfluss des N-terminalen Bereichs im C-terminal verlängerten Protein abgeschwächt, so dass sich der Eintrag an Phosphothreonin zur Gesamtphosphorylierung verringert. Der Aminosäurebereich von 447-690 wies mit 79% ähnlich dem Bereich von 112-449 einen deutlichen Überschuss an Phosphoserin auf.

Allen Deletionsmutanten war ein mit weniger als 5% verschwindend geringer Anteil an Phosphotyrosin gemeinsam, wobei die in Einzelmessungen auch kein Phosphotyrosin detektiert wurde. Allein NRF447-690 zeigte einheitlich keinen Phosphotyrosingehalt. Wie bereits erwähnt könnten die geringen Mengen an Phosphotyrosin durch Verluste bei der Hydrolyse der Proteine bedingt sein. Allerdings spricht das Überwiegen der Serin-/Threoninphosphorylierung im Zellkern gegenüber Tyrosinphosphorylierung im Zytosol bzw. membranständigen Rezeptoren für das Phosphorylierungsprofil des im Nukleus lokalisierten NRF.

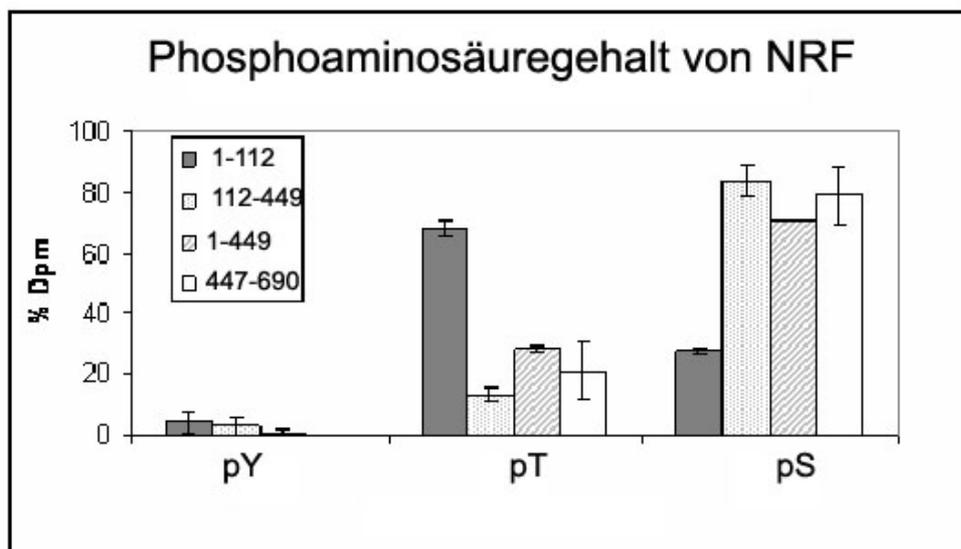


Abb. 2.12 Prozentualer Gehalt an den phosphorylierten Hydroxyaminosäuren Phosphoserin (pS), Phosphothreonin (pT) und Phosphotyrosin (pY)

in Dpm bezogen auf die Gesamt-Dpm der Phosphoaminosäuren. Die Werte stellen Mittelwerte dar für die einzelnen Deletionsmutanten dar: NRF1-112 (grau), NRF112-449 (gepunktet), NRF1-449 (gestreift), NRF447-690 (weiss).

2.3 Zytokin regulierte Phosphorylierung von NRF

NRF übt eine duale Funktion auf den durch inflammatorische Zytokine (z.B. IL-1 β , TNF α) sowie Virusinfektion induzierbaren IL-8 Promotor aus. Während durch NRF im Grundzustand die Transkription von *IL-8* mRNA reprimiert wird, wirkt seine Anwesenheit während einer NF κ B abhängigen Aktivierung transkriptionssteigernd [Nourbakhsh *et al.*, 2001].

Frühere Untersuchungen deuteten darauf hin, dass eine Stimulation der Zellen mit IL-1 β eine Dephosphorylierung von NRF bewirkt [Niedick, 2000]. Nach der erfolgreichen Erstellung eines Profils für die konstitutive Phosphorylierung von NRF im zellfreien System wurde dieser experimentelle Ansatz deshalb auf die Zytokin regulierte Phosphorylierung (IL-1 β) ausgeweitet.

Wesentliche Prozesse der IL-1 induzierten Transkriptionsregulation laufen in einem Zeitfenster von einer Stunde ab [Griffin & Moynagh, 2006]:

- Phosphorylierung des Inhibitors κ B α (I κ B α) durch aktivierte I κ B-Kinase mit anschließender Ubiquitinylierung und proteosomaler Degradation
- Translokation der p65/p50-NF κ B Heterodimere in den Zellkern, Bindung an κ B-Element im Promotorbereich des IL-8 Gens
- Parallele Aktivierung Stress aktivierter Proteinkinasen (SAPK/JNK) durch vorgeschaltete Kinasekaskaden
- Translokation aktivierter SAPK/JNK in den Zellkern, dortige Phosphorylierung von Zielproteinen, z.B. cJun (Bestandteil von AP-1) [Krause *et al.*, 1998]

Aufgrund der ständigen Interaktion von NRF mit p65 NF κ B und anderen Proteinen der Transkriptionsmaschinerie [Bartels, 2006] wurde daher vermutet, dass die für seine duale Funktion notwendigen Modifikationen (De-/Phosphorylierung) ebenfalls in diesem zeitlichen Rahmen stattfinden. Die für die Zellen gewählte Stimulationsdauer reichte somit von null Minuten (Kontrollwert) bis hin zu einer Stunde.

2.3.1 IL-1 β Stimulation von HeLa-Zellen

Um die IL-1 abhängige Phosphorylierung von NRF im zellfreien System zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen auf Zellkulturschalen ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit rekombinantem humanem IL-1 β (Einsatzkonzentration: 10 ng/ml) für unterschiedliche Zeitdauern behandelt. Kontrollzellen blieben unbehandelt. Nach Präparation der Zytosol- und Kernlysate wurden nach Bradford die Proteinkonzentrationen bestimmt. Die Kinasekapazität der Kernlysate wurde durch Inkubation von gleichen Mengen an Kernprotein mit Kinasepuffer und 0,1 μ Ci/ μ l γ -³²P ATP überprüft.

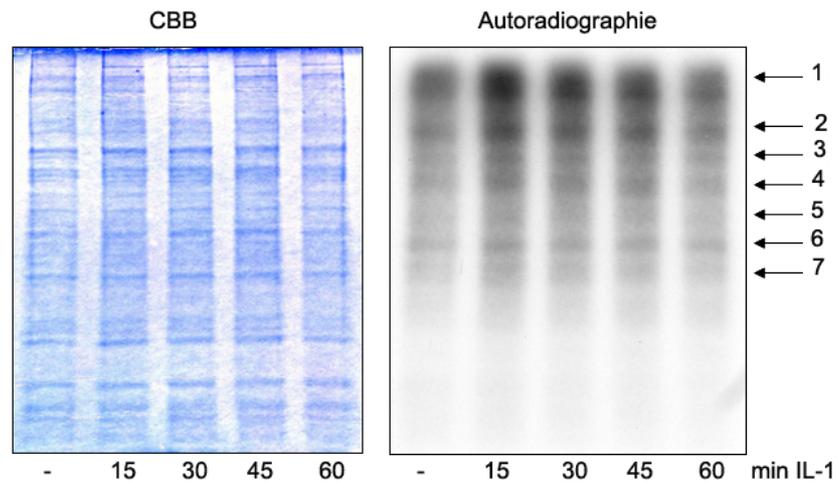


Abb. 2.13 Autophosphorylierung der Kernlysate aus IL-1 stimulierten HeLa-Zellen

Dargestellt sind die nach Bradford abgeglichenen und mittels γ - ^{32}P ATP autophosphorylierten Kernlysate aus IL-1 β stimulierten HeLa-Zellen. Nach Abstoppen der Reaktion in Auftragspuffer und anschließender denaturierender PAGE wurde das Gel gefärbt (CBB, links). Die Detektion der phosphorylierten Kernproteine erfolgte mittels Autoradiographie für 12 Stunden bei -80°C .

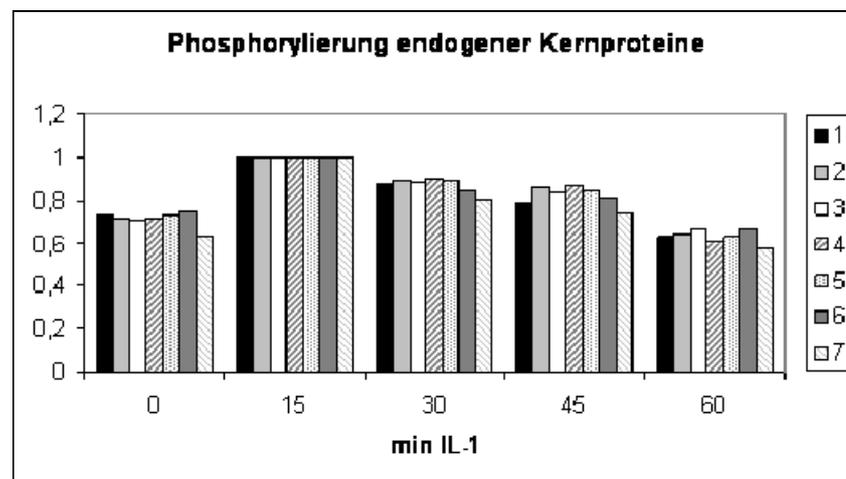


Abb. 2.14 Densitometrische Quantifizierung der IL-1 abhängigen Phosphorylierung von endogenen Kernproteinen

Die Auswertung der autoradiographischen Signale der phosphorylierten Proteine (**Abb. 2.16**, markiert durch Pfeile) erfolgte mittels des Programms *ImageJ 1.38x* (W. Rasband, Nat. Institutes of Health, USA) in vertikaler Dimension. Die Ergebnisse wurden auf die jeweiligen Signalmaxima normiert, die Maxima wurden gleich eins gesetzt.

Abb. 2.13 zeigt eine repräsentative Präparation von Kernlysaten IL-1 stimulierter HeLa-Zellen nach Bradfordmessung und Abgleich. Wie eine Autoradiographie des Gels veranschaulicht, wiesen alle Kernlysate eine Kinasekapazität auf, wobei diese bei 15 Minuten IL-1 Stimulation maximal war und darauf wieder abnahm. Dies ist auf die IL-1 abhängige Aktivierung bestimmter

Kinasefamilien (z.B. SAPK/JNK, siehe 2.5.) zurückzuführen. Eine densitometrische Messung der autoradiographischen Signale lieferte ein noch genaueres Bild.

Wie **Abb. 2.14** zusammenfasst, wiesen von sieben untersuchten Banden sämtliche ein Signalmaximum der Phosphorylierung nach 15 Minuten Stimulation mit IL-1 β auf, wobei die Substratphosphorylierung um ca. 30% im Mittel anstieg. Die Intensität der Phosphorylierung nahm dann sukzessive ab und fiel nach 60 Minuten sogar unter den Kontrollwert (null Minuten).

2.3.2 Kontrolle der Signalinduktion durch Messung der IL-1 regulierten JNK-Aktivität an einem GST-Jun-Fusionsprotein

Um die induzierte Kinaseaktivität an einem exogenen Substrat zu zeigen, wurde ein GST-Jun-Fusionsprotein (Jun1-135) als Referenzprotein für den Kinaseassay gewählt. Dies hatte zwei hauptsächliche Gründe: Zum einen ist cJun ein physiologisches Substrat der IL-1 aktivierten JNK, so dass damit stets die Qualität der Kernlysate kontrolliert werden konnte. Zweitens ist die Interaktion zwischen JNK und Jun aufgrund von Bindungsdomänen sehr stabil, was die Phosphorylierung sehr effizient und den Kontrolltest robust macht.

Für den Test wurde aus *E. coli* aufgereinigtes GST-Jun1-135 zusammen mit Kinasepuffer, ATP/0,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ γ -³²P ATP und gleichen Mengen Kernlysate aus IL-1 stimulierten HeLa-Zellen bzw. Kontrollzellen inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung mittels GSH-Sepharose. Die Proben wurden in Auftragspuffer aufgekocht und auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel geladen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel CBB gefärbt und getrocknet. Die Detektion der Substratphosphorylierung erfolgte mittels Autoradiographie.

Wie in **Abb. 2.15** repräsentativ zu sehen ist, wurde rekombinantes GST-Jun1-135 durch Kernlysate aus HeLa-Zellen nach 15 Minuten IL-1 Stimulation maximal phosphoryliert, wobei die Intensität der Phosphorylierung sukzessive abnahm und nach einer Stunde wieder das basale Niveau erreichte. Eine densitometrische Auswertung ergab, dass die Phosphorylierung vom basalen Niveau auf maximale Phosphorylierung um ca. 65% anstieg (**Abb. 2.16**).

Dies weist auf eine gute Stimulierbarkeit der HeLa-Zellen durch IL-1 hin, so dass von einer hinreichenden Aktivierung der entsprechenden Signalwege ausgegangen werden kann, was eine Grundvoraussetzung für den experimentellen Ansatz darstellt.

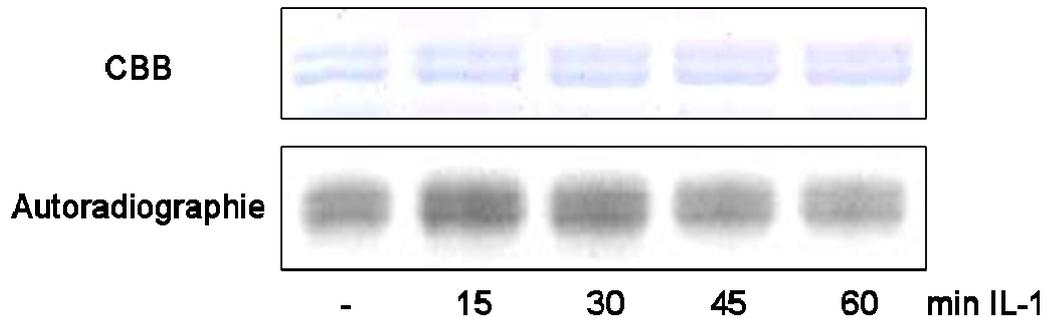


Abb. 2.15 Phosphorylierung von GST-Jun1-135 im zellfreien System durch Kerlysate aus IL-1 stimulierten HeLa-Zellen in Abhängigkeit der Stimulationsdauer

Die Abbildung zeigt die durch CBB-Färbung visualisierten Proteinbanden. Die Detektion der Substratphosphorylierung geschah mittels Autoradiographie für sechs Stunden bei RT gegen einen Röntgenfilm (X-Omat, Kodak). Dabei konnte eine maximale Substratphosphorylierung nach 15 Minuten IL-1 Stimulation beobachtet werden

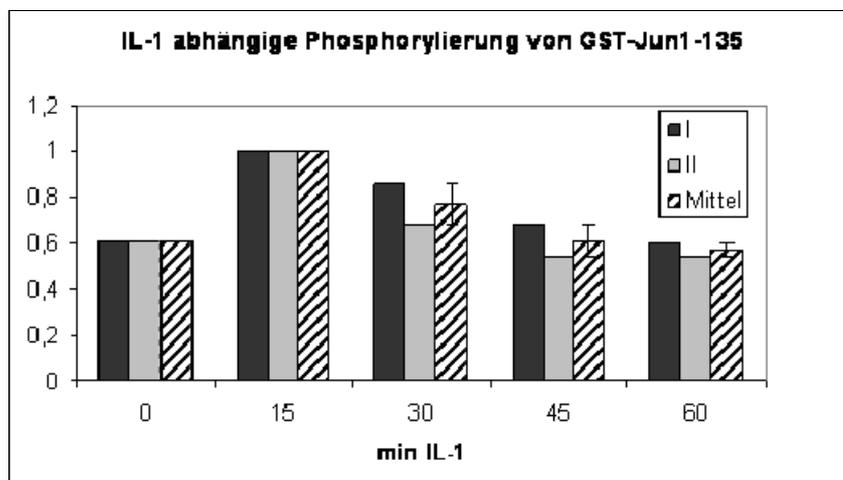


Abb. 2.16 Zusammenfassung der densitometrischen Auswertung zweier unabhängiger Messungen der IL-1 induzierten Phosphorylierung von GST-Jun1-135

Die Auswertung wurde unter Verwendung des Programms *ImageJ 1.38x* (W. Rasband, National Institute for Health, USA) an Autoradiographien der entsprechenden Kinaseassays durchgeführt. Die Werte wurden jeweils auf die Signalmaxima normiert, diese wurden gleich eins gesetzt.

Wie die Abbildung veranschaulicht, wurde GST-Jun1-135 nach 15 Minuten IL-1 Stimulation maximal phosphoryliert, wobei der Anstieg ca. 65% betrug. Die Phosphorylierung sank sukzessive und erreichte annähernd das Niveau der basalen Phosphorylierung nach einer Stunde Stimulation.

2.3.3 IL-1 abhängige Phosphorylierung der NRF-Deletionsmutanten

Nachdem die IL-1 Stimulierbarkeit der HeLa-Zellen und die damit verbundene Aktivierung der Signalwege anhand der induzierten Phosphorylierung endogener Kernproteine sowie eines GST-Jun-Fusionsproteins überprüft worden war, konnte der Einfluss der IL-1 Stimulation auf die Phosphorylierung von NRF untersucht werden. Dazu wurden dieselben Deletionsmutanten verwendet, die bereits für die Erstellung des basalen Phosphorylierungsprofils benutzt wurden.

Eine zuvor durchgeführte Kontrollreaktion mit der GST-Domäne als Proteinsubstrat sollte zeigen, ob eine IL-1 Stimulation die *in vitro* Phosphorylierung von GST bewirkt (siehe auch Abschnitt 2.1.2), was die Aussagen über die Phosphorylierung von NRF *ad absurdum* führen würde. Eine IL-1 induzierte Phosphorylierung der GST-Domäne konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Die in den folgenden Abschnitten untersuchten NRF-Deletionsmutanten sind als GST-NRF Fusionsproteine zu betrachten, werden jedoch nur als NRF bezeichnet.

2.3.3.1 Phosphorylierung von NRF1-449

Zunächst wurde der Bereich der Aminosäuren 1-449 untersucht. Dieser umfasst die aktive Repressionsdomäne (ARD) sowie die von Bartels [Bartels, 2006] charakterisierte und die minimale NRF-p65-Interaktionsdomäne. Die Deletionsmutante NRF1-449 zeigte im basalen Zustand den höchsten Phosphorylierungsgrad, so dass es von großem Interesse war, ob die Phosphorylierung in diesem Bereich von NRF IL-1 abhängig reguliert würde.

Rekombinantes GST-NRF1-449 wurde zu diesem Zweck mit Kernlysaten aus IL-1 stimulierten HeLa-Zellen unter Zusatz von Kinasepuffer und ATP/ γ -³²P ATP inkubiert. Die Kernlysate wurden zuvor, wie in 2.3.2 beschrieben, auf ihre Kinaseaktivität und die IL-1 vermittelte JNK-Aktivierung getestet. Nach der Aufreinigung an GSH-Sepharose wurden die NRF- und Jun-GST-Fusionsproteine mittels denaturierender PAGE aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden durch CBB visualisiert und die Substratphosphorylierung mittels Autoradiographie der getrockneten Gele detektiert (**Abb. 2.17**). Eine quantitative Auswertung wurde erneut mittels *ImageJ* durchgeführt. Die Signalquotienten aus Autoradiographie und CBB-Färbung wurden auf das basale Niveau normiert, dessen Wert wurde gleich eins gesetzt (**Abb. 2.18**).

Wie **Abb. 2.17** repräsentativ veranschaulicht, bewirkte eine IL-1 Stimulation der HeLa-Zellen nach 15 Minuten, anders als im Fall von Jun, zunächst eine geringe Reduktion der Phosphorylierung von NRF1-449. Nach 30 Minuten Stimulation konnte dann sukzessive ein Anstieg in der Phosphorylierung des Substrats auf ca. beobachtet werden, welche das basale Niveau um bis zu 65% überstieg und nach einer Stunde leicht abflachte (**Abb. 2.18**). Scheinbar

fungierte NRF nicht als Substrat der SAPK/JNK Kinase, wobei zu bedenken ist, dass nur die Gesamtphosphorylierung verfolgt wurde. Bedingt durch die im Vergleich zu Jun1-135 etwas mehr als dreifache Proteingröße von NRF1-449 könnte es sich dabei auch um eine Überlagerung mehrerer regulatorischer Effekte handeln, zumal nach 30 Minuten IL-1 Stimulation das basale Phosphorylierungsniveau deutlich überschritten wurde. Es wäre also durchaus möglich, dass die Phosphorylierung durch IL-1 aktivierte Kinasen (z.B. SAPK/JNK) zeitlich verzögert in Erscheinung tritt.

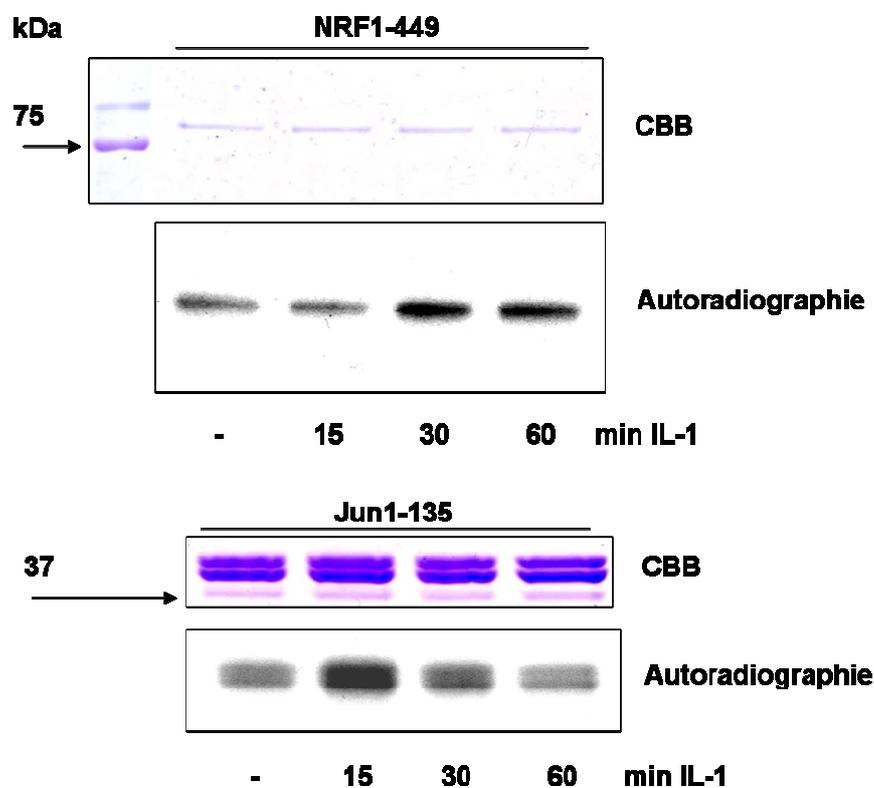


Abb. 2.17 IL-1 abhängige Phosphorylierung von NRF1-449 im Vergleich zu Jun1-135

Die Abbildung zeigt die IL-1 abhängige Phosphorylierung von NRF1-449 (oben) sowie von Jun1-135 (unten). Jeweils gleiche Mengen an GST-NRF1-449 bzw. GST-Jun1-135 wurden mit Kernlysaten IL-1 stimulierter HeLa-Zellen (null Minuten bis zu einer Stunde) für 30 Minuten bei 30°C unter Zusatz von 0,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP inkubiert. Nach Aufreinigung an GSH-Sepharose und Aufkochen in Auftragspuffer wurden die Proteine mittels denaturierender PAGE aufgetrennt. Die Färbung der Gele erfolgte mittels CBB. Nach dem Trocknen wurde die Substratphosphorylierung mittels Autoradiographie bei -80°C für 16 Stunden (NRF1-449) bzw. drei Stunden (Jun1-135) gegen einen Röntgenfilm (Kodak, X-Omat).

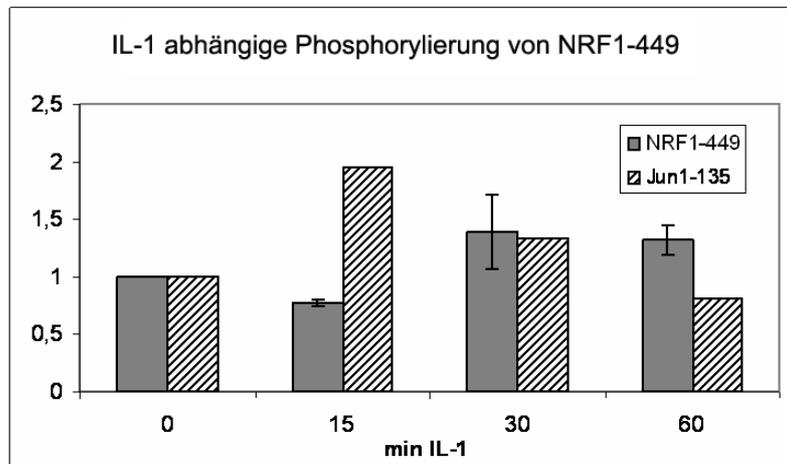


Abb. 2.18 Densitometrische Auswertung der *in vitro* Phosphorylierung von NRF1-449 und Jun1-135

Die Abbildung fasst die Ergebnisse der Auswertung für NRF1-449 (graue Säulen) und Jun1-135 (gestreift) zusammen. Die Auswertung wurde mittels *ImageJ 1.38x* (W. Rasband, National Institutes for Health, USA) durchgeführt. Dazu wurden die Signalfächen der CBB gefärbten Proteinbanden sowie der autoradiographischen Banden densitometrisch bestimmt. Die Flächenquotienten aus Autoradiographie/CBB wurden auf den jeweiligen Quotienten der basalen Phosphorylierung (null Minuten IL-1) normiert, dessen Wert wurde gleich eins gesetzt.

2.3.3.2 Phosphoaminosäureanalyse der IL-1 abhängigen Phosphorylierung von NRF1-449

Aus der Phosphoaminosäureanalyse der basalen Phosphorylierung war bereits bekannt, dass der Aminosäurebereich von 1-449 Serin/Threonin phosphoryliert vorliegt. Die Frage lag daher nahe, an welchen Aminosäureresten die IL-1 abhängige Regulation stattfindet.

Zu diesem Zweck wurde GST-NRF1-449 mit Kernlysaten IL-1 stimulierter HeLa-Zellen unter Zusatz von $1 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP inkubiert. Nach weiterer Aufarbeitung und denaturierender PAGE wurde das Gel CBB gefärbt und anschließend nass exponiert. Wie **Abb. 2.19** demonstriert, wurde das Phosphorylierungsprofil aus **Abb. 2.17** reproduziert.

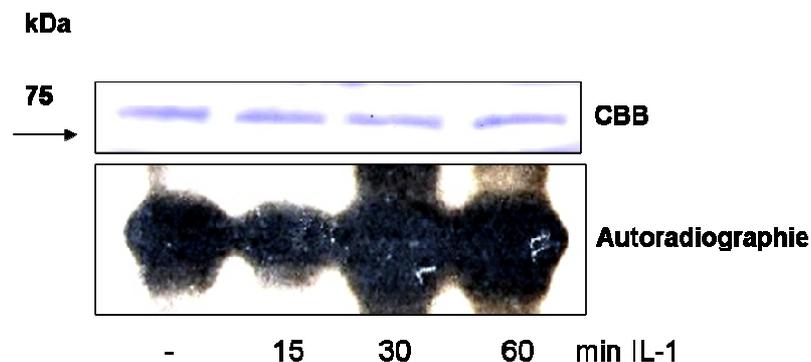


Abb. 2.19 *In vitro* Phosphorylierung von NRF1-449 in Abhängigkeit von IL-1 für die Phosphoaminosäureanalyse

Rekombinantes GST-NRF1-449 wurde mit jeweils gleichen Mengen an Kernlysaten IL-1 stimulierter HeLa-Zellen unter Zusatz von $1 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP für eine Stunde bei 30°C inkubiert. Nach Aufreinigung über GSH-Sepharose und denaturierender PAGE wurden die Proteinbanden durch CBB visualisiert. Die Detektion der Substratphosphorylierung wurde mittels Autoradiographie für 30 Minuten bei -80°C gegen einen Röntgenfilm (Kodak, X-Omat) durchgeführt und diente der Reproduktionskontrolle vor der weiteren Aufarbeitung.

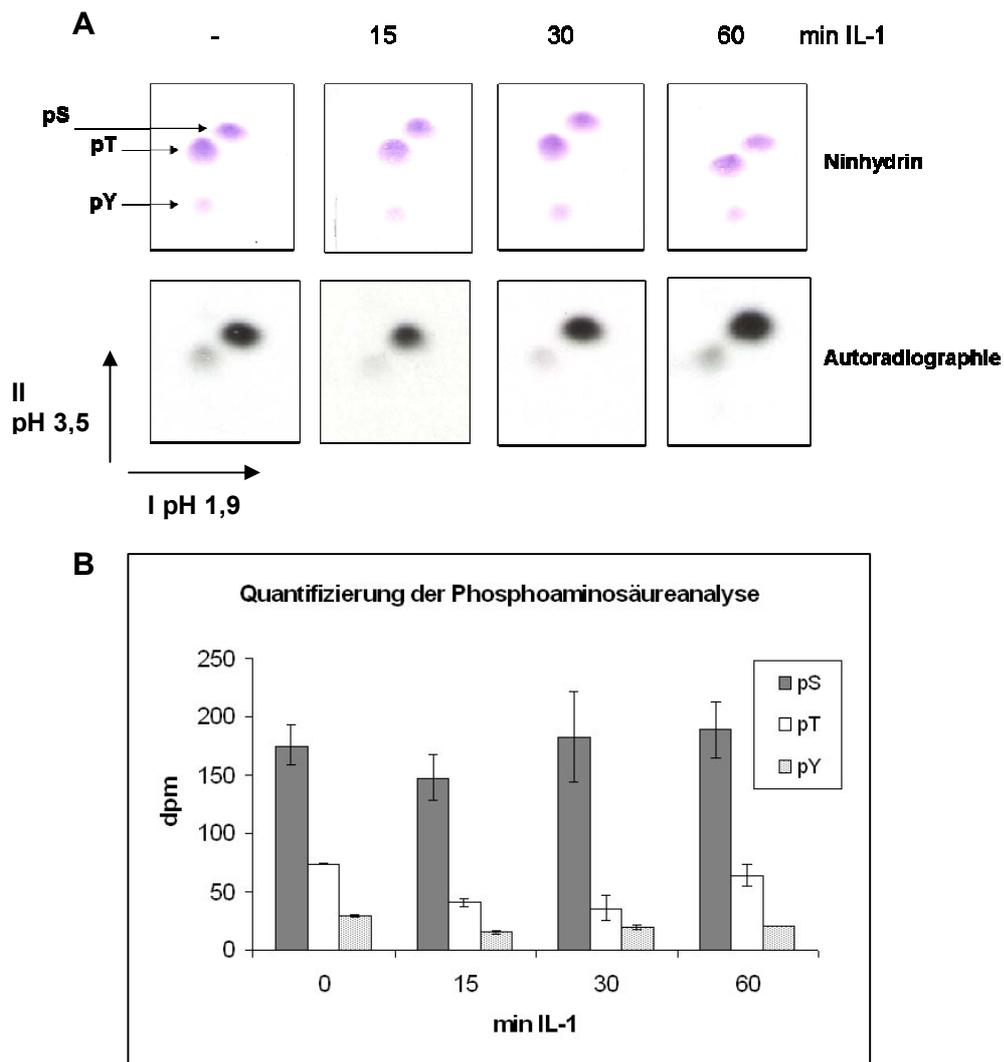


Abb. 2.20 Phosphoaminosäureanalyse der IL-1 abhängigen Phosphorylierung von NRF1-449

Für die Analyse wurden die Proteinbanden aus dem nicht getrockneten Gel geschnitten und in 6 M HCl bei 110°C für eine Stunde inkubiert. Nach Evaporation der Säure und Aufnahme der Proben in Elektrophoresepuffer pH 1,9 wurden jeweils gleiche Mengen Material unter Zusatz von $0,5 \mu\text{l}$ Phosphoaminosäurestandard auf eine Zellulose beschichtete Dünnschichtplatte (Merck) aufgetropft und getrocknet. Die Phosphoaminosäuren wurden mittels zweidimensionaler Elektrophorese aufgetrennt, der Standard wurde durch Ninhydrin visualisiert. Die Phosphoaminosäuren wurden mittels Autoradiographie (Kodak, X-Omat) für 18 Stunden bei -80°C detektiert (A). Für die quantitative Auswertung

wurden die Ninhydrin gefärbten Phosphoaminosäureflecken ausgeschnitten, zerteilt und mit Szintillatorflüssigkeit überzogen. Anschließend wurden die jeweiligen Zerfälle/Minute (Dpm) gemessen. Die Abbildung zeigt die Auftragung der jeweiligen Messwerte für die einzelnen Aminosäuren in Abhängigkeit der Stimulationsdauer mit IL-1 (**B**).

Nach der Exposition wurden die Proteinbanden aus dem Gel herausgeschnitten und in 6 M Salzsäure für eine Stunde bei 110°C hydrolysiert. Nach Evaporation der Säure und Aufnahme der Hydrolysate in Elektrophoresepuffer wurden jeweils gleiche Volumina unter Zusatz von Phosphoaminosäurestandard auf Zellulose beschichtete Dünnschichtplatten (Merck) getropft und getrocknet. Die Phosphoaminosäuren wurden mittels zweidimensionaler Elektrophorese aufgetrennt. Nach Anfärbung des Phosphoaminosäurestandards durch Ninhydrin wurden die Phosphoaminosäuren mittels Autoradiographie detektiert. Nach ausreichender Exposition wurden die Phosphoaminosäureflecken aus der Dünnschichtplatte isoliert. Unter Zusatz von Szintillator wurden die Zerfälle/Minute (dpm) gemessen.

Wie **Abb. 2.20 A** veranschaulicht, wurde NRF1-449 sowohl im basalen Zustand als auch in Abhängigkeit von IL-1 an Serin- und Threoninresten phosphoryliert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass 15 Minuten Stimulation durch IL-1 sowohl den Gehalt an Phosphoserin als auch an Phosphothreonin reduzierte.

Die weitere Stimulation mit IL-1 führte zu einem Wiederanstieg des Phosphoserin- und Phosphothreoningehalts (**Abb. 2.20 A**). Eine Quantifizierung der Daten geschah in diesem Fall durch Messung der Dpm der aus der Dünnschichtplatte isolierten Phosphoaminosäuren. Diese zeigte für den nicht stimulierten Zustand ein Verhältnis von pS/pT von ca. 2,4 und korrelierte so mit den Messungen aus **2.2.3**. Infolge der IL-1 Stimulation vergrößerte sich das Verhältnis, bedingt durch die verhältnismäßig stärkere Reduktion von Phosphothreonin, und erreichte bei 30 Minuten mit einem Wert von ca. 5 sein Maximum (**Abb. 2.20 B**). Normiert man die gemessenen Dpm der einzelnen Phosphoaminosäuren auf ihre jeweiligen Basalwerte und setzt diese gleich eins, so zeigt sich, dass die IL-1 abhängige Regulation der Phosphorylierung an Threonin im Mittel eine gegenüber Serin zeitlich verzögerte Kinetik aufwies. Dies resultierte darin, dass der Phosphothreoningehalt nach einer Stunde IL-1 Stimulation sein basales Niveau erreichte, während der Gehalt an Phosphoserin bereits nach 30 Minuten im Mittel größer als im nicht stimulierten Zustand war (**Abb. 2.21**).

Interessanterweise konnte durch Messung der Dpm ein gewisser Anteil an Phosphotyrosin detektiert werden, der – ähnlich zu den früheren Ergebnissen – durch Autoradiographie nicht sichtbar war. Der Anteil betrug durchweg weniger als 10% der Gesamtzerfälle aller Phosphoaminosäuren (**Abb. 2.21 b**), war damit jedoch größer als in den Messungen zum basalen Phosphorylierungsprofil (**Abb. 2.12**). Die unterschiedlichen Resultate sind

möglicherweise auf die besondere Säureempfindlichkeit von Phosphotyrosin zurückzuführen, was besonders bei geringen Mengen zu prozentual größeren Schwankungen führen kann. Wie die **Abb. 2.21 a** verdeutlicht, unterlag auch die Tyrosinphosphorylierung einer IL-1 bedingten Reduktion. Die weitere Stimulation führte nach einer Stunde zu einem Wiederanstieg auf ca. 70% des basalen Niveaus und blieb damit unter dem Gehalt an Phosphoserin – und Threonin zurück.

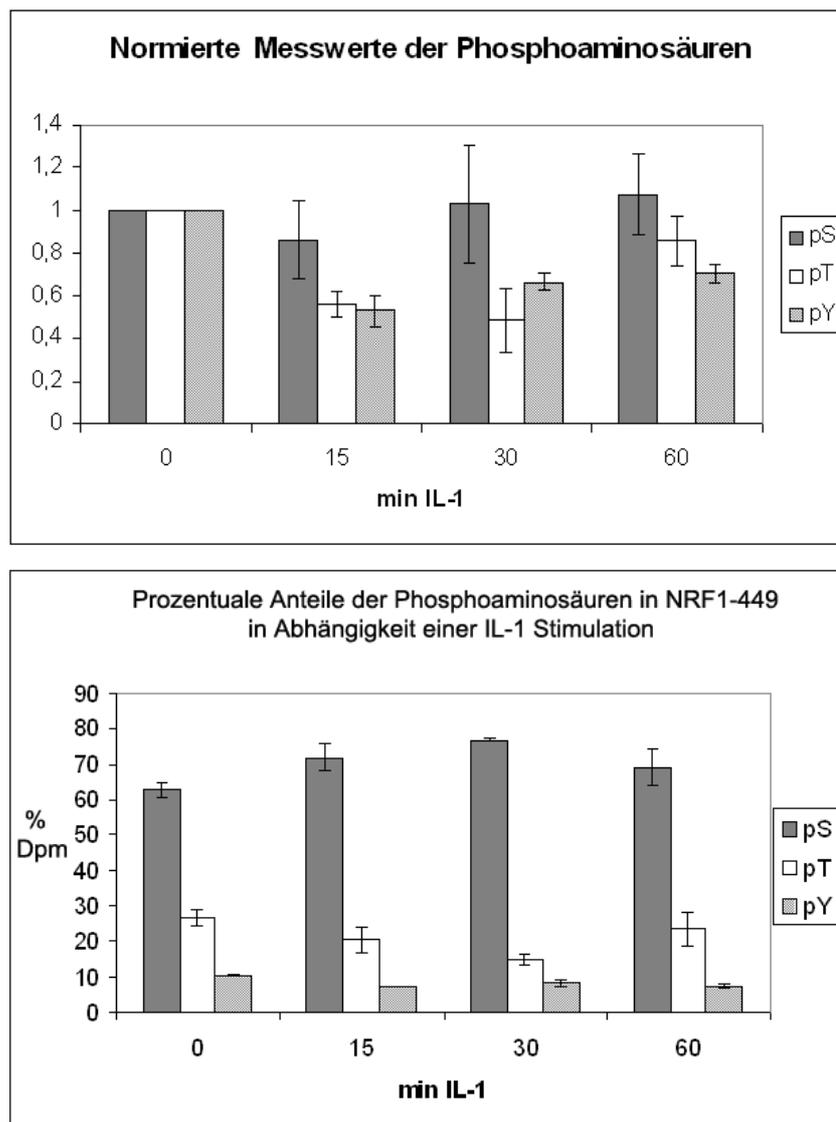


Abb. 2.21 Normierung der Phosphoaminosäuren (a, oben) und die prozentuale Verteilung der Phosphoaminosäuren in Abhängigkeit der IL-1 Stimulation (b, unten)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Sequenzbereich der Aminosäuren 1-449 von NRF sowohl im unstimulierten als auch im IL-1 stimulierten Zustand prominent an Serin- und Threoninresten phosphoryliert wird. Dabei führt eine Stimulation der Zellen mit IL-1 nach 15 Minuten zu einer Reduktion der Phosphorylierung, nach 30 Minuten zu einer neu induzierten Phosphorylierung vor allem an Serinen.

Um diesen Aminosäurebereich näher zu charakterisieren, wurden im Folgenden die Bereiche von 1-112 sowie von 112-449 separat betrachtet. Letzterer enthält die von Bartels und Mitarbeitern identifizierte minimale p65-Interaktionsdomäne [Bartels, 2006], während der Bereich von 1-112 in früheren Peptidkartierungen Bereiche mit hoher konstitutiver Phosphorylierung aufwies (Nourbakhsh, nicht publiziert).

2.3.3.3 Phosphorylierung von NRF1-112

Wie am Beispiel von NRF1-449 beschrieben wurde in *E. coli* produziertes und GSH-Sepharose aufgereinigtes GST-NRF1-112 (Klonierung siehe 2.4.1) mit jeweils gleichen Mengen Kernlysate aus IL-1 stimulierten HeLa-Zellen unter Zusatz von ATP/0,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP inkubiert. Nach Aufreinigung über GSH-Sepharose und Auftrennung mittels denaturierender PAGE wurden die Proteine durch CBB-Färbung visualisiert. Die Detektion der Substratphosphorylierung erfolgte nach Trocknen mittels Autoradiographie.

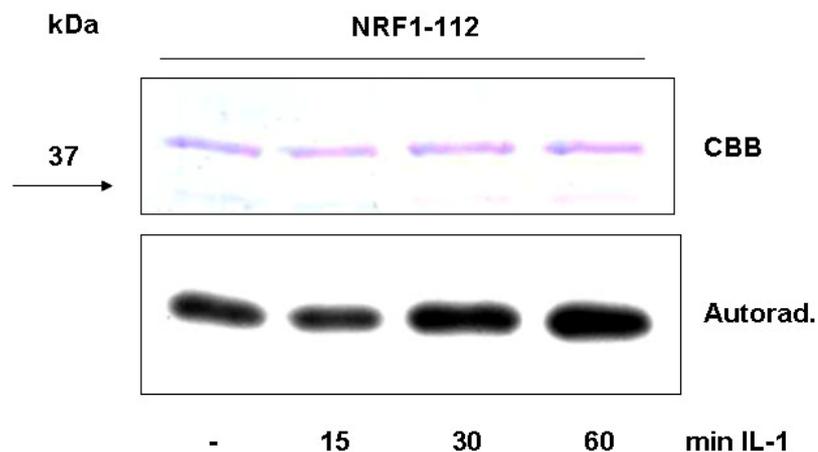


Abb. 2.22 IL-1 abhängige induzierte Phosphorylierung von NRF1-112 durch Kernlysate aus HeLa-Zellen

GST-NRF1-112 wurde mit jeweils gleichen Mengen an Kernlysaten aus IL-1 stimulierten bzw. unstimulierten HeLa-Zellen unter Zusatz von Kinasepuffer, ATP und 0,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach Aufreinigung an GSH-Sepharose und denaturierender PAGE wurden die Proteinbanden durch CBB-Färbung visualisiert. Die Detektion der Substratphosphorylierung geschah mittels Autoradiographie gegen einen Röntgenfilm (Kodak, X-Omat) bei -80°C für 13 Stunden. Die Abbildung zeigt eine induzierte Phosphorylierung nach 30 Minuten IL-1 Stimulation.

Wie **Abb. 2.22** demonstriert, bewirkte die IL-1 Stimulation der Zellen eine gegenüber NRF1-112 induzierte Kinaseaktivität, was der densitometrischen Auswertung nach zu einem mittleren Anstieg der Substratphosphorylierung um ca. 20% im Vergleich zum unstimulierten Zustand führte (**Abb. 2.23**). Die Phosphorylierungsintensität nahm bei einer Stimulation von einer Stunde noch weiter zu. Im Gegensatz zum C-terminal verlängerten NRF1-449 konnte im Mittel keine Reduktion der Phosphorylierung nach 15 Minuten IL-1 Stimulation beobachtet werden.

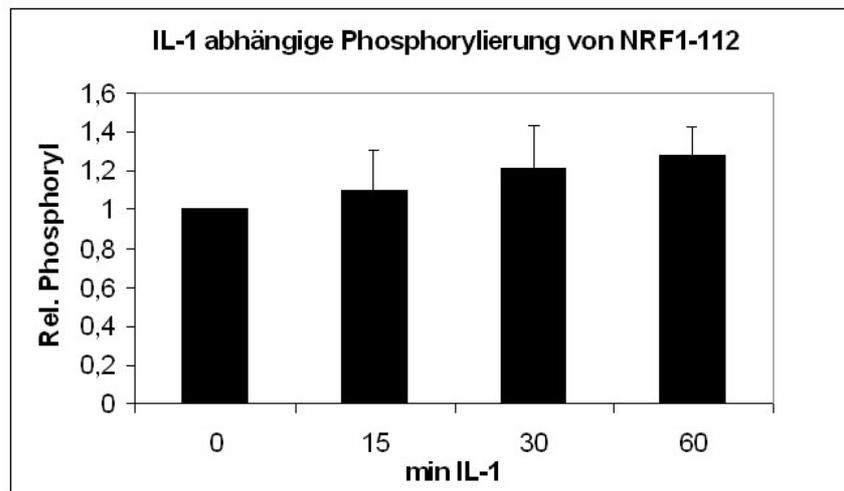


Abb. 2.23 Densitometrische Auswertung zeigt eine Zunahme der Phosphorylierung von 20% nach 30 Minuten IL-1 Stimulation

Für die Auswertung wurden die CBB gefärbten Proteinbanden sowie die autoradiographischen Signale aus sieben unabhängigen Experimenten mittels *ImageJ 1.38x* (W. Rasband, National Institutes for Health, USA) densitometrisch ausgewertet. Aus den Signalfächen der Autoradiographie und der CBB-Färbung wurden Quotienten gebildet und auf den Wert von null Minuten IL-1 normiert. Dieser wurde gleich eins gesetzt. Die Abbildung zeigt die IL-1 abhängige Phosphorylierung als Vielfache der basalen Phosphorylierung.

2.3.3.4 Phosphorylierung von NRF112-449

Bisher konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation durch IL-1 nach 15 Minuten zu einer Reduktion der Phosphorylierung von NRF1-449 führt, gefolgt von einem Wiederanstieg nach 30 Minuten Stimulation. Im Gegensatz dazu konnte für NRF1-112 nur ein Anstieg der Phosphorylierung in Abhängigkeit von IL-1 beobachtet werden.

NRF112-449 ist komplementär zu NRF1-112, bezogen auf den Aminosäurebereich von 1-449, was die Frage aufwarf, ob dieser Bereich möglicherweise für die Reduktion der Phosphorylierung verantwortlich ist. Um dies zu klären wurde rekombinantes GST-NRF112-449 mit gleichen Mengen Kernlysate aus IL-1 stimulierten bzw. unstimulierten HeLa-Zellen unter Zusatz von Kinasepuffer und ATP/0,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ γ - ^{32}P ATP inkubiert. Nach Aufreinigung über GSH-

Sepharose und Auftrennung mittels denaturierender PAGE wurden die Proteinbanden durch CBB-Färbung visualisiert. Die Substratphosphorylierung wurde durch Autoradiographie des getrockneten Gels detektiert. **Abb. 2.24** zeigt die Ergebnisse der *in vitro* Phosphorylierung. Die Stimulation der Zellen mit IL-1 bewirkte einen deutlich sichtbaren Anstieg der Phosphorylierung von NRF112-449. Diese Zunahme blieb während der weiteren Stimulation bis zu einer Stunde bestehen.

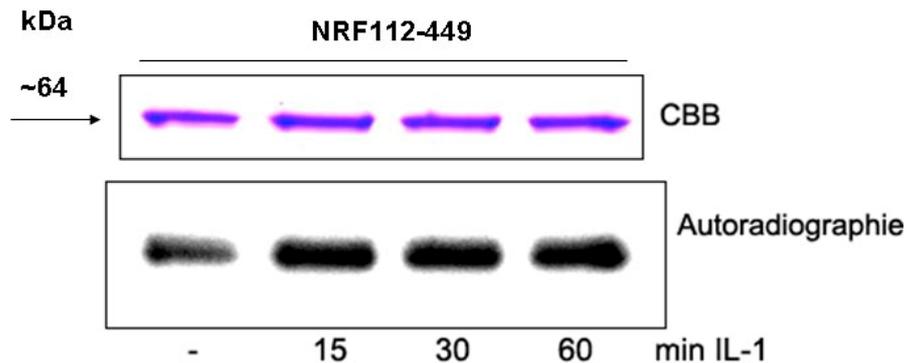


Abb. 2.24 IL-1 Stimulation führt zu einem Anstieg der Phosphorylierung von NRF112-449

Rekombinantes GST-NRF112-449 wurde mit jeweils gleichen Mengen an Kerlysat aus IL-1 stimulierten bzw. nicht stimulierten (Kontrolle) HeLa-Zellen unter Zusatz von Kinasepuffer und ATP/0,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP inkubiert. Die Proteine wurden anschließend an GSH-Sepharose aufgereinigt und mittels denaturierender PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden durch CBB-Färbung visualisiert und ihre Phosphorylierung durch Autoradiographie des getrockneten Gels detektiert. Die Detektion erfolgte bei RT für 19 Std. gegen einen Röntgenfilm (Kodak, X-Omat).

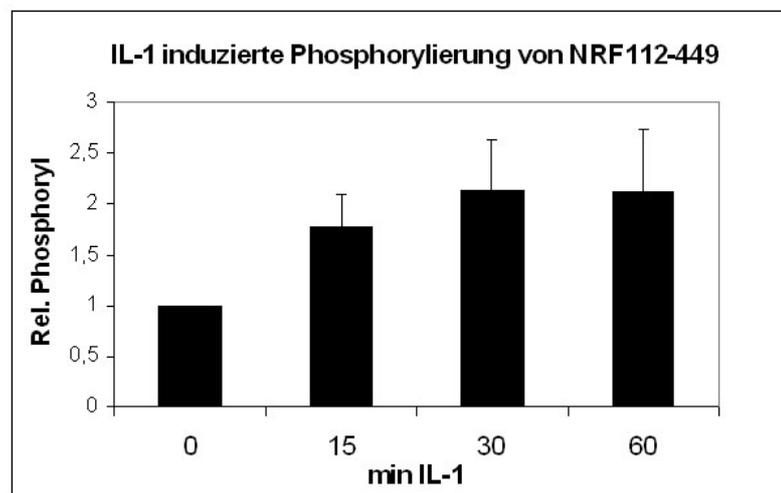


Abb. 2.25 Densitometrische Messungen zeigen einen Phosphorylierungsanstieg von bis zu 100% nach IL-1 Stimulation

Für die Auswertung wurden die CBB gefärbten Proteinbanden sowie die autoradiographischen Signale aus drei unabhängigen Experimenten mittels *ImageJ 1.38x* (W. Rasband, National Institutes for Health, USA) densitometrisch ausgewertet. Aus den Signalfächern der Autoradiographie und der CBB-Färbung wurden Quotienten gebildet und auf

den Wert von null Minuten IL-1 normiert. Dieser wurde gleich eins gesetzt. Die Abbildung zeigt die IL-1 abhängige Phosphorylierung als Vielfache der basalen Phosphorylierung.

Eine quantitative Auswertung mittels Densitometrie ergab einen Anstieg der Phosphorylierung nach IL-1 Stimulation um 75-100% bezogen auf die Phosphorylierung im nicht stimulierten Zustand (**Abb. 2.25**).

Damit unterlag die Phosphorylierung von NRF sowohl im Bereich der Aminosäuren 1-112 als auch von 112-449 einer IL-1 abhängigen Regulation. Die Stimulation durch IL-1 führte in beiden Fällen zu einer Zunahme der Phosphorylierung. Eine zwischenzeitliche Reduktion wie sie für NRF1-449 nach 15 Minuten IL-1 Stimulation beobachtet wurde, konnte weder für NRF1-112 noch für NRF112-449 festgestellt werden.

2.3.3.5 Phosphorylierung von NRF390-486

Die C-terminale Verlängerung von NRF1-389 um 60 Aminosäuren führte zu einer stärkeren basalen Phosphorylierung (siehe Abschnitt 2.2.3). Um zu überprüfen, ob sich in dem Bereich der Aminosäuren 390-449 auch induzierbare Phosphorylierungsstellen befinden, wurde GST-NRF390-486 zusammen mit Kernlysaten aus IL-1 stimulierten (30 Minuten, 60 Minuten) bzw. unstimulierten HeLa-Zellen inkubiert. Nach Aufreinigung der Proteine über GSH-Sepharose und denaturierender PAGE wurden die Proteinbanden durch CBB-Färbung visualisiert. Die Detektion der Substratphosphorylierung erfolgte mittels Autoradiographie.

Wie **Abb. 2.26** veranschaulicht, bewirkte eine IL-1 Stimulation von 30 Minuten einen starken Anstieg der Phosphorylierung, die nach einer Stunde auf das basale Niveau zurückkehrte. Die densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten ergab eine IL-1 bedingte Steigerung der Phosphorylierung um ca. 64% gegenüber dem nicht stimulierten Zustand (**Abb. 2.27**).

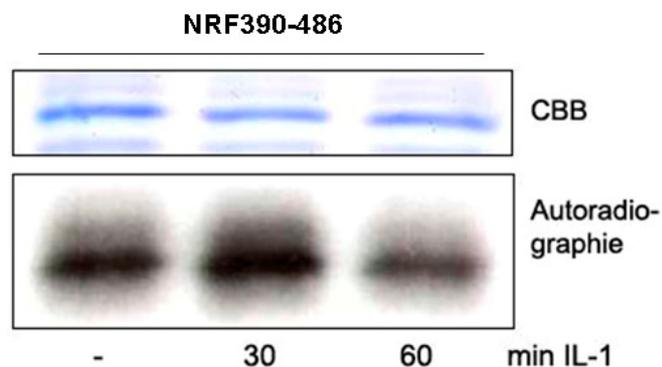


Abb. 2.26 Induzierte Phosphorylierung von NRF390-486 durch 30 Minuten IL-1 Stimulation

Rekombinantes GST-NRF390-486 wurde mit jeweils gleichen Mengen Kernlysate aus IL-1 stimulierten (30 Minuten bzw. 60 Minuten IL-1) bzw. nicht stimulierten HeLa-Zellen für 30 Minuten bei 30°C unter Zusatz von Kinasepuffer,

ATP und $0,1 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP inkubiert. Die Proteine wurden anschließend an GSH-Sepharose aufgereinigt und mittels denaturierender PAGE aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte durch CBB-Färbung. Nach Trocknen des Gels wurde die Substratphosphorylierung mittels Autoradiographie für 100 Stunden bei RT gegen einen Röntgenfilm (Kodak, X-Omat) detektiert.

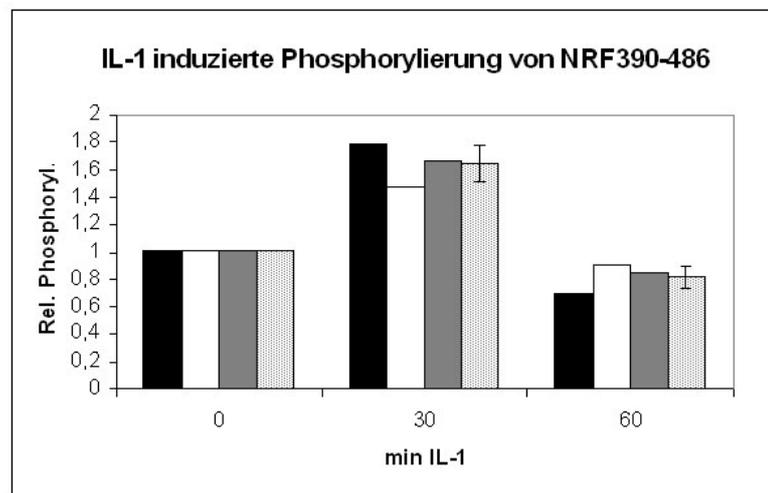


Abb. 2.27 Densitometrische Auswertung der *in vitro* Phosphorylierung von NRF390-486 zeigt einen Anstieg der Phosphorylierung um bis zu 70% nach 30 Minuten IL-1 Stimulation

Für die Auswertung wurden mittels des Programms *Image J 1.38x* (W. Rasband, Institutes for Health, USA) die Signalfächen aus Autoradiographie sowie CBB-Färbung ermittelt und jeweils zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die daraus resultierenden Quotienten wurden auf die Werte des unstimulierten Zustandes (null Minuten IL-1) normiert. Dieser wurde gleich eins gesetzt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten (schwarz, weiß und grau) sowie die Mittelwerte (gemustert) mit Standardabweichung.

Da NRF390-486 den zu untersuchen Bereich C-terminal um 37 Aminosäuren übersteigt, wurde der fragliche IL-1 regulierte Bereich zusätzlich vom C-Terminus des NRF-Proteins eingegrenzt. Dazu wurde zunächst die IL-1 abhängige Phosphorylierung von NRF390-486 mit dem C-terminal verlängerten NRF390-690 verglichen. Dazu wurden rekombinantes GST-NRF390-690 und GST-NRF390-486 zusammen mit Kernlysaten IL-1 stimulierter bzw. nicht stimulierter Zellen inkubiert. Nach Aufreinigung über GSH-Sepharose und denaturierender PAGE wurden die Proteinbanden durch CBB-Färbung visualisiert. Die Substratphosphorylierung wurde mittels Autoradiographie detektiert. Hier zeigte sich, dass im Fall von NRF390-690 die Phosphorylierung nach einer Stunde Stimulation nicht abnahm, sondern auf einem vergleichbaren Niveau blieb. Interessanterweise wurde ein wahrscheinlich C-terminal proteolytisch abgedautes Fragment von NRF390-690 oder ein unvollständiges Translationsprodukt mit dem ungefähren Molekulargewicht von NRF390-486 (markiert durch Asterisken) ein ähnliches Phosphorylierungsmuster wie dieses auf (**Abb. 2.28**).

So konnte vermutet werden, dass die nach 30 Minuten IL-1 Stimulation maximal phosphorylierbaren Aminosäuren im Bereich von 390-486 liegen, es jedoch weitere induzierbare Phosphorylierungen geben muss, die weiter C-terminal liegen und zeitlich später phosphoryliert werden.

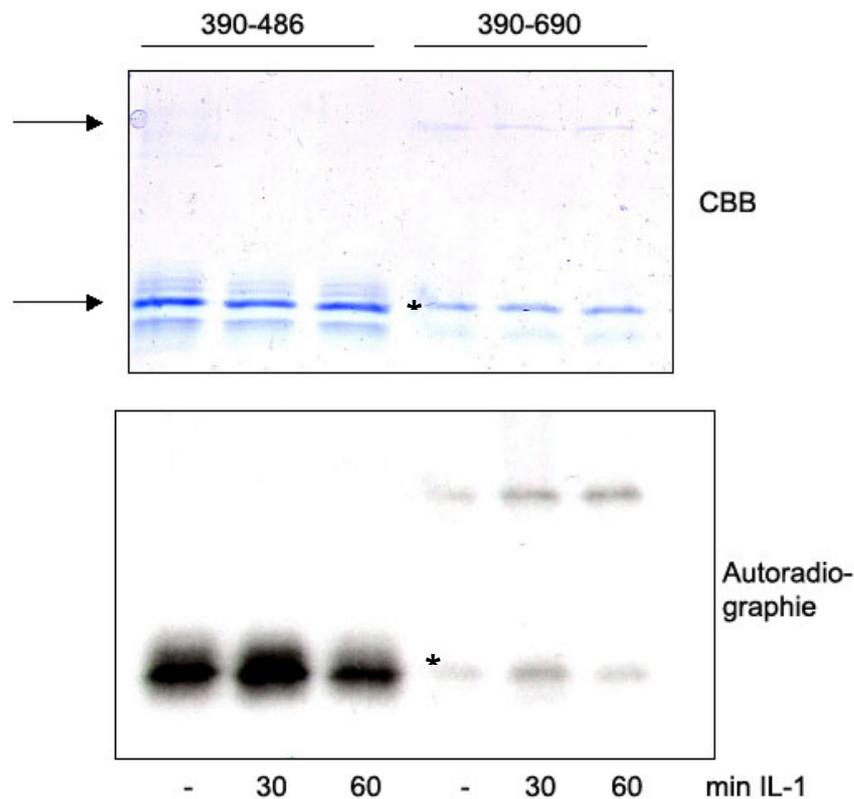


Abb. 2.28 Vergleichende Phosphorylierung von NRF390-486 und NRF390-690 zeigt ein unterschiedliches Verhalten nach IL-1 Stimulation

Rekombinantes GST-NRF390-486 sowie GST-NRF390-690 (Pfeile) wurden mit jeweils gleichen Mengen an Kernlysat aus IL-1 stimulierten (39 Minuten, 60 Minuten) bzw. nicht stimulierten Zellen unter Zusatz von Kinasepuffer, ATP/0,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Proteine wurden anschließend an GSH-Sepharose aufgereinigt und über eine denaturierende PAGE aufgetrennt. Durch CBB-Färbung wurden die Proteine visualisiert. Nach Trocknen des Gels wurde die Substratphosphorylierung durch Autoradiographie gegen einen Röntgenfilm (Kodak, X-Omat) für 100 Stunden bei RT detektiert. Asterisk markiert proteolytisches Fragment von NRF390-690.

2.3.3.6 Phosphorylierung von NRF447-690

Abschließend wurde der Bereich der Aminosäuren von 447-690 betrachtet. Dieser umfasst den C-Terminus von NRF mit putativen DNA erkennenden Domänen (G-Patch, R3H), spielte jedoch nach den bisherigen Erkenntnissen weder für die reprimierende noch für die koaktivierende Funktion des Proteins eine Rolle.

Aufgrund der in 2.5.3.6 geäußerten Vermutung war es dennoch von Interesse, ein IL-1 abhängiges Phosphorylierungsprofil für diesen Bereich von NRF zu erstellen. Dazu wurde rekombinantes GST-NRF447-690 zusammen mit Kernlysaten aus IL-1 stimulierten bzw. nicht stimulierten HeLa-Zellen inkubiert. Nach Aufreinigung an GSH-Sepharose und denaturierender PAGE wurden die Proteine durch CBB-Färbung visualisiert. Die Detektion der Substratphosphorylierung erfolgte mittels Autoradiographie. Wie **Abb. 2.29** veranschaulicht, bewirkte eine Stimulation der Zellen mit IL-1 eine zeitlich sukzessive Zunahme der Phosphorylierung von NRF447-690 durch die entsprechenden Kernlysate. Eine an drei unabhängigen Experimenten durchgeführte densitometrische Analyse ergab eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung nach einer Stunde IL-1 Stimulation (**Abb. 2.30**).

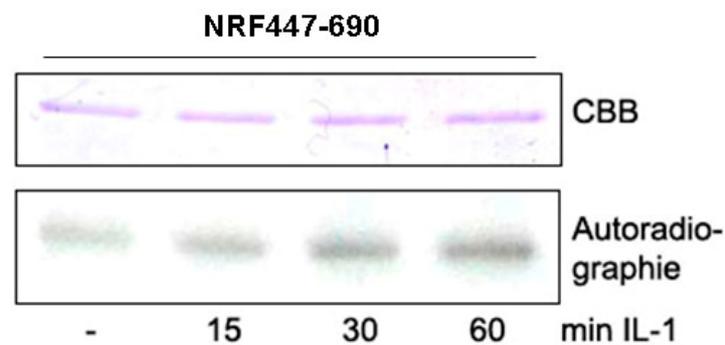


Abb. 2.29 Durch IL-1 Stimulation induzierte Phosphorylierung von NRF447-690

Rekombinantes GST-NRF447-690 wurde mit jeweils gleichen Mengen Kernlysat IL-1 stimulierter bzw. nicht stimulierter HeLa-Zellen unter Zusatz von Kinasepuffer und ATP/0,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach Aufreinigung der Proteine an GSH-Sepharose wurden diese über denaturierende PAGE aufgetrennt und durch CBB-Färbung visualisiert. Die Detektion der Substratphosphorylierung geschah mittels Autoradiographie gegen einen Röntgenfilm (Kodak, X-Omat) für 65 Stunden bei -20°C.

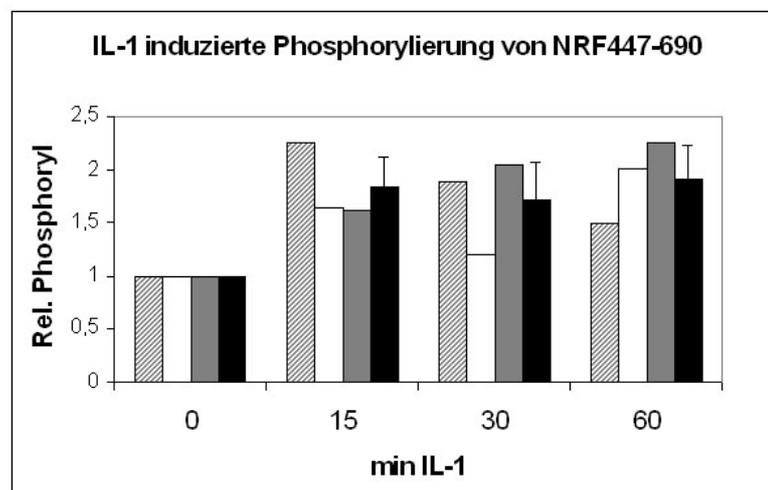


Abb. 2.30 Densitometrische Auswertung der *in vitro* Phosphorylierung von NRF447-690 zeigt einen Phosphorylierungsanstieg um ca. 70% nach einer Stunde IL-1 Stimulation

Die Abbildung zeigt die auf die basalen Werte (null Minuten IL-1) normierten Quotienten aus den Signalfächern der Autoradiographie und der CBB-Färbung in Abhängigkeit einer IL-1 Stimulation. Die Quotienten aus der unstimulierten Kontrolle wurden jeweils gleich eins gesetzt. Es wurden drei unabhängige Experimente densitometrisch unter Verwendung des Programms *Image J 1.38x* (W. Rasband, Institutes for Health, USA) ausgewertet (gestreift, weiß und grau). Die gebildeten Mittelwerte (schwarz) sind mit den errechneten Standardabweichungen versehen.

2.3.4 IL-1 induzierte Phosphorylierung durch Kernlysate aus HEK-293R1-Zellen

Um zu zeigen, dass die IL-1 Abhängigkeit der Phosphorylierung von NRF im zellfreien Versuchssystem nicht auf eine Zelllinie beschränkt ist, wurden die Versuche beispielhaft für NRF1-449 mit Kernlysaten aus IL-1 stimulierten HEK293R1-Zellen wiederholt. NRF1-449 deckt ca. zwei Drittel der Aminosäuresequenz von NRF ab und umfasst sowohl die durch IL-1 regulierten putativen Phosphorylierungsstellen als auch die für die Interaktion mit p65 NF κ B und die duale Funktion notwendigen Domänen [Bartels, 2006].

HEK293R1-Zellen (AMGEN, USA) sind mit dem IL-1 Rezeptor stabil transfizierte HEK293-Zellen. Durch die Überexpression des Rezeptors sollte der Signaleintrag in die Zelle durch IL-1 Stimulation gegenüber anderen Zelllinien (z.B. HeLa) erhöht sein, was sich positiv auf die zu messende Substratphosphorylierung durch IL-1 induzierte Kinasen auswirken müsste. Bei den Versuchen mit Kernlysaten aus HeLa-Zellen fiel besonders auf, dass die Phosphorylierung der rekombinanten GST-NRF-Substrate im Vergleich zu GST-Jun häufig weniger effizient ausfiel, was durch ein weniger affines Substratverhalten gegenüber den beteiligten Kinasen erklärt werden könnte. Durch eine stärkere Aktivierung dieser Kinasen könnten die Regulationseffekte in der Phosphorylierung von NRF vergrößert werden.

Um dies zu überprüfen, wurden HEK293R1-Zellen in einer Zeitreihe IL-1 stimuliert bzw. als Kontrolle unstimuliert belassen. Die Kernfraktionen wurden präpariert und nach Konzentrationsmessung (Bradford) in einer denaturierenden PAGE durch CBB-Färbung abgeglichen. Anschließend wurden gleiche Mengen Kernlysate zusammen mit rekombinantem GST-Jun1-135 unter Zusatz von Kinasepuffer und ATP/0,1 μ Ci γ -³²P ATP inkubiert.

Die Proteine wurden anschließend an GSH-Sepharose aufgereinigt und über eine denaturierende PAGE aufgetrennt. Nach CBB-Färbung und Trocknen des Gels wurde die Substratphosphorylierung durch Autoradiographie detektiert. Eine Quantifizierung wurde durch Ausschneiden der CBB gefärbten Proteinbanden und anschließender Messung der Zerfälle/Minute (Dpm) durchgeführt.

Wie **Abb. 2.31** veranschaulicht, verursachte die IL-1 Stimulation von HEK293R1-Zellen eine maximale Phosphorylierung von GST-Jun1-135 nach 15 Minuten Stimulation, wie es bereits an HeLa-Zellen beobachtet werden konnte. Eine Quantifizierung durch Messung der Dpm zeigt jedoch, dass die Aktivierung der Jun-N-terminalen Kinase (JNK) mit einem Anstieg der Phosphorylierung auf etwa das 2,5 fache des basalen Niveaus stärker war als in HeLa-Zellen (2.2.2) und auch zeitverzögert herunterreguliert wurde (**Abb. 2.32**).

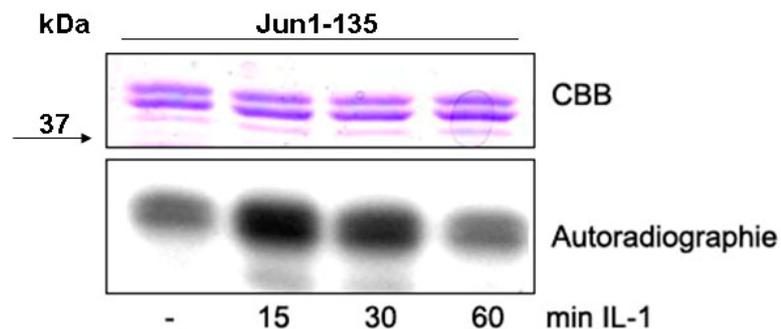


Abb. 2.31 IL-1 Stimulation von HEK293R1-Zellen führt nach 15 Minuten zu einer maximalen Phosphorylierung von Jun1-135

Rekombinantes GST-Jun1-135 wurde mit jeweils gleichen Mengen an Kernlysate aus IL-1 stimulierten bzw. nicht stimulierten HEK293R1-Zellen unter Zusatz von Kinasepuffer, ATP und $0,1 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine an GSH-Sepharose aufgereinigt und mittels denaturierender PAGE aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden durch CBB-Färbung visualisiert. Die Substratphosphorylierung wurde nach Trocknung des Gels durch Autoradiographie gegen einen Röntgenfilm (Kodak, X-Omat) für sechs Stunden bei -80° detektiert.

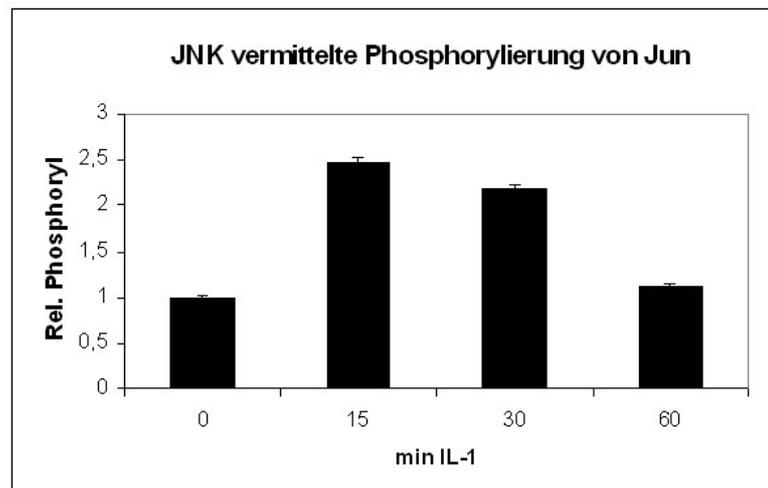


Abb. 2.32 Quantitative Auswertung durch Messung der Dpm zeigt einen IL-1 induzierten Anstieg der Phosphorylierung auf das 2,5 fache des basalen Niveaus

Für die Quantifizierung wurden die CBB gefärbten Proteinbanden aus dem getrockneten Gel geschnitten und in Szintillatorflüssigkeit überführt. Die Zerfälle/Minute wurden durch Messung im Szintillationszähler detektiert. Die Werte der IL-1 Stimulation wurde auf das basale Niveau (null Minuten IL-1) normiert, dieses wurde gleich eins gesetzt.

Im Folgenden wurde GST-NRF1-449 zusammen mit den Kernlysaten inkubiert. Nach Aufreinigung an GSH-Sepharose und denaturierender PAGE wurde die Substratphosphorylierung mittels Autoradiographie detektiert. Die Visualisierung der Proteinbanden geschah durch CBB-Färbung.

Abb. 2.33 zeigt die Ergebnisse der *in vitro* Phosphorylierung. Wie zu erkennen ist, bewirkte die Stimulation durch IL-1 auch hier eine Modulation der Phosphorylierung von NRF. Jedoch trat ein Wideranstieg der Phosphorylierung offensichtlich zeitverzögert und deutlich schwächer ein als dies in den Experimenten mit HeLa-Zellen der Fall war. Eine quantitative Analyse durch Dpm-Messung der Proteinbanden aus zwei unabhängigen Experimenten (**Abb. 2.34**) enthüllte, dass im Gegensatz zu der Phosphorylierung durch Kernlysate aus HeLa-Zellen nach 30 Minuten Stimulation nur ein allenfalls geringer Wideranstieg der Phosphorylierung einsetzte. Nach einer Stunde Stimulation erhöhte sich das Niveau der Phosphorylierung im Mittel auf ca. das 1,2 fache der basalen Phosphorylierung und damit insgesamt geringer ausfiel als dies für HeLa-Zellen beobachtet wurde (2.3.3.1).

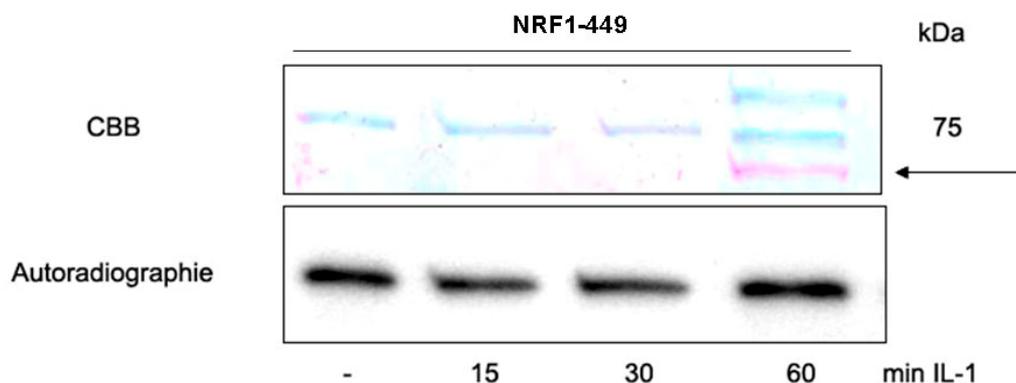


Abb. 2.33 Phosphorylierung von NRF1-449 durch Kernlysate IL-1 stimulierter HEK293R1-Zellen zeigt zu HeLa-Zellen veränderte IL-1 abhängige Modulation

Rekombinantes GST-NRF1-449 wurde zusammen mit gleichen Mengen an Kernlysate aus IL-1 stimulierten bzw. unstimulierten HEK293R1-Zellen unter Zusatz von Kinasepuffer, ATP/0,1 μ Ci/ μ l γ -³²P ATP für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine an GSH-Sepharose aufgereinigt und über eine denaturierende PAGE aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden durch CBB-Färbung visualisiert. Nach Trocknen des Gels wurde die Substratphosphorylierung mittels Autoradiographie gegen einen Röntgenfilm (Kodak, X-Omat) für drei Stunden bei -80°C detektiert.

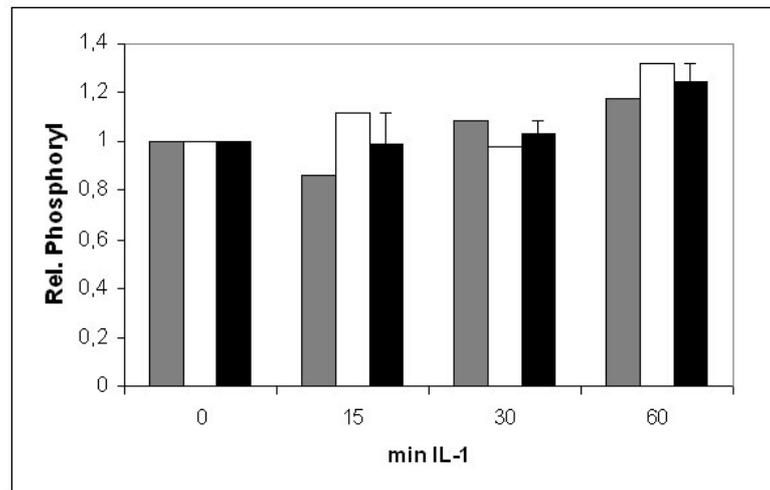


Abb. 2.34 Quantifizierung durch Messung der Dpm zeigt einen zeitverzögerten Wiederanstieg der Phosphorylierung von NRF1-449 nach 30 Minuten IL-1 Stimulation

Die Abbildung zeigt die Dpm-Werte als Vielfache der basalen Phosphorylierung (null Minuten IL-1) aus zwei unabhängigen Experimenten (grau, weiß) sowie die Mittelwerte mit Standardabweichung (schwarz). Für die Analyse wurden die CBB gefärbten Proteinbanden aus dem getrockneten Gel geschnitten und in Szintillatorflüssigkeit überführt. Anschließend wurden die Zerfälle/Minute gegen einen Leerwert im Szintillationszähler gemessen. Alle Werte wurden auf die basalen Dpm normiert, diese wurden jeweils gleich eins gesetzt.

Bedingt durch diese Ergebnisse haben sich die Erwartungen, durch die Verwendung der IL-1 Rezeptor überexprimierenden HEK293R1-Zellen eine stärkere Modulation der *in vitro* Phosphorylierung von NRF beobachten zu können, nicht bestätigt. Es wurde deshalb von der Erstellung eines vollständigen Phosphorylierungsprofils mit dieser Zelllinie abgesehen.

2.4 Regulation der NRF-Phosphorylierung nach Virusinfektion

Neben der Rezeptor vermittelten zellulären Signalinduktion durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- α vermag auch die Virusinfektion einer Zelle diese zu aktivieren und so zur Neusynthese von Chemokinen wie IL-8 (CXCL-8) anzuregen. Dabei werden virale Komponenten, z.B. Nukleinsäuren, durch zelluläre Rezeptoren der TLR-Familie erkannt. Dies führt ähnlich der Reaktion auf Zytokine zu einer Aktivierung von Kinasekaskaden und assoziierten Transkriptionsfaktoren (z.B. NF κ B), die mit der positiven Regulation proinflammatorischer Gene, z.B. IL-8 eine Immunantwort auslösen [Wagoner *et al.*, 2007].

2.4.1 Infektion von HeLa-Zellen mit dem Newcastle Disease Virus (NDV)

Um zu untersuchen, ob eine virale Infektion die Phosphorylierung von NRF beeinflusst und inwieweit sie sich möglicherweise von der Zytokin abhängigen Regulation durch IL-1 unterscheidet, wurden HeLa-Zellen mit dem Newcastle Disease Virus (NDV), einem aviären Vertreter aus der Familie der Paramyxoviren behandelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Für die Experimente wurden anschließend Kernlysate präpariert und nach Konzentrationsmessung (Bradford) auf einem Proteingel durch CBB-Färbung abgeglichen. Zusätzlich wurden jeweils gleiche Mengen an Kernlysate unter Zusatz von Kinasepuffer und ATP/ γ - ^{32}P ATP autophosphoryliert. Die Phosphorylierung der endogenen Kernproteine wurde mittels Autoradiographie detektiert.

Abb. 2.35 zeigt die Ergebnisse. Dabei wurde deutlich, dass im Gegensatz zu der Stimulation durch IL-1 die virale Infektion durch das NDV einen heterogenen Einfluss auf die Phosphorylierung der Kernproteine ausübt. Während die Stimulation mit IL-1 bei allen sieben betrachteten Proteinen einen Anstieg der Phosphorylierung nach 15 Minuten verursachte (2.5), konnte im Fall der Infektion durch NDV nur bei drei von sieben untersuchten Proteinen eine induzierte Phosphorylierung beobachtet werden. Für die vier weiteren wurde entweder zunächst kein Anstieg bzw. eine Abnahme der Phosphorylierung festgestellt werden (**Abb. 2.36**). Zudem trat eine maximale Phosphorylierung bei allen Proteinen frühestens nach 30 Minuten nach Stimulation ein. Dies spricht für eine unterschiedliche Kinetik der beteiligten Signalwege und lässt ein ebenfalls vom IL-1 Signalweg abweichendes Phosphorylierungsprofil für NRF erwarten.

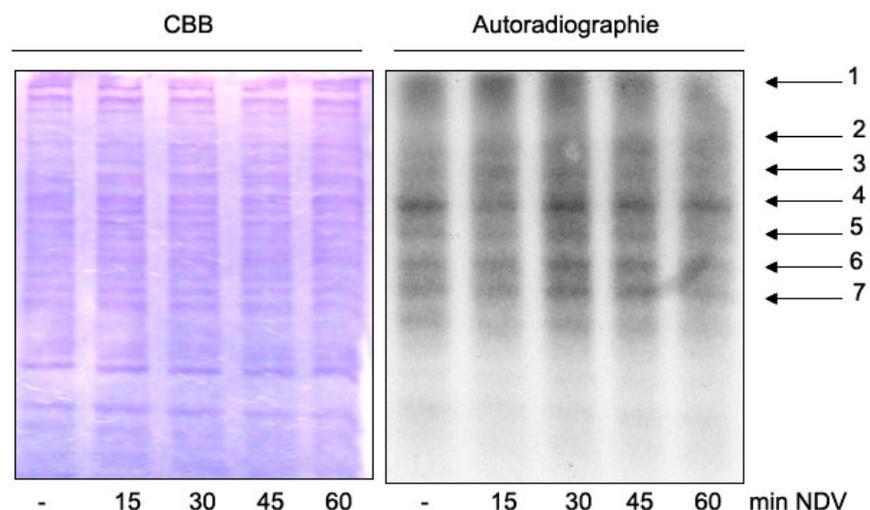


Abb. 2.35 Eine Zellstimulation durch NDV-Infektion zeigte eine von IL-1 verschiedene Phosphorylierungskinetik

Für das Experiment wurden jeweils gleiche Mengen an Kernlysaten aus NDV stimulierten bzw. unbehandelten HeLa-Zellen unter Zusatz von Kinasepuffer und ATP/0,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Ansätze wurden in Auftragspuffer aufgekocht und über eine denaturierende PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden durch CBB visualisiert. Ihre Phosphorylierung wurde mittels Autoradiographie des getrockneten Gels gegen einen Röntgenfilm (Kodak, X-Omat) für sechs Stunden bei -80°C detektiert.

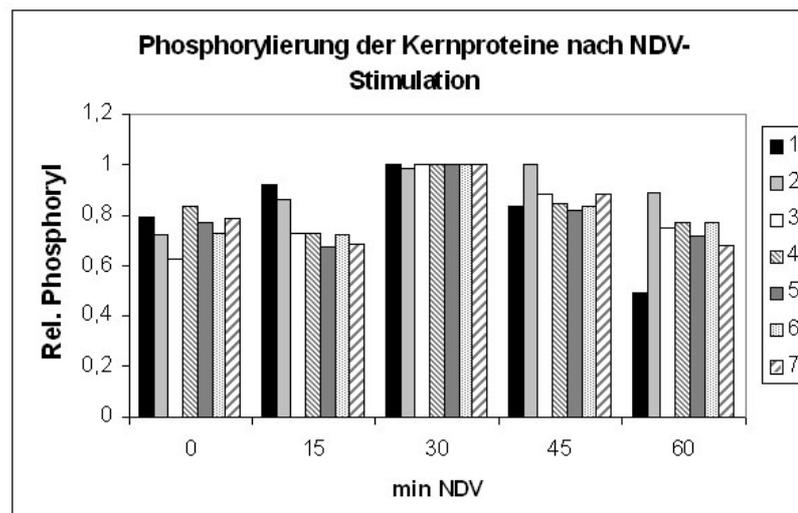


Abb. 2.36 Untersuchte Kernproteine zeigten eine maximale Phosphorylierung nach 30 Minuten Stimulation durch NDV

Für eine quantitative Betrachtung wurden sieben prominente Kernproteine (1-7) anhand der Autoradiographie ausgesucht. Mittels des Programms *Image J 1.38x* (W. Rasband, National Institutes for Health, USA) wurden jeweils identische Areale markiert und densitometrisch ausgewertet. Für die Darstellung in der Abbildung wurden die erhaltenen Signalfächen der Proteinphosphorylierungen auf den jeweils größten Wert normiert, dieser wurde gleich eins gesetzt.

2.4.2 NDV abhängige Phosphorylierung von NRF1-449

In den Experimenten zur IL-1 abhängigen Phosphorylierung wurde für NRF der Bereich von 1-449 in seiner Phosphorylierung bereits als sichtbar reguliert beschrieben. Aus diesem Grund wurde der Einfluss einer Virusinfektion zunächst an dieser Deletionsmutante untersucht.

Dazu wurde GST-NRF1-449 mit jeweils gleichen Mengen Kernlysate aus NDV stimulierten bzw. nicht stimulierten HeLa-Zellen unter Zusatz von Kinasepuffer und ATP/0,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP inkubiert. Nach Aufreinigung der Proteine an GSH-Sepharose und Auftrennung über eine denaturierende PAGE wurden die Proteinbanden mittels CBB-Färbung visualisiert. Die Detektion der Substratphosphorylierung geschah durch Autoradiographie. Wie **Abb. 2.37** veranschaulicht, bewirkte die Zellstimulation durch NDV eine Reduktion der Phosphorylierung nach 30 Minuten gefolgt von einem Wiederanstieg innerhalb weiterer 15 Minuten Stimulation. Eine Quantifizierung mittels densitometrischer Analyse zeigte, dass die Stimulation eine

maximale Reduktion der Phosphorylierung um ca. 50% verursachte. Trotz des Wiederanstiegs nach 45 Minuten erreichte das Niveau auch nach einer Stunde nur ca. 72% der basalen Phosphorylierung (**Abb. 2.38**).

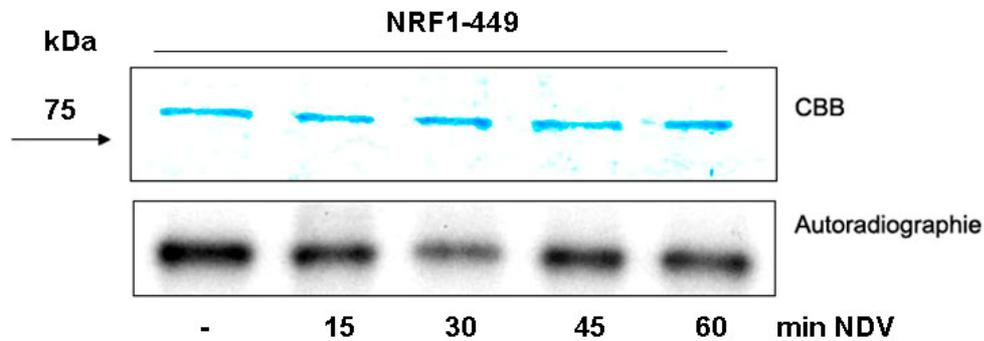


Abb. 2.37 Die Zellstimulation durch NDV bewirkte eine Reduktion der Phosphorylierung von NRF1-449 nach 30 Minuten

Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment zur NDV abhängigen *in vitro* Phosphorylierung von NRF1-449. Rekombinantes GST-NRF1-449 wurde mit jeweils gleichen Mengen an Kernlysat aus NDV stimulierten bzw. nicht stimulierten HeLa-Zellen für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine an GSH-Sepharose aufgereinigt und mittels denaturierender PAGE aufgetrennt. Nach CBB-Färbung wurde die Substratphosphorylierung durch Autoradiographie gegen einen Röntgenfilm (Kodak, X-Omat) für 14 Stunden bei -80°C detektiert.

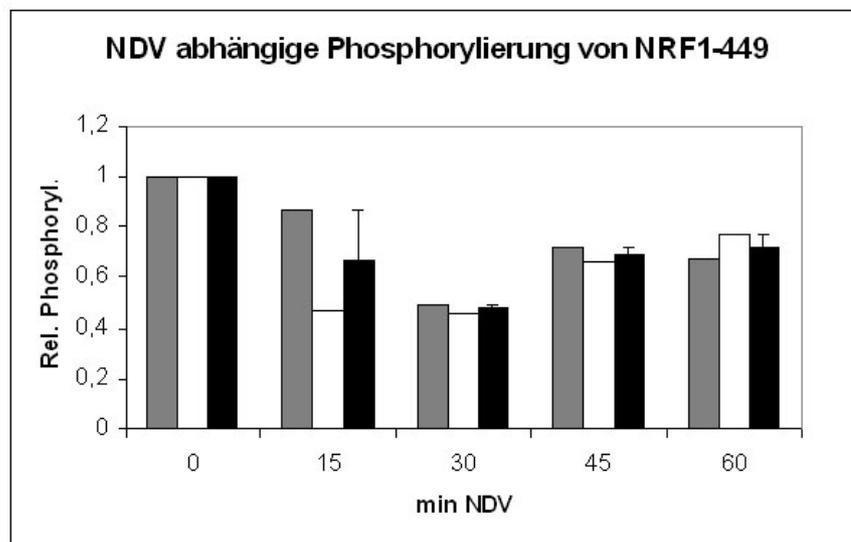


Abb. 2.38 Die densitometrische Quantifizierung zeigte eine anhaltende Reduktion der Phosphorylierung durch NDV Stimulation

Die Abbildung zeigt die densitometrische Auswertung der NDV abhängigen Phosphorylierung von NRF1-449 als Vielfache der basalen Phosphorylierung aus zwei unabhängigen Experimenten (weiß, grau) sowie deren errechnete Mittelwerte (schwarz) mit den sich ergebenden Standardabweichungen. Dazu wurden mittels des Programms *Image J* 1.38x (W. Rasband, National Institutes for Health, USA) jeweils identische Flächen der CBB gefärbten Proteinbanden sowie der autoradiographischen Signale densitometrisch ausgewertet. Die erhaltenen Signalfächen aus

Autoradiographie und CBB-Färbung wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt und die errechneten Quotienten auf den Wert der basalen Phosphorylierung normiert. Dieser wurde gleich eins gesetzt.

2.4.3 NDV abhängige Phosphorylierung von NRF390-486

In den Experimenten zur IL-1 abhängigen Phosphorylierung von NRF erwies sich der Bereich der Aminosäuren 390-486 als Ziel Zytokin induzierter Kinasen, die eine maximale Phosphorylierung nach 30 Minuten Stimulation verursachten.

Um zu untersuchen, inwiefern dieser Bereich Ziel von Phosphorylierungen nach Zellstimulation durch NDV sein könnte, wurde GST-NRF390-486 zusammen mit Kernlysaten aus NDV stimulierten bzw. nicht stimulierten HeLa-Zellen unter Zusatz von ATP/ γ - ^{32}P ATP inkubiert.

Nach Aufreinigung der Proteine an GSH-Sepharose gefolgt von der Auftrennung durch denaturierende PAGE wurden die Proteine mittels CBB-Färbung visualisiert. Die Detektion der Substratphosphorylierung erfolgte durch Autoradiographie des getrockneten Gels.

Wie **Abb. 2.39** zeigt, wurde NRF390-486 nach einer NDV Stimulation der Zellen maximal phosphoryliert. Eine längere Stimulation bis zu einer Stunde resultierte in einer sukzessiven Abnahme der Phosphorylierung. Die mittels Densitometrie durchgeführte Quantifizierung ergab einen NDV induzierten Anstieg der Phosphorylierung auf das ca. 3,5 fache des basalen Wertes. Trotz der folgenden Reduktion im zeitlichen Verlauf blieb das Niveau nach einer Stunde mit einem Faktor von ca. 1,5 über dem nicht stimulierten Zustand (**Abb. 2.40**).

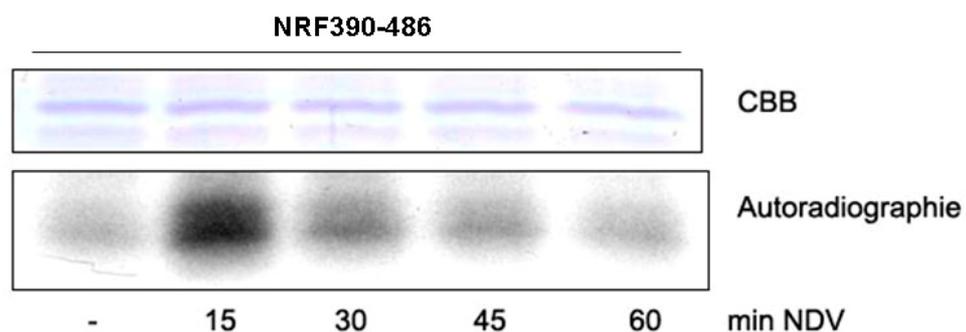


Abb. 2.39 NDV Stimulation von 15 Minuten induzierte eine maximale Phosphorylierung von NRF390-486

Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment zur NDV abhängigen Phosphorylierung von NRF390-486. Rekombinantes GST-NRF390-486 wurde mit jeweils gleichen Mengen an Kernlysate aus NDV stimulierten bzw. nicht stimulierten HeLa-Zellen für 30 Minuten bei 30°C unter Zusatz von Kinasepuffer und ATP/0,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ γ - ^{32}P ATP inkubiert. Die Proteine wurden anschließend an GSH-Sepharose aufgereinigt und mittels denaturierender PAGE aufgetrennt. Nach CBB-Färbung zur Visualisierung der Proteinbanden und anschließendem Trocknen des Gels wurde die Substratphosphorylierung mittels Autoradiographie gegen einen Röntgenfilm (Kodak, X-Omat) bei -80°C für 42 Stunden detektiert.

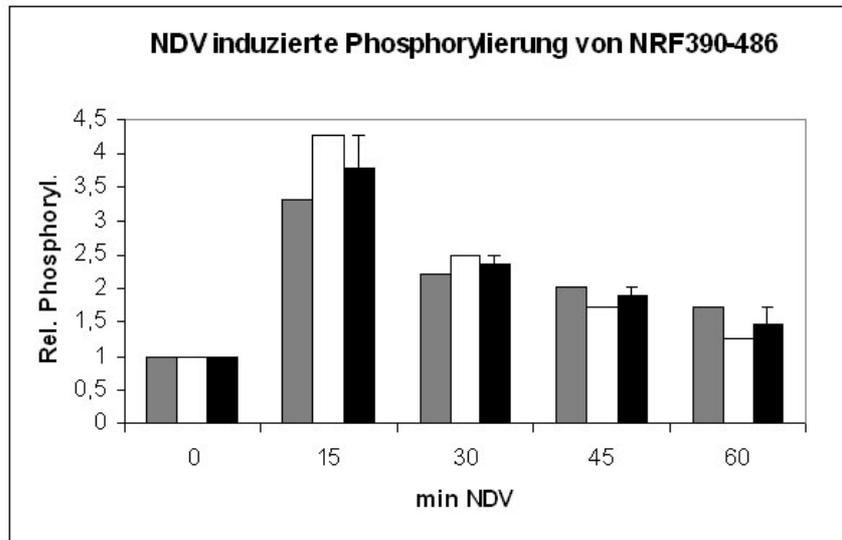


Abb. 2.40 Densitometrische Quantifizierung zeigt einen Anstieg der Phosphorylierung von NRF390-486 auf das 3,5 fache des nicht stimulierten Niveaus

Die Abbildung zeigt die Quotienten der densitometrisch aus zwei unabhängigen Experimenten (grau, weiß) ermittelten Signalfächen aus Autoradiographie und CBB-Färbung sowie deren Mittelwerte (schwarz) als Vielfache der basalen Phosphorylierung. Für die Auswertung wurden mittels des Programms *Image J 1.38x* (W. Rasband, National Institutes for Health, USA) jeweils identische Areale der CBB gefärbten Proteinbanden sowie der autoradiographischen Signale für die NDV abhängigen Phosphorylierungen und die nicht stimulierte Phosphorylierung analysiert. Die erhaltenen densitometrischen Flächen wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt und die resultierenden Quotienten auf den Wert der basalen Phosphorylierung normiert. Dieser wurde gleich eins gesetzt.

Wie die Experimente zur NDV abhängigen Phosphorylierung von NRF für die gewählten Bereiche 1-449 und 390-486 exemplarisch zeigen, bewirkte die virale Zellstimulation ähnlich der Stimulation durch IL-1 zunächst eine Reduktion der Phosphorylierung im Bereich der Aminosäuren 1-449. Im Gegensatz zur IL-1 Stimulation war diese mit 30 Minuten jedoch zeitverzögert. Analog dazu konnte nach NDV Stimulation im Bereich von 390-486 eine induzierte maximale Phosphorylierung nach 15 Minuten beobachtet werden. Diese trat nach IL-1 Stimulation erst nach 30 Minuten ein und war synchron mit einem Wiederanstieg der Phosphorylierung für NRF1-449. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für beide aktivierte Signalwege, durch IL-1 und Virus, identische Sequenzbereiche aus NRF Ziele der Modifikation durch Phosphorylierung darstellen, die jedoch einer jeweils unterschiedlichen zeitlichen Kinetik unterliegen. Ob dabei auch jeweils gleiche Aminosäuren modifiziert werden, bleibt dabei unbeantwortet. Man könnte jedoch vermuten, dass aufgrund einer potenziellen Konvergenz der Signalwege mit der Konsequenz der transkriptionellen Aktivierung durch NRF die fraglichen Kinasen in beiden Signalwegen und damit ihre Zielaminosäuren in NRF identisch sind.

2.5 Phosphopeptidkartierung nach *in vitro* Phosphorylierung (*Phosphopeptide Mapping*) in Abhängigkeit einer IL-1 Stimulation

Im bisherigen experimentellen Ansatz wurde nicht mit definierten Kinasen gearbeitet. Die aus nicht stimulierten bzw. stimulierten Zellen präparierten Kernfraktionen enthielten vielmehr eine Vielzahl regulierter Kinasen, die unter *in vitro* Bedingungen exogene Substrate phosphorylieren können. Die durch Autoradiographie detektierte Phosphorylierung von NRF stellte somit stets die Summe einzelner Phosphorylierungen dar. Dies kann zur Nivellierung von Phosphorylierungsunterschieden führen, wie sie z.B. Zytokin induzierte Aktivierung von Kinasen auftreten. Die Phosphopeptidkartierung kann hier experimentelle Unterstützung leisten, indem sie die das Phosphorylierungsprofil weiter auflöst. Die *in vitro* gewonnenen Informationen über die basale und IL-1 induzierte Phosphorylierung von NRF sollten durch die Betrachtung der Peptidebene erweitert werden. Die Methode wurde zunächst an *in vitro* phosphoryliertem Protein etabliert, um später auch für eine vergleichende Untersuchung der *in vivo* Phosphorylierung mittels biosynthetischer Markierung (siehe Abschnitt 2.8.1) eingesetzt zu werden. Die Phosphopeptidkartierung ist eine klassische Methode zur Aufklärung der Proteinphosphorylierung. Sie basiert auf dem proteolytischen Verdau (z.B. mittels Trypsin) des Substratproteins und der anschließenden zweidimensionalen Auftrennung der entstehenden (Phospho-) Peptide mittels Elektrophorese und Chromatographie. Dabei kann in der ersten elektrophoretischen Dimension Information über das Ladungs/Masse-Verhältnis gewonnen werden, während die Auftrennung in der zweiten chromatographischen Dimension mit der Hydrophobizität der Peptide korreliert. Die Verwendung von (γ - ^{32}P)-ATP zur Markierung macht diese Methode zudem äußerst sensitiv [Boyle *et al.*, 1991; van der Geer & Hunter, 1994].

2.5.1 Phosphopeptidkartierung von NRF1-112

Als primäres Ziel wurde NRF1-112 ausgewählt, da die Anzahl der theoretisch entstehenden tryptischen Peptide überschaubar war und der Bereich sich als Ziel sowohl konstitutiver als auch IL-1 induzierter Phosphorylierung auszeichnete (siehe Abschnitt 2.3.3.3).

Dazu wurde rekombinantes GST-NRF1-112 durch Kernlysate IL-1 stimulierter HeLa-Zellen sowie nicht stimulierter Zellen (Kontrolle) unter Zusatz von Kinasepuffer, ATP/ γ - ^{32}P ATP *in vitro* phosphoryliert. Nach Aufreinigung an GSH-Sepharose wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Proteinabgleich geschah mittels Ponceau-Färbung (nicht gezeigt). Die Proteine wurden anschließend proteolytisch verdaut, aufgearbeitet und zweidimensional aufgetrennt (4.2.4.11). Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wurden die

Phosphopeptide autoradiographisch visualisiert. Zur näheren Charakterisierung wurden prominente Peptide zufällig durchnummeriert (I-VIII bzw. I-IX) auf ihr jeweiliges Migrationsverhalten untersucht. Wie die **Abb. 2.41** zeigt, ergaben beide Proben, unstimuliert sowie IL-1 stimuliert, mit Ausnahme des Peptids IX ein ähnliches Peptidmuster. Im Fall der IL-1 stimulierten Probe schien dies zunächst zu den Signalen der unstimulierten Probe diagonal verschoben. Zunächst bestand die Annahme, dass es sich, bedingt durch zusätzliche IL-1 induzierte Phosphorylierungen, um Phosphoisomere derselben Peptide handeln könnte [van der Geer & Hunter, 1994]. Eine Auftragung der Laufquotienten der Peptide in beiden Dimensionen zeigte jedoch, dass mit Ausnahme von Peptid VIII, die Peptide I-VII im IL-1 stimulierten Zustand in beiden Dimensionen in gleicher Richtung versetzt waren (**Abb. 2.42**). Dies deutete auf Unregelmäßigkeiten im Lauf hin und widersprach der anfänglichen Annahme einer Diagonalenbildung durch phosphoisomere Peptide [van der Geer & Hunter, 1994]. Es handelte sich folglich sehr wahrscheinlich jeweils um dieselben Phosphopeptide. Eine densitometrische Auswertung zeigte, dass die Signalintensität der Peptide I, II, III, VI und VII nach IL-1 Stimulation zunahm, während für die Peptide IV, V und VIII eine Reduktion beobachtet werden konnte (**Abb. 2.43**). Interessant im Fall der Reduktion des Signals von Peptid VIII war das Erscheinen des Peptids IX in diagonalen Position, was als wesentlicher Unterschied zwischen dem nicht stimulierten Zustand und dem nach IL-1 Stimulation festgestellt werden konnte. Um eine mögliche Verdeckung von Peptid IX im nicht stimulierten Zustand aufgrund der schlechteren Auftrennung im fraglichen Bereich auszuschließen, wurde dieser mittels des Programms *Image J 1.38x* näher betrachtet. Eine höhere Auflösung zeigte, dass es sich im nicht stimulierten Zustand tatsächlich um ein einzelnes Peptid handelte, während nach IL-1 Stimulation zwei distinkte Peptide erkennbar waren (**Abb. 2.44**). Die diagonale Position der Peptide zueinander ließ vermuten, dass es sich um Phosphoisomere desselben Peptids handeln könnte. Die Signalreduktion des Peptids VIII zugunsten des Peptids IX könnte so als Gleichgewichtsverschiebung einer Einfachphosphorylierung zu einer Mehrfachphosphorylierung gedeutet werden. Eine genaue Zuordnung könnte nur durch weitere Analyse mittels Sekundärverdau und Edman-Abbau isolierter Peptide erfolgen, was im technischen Rahmen dieser Arbeit leider nicht möglich war.

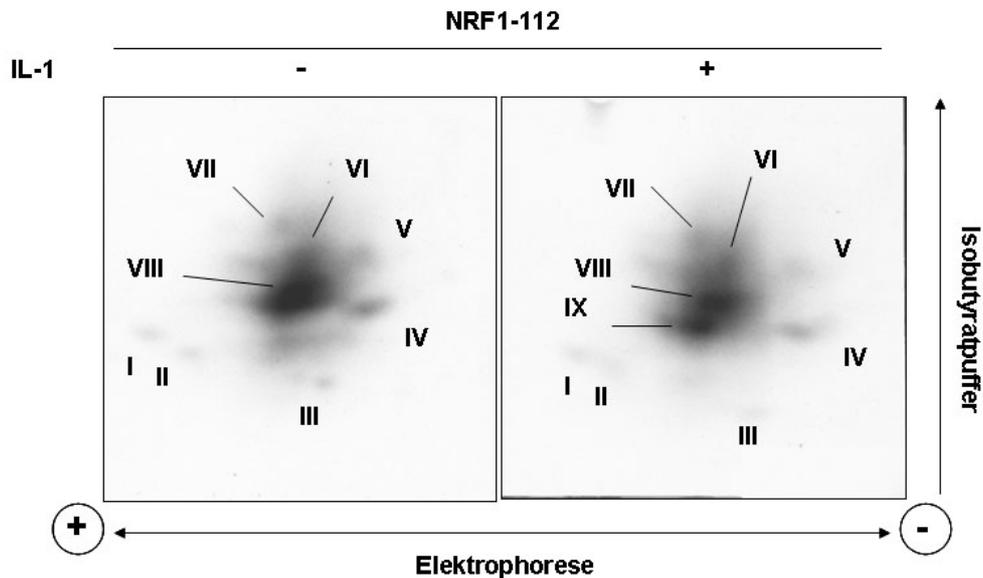


Abb. 2.41 Vergleichende Phosphopeptidkartierung von NRF1-112 im nicht stimulierten und IL-1 stimulierten Zustand

GST-NRF1-112 wurde zusammen mit gleichen Mengen Kernlysate aus nicht stimulierten (-) bzw. IL-1 stimulierten HeLa-Zellen (+) unter Zusatz von $1\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP für eine Std. bei 30°C inkubiert. Nach Aufreinigung an GSH-Sepharose und Auftrennung mittels denaturierender PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend durch Zugabe von Trypsin proteolytisch verdaut. Die Peptide wurden anschließend eingeeengt, oxidiert und weiter aufgearbeitet. Anschließend wurden die getrockneten Peptide in Elektrophoresepuffer aufgenommen. 3909 cpm (-) bzw. 3824 cpm (IL-1) wurden auf eine Zellulose beschichtete Kunststoffolie (Merck) aufgetropft, getrocknet und anschließend elektrophoretisch und chromatographisch aufgetrennt. Die Detektion der Phosphopeptide geschah durch Autoradiographie der trockenen Folien für 93 Std. bei -80°C gegen einen Röntgenfilm (Kodak, X-Omat).

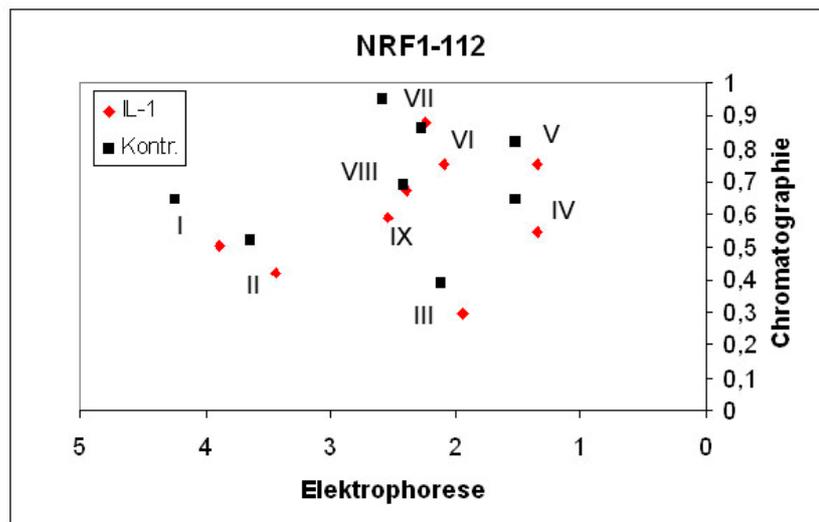


Abb. 2.42 Vergleich der Phosphopeptidmuster von NRF1-112 im nicht stimulierten und IL-1 stimulierten Zustand

Die Peptide I-IX wurden auf ihre relativen Laufstrecken in der elektrophoretischen sowie der chromatographischen Dimension untersucht. Als Referenz diente in der elektrophoretischen Dimension der Farbstoff Xylencyanol FF, in der Chromatographie ϵ -DNP-Lysin. Die gemessenen Laufstrecken wurden jeweils auf diese normiert. Die Abbildung zeigt die Positionen der Phosphopeptide im nicht stimulierten (Kontrolle, schwarz) sowie nach IL-1 Stimulation (IL-1, rot).

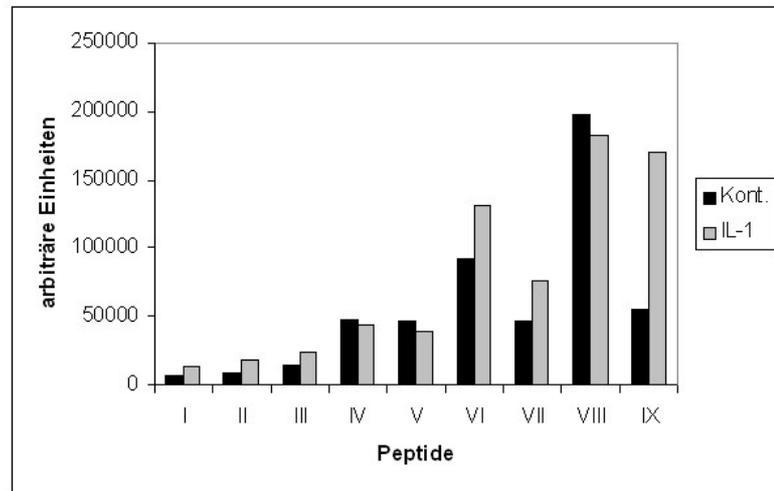


Abb. 2.43 Densitometrische Quantifizierung der Signalintensitäten der Phosphopeptide I-IX

Für eine vergleichende Quantifizierung wurden die autoradiographischen Signale der Peptide I-IX mittels des Programms *Image J 1.38x* (W. Rasband, Nat. Institutes for Health, USA) densitometrisch ausgewertet. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse für die einzelnen Peptide im nicht stimulierten Zustand (Kont., schwarz) sowie nach IL-1 Stimulation (IL-1, grau) als arbiträre Einheiten.

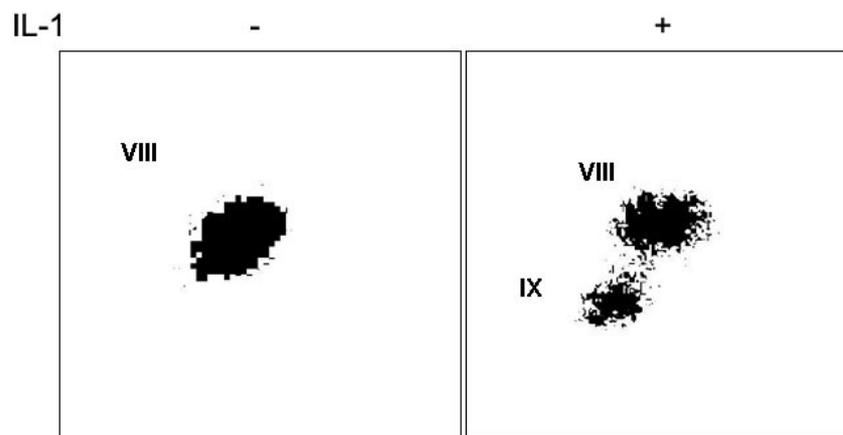


Abb. 2.44 Hochauflösende Betrachtung der Peptide VIII und IX als potenzielle Phosphoisomere

Für die Analyse wurden die Autoradiographien mittels des Programms *Image J 1.38x* hochauflösend betrachtet. Die Abbildung zeigt den Bereich um die Peptide VIII und IX.

Insgesamt konnte durch die Phosphopeptidkartierung gezeigt werden, dass durch die zelluläre IL-1-Stimulation *in vitro* eindeutig mehrere Phosphorylierungen im N-terminalen Bereich von NRF (1-112) induziert wurden. Dabei wurde im Fall des Peptids IX vermutlich eine Phosphorylierungsstelle in unmittelbarer Nähe zu einer basal phosphorylierten Aminosäure erzeugt, was zu seinem Laufverhalten als Phosphoisomer zu Peptid VIII geführt haben könnte. Mögliche Kandidaten werden in Abschnitt 2.6 näher untersucht.

2.5.2 Phosphopeptidkartierung von NRF112-449

NRF112-449 umfasst den bereits beschriebenen Zielbereich basaler sowie IL-1 regulierter Phosphorylierung (siehe Abschnitt 2.3.3.4 und 2.3.3.5) und wurde deshalb als weiteres Protein für die Phosphopeptidkartierung ausgewählt. Entsprechend der Analyse von NRF1-112 wurde rekombinantes GST-NRF112-449 *in vitro* phosphoryliert und tryptisch verdaut, aufgearbeitet und aufgetrennt (siehe 2.5.1; 4.2.4.11). Die Phosphopeptide wurden durch Autoradiographie detektiert. Wie die **Abb. 2.45** zeigt, ergab die Proteolyse von NRF112-449 im nicht stimulierten sowie im IL-1 stimulierten Zustand ein ähnliches Peptidmuster. Dabei waren die Peptide I-III und IV-VI aufgrund ihrer diagonalen Anordnung besonders auffällig, da es sich dabei wahrscheinlich um verwandte Fragmente eines Partialverdaus handelte, welche durch eng benachbarte Arginine bzw. Lysine beim Verdau durch Trypsin sein könnten [van der Geer & Hunter, 1994]. Die Aminosäuresequenz in NRF112-449 wurde auf dieses Element untersucht. Dabei fiel der Bereich von Serin 421 bis Lysin 439 auf, der in seiner Sequenz ⁴²¹SSQCHTGSSPRGSGKKK⁴³⁷ drei eng benachbarte Lysine sowie ein Arginin als potenzielle Trypsinspaltstellen aufweist. Einen zusätzlichen Hinweis auf diese Zielsequenz erbrachte die Position der Peptide IV-VI, die in der chromatographischen Dimension gegenüber den Peptiden I-III jeweils vertikal verschoben erschienen. Aufgrund des Cysteins an Position 424 könnte es sich dabei um Oxidationsvarianten derselben Peptide handeln. Wie in Abschnitt 2.6.1 noch gezeigt wird, weist dieser Bereich von NRF mehrere potenzielle Phosphorylierungsstellen auf. Den Ergebnissen der Phosphopeptidkartierung entsprechend ist dieser Bereich das Ziel sowohl basaler als auch IL-1 induzierter Phosphorylierung. Eine Quantifizierung der Peptide I-VIII mittels Densitometrie zeigte, dass – ähnlich wie für NRF1-112 – in verschiedenen Peptiden durch IL-1 Stimulation sowohl eine Reduktion (I-V) als auch ein Anstieg der Phosphorylierung (VI-VIII) beobachtet werden konnte (**Abb. 2.46**).

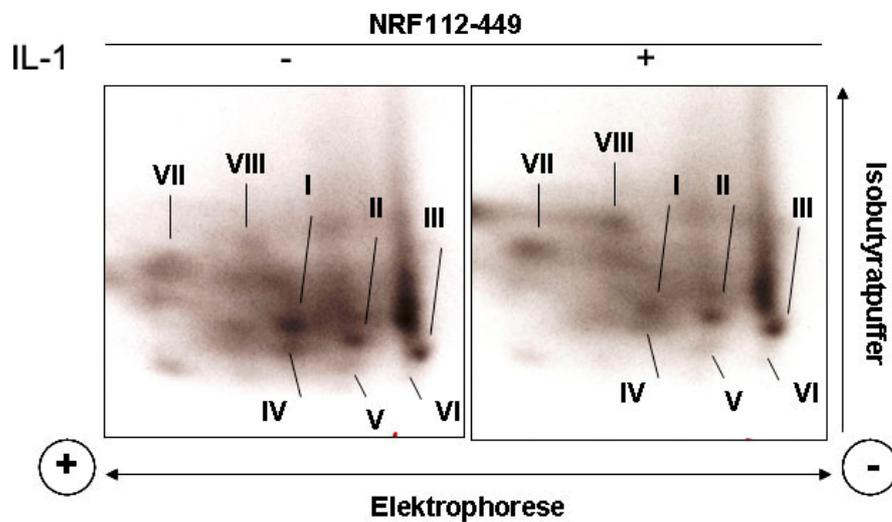


Abb. 2.45 Vergleichende Phosphopeptidkartierung von NRF112-449 im nicht stimulierten und IL-1 stimulierten Zustand

GST-NRF112-449 wurde zusammen mit gleichen Mengen Kernlysat aus nicht stimulierten (-) bzw. IL-1 stimulierten HeLa-Zellen (+) unter Zusatz von $1\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP für eine Std. bei 30°C inkubiert. Nach Aufreinigung an GSH-Sepharose und Auftrennung mittels denaturierender PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend durch Zugabe von Trypsin proteolytisch verdaut. Die Peptide wurden anschließend eingengt, oxidiert und weiter aufgearbeitet. Anschließend wurden die getrockneten Peptide in Elektrophoresepuffer aufgenommen. 2474 cpm (-) bzw. 1791 cpm (IL-1) wurden auf eine Zellulose beschichtete Kunststoffolie (Merck) aufgetropft, getrocknet und anschließend elektrophoretisch und chromatographisch aufgetrennt. Die Detektion der Phosphopeptide geschah durch Autoradiographie der trockenen Folien für 45 d bei -80°C gegen einen Röntgenfilm (Kodak, X-Omat).

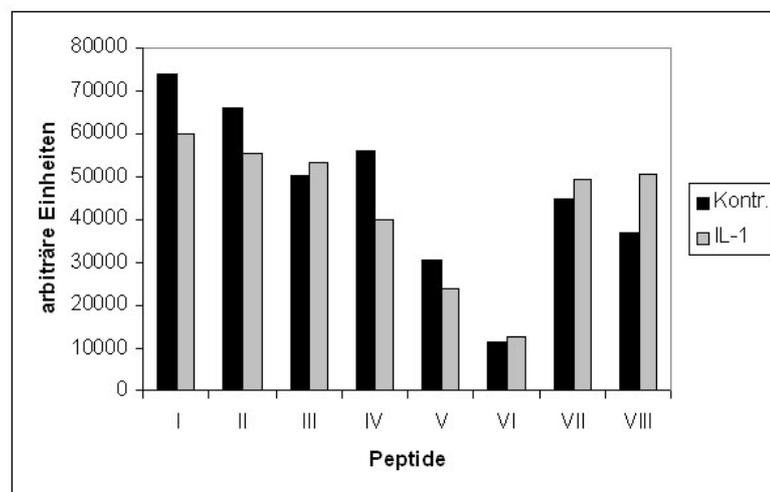


Abb. 2.46 Densitometrische Quantifizierung der Signalintensitäten der Phosphopeptide I-VIII

Für eine vergleichende Quantifizierung wurden die autoradiographischen Signale der Peptide I-VIII mittels des Programms *Image J 1.38x* (W. Rasband, Nat. Institutes for Health, USA) densitometrisch ausgewertet. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse für die einzelnen Peptide im nicht stimulierten Zustand (Kont., schwarz) sowie nach IL-1 Stimulation (IL-1, grau) als arbiträre Einheiten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Phosphorylierungsprozesse *in vitro* sich als komplexer erwiesen haben, als dies durch die bloße Betrachtung der Gesamtphosphorylierung erkennbar war. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse aus den Kinaseassays (Abschnitt 2.3 ff.) und der darauf aufbauenden Phosphopeptidkartierung boten sich sowohl der Bereich der Aminosäuren 1-112 als auch 421-437 für eine nähere Untersuchung an.

Diese wird im folgenden Abschnitt 2.6 behandelt.

2.6 Identifikation phosphorylierter Aminosäuren in NRF

Eine mögliche Vorgehensweise, um die an der basalen bzw. einer stimulationsabhängigen Phosphorylierung beteiligten Aminosäuren zu identifizieren, stellt die *in vitro* Mutagenese dar. Dabei wird durch Basenaustausch in der kodierenden Sequenz die fragliche Aminosäure Serin, Threonin oder Tyrosin gegen Alanin ausgetauscht. Alanin ist im Gegensatz zu den genannten Hydroxyaminosäuren nicht phosphorylierbar. Für den Fall, dass die mutierte Aminosäure tatsächlich phosphoryliert wird, sollte sich der Austausch in einer Reduktion der Phosphorylierung niederschlagen. Alternativ können auch größere Bereiche der Aminosäuresequenz deletiert werden, falls die Vermutung besteht, dass sich mehrere phosphorylierte Aminosäuren darin befinden. Auch in diesem Fall sollte die Phosphorylierung reduziert werden. Eine dritte Möglichkeit ist der Nachweis der Phosphorylierung mittels Phosphoepitope erkennender Antikörper.

2.6.1 Eingrenzung der zu untersuchenden Aminosäuren durch Computer gestützte Vorhersageprogramme (*in silico*)

NRF enthält in seiner Aminosäuresequenz 53 potenziell phosphorylierbare Serine, 41 Threonine sowie 28 Tyrosine. Ein Versuch die entscheidenden Aminosäuren, z.B. durch *in vitro* Mutagenese, ohne vorherige Selektion zu ermitteln, würde zu einer unübersichtlichen Zahl an Einzel- und Mehrfachmutanten führen. Es ist deshalb nahe liegend, die zu untersuchenden Aminosäuren einzugrenzen, um die Anzahl der Mutationen sinnvoll zu optimieren. Eine anwenderfreundliche Methode stellt die Nutzung von speziellen Vorhersageprogrammen dar. Diese *in silico* Methode basiert auf der Annahme, dass Kinasen ihre Substrate im Allgemeinen

durch Erkennung spezifischer Sequenzmotive phosphorylieren. Durch Kenntnis dieser Motive können Vorhersagen über die Phosphorylierbarkeit beliebiger Proteinsubstrate getroffen werden. Gemeinsam ist allen Programmen die Verwendung mathematischer Algorithmen, mittels derer für die jeweilige putative Phosphorylierungsstelle ein entsprechender Wahrscheinlichkeitswert (*engl. score*) berechnet wird. Bei dieser Berechnung setzen die einzelnen Programme in ihrer Vorhersage unterschiedliche Schwerpunkte; aus diesem Grund wurden mehrere Programme vergleichend eingesetzt: *NetPhos 2.0* [Blom *et al.*, 1999], *NetPhosK 1.0* [Blom *et al.*, 2004], *Scansite* [Obenauer *et al.*, 2003], *GPS (group-based phosphorylation prediction and scoring)* [Zhou *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2005], *DISPHOS* [Dunker *et al.*, 2002; Iakoucheva *et al.*, 2004] sowie *ELM (eukaryotic linear motifs)* [Puntenvoll *et al.*, 2003].

AS \ Progr.	NetPhos	NetPhosK	Scansite	GPS	DISPHOS	ELM
S 35	0,995	PKA/RSK	- / - / CaMKII	- / PKA, S6K, CaMKII	+	-
T 36	0,069	-	- / - / -	CaMKI/IV, S6K / *, CDK7	-	-
S 106	0,992	-	- / - / CK1	CK1 / *, CK2	-	-
T 153	0,912	p38 MAPK	- / GSK3 / *, CDK5, Cdc2	CDK, Cdc, GSK3 / *, MAPK	+	Mod. GSK3
S 422	0,918	PKG	- / - / GSK3	CaMKI/IV / *	+	Mod. GSK3
S 428	0,027	-	- / - / PKDδ	- / GSK3	+	-
S 429	0,952	CDK5/ GSK3	- / CDK5, Cdc2 / *	CDK / *, MAPK, MK2, Cdc2	+	Mod. ProDK Mod. GSK3
Erläuterung	Wert	PK	hoch/mittel/ niedrig	hoch/mittel	+/-	Motiv

Tab. 2.1 Übersicht der vorhergesagten Phosphorylierungsstellen und ihrer potenziellen Kinasen

Die Tabelle fasst die Ergebnisse der einzelnen Vorhersageprogramme zusammen. Die Vorhersagen werden in der den Programm üblichen Weise dargestellt (Erläuterung). Für Scansite und GPS stehen jeweils drei bzw. zwei Strichengrade gezeigt. Identische Vorhersagen sind mit einem Asterisken gekennzeichnet (*).

Für die Vorhersage an NRF wurde dessen vollständige Aminosäuresequenz (SwissProt Datenbankeintrag: O15226) verwendet und in die jeweiligen Programmmasken eingespeist. Um den Umfang der Vorhersagen zu begrenzen, wurden die Auswahl der möglichen Kinasegruppen in *GPS* auf die Kinasen CK1, CK2, CaMKI/IV –und II, MAPK, MAPKK, MAPKKK, MAPKAPK2, CDKs, Cdc2 (CDK1), CAK (CDK7), IKK, GSK3, PKA, PKC, PDK sowie S6K (z.B. MSK-1) beschränkt. Für das Programm *DISPHOS* wurde die Untergruppe der regulatorischen Proteine

ausgewählt. Schließlich wurden in *ELM* die Filter für humane und kernständige Proteine eingesetzt. Trotz der entsprechenden Filter der jeweiligen Programme war die Anzahl der Vorhersagen sehr groß, so dass im Folgenden nicht alle Ergebnisse dargestellt werden können. Durch den Abgleich der Vorhersagen der einzelnen Programme unter Berücksichtigung der bisherigen experimentellen Befunde (siehe Abschnitte 2.4 und 2.5) wurden acht Aminosäuren für eine weitere Untersuchung ausgewählt: die Serine an Position 35, 106, 422, 428, 429, 433 sowie die Threonine 36 und 153. Diese zeichneten sich mit Ausnahme von Threonin 36 und Serin 428 durch Vorhersagewerte von mindestens 0,9 (*NetPhos*) aus und wiesen in Bezug auf die modifizierende Kinasefamilie Übereinstimmungen auf (**Tab. 2.1**).

Allen vorhergesagten Phosphorylierungsstellen gemeinsam ist ihre Lage in Bereichen von NRF, die sich in den vorherigen Abschnitten (siehe 2.2, 2.3 und 2.4) als Ziele sowohl basaler als auch Zytokin bzw. Virus induzierter Phosphorylierung erwiesen hatten und die im Fall der Aminosäuren 421-439 mittels Phosphopeptidkartierung teilweise eingegrenzt werden konnten (siehe Abschnitt 2.5). Ausnahmen gegenüber den Vorhersagen stellten hier Threonin 36 sowie Threonin 153 dar, die jedoch aufgrund des experimentell belegten Hinweises auf Threoninphosphorylierung einbezogen wurde (siehe Abschnitt 2.2 und 2.3). Als allen Phosphorylierungsstellen gemeinsam wurde ihre Lage in potenziell fehlgeordneten Proteinstrukturen festgestellt [Iakoucheva *et al.*, 2004], wie in **Abb. 2.47** dargestellt wird.

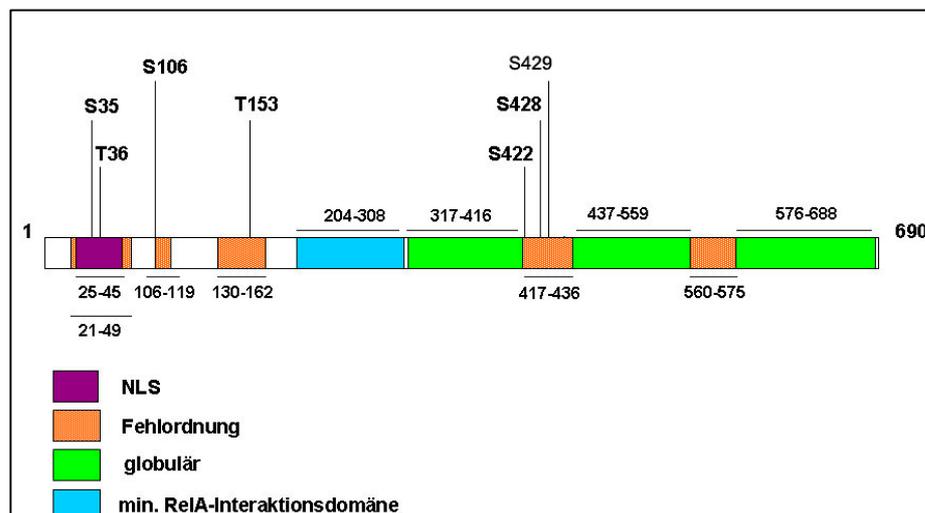


Abb. 2.47 Übersicht der vorhergesagten Phosphorylierungsstellen unter dem Aspekt potenzieller Fehlordnung

Die Abbildung veranschaulicht die in 2.6.1 behandelten Vorhersagen von Phosphorylierungsstellen im Vergleich mit potenziell fehlgeordneten Bereichen der NRF-Proteinstruktur (orange). Dargestellt wurden ferner globuläre Bereiche (grün, ELM), die Kernlokalisierungssequenz (violett) sowie die minimale Interaktionsdomäne für p65 NFκB (blau) [Bartels, 2006].

Mit Ausnahme von Threonin 153 wurden die weiteren putativen Phosphorylierungsstellen im Folgenden mittels *in vitro* Mutagenese untersucht.

2.6.2 Phosphorylierung der Doppelmutante S35/T36/A (STA)

Für die Untersuchungen zur Phosphorylierung an Serin 35 und Threonin 36 wurde durch *in vitro* Mutagenese (Quick Change® Site-directed mutagenesis Kit, Stratagene) mittels mutagener Oligonukleotide (S35_T36_A_fwd und S35_T36_A_rev, Sequenz siehe Abschnitt 5) die kodierende Sequenz des Plasmids pGST-NRF1-112 so verändert. Dies bewirkte einen Einbau der nicht phosphorylierbaren Aminosäure Alanin an den genannten Positionen. Die Manipulation der DNA-Sequenz wurde, bedingt durch den Einbau einer zusätzlichen Restriktionsstelle für die Restriktionsendonuklease *SphI* durch einen Verdau überprüft.

Das Plasmid wurde anschließend in den *E. coli* Stamm BL21 überführt, durch Zugabe von IPTG ins Kulturmedium wurde das rekombinante GST-Fusionsprotein produziert und nach Lyse der Bakterien an GSH-Sepharose aufgereinigt. Nach Proteinabgleich mit dem Wildtyp-Protein wurden jeweils gleiche Mengen an Protein zusammen mit Kernlysat unstimulierter HeLa-Zellen unter Zusatz von Kinasepuffer und ATP/(γ -³²P) ATP inkubiert. Nach Aufreinigung an GSH-Sepharose und Auftrennung über eine denaturierende PAGE wurden die Proteinbanden durch CBB angefärbt. Die Phosphorylierung wurde durch Autoradiographie detektiert. Wie **Abb. 2.48 A** demonstriert, bewirkte die Mutation eine Reduktion der basalen Phosphorylierung von NRF1-112. Um festzustellen, ob sowohl S35 als auch T36 an dieser Phosphorylierung beteiligt waren, wurden die Proteine aus dem Gel geschnitten und sauer hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde eingengt und in TLE-Puffer (pH 1,9) aufgenommen. Gleiche Volumina wurden zusammen mit einem Standard aus Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin auf eine Zellulose beschichtete Kunststoffolie (Merck) aufgetropft. Nach Eintrocknen wurden die Phosphoaminosäuren elektrophoretisch in zwei Dimensionen aufgetrennt. Die Phosphoaminosäuren wurden durch Autoradiographie sowie Ninhydrinfärbung des beigefügten Standards visualisiert. Wie **Abb. 2.48 B** veranschaulicht wurde sowohl der Gehalt an Phosphoserin als auch an Phosphothreonin reduziert. Phosphotyrosin hingegen war nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Eine densitometrische Auswertung (*Image J 1.38x*) ergab dabei eine Reduktion von Phosphoserin um ca. 87%, Phosphothreonin um ca. 59% reduziert. Das Verhältnis der Summe aus Phosphoserin und -threonin im Wt und in der Mutante entsprach dabei annähernd dem Verhältnis der jeweiligen Gesamtphosphorylierung.

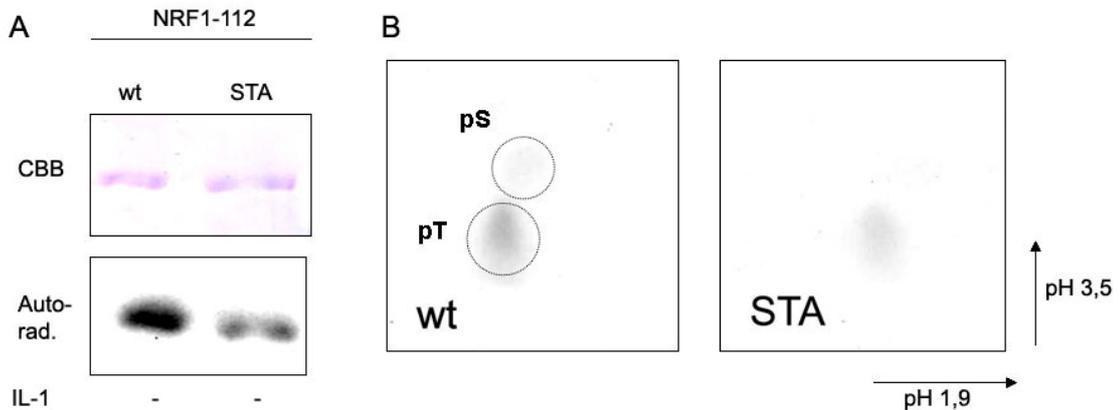


Abb. 2.48 Alaninmutation von S35 und T36 bewirkte eine basale Reduktion an Phosphoserin und Phosphothreonin in NRF1-112

Für die Analyse wurden rekombinantes GST-NRF1-112wt sowie dessen STA-Mutante mit jeweils gleichen Mengen Kernlysate aus unstimulierten HeLa-Zellen unter Zusatz von $1 \mu\text{Ci } (\gamma\text{-}^{32}\text{P}) \text{ ATP}/\mu\text{l}$ für eine Stunde bei 30°C inkubiert. Nach Aufreinigung an GSH-Sepharose und Auftrennung über eine denaturierende PAGE wurden die Proteine durch CBB angefärbt. Die Detektion der Phosphorylierung erfolgte durch Autoradiographie des nicht getrockneten Gels für 30 Minuten bei -80°C gegen einen Röntgenfilm (Kodak, X-Omat) (A). Die Proteine wurden anschließend ausgeschnitten, sauer hydrolysiert, im Vakuum eingedunstet und in TLE-Puffer aufgenommen. Gleiche Mengen wurden unter Zusatz eines Phosphoaminosäure-Standards (pS, pT, pY je 1 mg/ml) auf Zellulose beschichtete Kunststoffolien (Merck) aufgetropft und elektrophoretisch in zwei Dimensionen aufgetrennt. Die Detektion der Phosphoaminosäuren geschah mittels Autoradiographie gegen einen Röntgenfilm (X-Omat, Kodak) für 65 Std. bei -80°C und Positionsabgleich durch Ninhydrinfärbung des Standards (Kreise). Deutlich zu erkennen ist die Reduktion sowohl von Phosphoserin als auch Phosphothreonin (B).

Um festzustellen, ob sich die Mutation Auswirkungen auf eine IL-1 induzierte Phosphorylierung auswirken würde, wurde die Phosphorylierung erneut unter Verwendung von Kernlysaten aus IL-1 stimulierten bzw. nicht stimulierten (Kontrolle) HeLa-Zellen wiederholt. Zusätzlich wurde überprüft, ob die Mutation auch in einem nahezu vollständigen NRF-Protein noch einen reduktiven Effekt zeigen würde. Dazu wurde die Mutation in das für das C-terminal längere GST-NRF1-449 kodierende Plasmid eingebracht. Entsprechend GST-NRF1-112STA wurde auch dieses Protein aus *E. coli* BL21 mittels GSH-Sepharose aufgereinigt und zusammen mit dem Wildtypprotein experimentell untersucht. Dazu wurden die Proteine mit Kernlysate aus IL-1 stimulierten sowie nicht stimulierten (Kontrolle) HeLa-Zellen unter Zusatz von Kinasepuffer und $\text{ATP}/\gamma\text{-}^{32}\text{P} \text{ ATP}$ inkubiert. Nach Aufreinigung an GSH-Sepharose und Auftrennung mittels denaturierender PAGE wurden die Proteine durch CBB-Färbung visualisiert. Die Detektion der Phosphorylierung erfolgte durch Autoradiographie des getrockneten Gels. Wie **Abb. 2.49** zeigt, bewirkte die Mutation von S35 und T36 zu Alanin eine Reduktion der IL-1 induzierten

Phosphorylierung sowohl in NRF1-112STA als auch in NRF1-449STA. Es konnte allerdings auch in NRF1-449STA ein Anstieg der Phosphorylierung nach 30 Minuten Stimulation durch IL-1 beobachtet werden (**A**). Der densitometrische Vergleich zwischen Wildtypproteinen und STA-Mutanten zeigte, dass die Reduktion der Phosphorylierung mit ca. 17% in NRF1-449STA geringer war als mit 49% in NRF1-112STA. Ähnliches konnte für die Stimulationsdauer von 60 Minuten beobachtet werden. Hier betrug die Reduktion im Vergleich zum Wildtyp ca. 23% im Fall von NRF1-449STA bzw. 42% für das C-terminal verkürzte NRF1-112STA (**B**). Diese Beobachtungen zeigten, dass die mutierten Phosphorylierungsstellen *in vitro* an der IL-1 regulierten Phosphorylierung beteiligt sind, es jedoch weitere geben muss. Im Gegensatz dazu schien die basale Phosphorylierung von NRF1-449STA im Vergleich zum Wildtyp sogar zuzunehmen, was möglicherweise auf eine inhibitorische Funktion von S35/T36 gegenüber anderen Phosphorylierungsstellen im basalen Zustand hindeuten könnte (**B**).

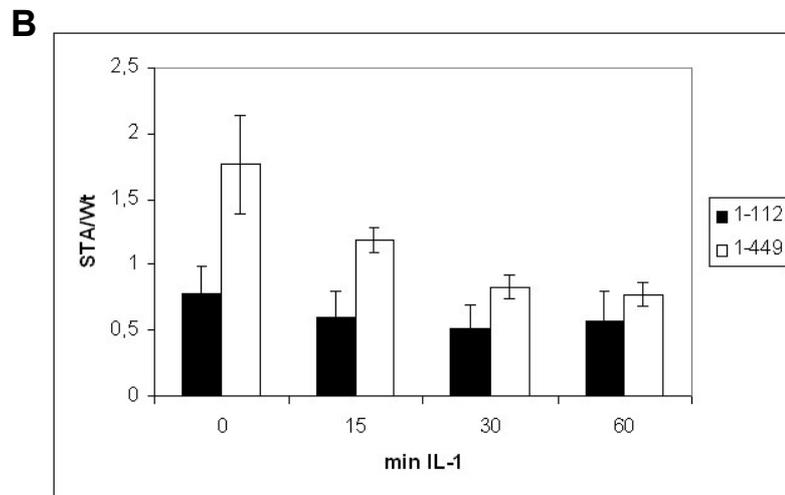
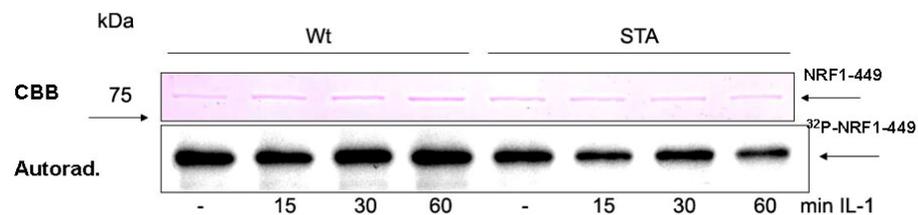
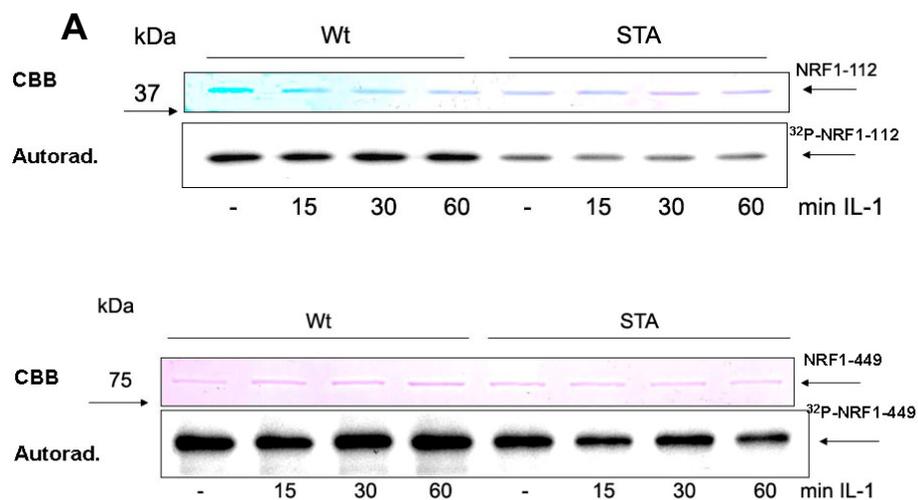


Abb. 2.49 Mutation von S35 und T36 bewirkte eine Reduktion der IL-1 induzierten Phosphorylierung in NRF1-112 und NRF1-449

Die Abbildung zeigt die vergleichende Phosphorylierung von NRF1-112 und NRF1-449 sowie ihren STA-Mutanten in Abhängigkeit von IL-1. Dazu wurden die rekombinanten GST-Fusionsproteine zusammen mit jeweils gleichen Mengen Kernlysate aus IL-1 stimulierten (15-60 Minuten) bzw. nicht stimulierten HeLa-Zellen (-) unter Zusatz von Kinasepuffer und ATP/0,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach Aufreinigung an GSH-Sepharose und Auftrennung mittels denaturierender PAGE wurden die Proteine durch CBB angefärbt. Die Detektion der Phosphorylierung erfolgte durch Autoradiographie gegen einen Röntgenfilm für 14 Std. (1-112) bzw. für 62 Std. bei RT (**A**). Die densitometrische Auswertung wurde mittels des Programms *Image J 1.38x* (W. Rasband, Nat. Institutes for Health, USA) durchgeführt. Dazu wurden jeweils identische Areale der jeweiligen Versuchsreihen ausgewählt und die ermittelten Signalfächen aus Autoradiographie und CBB-Färbung in Relation gesetzt. Aus den resultierenden Werten für die Wildtypproteine und ihre jeweiligen STA-Mutanten wurden Quotienten gebildet. Die Abbildung zeigt diese in Abhängigkeit der IL-1 Stimulation (**B**).

2.6.3 Phosphorylierung der Dreifachmutante Y97/Y100/S106/A (Mu1)

Ein weiterer auf seine mögliche Phosphorylierung zu untersuchender Bereich bestand aus den drei Aminosäuren Tyrosin 97, Tyrosin 100 und Serin 106 (Y97/Y100/S106). Aufgrund der Vorhersagen (siehe Abschnitt 2.8.1) sowie früheren experimentellen Befunden aus einem Peptid-Assay, die auf eine Beteiligung an der basalen Phosphorylierung schließen ließen (persönl. Mitteilung: M. Nourbakhsh), wurden in Kombination Alaninmutationen (A97/A100/A106: Mu1) in die für GST-NRF1-112 und GST-NRF1-449 kodierenden Plasmide eingeführt. Die dadurch entstandenen Plasmide pGST-NRF1-112Mu1 und pGST-NRF1-449Mu1 wurden in *E. coli* BL21 eingebracht. Durch Zusatz von IPTG zum Kulturmedium wurden die rekombinanten GST-Fusionsproteine produziert und an GSH-Sepharose aufgereinigt.

Nach Proteinabgleich wurden die Mu1-Proteine im Vergleich mit ihren jeweiligen Wildtypproteinen zusammen mit Kernextrakten aus IL-1 stimulierten sowie nicht stimulierten (Kontrolle) HeLa-Zellen unter Zusatz von ATP/ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP inkubiert. Nach Aufreinigung an GSH-Sepharose wurden die Proteine mittels denaturierender PAGE aufgetrennt und durch CBB-Färbung visualisiert. Die Detektion der Substratphosphorylierung geschah durch Autoradiographie der getrockneten Gele.

Für eine Quantifizierung wurden die CBB gefärbten Proteinbanden sowie die Autoradiographien densitometrisch ausgewertet (*Image J 1.38x*).

Wie die **Abb. 2.50** demonstriert, bewirkte die Mutation der Tyrosine 97 und 100 sowie des Serins 106 eine drastische Reduktion sowohl der basalen als auch der IL-1 induzierten Phosphorylierung von NRF1-112. Die Reduktion betrug ca. 82% im basalen Zustand bzw. 78% nach 60 Minuten IL-1 Stimulation (**B**). Dagegen resultierte die Mutation in NRF1-449 in keiner Reduktion der basalen Phosphorylierung, wohl aber der IL-1 abhängigen (**A**). Im Vergleich zur

Mutation an S35/T36 erzielte die Dreifachmutation an Y97/Y100/S106 in beiden Proteinlängen eine größere Reduktion der IL-1 abhängigen Phosphorylierung. Gleichzeitig konnte auch für NRF1-449Mu1 ein Phosphorylierungsanstieg nach 30 Minuten IL-1 Stimulation beobachtet werden. Dieser war, ähnlich dem Verhalten in NRF1-449STA, allerdings schwächer ausgeprägt (Reduktion um ca. 35%) als im Wildtypprotein.

Mit den Mutationen an S35/T36 (STA) bzw. Y97/Y100/S106 (Mu1) wurden, mit Ausnahme von T153, sämtliche potenzielle Phosphorylierungsstellen innerhalb der aktiven Repressionsdomäne (siehe Abschnitt 2.8.1) von NRF behandelt. Der folgende Abschnitt wird sich mit dem Bereich der Aminosäuren 421-429 beschäftigen.

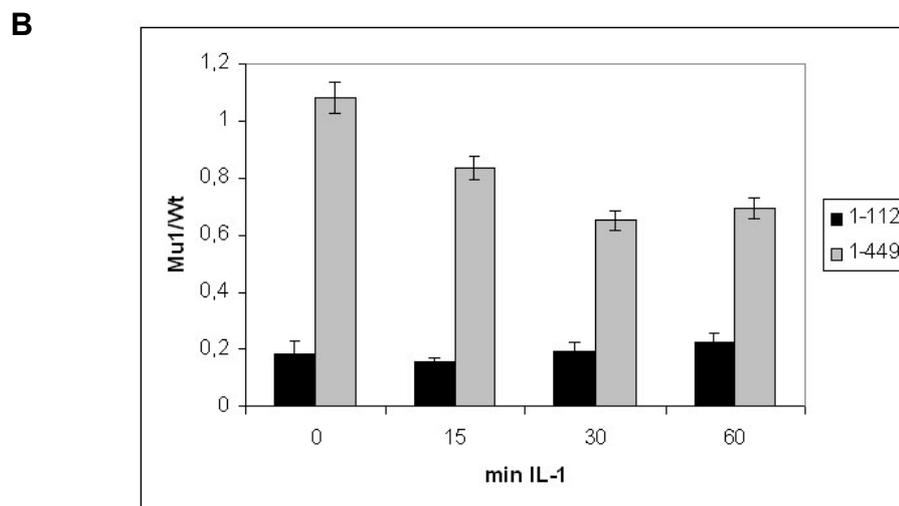
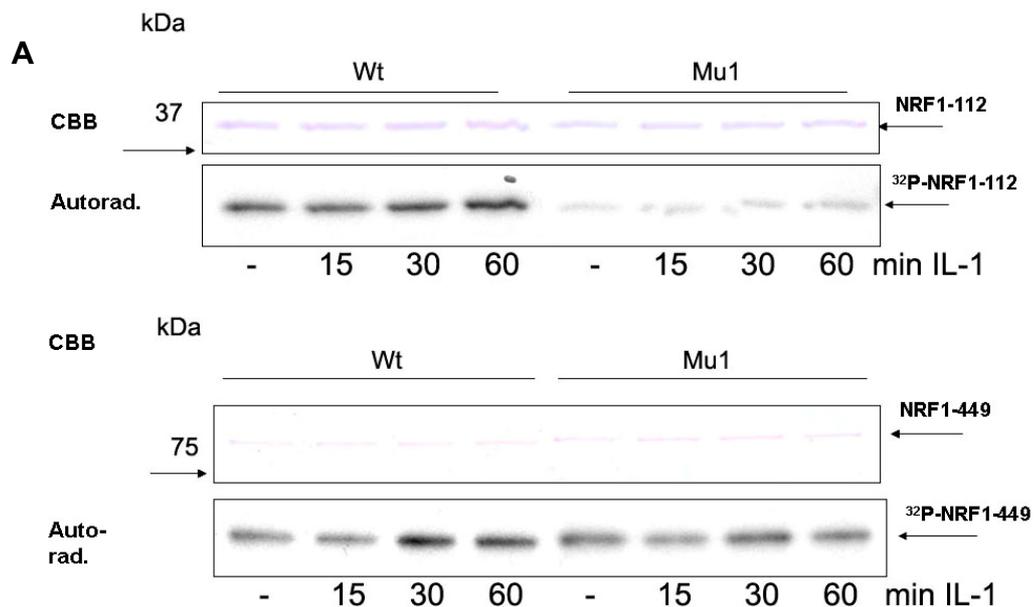


Abb. 2.50 Mutation von Y97/Y100/S106 bewirkte eine Reduktion IL-1 induzierten Phosphorylierung in NRF1-112 und NRF1-449

Die Abbildung zeigt die vergleichende Phosphorylierung von NRF1-112 und NRF1-449 sowie ihren Mu1-Mutanten in Abhängigkeit von IL-1. Dazu wurden die rekombinanten GST-Fusionsproteine zusammen mit jeweils gleichen Mengen Kernlysate aus IL-1 stimulierten (15-60 Minuten) bzw. nicht stimulierten HeLa-Zellen (-) unter Zusatz von Kinasepuffer und ATP/0,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach Aufreinigung an GSH-Sepharose und Auftrennung mittels denaturierender PAGE wurden die Proteine durch CBB angefärbt. Die Detektion der Phosphorylierung erfolgte durch Autoradiographie gegen einen Röntgenfilm (Kodak, X-Omat) für 4d. (1-112) bei RT bzw. 16 Std. bei -80°C (1-449) (**A**). Die densitometrische Auswertung wurde mittels des Programms *Image J 1.38x* (W. Rasband, Nat. Institutes for Health, USA) durchgeführt. Dazu wurden jeweils identische Areale der jeweiligen Versuchsreihen ausgewählt und die ermittelten Signalfächen aus Autoradiographie und CBB-Färbung in Relation gesetzt. Aus den resultierenden Werten für die Wildtypproteine und ihre jeweiligen Mu1-Mutanten wurden Quotienten gebildet. Die Abbildung zeigt diese in Abhängigkeit der IL-1 Stimulation (**B**).

2.6.4 Phosphorylierung der Deletionsmutante delta 421-429 (delta1)

Der Bereich der Aminosäuren 421-429 in NRF enthält zugleich drei putative Phosphorylierungsstellen, S422, S428 und S429 (siehe Abschnitt 2.6.1), die als potenzielle Ziele Cyclin abhängiger Kinasen (CDK) als Modulatoren der Transkriptionsinitiation/-elongation [Nissen and Yamamoto, 2000; Fu *et al.*, 2004] bzw. von MAP-Kinasen als Zytokin aktivierte Kinasefamilie während inflammatorischer Prozesse [Holtmann *et al.*, 1999].

Um den Beitrag dieser Aminosäuren zur basalen sowie zur IL-1 induzierten Phosphorylierung von NRF zu messen, wurde – aufgrund der benachbarten Lage der Aminosäuren innerhalb der Primärstruktur – der AS-Sequenzbereich von 421-429 durch *in vitro* Mutagenese komplett deletiert. Die dafür verwendeten mutagenen Oligonukleotide (5`_delta1_ClaI und 3`_delta1_ClaI) wurden so synthetisiert, dass sie die entsprechende kodierende Sequenz im Plasmid pGST-NRF1-449 überbrückten. Das derart veränderte Plasmid pGST-NRF1-449 Δ 1 wurde in *E. coli* BL21 eingebracht. Durch Zugabe von IPTG zum Kulturmedium wurde das rekombinante GST-Fusionsprotein produziert und an GSH-Sepharose aufgereinigt. Nach Proteinabgleich wurden GST-NRF1-449wt und seine delta1-Mutante zusammen mit Kernlysate aus IL-1 stimulierten bzw. nicht stimulierten (Kontrolle) HeLa-Zellen unter Zusatz von Kinasepuffer und ATP/ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP inkubiert. Nach anschließender Aufreinigung der Proteine an GSH-Sepharose wurden diese mittels denaturierender PAGE aufgetrennt und durch CBB-Färbung visualisiert. Die Detektion der Substratphosphorylierung geschah mittels Autoradiographie des getrockneten Gels (**Abb. 2.51 A**). Wie in **Abb. 2.51** zu sehen ist, bewirkte die Deletion der Aminosäuren 421-429 eine deutliche Reduktion sowohl der basalen als auch der IL-1 induzierten Phosphorylierung von NRF1-449 (**A**). Eine densitometrische Analyse ergab

dabei eine Reduktion der basalen Phosphorylierung um ca. 56% im basalen Zustand bzw. um ca. 61% nach 30 Minuten IL-1 Stimulation (**B**). Zwar konnte in der delta1-Mutante nach 60 Minuten Stimulation ein geringer Wiederanstieg der Phosphorylierung beobachtet werden, dieser war im Vergleich zur Phosphorylierung des Wildtypproteins um ca. 57% reduziert. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass der Bereich der Aminosäuren 421-429 mit den darin befindlichen Serinen ein wesentliches Ziel sowohl der konstitutiven als auch der IL-1 regulierten Phosphorylierung von NRF darstellt.

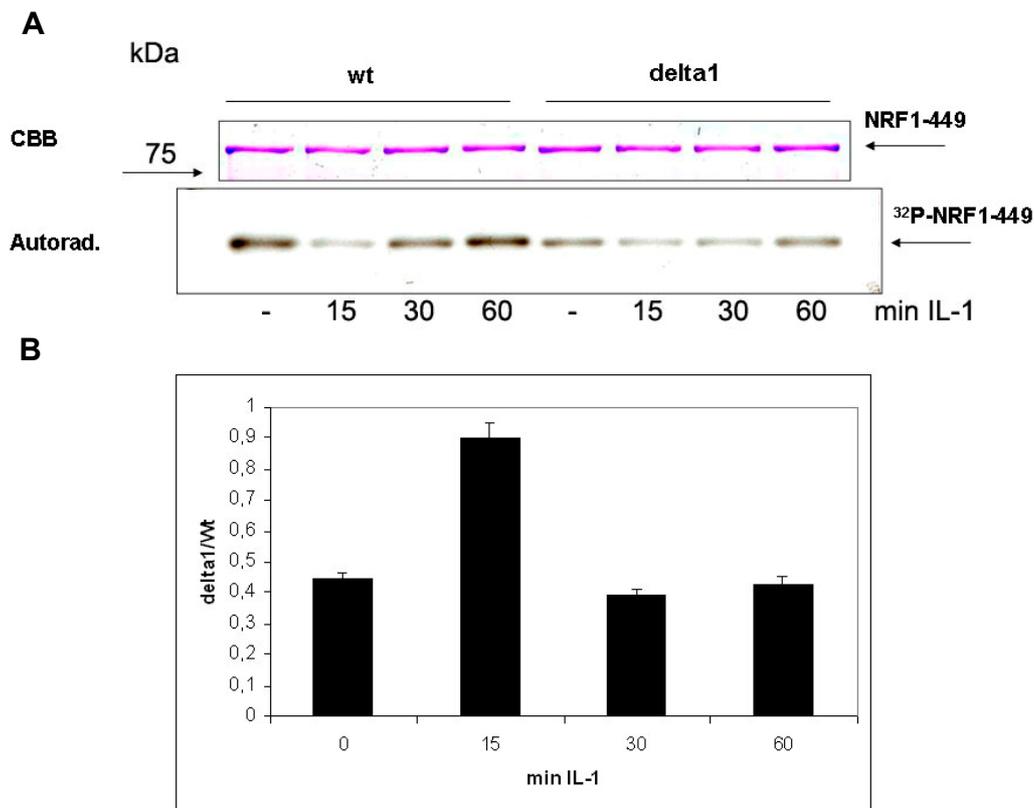


Abb. 2.51 Reduktion der basalen und IL-1 induzierten Phosphorylierung in NRF1-449 durch Deletion der Aminosäuren 421-429

Die Abbildung zeigt die vergleichende Phosphorylierung von NRF1-449 mit ihrer $\Delta 1$ -Mutante in Abhängigkeit einer IL-1 Stimulation. Dazu wurden die rekombinanten GST-Fusionsproteine zusammen mit jeweils gleichen Mengen Kernlysate aus IL-1 stimulierten (15-60 Minuten) bzw. nicht stimulierten HeLa-Zellen (-) unter Zusatz von Kinasepuffer und ATP/0,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach Aufreinigung an GSH-Sepharose und Auftrennung mittels denaturierender PAGE wurden die Proteine durch CBB angefärbt. Die Detektion der Phosphorylierung erfolgte durch Autoradiographie gegen einen Röntgenfilm (Kodak, X-Omat) für 10 Std. bei -80°C (**A**). Die densitometrische Auswertung wurde mittels des Programms *Image J 1.38x* (W. Rasband, Nat. Institutes for Health, USA) durchgeführt. Dazu wurden jeweils identische Areale der jeweiligen Versuchsreihen ausgewählt und die ermittelten Signalfächen aus Autoradiographie und CBB-Färbung in Relation gesetzt. Aus den resultierenden Werten

für die Wildtypproteine und ihre jeweiligen delta1-Mutanten wurden Quotienten gebildet. Die Abbildung zeigt diese in Abhängigkeit der IL-1 Stimulation (B).

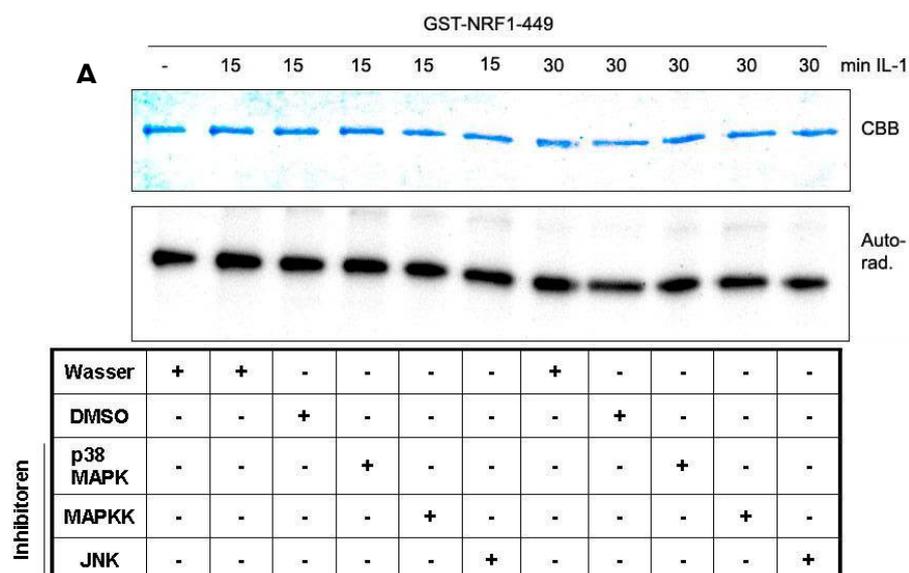
2.7 Inhibition der Phosphorylierung von NRF im zellfreien System

In einem nächsten Schritt wurde versucht, die Phosphorylierung von NRF durch Zusatz von spezifischen Kinaseinhibitoren zu inhibieren. Auf diese Weise sollte mehr Information über die Integration von NRF in das zelluläre Signalnetzwerk erlangt werden.

2.7.1 Phosphorylierung unter Zusatz von Inhibitoren der Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK)

Die bisherigen Experimente zeigten, dass durch IL-1 Stimulation die konstitutive Phosphorylierung von NRF im Bereich seiner Aminosäuren 1-449 zunächst reduziert wurde. Eine weitere Stimulation jedoch resultierte in einem Wideranstieg über das basale Niveau, was zu der Schlussfolgerung führte, dass die darin involvierten Kinasen durch IL-1 Stimulation aktiviert werden oder möglicherweise durch IL-1 aktivierte Kinasen reguliert werden. Dies trifft im Besonderen auf die Familie der MAPK und durch sie regulierte Kinasen zu (1.2.2 ff.).

Um dies zu überprüfen, wurde rekombinantes GST-NRF1-449 zusammen mit Kernlysaten aus IL-1 stimulierten bzw. nicht stimulierten HeLa-Zellen inkubiert. In parallelen Ansätzen wurden jeweils ein Inhibitor von JNK (SP 600125), der p38 MAP-Kinase (SB 203580) und der ERK-Kinase MEK1 und MEK2 (PD 98059) eingesetzt sowie jeweils Lösungsmittel- und Wasserkontrollen.



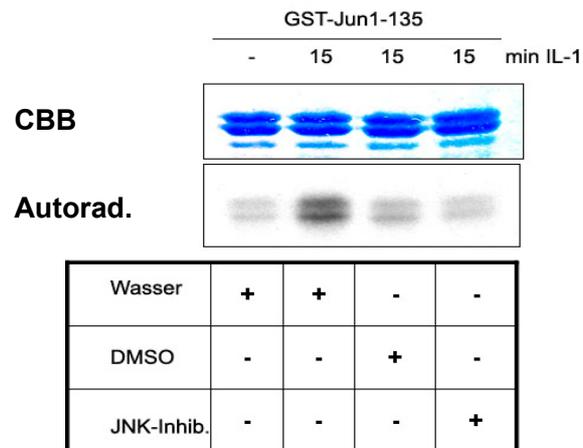


Abb. 2.52 A: IL-1 induzierte Phosphorylierung von NRF1-449 in Abhängigkeit von Kinaseinhibitoren der MAPK-Familie

Die Abbildung zeigt den Einfluss von drei Kinaseinhibitoren der MAPK-Familie auf die Phosphorylierung von NRF1-449. Dazu wurde rekombinantes GST-NRF1-449 zusammen mit Kernlysaten aus IL-1 stimulierten (15/30 Minuten) bzw. nicht stimulierten HeLa-Zellen inkubiert. In parallelen Ansätzen wurde entweder H₂O (Wasserkontrolle), DMSO (Lösungsmittelkontrolle) sowie die Inhibitoren der p38 MAP-Kinase (SB 203580), der ERK-Kinase MEK (PD 98059) und der Jun-N-terminalen Kinase JNK (SP 600125) in den Endkonzentrationen 1 μ M, 2 μ M bzw. 2 μ M zugesetzt. Zusammen mit ATP/0,1 μ Ci/ μ l γ -³²P ATP wurden die Ansätze für 30 Minuten bei 30°C inkubiert, anschließend wurden die Proteine an GSH-Sepharose aufgereinigt und mittels denaturierender PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden durch CBB angefärbt, die Substratphosphorylierung mittels Autoradiographie gegen einen Röntgenfilm (Kodak, X-Omat) bei -80°C für fünf Stunden detektiert.

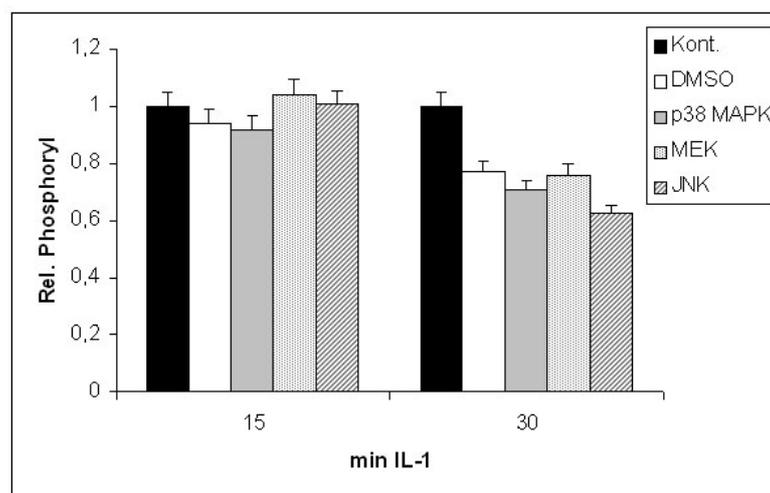


Abb. 2.52 B: Quantifizierung der Inhibition der Phosphorylierung durch MAPK-Inhibitoren

Die Abbildung zeigt die Quantifizierung der IL-1 induzierten *in vitro* Phosphorylierung von NRF1-449 in Abhängigkeit von MAPK-Inhibitoren. Die Phosphorylierungen in Abhängigkeit des p38 MAPK-Inhibitors (grau), des MEK- Inhibitors (gemustert), des JNK-Inhibitors (gestreift) sowie der DMSO-Kontrolle (weiß) sind als Vielfache der Negativkontrolle

(Wasser, schwarz) dargestellt. Die Quantifizierung wurde densitometrisch mittels des Programms *Image J 1.38x* (W. Rasband, National Institutes for Health, USA) durchgeführt. Dazu wurden jeweils identische Areale der CBB gefärbten Proteinbanden und der autoradiographischen Signale betrachtet. Die aus Autoradiographie und CBB-Färbung ermittelten Quotienten wurden auf die jeweiligen Werte der Wasserkontrolle (schwarz) normiert, diese wurden gleich eins gesetzt.

Als Referenz diente GST-Jun1-135, welches gleichzeitig in einer Kontrolle für die JNK-Inhibition durch SP 600125 verwendet wurde. Nach der Phosphorylierung wurden die Proteine an GSH-Sepharose aufgereinigt und über eine denaturierende PAGE aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden CBB gefärbt und die Substratphosphorylierung durch Autoradiographie des getrockneten Gels detektiert (**Abb. 2.52 A**). Für eine Quantifizierung wurden die CBB-Banden sowie die autoradiographischen Signale densitometrisch ausgewertet (**Abb. 2.52 B**).

Wie zu erkennen ist, verursachte der Zusatz des JNK-Inhibitors SP 600125 zum Ansatz eine deutliche Reduktion der IL-1 induzierten Phosphorylierung von Jun1-135. Durch den Zusatz von DMSO konnte eine unspezifische Reduktion beobachtet werden. Diese war jedoch geringer als der inhibitorische Effekt des JNK-Inhibitors. Im Gegensatz dazu konnte für NRF1-449 nach 15 Minuten IL-1 Stimulation kein inhibitorischer Effekt beobachtet werden. Nur für eine Stimulationszeit von 30 Minuten verursachte der Zusatz der Inhibitoren der p38 MAPK sowie von JNK eine im Vergleich zur DMSO-Kontrolle um ca. 6% bzw. 15% stärkere Reduktion der Phosphorylierung. Der Zusatz des MEK-Inhibitors PD 98059 bewirkte eine Reduktion von weniger als 1% (**Abb. 2.52 B**).

Diese Daten zeigen, dass die MAPK JNK vermutlich an der IL-1 induzierte Phosphorylierung nach 30 Minuten Stimulation, jedoch nicht nach 15 Minuten Stimulation beteiligt ist.

2.8 Untersuchungen zur *in vivo* Phosphorylierung

Für die Beantwortung der Frage nach der *in vivo* Phosphorylierung von NRF gibt es alternative Möglichkeiten. Zwei dieser Möglichkeiten, die biosynthetische Markierung sowie die massenspektrometrische Analyse, sollen im Weiteren vorgestellt werden.

2.8.1 Biosynthetische Markierung von überexprimiertem NRF-Strep Fusionsprotein mit ³²P-Orthophosphat

Eine klassische Methode stellt die Nutzung radioaktiver Nuklide dar, die wie in den *in vitro* Experimenten den Vorteil sehr hoher Sensitivität aufweisen. Dabei wird durch Zusatz von ³²P-

Orthophosphorsäure zum Kulturmedium der ATP-Vorrat der Zelle teilweise radioaktiv markiert, und u.a. biosynthetisch während der Phosphorylierung von Proteinen eingebaut. Das zu untersuchende Zielprotein kann aus dem Zelllysate aufgereinigt und seine Phosphorylierung autoradiographisch oder durch Messung der Zerfälle/Minute bestimmt werden. Die Methode bietet außerdem die Möglichkeit einer weiteren Charakterisierung mittels Phosphoaminosäureanalyse und Phosphopeptidkartierung.

Das folgende Experiment wurde unter Einsatz eines überexprimierten NRF-Strep Fusionsproteins [Skerra & Schmidt, 1999; Voss & Skerra, 1997] durchgeführt. Dies hatte folgende Gründe: Einerseits liegen Transkriptionsfaktoren häufig nur in geringen zellulären Konzentrationen vor, während – vor allem – für die geplanten weiteren Charakterisierungen (Phosphopeptidkartierung etc.) eine gut handhabbare Proteinmenge benötigt wurde. Zum anderen existierten für die Isolation des endogenen NRF-Proteins keine für eine Präzipitation geeigneten Antikörper noch Protokolle zur Aufreinigung. Für das folgende Experiment wurden HeLa ACC57-Zellen auf Zellkulturschalen ausgesät und am folgenden Tag mit Plasmid-DNA transfiziert, die für ein C-terminales NRF-Strep-Fusionsprotein kodiert. Dieses Plasmid wurde durch Klonierung des kodierenden Bereichs für NRF aus dem Plasmid pNRF2722TAP in den Zielvektor pEXPR-IBA103 (**Abb. 2.53**) hergestellt (4.2.3.9.6). Dieser unterliegt der Transkriptionskontrolle eines CMV-Promotors zur Expression in Säugerzellen und verfügt über eine Neomycinresistenz (Neo^R), ein SV40-Polyadenylierungssignal (SV40 pA). Ein SV40 Replikationsursprung (SV40 ori) ermöglicht die Replikation in eukaryontischen Zellen. Für die selektive Amplifikation in Bakterien enthält die Vektorsequenz eine Ampicillinresistenz (Amp^R) sowie einen bakteriellen Replikationsursprung (pUC ori).

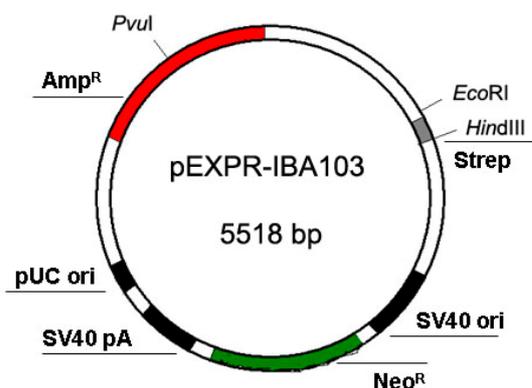


Abb. 2.53 Übersicht über den Zielvektor pEXPR-IBA103 (IBA)

Als Kontrolle dienten nicht transfizierte Zellen. Am folgenden Tag wurden transfizierte sowie Kontrollzellen mit ^{32}P -Orthophosphorsäure (Hartmann) biosynthetisch markiert (4.2.1.5). Die

Zellen wurden anschließend mit IL-1 β für 15 und 30 Minuten stimuliert bzw. nicht stimuliert. Das Medium wurde verworfen, die Zellen anschließend extensiv gewaschen und lysiert (4.2.1.5; 4.2.1.7). Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen. Jeweils ein Aliquot wurde aufbewahrt, das NRF-Strep-Fusionsprotein wurde anschließend mittels einer Strep-Tactinmatrix® (IBA) aus den Überständen präzipitiert und durch Aufkochen in Auftragspuffer eluiert (4.2.4.8). Die Proteine aus Überständen, den Durchflüssen und den Eluaten wurden mittels einer denaturierenden PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (4.2.4.4). Die Phosphorylierung wurde durch Autoradiographie detektiert (**Abb. 2.54 A**). Anschließend wurde NRF-Strep durch Immunfärbung mittels HRP gekoppeltem Strep-Tactin® nachgewiesen (**Abb. 2.54 B**).

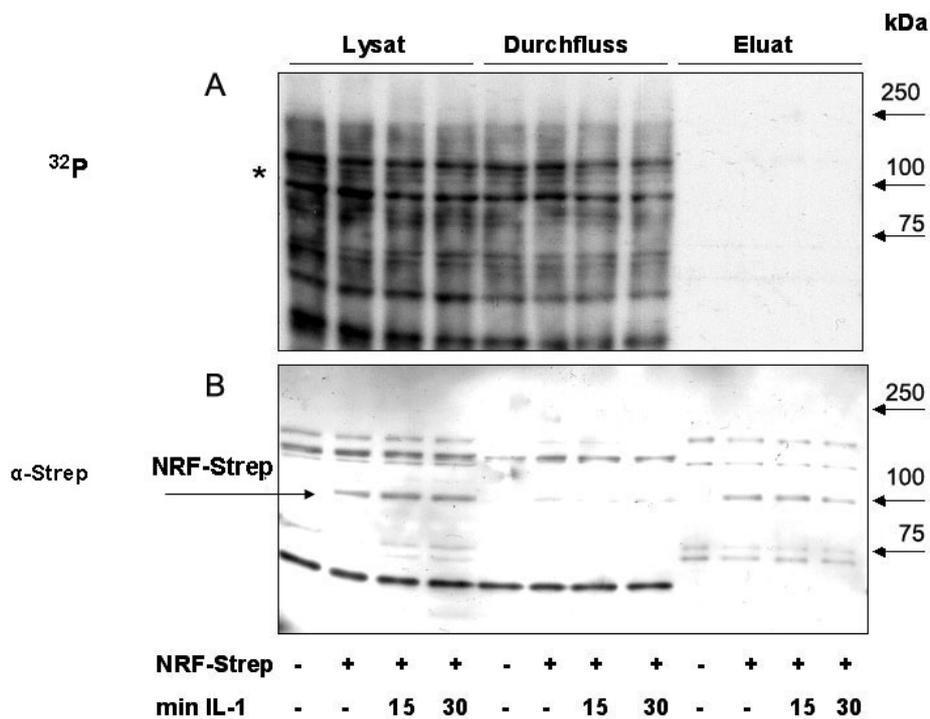


Abb. 2.54 Analyse der *in vivo* Phosphorylierung von NRF in Abhängigkeit von IL-1 durch biosynthetische Markierung mit ^{32}P -Orthophosphat

Für die Analyse wurden je $2 \cdot 10^6$ HeLa-Zellen mit dem Plasmid *pNRF2722Strep* transfiziert (+) bzw. untransfiziert gelassen (-). Die Zellen wurden eine Stunde vor der Stimulation mit phosphatfreiem Medium gewaschen und eine Stunde in diesem gehungert. Anschließend wurde das Medium mit je $125 \mu\text{Ci/ml}$ ^{32}P -Orthophosphat Endkonzentration versetzt und die Zellen für die angegebene Zeit mit 100 ng/ml IL-1 stimuliert. Das Medium wurde verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend lysiert und zentrifugiert. Die Überstände wurden mit der Strep-Tactinmatrix inkubiert. Die Matrix wurde gewaschen, die Proteine durch Aufkochen in Auftragspuffer eluiert. Je 10% der Lysate, der Durchflussfraktionen sowie der Eluate wurden mittels denaturierender PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Phosphorylierung der Proteine wurde mittels Autoradiographie gegen einen Röntgenfilm (X-Omat, Kodak) für zwölf Stunden bei RT detektiert (**A**).

Nach ausreichender Autoradiographie wurde die Membran in TBS/T + 1,5% BSA abgesättigt, gewaschen und anschließend mit HRP gekoppeltem Strep-Tactin (1:4000 in TBS/T) für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde vorhandenes NRF-Strep durch Chemolumineszenz (SuperSignal® West pico Chemoluminescent Substrate Kit, Pierce) visualisiert. Die Exposition erfolgte bei RT für 30 Sekunden gegen einen ECL-Film (Amersham) (B). Der Asterisk markiert die jeweilige Laufhöhe von NRF-Strep.

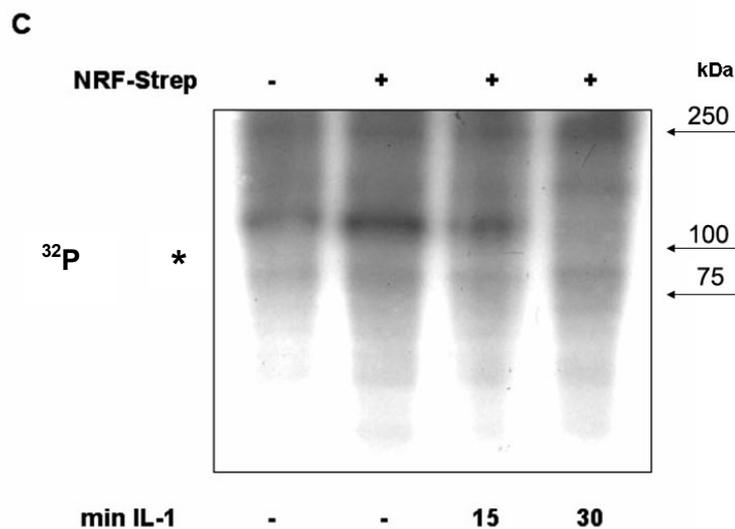


Abb. 2.54 C Autoradiographie der eluierten Fraktionen nach Auftrennung über ein denaturierendes Proteingel

Die Abbildung zeigt die Autoradiographie der Elutionsfraktionen aus der biosynthetischen Markierung (s.o.). Dazu wurden erneut gleiche Mengen an Eluat aus nicht transfizierten Zellen (-) sowie mit für NRF2722Strep kodierendem Plasmid transfizierten Zellen (+) nach IL-1 Stimulation auf ein denaturierendes Proteingel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel getrocknet und für 90 Stunden bei -80°C gegen einen Röntgenfilm (X-Omat, Kodak) exponiert. Die ungefähre Laufhöhe von NRF-Strep wird durch den Asterisk markiert.

Die Immunfärbung mittels HRP gekoppeltem Strep-Tactin® zeigte in den verschiedenen Lysaten eine vergleichbare Expression des für NRF2722-Strep kodierenden Plasmids sowie eine vergleichbare Aufreinigung von NRF-Strep in den Eluaten (**Abb. 2.54 B**). Wie anhand der Autoradiographie zu erkennen ist, bewirkte der Einbau von ³²P-Phosphat in den zellulären ATP-Vorrat die Isotopenmarkierung zahlreicher endogener Proteine. Nach der Aufreinigung blieb ein Großteil der Aktivität in den Überständen bzw. wurde durch das Waschen entfernt. In der Autoradiographie konnte nach 18 Stunden Exposition kein radioaktiv markiertes NRF-Strep detektiert werden (**Abb. 2.54 A**). Im Vergleich zu den Lysaten und den Durchflüssen war die detektierbare Aktivität insgesamt sehr gering. Um auszuschließen, dass aufgrund ineffizienteren Transfers des phosphorylierten NRF-Strep keine Detektion möglich war, wurden erneut gleiche Mengen der Elutionen auf ein denaturierendes Proteingel geladen und aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend nur getrocknet und gegen einen Röntgenfilm exponiert. Wie **Abb. 2.54 C**

zeigt, konnte auch in diesem Fall keine von der Kontrolle unterscheidbare Bande detektiert werden. Vielmehr zeigte sich bei längerer Autoradiographiedauer ein starker Hintergrund aus unspezifisch aufgereinigten Proteinen größeren Molekulargewichts.

Da in diesem Fall die Transfereffizienz als Parameter ausschied, konnte das Ergebnis nur mit einer geringen Markierung des ektopisch exprimierten NRF-Strep Fusionsproteins im Vergleich zu den endogenen Proteinen der Zelle erklärt werden.

2.8.2 Massenspektrometrische Untersuchungen zur Phosphorylierung von überexprimiertem NRF-Strep Fusionsprotein

Eine alternative Methode zur Aufklärung von posttranslationalen Modifikationen (z.B. Phosphorylierung) bedient sich der Massenspektrometrie (MS).

Dabei entfällt der Nachteil des Arbeitens mit größeren Mengen an Radioaktivität, wie es für die biosynthetische Markierung notwendig ist. Die Leistungsfähigkeit moderner Massenspektrometer erlaubt es, Phosphorylierungsprozesse auf Proteomebene zu untersuchen [Beausoleil *et al.*, 2004]. Für die massenspektrometrische Analyse wird das Zielprotein zunächst proteolytisch verdaut, wobei üblicherweise Trypsin verwendet wird.

Die entstehenden Peptide werden anschließend säulenchromatographisch, z.B. über eine LC-Säule, aufgetrennt und im Massenspektrometer ionisiert. Durch die Massenbestimmung der Ionen ist es bei Bekanntheit des Proteins möglich, durch den Vergleich der errechneten mit den theoretischen Massen mögliche Phosphorylierungen zu benennen (Massendifferenz: 80 bzw. 160 Da). Durch weitere massenspektrometrische Fragmentierung der Peptidionen (MS/MS, MS²) können diese potenziellen Phosphorylierungen verifiziert bzw. falsifiziert werden.

2.8.2.1 Affinitätsaufreinigung von NRF-Strep durch das One-STrEP™-System (IBA)

Für die massenspektrometrische Bestimmung der Phosphorylierungsstellen von NRF wurde wie im Fall der biosynthetischen Markierung mit überexprimiertem NRF-Strep Fusionsprotein gearbeitet. Die Methode wurde während der Diplomarbeit von Anke Roden etabliert.

Dazu wurden HeLa ACC 57-Zellen auf Kulturschalen (Greiner) ausgesät und am folgenden Tag mit dem Plasmid pNRF2722Strep transfiziert. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Zellyse. Nach der Zentrifugation der Lysate wurden die Überstände zweifach auf Strep-Tactin Affinitätschromatographiesäulen (One-STrEP™, IBA) gegeben. Die Säulen wurden anschließend gewaschen und NRF-Strep durch Desthiobiotin (DTB) haltigen Puffer in sechs Fraktionen eluiert. Die Analyse der Lysate, der Durchflussfraktionen sowie der Wasch- und Elutionsfraktionen erfolgte nach denaturierender PAGE mittels Transfer auf eine aktivierte

PVDF-Membran (Immobilon P®, Millipore) und anschließender Immunfärbung durch HRP gekoppeltes Strep-Tactin®.

Wie die **Abb. 2.55** zeigt, wurde NRF-Strep aus den Lysatüberständen aufgereinigt, wobei in den Fraktionen 3-5 die Mehrheit des Proteins eluiert wurde.

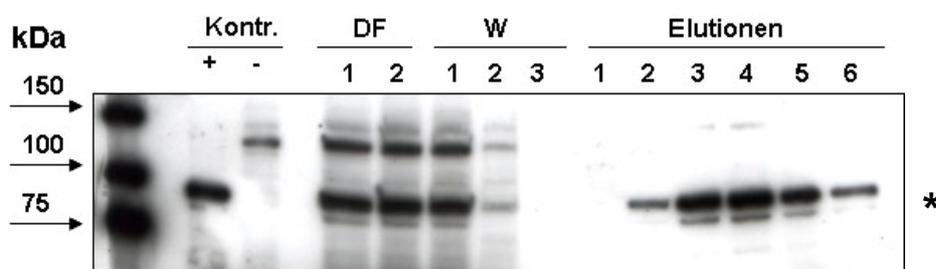


Abb. 2.55 Affinitätschromatographische Aufreinigung von NRF-Strep aus HeLa ACC 57-Zellen

Die Abbildung zeigt die erfolgreiche Aufreinigung und Elution von überexprimiertem NRF-Strep aus HeLa ACC 57-Zellen. Für die Aufreinigung wurden die Lysate aus 25 Zellkulturschalen vereinigt und zentrifugiert. Die Überstände wurden zweifach über eine Strep-Tactin Superflow® (0,5 ml Säulenvolumen, IBA) gegeben. Die Durchflussfraktionen DF 1 und 2) wurden aufgefangen. Die Säule wurde dreimal gewaschen (W1-3), anschließend wurde das Protein durch Zugabe von Desthiobiotin haltigem Puffer in sechs Fraktionen eluiert (Elutionen 1-6).

Für die Analyse wurden je 20 µl aller Fraktionen sowie je 10 µl einer Lysatkontrolle aus pNRF2722Strep transfizierten HeLa-Zellen (+) und einer Negativkontrolle (-) aus nicht transfizierten HeLa-Zellen in Auftragspuffer aufgeköcht und mittels einer denaturierenden PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf eine aktivierte PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore) transferiert. Nach Absättigung der Membran in TBS/T + 1,5% BSA wurde diese für eine Stunde bei RT mit HRP gekoppeltem Strep-Tactin® (1:4000 in TBS/T) inkubiert. Nach Waschen der Membran wurde NRF-Strep durch Chemolumineszenz (Chemolumineszenz (SuperSignal® West pico Chemoluminescent Substrate Kit, Pierce) visualisiert. Die Detektion geschah durch Exposition für eine Minute bei RT gegen einen ECL-Film (Amersham). Der Asterisk markiert die Laufhöhe von NRF-Strep.

Die Abbildung zeigt außerdem, dass auch nach zweifachem Durchfluss über die Säule anscheinend noch freies NRF-Strep bzw. ein Protein mit gleichem Molekulargewicht in Lösung vorlag. Es wurde vermutet, dass möglicherweise durch die Einnahme einer sterisch ungünstigen Konformation die Bindung von NRF-Strep an die Säulenmatrix behindert würde. Ein Zusatz von 2% SDS, das zur Entfaltung des Proteins beitragen sollte, wurde dem Lysat zugesetzt. Dies führte bei nachgeschalteter zweiter Säule zu einer zusätzlichen Ausbeute an eluiertem NRF-Strep (Daten nicht gezeigt).

Für die Analyse durch MS sollte aufgereinigtes NRF-Strep über ein präparatives Proteingel aufgetrennt und isoliert werden. Um das Auftragsvolumen zu reduzieren, wurden die am höchsten konzentrierten Elutionen vereinigt und mittels Ultrafiltration (Centricon®, Millipore) bei einer Ausschlussgröße von 50 kDa entsalzt und aufkonzentriert. Das dafür durch Transfektion

und Aufreinigung gewonnene Material entstammte einem Zelllysate aus 50 Kulturschalen (145 mm) mit einem Eluatvolumen von ca. 1,5 ml. Für die Aufkonzentrierung wurde die Centricon®-Einheit zunächst mit einer BSA haltigen PBS-Lösung abgesättigt, um eine mögliche spätere Proteinadsorption zu unterdrücken. Die vereinigten Eluatfraktionen wurden anschließend durch Zentrifugation aufkonzentriert und durch Umdrehen der Ultrafiltrationsküvette in ein Auffanggefäß überführt. Durch die Ultrafiltration wurde das Probenvolumen auf ca. das 21-tel des Ausgangsvolumens reduziert. Für die Kontrolle wurde aus dem Konzentrat eine Verdünnungsreihe erstellt und mit einem Aliquot vor der Ultrafiltration verglichen. Dazu wurden jeweils gleiche Volumina in Auftragspuffer aufgekocht und mittels einer denaturierenden PAGE aufgetrennt. Als Referenz dienten jeweils 20 µl der nicht filtrierten vereinigten Elutionen sowie des Filtrats. Für die Positivkontrolle wurde erneut Lysat pNRF2722Strep transfizierter HeLa ACC 57-Zellen (5 µl) verwendet. Nach Transfer der Proteine auf eine aktivierte PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore) wurde NRF-Strep durch Immunfärbung mittels HRP gekoppeltem Strep-Tactin® visualisiert.



Abb. 2.56 Aufkonzentrierung des eluierten NRF-Strep durch Ultrafiltration mittels Centricon® (Millipore)

Die Abbildung zeigt die Verdünnungsreihe des aufkonzentrierten NRF-Strep Proteins im Vergleich zur eingesetzten Proteinmenge der nicht filtrierten vereinigten Elutionsfraktionen. Dazu wurden je 20 µl der nicht filtrierten Elutionsfraktionen sowie der Verdünnungsreihe des Konzentrats und des Filtrats in Auftragspuffer aufgekocht. Als Positivkontrolle diente 5 µl Lysat aus pNRF2722Strep transfizierten HeLa ACC57-Zellen. Die Proben wurden über einen denaturierenden Proteingel aufgetrennt und auf eine aktivierte PVDF-Membran transferiert. Nach Absättigung der Membran in TBST + 1,5% BSA wurde diese mit HRP gekoppeltem Strep-Tactin™ (1:4000 in TBST) für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach Waschen der Membran wurde NRF-Strep mittels Chemolumineszenz (SuperSignal® West pico Chemoluminescent Substrate Kit, Pierce) visualisiert. Die Detektion erfolgte bei RT für eine Minute gegen einen ECL-Film (Amersham). Der Asterisk markiert die Laufhöhe von NRF-Strep.

Wie die **Abb. 2.56** veranschaulicht, bewirkte die Ultrafiltration durch Centricon®-Filtrationsküvetten eine Anreicherung des NRF-Strep Proteins im Überstand, während im Filtrat seine Anwesenheit nicht detektiert werden konnte. Ein densitometrischer Vergleich der Verdünnungsreihe des aufkonzentrierten Überstandes mit dem eingesetzten Protein der Ausgangslösung durch das Programm *Image J 1.38x* zeigte, dass NRF-Strep mit einem Faktor von ca. 14 angereichert wurde, während die Ausbeute ca. 65% betrug.

2.8.2.2 Präparation von NRF-Strep durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Für die Analyse mittels Massenspektrometrie ist es zur eindeutigen Zuordnung der erhaltenen Massen zur Proteinsequenz besonders entscheidend, den Analyten möglichst rein darzustellen. Vorversuche hatten hier gezeigt, dass NRF-Strep selbst nach Affinitätschromatographie und Ultrafiltration mit einer Vielzahl an zellulären Fremdproteinen verunreinigt war.

Deshalb war es nicht möglich, das Konzentrat direkt zu untersuchen. Stattdessen wurde die Probe nach Zusatz von Auftragspuffer aufgeköcht und mittels denaturierender PAGE aufgetrennt. Um die Proteinbande nach CBB-Färbung möglichst genau lokalisieren und ausschneiden zu können, wurde als Referenz eine Probe aus nicht transfizierten HeLa ACC57-Zellen aufgetragen, welche identisch zu den transfizierten Zellen behandelt wurden (**Abb. 2.57 A**). Zusätzlich wurde ein Aliquot der NRF-Strep Probe nach erfolgter Gelelektrophorese auf eine aktivierte PVDF-Membran transferiert und durch Immunfärbung mittels HRP gekoppeltem Strep-Tactin® nachgewiesen (**Abb. 2.57 B**). Dies sollte durch Vergleich der Laufhöhe die Identifizierung von NRF-Strep im Proteinbandenmuster erleichtern. Insgesamt wurde für die präparative PAGE ein Material aus 125 Zellkulturschalen (145 mm) verwendet.

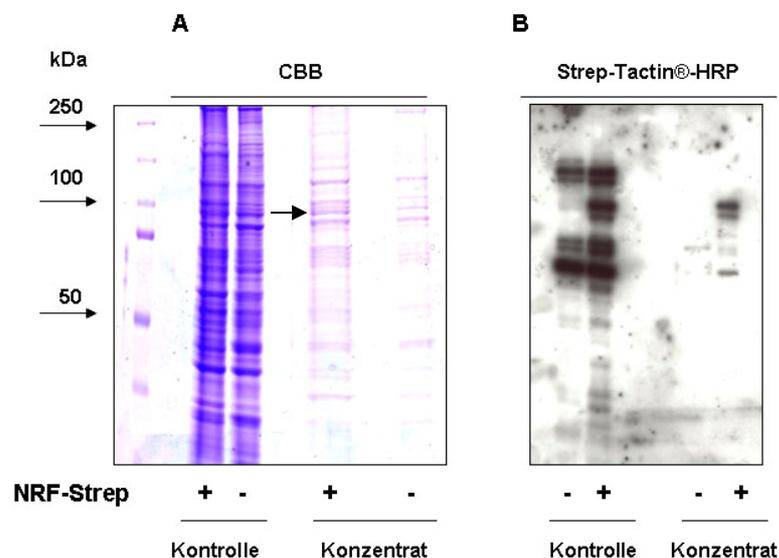


Abb. 2.57 Präparative Polyacrylamidgelelektrophorese von NRF-Strep aus Konzentrat

Die Abbildung zeigt das CBB gefärbte präparative Proteingel (**A**) sowie die Immunfärbung mittels HRP-gekoppeltem Strep-Tactin® auf einer PVDF-Membran (**B**).

Für das präparative Gel wurden 60 µl eines aus 125 Kulturschalen pNRF2722Strep transfizierter HeLa ACC57-Zellen (145 mm) gewonnenen Konzentrats (+) aufgetragen sowie 36 µl Konzentrat aus 25 Kulturschalen (145 mm) nicht transfizierter Zellen (-). Als Kontrollen dienten jeweils 10 µl Lysat aus pNRF2722Strep transfizierten (+) bzw. nicht transfizierten HeLa ACC57-Zellen (-). Als Proteingrößenstandard diente Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (BioRad). Das Gel wurde nach der Elektrophorese CBB gefärbt und extensiv in 10% Essigsäure entfärbt (**A**).

Für die Immunfärbung wurden jeweils 3 µl derselben Konzentrate (+/-) sowie 10 µl der Kontrollen (+/-) eingesetzt. Der Transfer erfolgte nach der Elektrophorese auf eine aktivierte PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore). Nach Absättigung der Membran in TBST + 1,5% BSA wurde diese mit HRP gekoppeltem Strep-Tactin® (1:4000 in TBST) für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Visualisierung von NRF-Strep erfolgte mittels Chemolumineszenz (SuperSignal® West pico Chemoluminescent Substrate Kit, Pierce) und wurde durch Exposition für 15 Sekunden bei RT gegen einen ECL-Film (Amersham) detektiert.

Wie die **Abb. 2.57** zeigt, konnte nach CBB-färbung des Gels durch Vergleich der Bandenmuster des NRF-Strep enthaltenden Konzentrats mit dem aus nicht transfizierten Zellen eine spezifische Proteinbande lokalisiert werden (**A**). Deren Laufverhalten entsprach dem durch Strep-Tactin® visualisierten Protein der PVDF-Membran (**B**). Es war somit sehr wahrscheinlich, dass es sich bei der aus dem Gel isolierten Bande um NRF-Strep handelte.

2.8.2.3 Untersuchung der NRF-Strep Proteingelbande auf potenzielle Phosphorylierungsstellen mittels MALDI-TOF-MS und nLC-ESI-MS/MS

Die ausgeschnittene Gelbande wurde zur Untersuchung an die PANATEcs GmbH (Tübingen) übergeben. Dort wurde zunächst sämtliches in der Gelbande vorhandenes Protein zunächst unter Zusatz von 10 mmol/L DTT reduziert und mit 40 mmol/L Iodacetamid alkyliert. Anschließend wurde das so behandelte Protein durch Zugabe von Trypsin proteolytisch verdaut und aus dem Gel eluiert. Ca. 10% der erhaltenen Peptidmenge wurde zunächst mittels MALDI-ReTOF Massenspektrometrie (Reflex IV MALDI Massenspektrometer, Bruker Daltonik GmbH) auf potenzielle Phosphorylierungsstellen untersucht. Die Erstellung des Peptidmassen-Fingerabdrucks zeigte signifikant die Anwesenheit von NRF in der Probe. Zusätzlich wurden als Verunreinigungen signifikant humanes Nucleolin sowie verschiedene Keratinvarianten in der Probe nachgewiesen. **Abb. 2.58** zeigt die den Peptiden der NRF-Sequenz zugeordneten Signale des MS-Spektrums (**A**) sowie deren Verteilung in der Primärstruktur des Proteins (**B**). Die Abdeckung entsprach dabei ca. 34% der Gesamtsequenz und war damit relativ niedrig.

Außerdem zeigte sich, dass die sich im Interesse befindlichen Sequenzbereiche (siehe 2.8.1 und 2.8.2-4) der Aminosäuren 33-44, 94-124 mit Ausnahme des Peptids 421-435 (⁴²¹SSQCHTGGSPRGSGK⁴³⁵) nicht abgedeckt wurden. Letzteres, vermutlich durch eine von Trypsin nicht erkannte Spaltstelle entstanden (fett), enthielt mit einer berechneten Masse von 1555,64 Da gegenüber einer theoretischen Masse von 1475,67 Da eine Massendifferenz von ca. 80 Da, was einer potenziellen Phosphorylierung entspricht. Aufgrund eines schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses wurde dieses nicht aufgeführt (persönl. Mitteilung: U. Kratzer).

A

Start	End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
51	56	783.4238	782.4165	782.4300	-0.0135	0	K.FHARPR.F
82	94	1545.6243	1544.6171	1544.7042	-0.0871	0	K.EVNEQTHFASMPR.D
171	176	827.4235	826.4162	826.4225	-0.0063	0	K.QFFIER.L
177	183	832.4431	831.4359	831.4854	-0.0496	0	K.LLATIRK.N
212	222	1308.5863	1307.5790	1307.6761	-0.0971	0	K.TNPEYIAFLK.E
223	231	979.4897	978.4824	978.5386	-0.0561	0	K.EIIPADIPK.N
246	259	1575.7131	1574.7058	1574.7399	-0.0340	0	R.CQNIYLTGYAGSK.N
264	272	1002.4985	1001.4912	1001.5505	-0.0593	1	R.DRATELAVK.L
278	284	870.5217	869.5145	869.5447	-0.0302	1	R.IEVVYVR.R
368	374	940.4738	939.4665	939.3442	0.0723	0	K.YEMMFR.T
464	472	1189.5034	1188.4961	1188.5485	-0.0524	0	R.MTVEYVYR.M
490	509	1265.5536	1264.5463	1264.6663	-0.1200	1	K.TVRYEAGEAVK.T
501	509	937.4469	936.4396	936.4552	-0.0156	0	K.YEAGEAVK.T
514	523	1127.5838	1126.5765	1126.6346	-0.0581	0	K.TQPTVINLK.K
525	533	945.4395	944.4323	944.4927	-0.0604	0	K.GAVEDEVSK.N
534	546	1494.5976	1493.5904	1493.7110	-0.1206	1	R.NEIQGRSAFAYK.Q
551	560	1171.5655	1170.5582	1170.5993	-0.0411	0	K.EDNIGNQLLR.K
562	571	963.4142	962.4069	962.4644	-0.0575	0	K.MGMTGGGLK.S
572	583	1271.5760	1270.5687	1270.6881	-0.1193	1	K.SGEGIREPISVK.E
578	583	672.3982	671.3909	671.3854	0.0056	0	R.KPISVK.E
578	587	1194.5205	1193.5133	1193.6404	-0.1272	1	R.EDISVKEQHK.R
584	588	697.3725	696.3652	696.3667	-0.0015	1	K.EQHRR.E
588	597	1143.4929	1142.4856	1142.6044	-0.1188	1	K.REGLDVER.V
589	597	987.4871	986.4798	986.5033	-0.0235	0	R.EGLDVER.V
605	611	886.4826	885.4753	885.4920	-0.0167	0	R.DIKIIR.N
616	626	1279.5551	1278.5479	1278.5840	-0.0362	0	R.SESHTLTPSR.E
627	633	876.4433	875.4360	875.3985	0.0375	0	R.ELINDER.K
635	642	965.4591	964.4518	964.5454	-0.0936	0	K.QHQIAQK.Y
649	656	864.4364	863.4291	863.3998	0.0293	0	K.SHGVDHR.Y
657	662	706.3930	705.3857	705.4174	-0.0317	0	R.YLVVGR.K
657	663	834.4110	833.4037	833.5123	-0.1086	1	R.YLVVGRK.R

B

1	MEKILQMAEG	IDIGEMPSYD	LVLSKPSKQ	KRHLSTCDGQ	NPPKKQAGSK
51	FHARPRFEPV	HVFASSSKDE	RQEDPYGPQT	KEVNEQTHFA	SMPRDIYQDY
101	TQDSFSIQDG	NSQYCDSSGF	ILTKDQPVTA	NMYFDSGNPA	PSTTSQOANS
151	QSTPEPSFSQ	TFPESVVAEK	QYFIEKLTAT	IKWNLNPEM	TSGSDKINYT
201	YMLTRCIQAC	KTNPEYIYAP	LKEIIPADIP	KNKKLLTDGY	ACEVRCQNIY
251	LTTGYAGSKN	GSRDRATELA	VKLLQKRIEV	RVVRKPKFHT	FGEDLVVCCI
301	GMSSYFPPA	LKPPEDLVVL	GKDASGQPIF	NASAKHWNF	VITENANDAI
351	GILNNSASFN	KMSIEYKYEM	MPNRTWRCRV	FLQDHCLAEG	YGTKTKSKHA
401	AADEALKILQ	KTQPTYPSVK	SSQCHTGSPP	RSGSKKKDKI	DLVVYENSSN
451	PVCTLNDAQ	FNRMTVEYVY	ERMTGLRWKC	KVILESEVIA	EAVGVKKTVK
501	YEAGEAVKT	LKKTQPTVIN	NLKGAVEDV	ISRNEIQGRS	AEEAYKQIQI
551	EDNIGNQLLR	KMGWTGGGLG	KSGEGIREPI	SVKEQHKREG	LGLDVERVNK
601	IAKRDIEQII	RNYARSESHT	DLTFSRELTN	DERKQIHQIA	QKYGLKSKSH
651	GVGHDRYLVV	GRKRRKEDLL	DQLKQEGQVG	HYELVMPQAN	

Abb. 2.58 Mascot-Datenbanksuche zum Peptidmassen-Fingerabdruck der NRF-Strep enthaltenden Proteingelbande

Für den Abgleich zwischen den errechneten und den theoretischen Massen der tryptischen Peptide durch das Mascot-Programm wurde die Swiss-Prot-Datenbank herangezogen. Die Abbildung zeigt die signifikanten Zuordnungen aufgelistet nach Anfangs- und Endamino-säuren sowie deren beobachtete (observed), erwartete (expt.) und errechnete (calc.) Massen (A). Ferner sind die zugeordneten Peptide in der Aminosäuresequenz von NRF rot hervorgehoben (B). (Quelle: Analysenbericht der PANATecs GmbH)

Der ersten Analyse mittels MALDI-ReTOF Massenspektrometrie folgte eine genauere Untersuchung unter Verwendung eines ESI-Tandem-Massenspektrometers mit vorgeschalteter nano-Flüssigkeitschromatographiesäule (n LC). Durch Vorschalten einer LC werden die Peptide chromatographisch aufgetrennt. In der folgenden Elektronen-Sprühionisation (ESI) werden diese zunächst zu Vorläufer-Ionen (*engl.: precursor*) und durch nachgeschaltete Stoßionisation unter Fragmentierung in Produkt-Ionen umgewandelt. Diese Kopplung zweier massenspektrometrischer Prozesse erlaubt in der Regel eine faktische Zuordnung der Ionen zum Peptid-Fingerabdruck des Proteins und ermöglicht darüber hinaus die Identifikation posttranslationaler Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen.

A

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss Sequence
33 - 45	494.8900	1481.6482	1480.7093	0.9389	1 R.HLSTCDGQNPFFK.Q (Ions score 15)
33 - 45	494.9740	1481.9002	1480.7093	1.1909	1 R.HLSTCDGQNPFFK.Q (Ions score 7)
82 - 94	516.1950	1545.5632	1544.7042	0.8590	0 K.EVNEQTHFASMPR.D (Ions score 21)
82 - 94	781.3710	1560.7274	1560.6991	0.0284	0 K.EVNEQTHFASMPR.D Oxidation (M) (Ions score 15)
82 - 94	521.5400	1561.5962	1560.6991	0.8991	0 K.EVNEQTHFASMPR.D Oxidation (M) (Ions score 13)
184 - 196	698.4370	1394.8594	1394.5984	0.2611	0 K.NLSNPMTSGSDK.I Oxidation (M) (Ions score 87)
212 - 222	654.9870	1307.9594	1307.6761	0.2833	0 K.TNPEYIYAPLK.E (Ions score 61)
223 - 231	490.3910	978.7674	978.5386	0.2289	0 K.EIPPADIPK.N (Ions score 25)
235 - 245	648.9220	1295.8294	1295.6180	0.2115	0 K.LLTDGYACEVR.C (Ions score 44)
368 - 374	477.9750	953.9354	955.3891	-1.4537	0 K.YEMPNR.T Oxidation (M) (Ions score 21)
412 - 420	510.9720	1019.9294	1019.5288	0.4007	0 K.TQPTYPSVK.S (Ions score 18)
464 - 472	603.3030	1204.5914	1204.5434	0.0480	0 R.MTVEYVYER.M Oxidation (M) (Ions score 58)
482 - 496	778.7130	1555.4114	1554.8869	0.5246	0 K.VILESEVIAEAVGK.K (Ions score 83)
501 - 509	469.6900	937.3654	936.4552	0.9102	0 K.YEAAGEAVK.T (Ions score 48)
551 - 560	586.5810	1171.1474	1170.5993	0.5482	0 K.EDNIGNQLLR.K (Ions score 49)
562 - 571	482.6620	963.3094	962.4644	0.8450	0 K.MGWTTGGGLK.S (Ions score 22)
604 - 611	522.0060	1041.9974	1041.5931	0.4044	1 K.RDIEQIIR.N (Ions score 30)
605 - 611	444.1220	886.2294	885.4920	0.7375	0 R.DDEQIIR.N (Ions score 41)
616 - 626	640.4010	1278.7874	1278.5840	0.2034	0 R.SESHTDLTFSR.E (Ions score 56)
665 - 674	629.4600	1256.9054	1256.7088	0.1966	2 R.RKEDLLDQLK.Q (Ions score 12)
665 - 674	420.4600	1258.3582	1256.7088	1.6494	2 R.RKEDLLDQLK.Q (Ions score 34)
666 - 674	551.6170	1101.2194	1100.6077	0.6117	1 R.KEDLLDQLK.Q (Ions score 40)

B

```

1 MEKILQMAEG IDIGEMPSYD LVLSKPSKQO KRHLSTCDGQ NPPKQAGSK
51 PHARPRFEPV HFAVSSKDE RQEDPYGPQT KEVNEQTHFA SMPRDIYQDY
101 TQDSFSIQDG NSQYCDSSGF ILTKDQPVTA NMYFDSGNPA PSTTSQQANS
151 QSTPEPSPSQ TFPESVVAEK QYFIEKLTAT IWKNLSNPEM TSGSDKINYT
201 YMLTRCIQAC KTNPEYIYAP LKEIPPADIP KNKLLTDGY ACEVRCQNIY
251 LTTGYAGSKN GSRDRATELA VKLLQKRIEV RVVRRKPKHT FGEDLVVCQI
301 GMSSYEFPPA LKPPEDLVVL GKDASGQPIF NASAKHWNF VITENANDAI
351 GILNNSASFN KMSIEYKYEM MPNRTWRCRV FLQDHLAEG YGTTKTSKHA
401 AADEALKILO KTOPTYPSVK SSQCHTSSP RGSGKKDKI DLVVVNSSN
451 PVCTLNDTAQ FNRMTVEYVY ERMTGLRWKC KVILESEVIA EAVGVKKTIVK
501 YEAAGEAVKT LKKTQPTVIN NLKKGAVEDV ISRNEIQRS ABEAYKQIQK
551 EDNIGNQLLR KMGWTGGGLG KSGEGIREPI SVKEQHKREG LGLDVERVNMK
601 IAKRDIEQII RNVARSESHT DLTFSRELTN DERKQIHQIA QKYGLKSKSH
651 VGGHDRYLIVV GRKRKEDLL DQLKQEGQVG HYELVMPQAN

```

Abb. 2.59 Mascot-Datenbanksuche zur MS/MS-Analyse von NRF-Strep

(Quelle: Analysenbericht der PANATecs GmbH)

Die daran anschließende Datenbanksuche mittels des Programms *Mascot* für MS/MS-Anwendungen zeigte auch in diesem Fall, dass es sich bei der untersuchten Probe um ein Gemisch aus Peptiden unterschiedlicher Proteine handelte. In dieser stellte NRF jedoch die Hauptkomponente dar und konnte mit 24% Sequenzabdeckung identifiziert werden. Dabei wurde auch der interessierende Bereich der Aminosäuren 33-44, jedoch nicht der anderen oben genannten abgedeckt. Wie **Abb. 2.59** demonstriert, konnten durch einen Vergleich der experimentell ermittelten mit den zu erwartenden Massen unter Berücksichtigung möglicher Phosphorylierungen an Serin, Threonin oder Tyrosin keine Phosphopeptide identifiziert werden. Dies galt auch für das bereits erwähnte Peptid 421-435, für das durch ESI-MS/MS Fragmentierung keine Phosphorylierung festgestellt werden konnte (persönl. Mitteilung: U. Kratzer).

Trotz dieser negativen Ergebnisse wurde erneut NRF-Strep aus unstimulierten sowie IL-1 stimulierten HeLa-Zellen aufgereinigt und für die Analyse vorbereitet. Zu diesem Zeitpunkt lagen jedoch noch keine neueren Ergebnisse vor. Eine Bestätigung der durch die *in vitro* Experimente eingegrenzten Phosphorylierungsstellen in NRF (siehe Abschnitt 2.6) steht somit noch aus.

3. Diskussion

3.1 Vorwort

Der NFκB reprimierende Faktor (NRF) ist in die basale transkriptionelle Inhibition dreier NFκB regulierter, proinflammatorischer Gene, namentlich IFN-β [Nourbakhsh & Hauser, 1999], iNOS [Feng *et al.*, 2002] sowie IL-8 [Nourbakhsh *et al.*, 2001], involviert und ist im letzten Fall essentiell für die IL-1 induzierte maximale Genexpression [Nourbakhsh *et al.*, 2001]. Wie bereits in Abschnitt 2 erwähnt wurde von Niedick die konstitutive Phosphorylierung eines NRF-myc Fusionsproteins in HeLa-Zellen beschrieben, die unter dem Einfluss zellulärer Stimulation abnahm [Niedick, 2000]. Die untersuchte NRF-cDNA war in diesem Experiment jedoch unvollständig und kodierte für ein C-terminal verkürztes Protein von 388 Aminosäuren.

Primäres Ziel dieser Arbeit war es, die Phosphorylierung des vollständigen Transkriptionsfaktors NRF im basalen Zustand sowie in Abhängigkeit einer zellulären Stimulation durch Zytokine (IL-1β) bzw. einer Virusinfektion (NDV) zu charakterisieren. Dieses wurde durch das parallele Verfolgen sich ergänzender (experimenteller) Ansätze erreicht. Dabei fanden klassische Radioisotopen-basierte Methoden Verwendung sowie die Massenspektrometrie und Computer-gestützte Vorhersageprogramme.

3.2 Phosphorylierung von NRF im zellfreien System

3.2.1 Das GST-Fusionssystem und die Aufreinigung der GST-NRF Fusionsproteine

Für die Untersuchungen zur Phosphorylierung von NRF im zellfreien System wurde das Glutathione S-transferase (GST) Gene Fusion System (Amersham Biosciences) verwendet.

Dieses basiert auf der IPTG induzierbaren Erzeugung von Fusionsproteinen in Bakterien, bestehend aus dem jeweiligen zu untersuchenden Zielprotein und einer N-terminal vorgelagerten GST-Domäne aus *Schistosoma japonicum*. [Smith & Johnson, 1988]. Anfängliche Versuche, das vollständige NRF-Protein als GST-Fusionsprotein in *E. coli* BL21 zu produzieren, scheiterten (nicht gezeigt). Wie Frangioni & Neel argumentieren, korreliert die Ausbeute an bakteriell exprimierten Proteinen reziprok mit ihrer Molekularmasse, so dass sich Proteine mit einer Masse >100 kDa (GST-NRF_{FL}~104 kDa kaum herstellen lassen [Frangioni & Neel, 1993]. Aus diesem Grund wurden verschiedene Bereiche der Primärstruktur von NRF in die entsprechenden kodierenden Sequenzen in den pGEX-4T-2 Vektor kloniert: NRF1-112, NRF1-389, NRF1-449, NRF112-449, NRF390-690, NRF447-690, NRF390-486. Entgegen den weiteren Beobachtungen von Frangioni & Neel zeigten diese Proteine in ihrer Aufreinigung aus

bakteriellen Lysaten keine spezielle Korrelation mit ihrer jeweiligen Molekularmasse. Zwar wiesen GST-NRF1-112 sowie die GST-Domäne selbst stets hohe Ausbeuten auf, jedoch konnte auch das verhältnismäßig große GST-NRF1-449 (ca. 78 kDa) gut aufgereinigt werden, während kleinere wie z.B. GST-NRF390-486 oder auch GST-NRF1-389 schlechtere Ausbeuten zeigten (nicht gezeigt). Wahrscheinlich beruhte dies auf ihrer unvollständigen Faltung, da stets ein ca. 70 kDa großes Protein unspezifisch kopräzipitiert wurde. Bei diesem Protein handelte es sich vermutlich um das Hitzeschockprotein DnaK aus *E. coli*, welches die Funktion eines Chaperons besitzt und fehlgefaltete Proteine bindet [Szabo *et al.*, 1994]. Wie bei Buchberger *et al.* beschrieben, ließ es sich durch Inkubation mit ATP entfernen [Buchberger *et al.*, 1994]. Eine Fehlfaltung könnte dann zu ihrer C-terminalen Degradation geführt haben. Diese Fragmente wurden dann bevorzugt aufgereinigt, da sie vermutlich größenbedingt die vollständigen Proteine von der GSH-Sepharosematrix ausschlossen [Frangioni & Neel, 1993]. Ob diese mögliche Fehlfaltung der Proteine eine Bedeutung für ihre potenzielle Phosphorylierbarkeit hat, wird später noch diskutiert werden (siehe Abschnitt 3.4.2).

3.2.2 Das GST-Fusionssystem im *in vitro* Kinasezymtest (*Kinase assay*)

In Bakterien produzierte GST-Fusionen eukaryontischer Proteine können trotz der fehlenden posttranslationalen Modifikationen ihrer physiologischen Funktion entsprechend voll funktionsfähig sein. So wurden bereits Kinasedomänen als bakterielle GST-Fusionsproteine erfolgreich eingesetzt [Bachmann *et al.*, 2004] und auch als exogene Substrate von Kinasen fanden GST-Fusionsproteine Verwendung [Price *et al.*, 1996]. Aufgrund der Notwendigkeit, die jeweiligen GST-NRF Proteine nach der Phosphorylierung aus dem Reaktionsansatz aufzureinigen (Abschnitt 3.3), wurden diese trotz der Möglichkeit, die GST-Domäne enzymatisch abzuspalten, vollständig eingesetzt. Über die Phosphorylierung der GST-Domäne *in vitro* gibt es widersprüchliche Aussagen [Zinck *et al.*, 1995; Rodriguez *et al.*, 2005]. Deshalb wurde im Vorfeld überprüft, ob die GST-Domäne unter den Versuchsbedingungen selbst Ziel einer *in vitro* Phosphorylierung ist. Diese Kontrolle war wesentlich, da sie eine Beteiligung der GST-Domäne am Phosphorylierungsprofil von NRF ausschließen sollte. Wie in **Abb. 2.2** eindeutig gezeigt werden konnte, wurde die GST-Domäne nicht durch Kernlysate aus HeLa-Zellen phosphoryliert. Als nächster Parameter wurde die zeitliche Kinetik der Phosphorylierung von NRF am Beispiel des Fusionsproteins GST-NRF1-449 überprüft. Dies war aus zwei Gründen notwendig: Zum einen besitzen Kinasen im zellfreien System häufig die Eigenschaft unspezifisch Proteinsubstrate zu phosphorylieren (Substratpromiskuität), dies umso mehr im Überschuss bzw. bei langen Inkubationszeiten. Zweitens sollte der Substratumsatz eine zeitabhängige Linearität aufweisen, um vergleichbar zu sein. Deshalb wurde beispielhaft GST-NRF1-449 in

einer Zeitreihe (null bis 45 Minuten) *in vitro* phosphoryliert. Dies zeigte, dass bereits nach fünf Minuten eine deutliche Phosphorylierung von NRF erzielt werden konnte (**Abb. 2.5**). Wie eine densitometrische Quantifizierung zeigte, nahm diese mit zunehmender Reaktionszeit weiter zu und erreichte nach 30 bis 45 Minuten eine Sättigung (**Abb. 2.6**). Dies demonstrierte die grundsätzliche Eignung von NRF als *in vitro* Substrat von Kinasen. Eine Betrachtung des Nullwerts in dieser Zeitreihe offenbarte einen dritten wichtigen Aspekt in der *in vitro* Phosphorylierung von NRF. Das im Stoppuffer im Überschuss enthaltene EDTA sollte durch Chelatierung des für die Kinaseaktivität essentiellen Mg^{2+} die Reaktion terminieren. Eine Überexposition des getrockneten Gels zeigte jedoch auch für den Nullwert eine schwache Phosphorylierung. Als Ursache dafür wurde angenommen, dass die Termination nicht unmittelbar erfolgte. Alternativ wäre es möglich, dass trotz des Überschusses an Chelator weiterhin eine schwache Reaktion stattfand, zumal die Reaktionsansätze zur Aufreinigung des Substrats weitere 30 Minuten bei 30°C inkubiert wurden. Da diese Phosphorylierung allerdings erst nach sehr langer Autoradiographie überhaupt sichtbar wurde, konnte sie in Anbetracht der für die in den Experimenten vergleichsweise kurzen Expositionszeiten vernachlässigt werden. Diese Vorversuche zeigten, dass das *in vitro* System unter Einsatz von γ - ^{32}P ATP für die Untersuchungen zur Phosphorylierung von NRF grundsätzlich geeignet war. Ein parallel erprobter Ansatz, basierend auf der Messung an verbrauchtem ATP [Cook *et al.*, 1982; Charter *et al.*, 2006], erwies sich im Gegensatz dazu als wenig geeignet und wurde vorläufig aufgegeben (Daten nicht gezeigt). Dieser Ansatz könnte, in Variation, jedoch zukünftig für ein Hochdurchsatz-Verfahren unter Verwendung von peptidischen Substraten der NRF-Sequenz und definierten Kinasen von großem Interesse sein.

In den folgenden Abschnitten wird zunächst die Phosphorylierung von NRF im nicht stimulierten Zustand besprochen. Soweit nicht anders bezeichnet handelt es sich bei den jeweiligen Deletionsvarianten und Mutanten von NRF stets um GST-Fusionsproteine.

3.3 Konstitutive Phosphorylierung von NRF

3.3.1 Reproduzierbarkeit der *in vitro* Phosphorylierung

Für die Untersuchungen zur konstitutiven Phosphorylierung von NRF wurden die bereits beschriebenen GST-NRF Fusionsproteine verwendet. Als Quelle der Kinaseaktivität dienten Kernlysate aus unstimulierten HeLa-Zellen. Diese wurden stets innerhalb von 24-48 Std. nach Aussaat der Zellen präpariert, so dass von einer Synchronisation der Zellen und damit einer vergleichbaren Aktivität des Kinoms ausgegangen werden konnte.

Eine weitere Auftrennung der Kernlysate, z.B. mittels MonoQ-Chromatographie [McLeod *et al.*, 2001], die eine genauere Auflösung hätte ermöglichen können, war im Rahmen dieser Arbeit methodisch leider nicht möglich. Die Verwendung der vollständigen Kernfraktion als Kinaseaktivität machte es deshalb notwendig, die als Substrate eingesetzten GST-NRF Fusionsproteine nach Beendigung der Reaktion erneut aufzureinigen. Dadurch bedingte Schwankungen der Konzentration in den Eluaten wurden durch einen densitometrischen Abgleich der autoradiographischen Signale auf die jeweiligen Proteinmengen abgeglichen und auf die jeweils höchste spezifische Phosphorylierung normiert. Hier zeigte sich eine gute Reproduzierbarkeit im Phosphorylierungsverhalten der einzelnen Deletionsmutanten (**Abb. 2.9**).

3.3.2 Basale Phosphorylierung von NRF im Bereich der Aminosäuren 1-112 und 390-486

Die vergleichende Phosphorylierung der Fusionsproteine NRF1-112, NRF1-389, NRF1-449, NRF112-449, NRF390-690, NRF447-690 und NRF390-486 konnte zeigen, dass der Bereich der Aminosäuren 1-112 das Ziel konstitutiv aktiver Kinasen ist. Eine Verlängerung des C-Terminus um 277 Aminosäuren zu NRF1-389 führte, wie die densitometrische Bestimmung der spezifischen Phosphorylierung zeigte (**Abb. 2.9**) zu keiner Veränderung der basalen Phosphorylierung, wobei NRF1-389 ungefähr dem bis 2002 bekannten NRF entspricht. Im Gegensatz dazu bewirkte eine weitere Verlängerung des C-Terminus um 60 Aminosäuren einen Anstieg der basalen Phosphorylierung. Eine schrittweise N-terminale Deletion zu den resultierenden Proteinen NRF112-449 und NRF390-486 zeigte, dass der entscheidende Zielbereich innerhalb der Aminosäuren 390-486 liegen muss. Eine schrittweise Deletion, ausgehend vom C-Terminus, bestätigte dies. So wiesen NRF390-690 und das C-terminal verkürzte NRF390-486 eine annähernd gleich starke spezifische Phosphorylierung auf, während die Phosphorylierung des zu NRF390-486 annähernd komplementären NRF447-690 nur ca. 44% dessen betrug. Der Bereich der Aminosäuren 390-486 von NRF konnte somit neben NRF1-112 als weiteres Ziel einer konstitutiven Phosphorylierung neu beschrieben werden. Dagegen legten diese Ergebnisse zunächst nahe, dass sich im Bereich von NRF112-389 keine an der basalen Phosphorylierung beteiligten Aminosäuren befinden.

Dies ist insofern interessant, als daraus geschlossen werden muss, dass in dem für die transkriptionelle Repression hinreichenden Bereich von NRF (1-389) nur ein konstitutiv phosphoryliertes Segment vorliegt. Darüber hinaus stellt sich die Frage nach der Funktion der Phosphorylierung im Bereich von 390-486, da dieser z.B. für die duale Funktion von NRF in der Regulation der Expression von IL-8 nicht notwendig war [Nourbakhsh *et al.*, 2001]. Dieser Aspekt wird im späteren Verlauf noch ausführlicher diskutiert werden.

3.3.3 Basale Serin- und Threonin-Phosphorylierung von NRF

Für die weitere Charakterisierung der Phosphorylierung von NRF wurde die Phosphoaminosäureanalyse mittels Dünnschichtelektrophorese nach Cooper [Cooper *et al.*, 1983] verwendet. Als Methode besitzt die Phosphoaminosäureanalyse gegenüber dem Einsatz phosphospezifischer Antikörper (z.B. anti-Phosphotyrosin) den Vorteil, die Phosphorylierung direkt durch die Detektion der Phosphoaminosäuren nachzuweisen. Dabei ist sie durch den Einsatz der Isotopenmarkierung (γ - ^{32}P ATP) überaus sensitiv. Entgegen der von Kamps verwendeten Methode, das Protein nach Transfer auf eine PVDF-Membran zu hydrolysieren [Kamps & Sefton, 1989], erwies sich die Hydrolyse im Gel als überaus praktikabel und weniger zeitaufwendig. Störungen im Laufverhalten der Phosphoaminosäuren durch Acrylamid konnten nicht festgestellt werden, sondern waren sehr wahrscheinlich auf einen Flussmittelstrom innerhalb der Zellulosematrix zurückzuführen. Im Gegensatz zu dem von Boyle *et al.* beschriebenen HTLE 7000 System [Boyle *et al.*, 1991] besaß die in dieser Arbeit verwendete DESAPHOR-Einheit (Desaga, Heidelberg) keine Möglichkeit durch Druckausübung diesen Nettostrom zu unterdrücken. Aufgrund des zur Probe beigefügten Standards aus Phosphoserin, -threonin und -tyrosin war es jedoch stets möglich die Signale der Autoradiographie eindeutig zuzuordnen. Die Analyse der verschiedenen Bereiche von NRF (NRF1-112, ~112-449, ~1-449 und ~447-690) offenbarte ein differenziertes Spektrum der Phosphoaminosäuren innerhalb der Primärstruktur (**Abb. 2.11**). So wies NRF in den Bereichen 447-690 und 112-449 mit jeweils ca. 80% einen deutlichen Phosphoserinüberschuss, während NRF1-112 mit ca. 75% Phosphothreonin eine entgegengesetzte Zusammensetzung der Phosphoaminosäuren zeigte. Interessanterweise spiegelte sich dieser hohe Anteil an Phosphothreonin in NRF1-449 nicht wider, wenn man es nur als Summe von NRF1-112 und NRF112-449 betrachtet. Ein ähnliches Phänomen konnte für Phosphotyrosin beobachtet werden. Während in NRF1-112 und NRF112-449 Mengen von etwas weniger als 5% des gesamten Phosphoaminosäuregehalts gemessen werden konnten, lag der Gehalt in NRF1-449 unter 1%. Wahrscheinlich wurden, bedingt durch die jeweilige Faltung in NRF1-112 bzw. NRF112-449 Aminosäuren modifiziert, die im Fall von NRF1-449 nicht zugänglich sind, so dass Phosphothreonin und auch Phosphotyrosin jeweils überrepräsentiert sind. Die in Abschnitt 2.2.4 genannte Überlegung, Phosphotyrosin könnte aufgrund seiner im Vergleich zu Phosphoserin – und threonin geringeren Stabilität während der sauren Lyse unterrepräsentiert sein, kann bedingt durch die relativ kurze Lysedauer von einer Stunde ausgeschlossen werden [Duclos *et al.*, 1991].

Die Phosphorylierung zellulärer Proteine geschieht durch Proteinkinasen, wobei Tyrosin- und Serin-/Threoninkinasen die beiden Hauptgruppen darstellen. Dabei überwiegt innerhalb der Zelle im Zytosol die Tyrosinphosphorylierung, während nukleäre Proteine zumeist an Serin- und

Threoninresten phosphoryliert werden. In dieser Hinsicht passen die gewonnenen Daten sehr gut zur Kernlokalisation von NRF, zumal eine Phosphorylierung durch Zytosolfractionen *in vitro* fast nicht festgestellt werden konnte (nicht gezeigt).

3.4 Phosphorylierung von NRF in Abhängigkeit zellulärer Stimulation durch Zytokine bzw. Virus

In den folgenden Abschnitten wird der Einfluss zellulärer Stimulation auf die Phosphorylierung von NRF diskutiert werden. Dabei wird zunächst die Stimulation durch Zytokine am Beispiel von IL-1 β , anschließend die Stimulation durch Virusinfektion (NDV) betrachtet. Diese Stimuli sind dafür bekannt, dass sie die zelluläre Transkription proinflammatorischer Gene aktivieren, die in der unspezifischen Immunantwort eine wesentliche Funktion einnehmen.

3.4.1 IL-1 β abhängige Phosphorylierung der NRF-Deletionsmutanten

Interleukin 1 β (IL-1 β) gehört zusammen mit seiner Isoform IL-1 α zur Familie der Zytokine. Neben dem Tumornekrosefaktor α (TNF α) ist es ein hauptsächlicher Induktor der Interleukin 8 (IL-8) Genexpression im verletzten oder durch Pathogene infizierten Gewebe [Kasahara *et al.*, 1991; Brasier *et al.*, 1998]. Ferner wurde die Induzierbarkeit der IL-8 Genexpression an einer Reihe humaner Zelllinien, wie Fibroblasten [Suzuki *et al.*, 2000; Georganas *et al.*, 2000; Aupperle *et al.*, 2001], intestinalen Epithelzellen [Jobin *et al.*, 1999; Bocker *et al.*, 2000] sowie den in dieser Arbeit verwendeten epithelialen HeLa-Zellen [Nourbakhsh *et al.*, 2001; Holtmann *et al.*, 2001] gut dokumentiert. IL-8 ist ein chemotaktisches Polypeptid und verursacht die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten des Immunsystems zu den sezernierenden Zellen, ist jedoch im gesunden Gewebe kaum nachweisbar [Baggiolini, 1998]. Unter dem Aspekt dieser strikten Regulation konnten Nourbakhsh *et al.* zeigen, dass NRF sowohl für die basale Repression als auch für die Induktion am IL-8 Promotor eine essentielle Funktion zukommt [Nourbakhsh *et al.*, 2001]. Es stellte sich daher die Frage nach einem möglichen regulatorischen Einfluss der Phosphorylierung von NRF auf seine duale Funktion, zumal Bartels und Mitarbeiter (zu Beginn dieser Arbeit) zeigen konnten, dass eine Interaktion zwischen NRF und RelA (p65 NF κ B) in beiden Zuständen vorliegt und auch notwendig ist [Bartels, 2006].

Zur Beantwortung dieser Frage wurde ebenfalls das System des *in vitro* Kinaseassays verwendet. Die Quelle der Kinaseaktivität stellte wiederum die Kernfraktion aus HeLa-Zellen dar, die zu diesem Zweck mit rekombinantem, humanem IL-1 β behandelt wurden. Vor den eigentlichen Versuchen wurden zunächst zwei wesentliche Kontrollen durchgeführt. Zum einen wurde die Kinaseaktivität der Kernlysate überprüft, um eine gleichbleibende Qualität zwischen

den verschiedenen Präparationen zu gewährleisten. Dies war notwendig, da die Aktivität vieler Enzyme in Rohlysaten häufig zu Instabilität neigt und folglich eine Aufreinigung unerlässlich macht [Carter, 1997]. Die Kernlysate zeigten hier eine gute intrinsische Kinaseaktivität, die anhand der Phosphorylierung endogener Kernproteine dokumentiert wurde (**Abb. 2.13**). Eine weitere Kontrolle war die Sicherstellung der zellulären Stimulation durch IL-1 und deren Konservierung in den Kernlysaten. Dies geschah mittels Messung der JNK-Aktivität an einem exogenen GST-Jun Fusionsprotein. Von Vorteil waren hierbei sowohl die gute Induzierbarkeit der Kinase durch Zytokine [Krause *et al.*, 1998] als auch die stabile Interaktion mit ihrem Substrat cJun. Letztere ermöglicht eine effiziente und spezifische Phosphorylierung auch unter *in vitro* Bedingungen [Sharrocks *et al.*, 2000; Barysyt-Lovejoy *et al.*, 2002], die in allen Präparationen zuverlässig reproduzierbar war (**Abb. 2.15**). Ein Vergleich der Phosphorylierung von GST-Jun und den endogenen Kernproteinen der Lysate zeigte zudem eine zeitliche Synchronität beider Profile mit einer maximalen Phosphorylierung nach 15 Minuten Stimulation (**Abb. 2.14; 2.16**).

NRF1-449 wurde konstitutiv maximal phosphoryliert (siehe Abschnitt 2.2.3). Aus diesem Grund wurde der Einfluss der IL-1 Stimulation auf die Phosphorylierung zunächst an diesem Bereich von NRF untersucht. Die durchgeführten Experimente konnten dabei zeigen, dass NRF im Gegensatz zu Jun nicht nach 15 Minuten induziert phosphoryliert wurde. Tatsächlich wurde zunächst eine Abnahme der Gesamtphosphorylierung beobachtet. Zeitversetzt nach 30 Minuten Stimulation wurde dann eine maximale induzierte Phosphorylierung beobachtet, die nach einer Stunde noch anhielt. Wie in Abschnitt 2.3.3.1 bereits angedeutet wurde, könnte es sich dabei um Überlagerungen verschiedener regulatorischer Effekte handeln. So könnten konstitutiv aktive Kinasen deaktiviert werden, während synchron eine Phosphorylierung durch IL-1 aktivierte Kinasen initiiert wird. **Abb. 3.1** veranschaulicht hypothetisch einen derartigen Verlauf.

Das beobachtete Phosphorylierungsprofil von NRF könnte so aus der vorgeschlagenen Überlagerung beider Effekte resultieren. Eine separate Betrachtung der Bereiche 1-112 und 112-449 verdeutlichte, dass die Stimulation durch IL-1 sich auf zwei Bereiche in der Primärstruktur von NRF konzentrierte: 1-112 und 390-486. Dort konnte jeweils eine Zunahme der Phosphorylierung nach 30 Minuten beobachtet werden (**Abb. 2.22; 2.26**), wobei im Bereich der Aminosäuren 390-486 diese nach einer Stunde wieder auf das basale Niveau zurückkehrte (**Abb. 2.27**). Interessanterweise war dieser Rückgang im C-terminal verlängerten NRF390-690 nicht zu beobachten (**Abb. 2.28**). Dagegen wies NRF447-690 eine Zunahme der Phosphorylierung nach Stimulation auf, die bis zu eine Stunde sukzessive zunahm (**Abb. 2.29**), wobei die Gesamtphosphorylierung im Verhältnis zu den anderen Bereichen von NRF vergleichsweise schwach war. Dies legt nahe, dass es wahrscheinlich weitere Zielstrukturen IL-1

induzierter Phosphorylierung im Bereich von 486-690 von NRF gibt. Entscheidend ist dabei, dass offensichtlich nicht nur der Abschnitt von NRF IL-1 abhängig phosphoryliert wird, welcher die Repressionsdomäne (1-296) sowie die DNA bindende Domäne (DBD) enthält (1-388). Tatsächlich konnte mit dem Bereich von 390-486 erstmalig eine weitere Zielstruktur IL-1 induzierter Kinasen eingegrenzt werden, die zudem konstitutiv phosphoryliert vorliegt (**Abb. 2.28**). Die Aminosäuren 390-486 befinden sich innerhalb der C-terminalen Region von NRF. Niedick *et al.* konnten zeigen, dass diese Region zur stimulationsunabhängigen Lokalisation von NRF innerhalb der zellulären Nucleoli verantwortlich ist und die Fähigkeit zur Bindung an doppelsträngige RNA (dsRNA) aufweist [Niedick *et al.*, 2004].

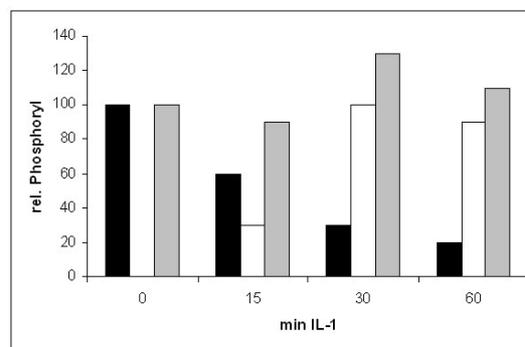


Abb. 3.1 Hypothetische Beteiligung konstitutiver sowie IL-1 aktivierter Proteinkinasen am Phosphorylierungsprofil von NRF1-449

Dargestellt sind die einzelnen Aktivitäten der konstitutiven (schwarz) sowie IL-1 aktivierter Kinasen (weiss) als relative Phosphorylierung von NRF1-449 in Abhängigkeit einer zeitlichen IL-1 Stimulation. In grau dargestellt sind die jeweiligen Summen aus konstitutiver sowie IL-1 induzierter Phosphorylierung.

Ähnlich dem Verhalten im nicht stimulierten Zustand konnte keine IL-1 induzierte Phosphorylierung im Bereich der Aminosäuren 112-390 festgestellt werden (nicht gezeigt). Dafür sprechen auch die Resultate von Bartels und Mitarbeitern, die zeigen, dass die Interaktion zwischen NRF und p65 NFκB stimulationsunabhängig ist [Bartels, 2006].

3.4.2 Vergleich der IL-1 induzierten Phosphorylierung durch Kernlysate aus HEK-293R1-Zellen

In HeLa-Zellen erreicht JNK eine maximale Aktivität nach 15 Minuten Stimulation [Krause *et al.*, 1998]. Weiterhin konnten Suzuki *et al.* in rheumatoiden synovialen Fibroblasten eine IL-1β bzw. TNFα abhängige Induktion der p38 MAPK Aktivität mit einer maximalen Aktivierung nach 30 Minuten zeigen [Suzuki *et al.*, 2000]. In neutrophilen Zellen wiederum konnte eine gezielte Aktivierung der p38 MAPK nach 10 Minuten, jedoch nicht eine Aktivierung von JNK nachgewiesen werden [Suzuki *et al.*, 2001]. Dies zeigt die Zellspezifität der Signalprozesse trotz

des gemeinsamen Vorkommens der beteiligten Komponenten. Sollte es sich bei der beobachteten induzierten Phosphorylierung um eine durch MAPK (z.B. JNK, p38 MAPK) verursachte Modifikation handeln, so könnten für HeLa-Zellen spezifische Faktoren die Phosphorylierung von NRF beeinflusst und für eine von den Kernproteinen und Jun abweichendes Phosphorylierungsprofil bewirkt haben. Dies könnte ebenfalls das von den Erwartungen abweichende Ergebnis der Phosphorylierung durch Kernlysate aus HEK-293R1 Zellen erklären (siehe Abschnitt 2.3.4). Hier hätte, bedingt durch die Überexpression des IL-1 Rezeptors, ein deutlicher Anstieg der Phosphorylierung beobachtet werden sollen. Im Gegensatz zu der gut dokumentierten Phosphorylierung von Jun (**Abb. 2.31**) durch JNK wurde eine im Vergleich zu HeLa-Zellen schwächere und zeitverzögerte Phosphorylierung von NRF1-449 beobachtet (**Abb. 2.33**), was für die Anwesenheit weiterer modulierender Proteine bzw. deren differenzielle Regulation spricht. Es wäre ferner ebenfalls möglich, dass die Phosphorylierung von NRF nicht durch JNK oder p38 MAPK selbst, sondern durch von diesen aktivierte Kinasen geschieht. So aktiviert p38 MAPK zytokinabhängig beispielsweise die MAPK aktivierte Proteinkinase 2 (MK2) [Clifton *et al.*, 1996], aber auch die Mitogen- und Stress aktivierte Proteinkinase 1 (MSK1) [Deak *et al.*, 1998].

3.4.3 Phosphoaminosäureanalyse von NRF1-449 nach IL-1 Stimulation

Eine Phosphoaminosäureanalyse der IL-1 abhängigen Phosphorylierung von NRF1-449 durch HeLa Kernlysate zeigte, dass an der Regulation der Phosphorylierung sowohl Serin- als auch Threoninreste beteiligt sind, wobei für die induzierte Phosphorylierung nach 30 Minuten IL-1 Stimulation hauptsächlich die Serinphosphorylierung eine Rolle spielt (siehe Abschnitt 2.3.3.2, **Abb. 2.20**). Der erhöhte Anteil an Phosphothreonin nach einer Stunde Stimulation könnte auf ein graduelles „Umschalten“ von NRF während der transkriptionellen Regulation hindeuten. Dies könnte für die Interaktion von NRF mit anderen Transkriptionsfaktoren wichtig sein und auf diese Weise einen Erklärungsansatz für seine duale Funktion bieten. Insgesamt zeigte die Analyse, dass NRF sowohl im nicht stimulierten als auch nach Stimulation durch Serin-/Threoninkinasen phosphoryliert wird. Vertreter der MAPK-Familie könnten somit potenzielle Aktivatoren von NRF darstellen. Dieser Aspekt wurde ebenfalls überprüft und wird in **3.6** noch diskutiert werden.

Eine wesentliche Schwierigkeit in der Interpretation der Phosphorylierungsänderung nach Stimulation stellt die Tatsache dar, dass aufgrund der verwendeten Enzymquelle die beobachtete Substratphosphorylierung stets die Summe aller potenziellen Phosphorylierungen darstellt. Mögliche synchron auftretende, gegenläufig regulierte Modifikationen sowie Schwankungen in der enzymatischen Aktivität könnten die Detektion von stimulationsbedingten Unterschieden nivellieren. Aus diesen Gründen und um Hinweise auf die möglichen

modifizierten Aminosäuren zu erhalten, wurde eine Phosphopeptidkartierung (*phosphopeptide mapping*) durchgeführt (siehe Abschnitt 2.5)

3.4.4 Phosphopeptidkartierung von NRF

3.4.4.1 Etablierung der Phosphopeptidkartierung

Die Phosphopeptidkartierung wird nach wie vor zur Aufklärung der Proteinphosphorylierung *in vitro* [Thuille *et al.*, 2005] und *in vivo* [Firulli *et al.*, 2004] sowie unter dem Einfluss stimulierender Faktoren [Joyal *et al.*, 1996; Carter *et al.*, 2003] erfolgreich eingesetzt. Für den Verdau mittels Trypsin wurde das *in vitro* phosphorylierte NRF zunächst, nach Luo *et al.*, elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert [Luo *et al.*, 1991]. Dies ermöglichte eine effiziente Proteolyse mit sehr guten Ausbeuten (>90%) an eluierten Peptiden (nicht gezeigt). Eine spätere Überladung der Zellulosematrix durch verschlepptes Trägerprotein konnte so vermieden werden [Luo *et al.*, 1990]. Der Verdau mittels Trypsin erzeugt in Bezug auf ihre Auftrennbarkeit durch Dünnschichtelektrophorese und Chromatographie Peptide von geeigneter mittlerer Größe. Zudem erfolgt die Spaltung sehr spezifisch C-terminal an basischen Aminosäuren (Arginin, Lysin) [Olsen *et al.*, 2004].

3.4.4.2 Phosphopeptidkartierung von NRF1-112

Im Fall von NRF1-112 waren die Muster der Phosphopeptide vor und nach IL-1 Stimulation mit Ausnahme des nach Stimulation zusätzlich detektierten Peptids IX identisch (**Abb. 2.41**). Dieses Peptid wurde in diagonalen Position zu Peptid VIII derart lokalisiert, dass die Vermutung bestand, es könne sich um Phosphoisomere desselben Peptids handeln [van der Geer & Hunter, 1994]. Eine Betrachtung aller theoretischen tryptischen Fragmente zeigte, dass in mindestens drei Peptiden (A, B und C) mehrere phosphorylierbare Aminosäuren vorlagen, in zweien davon sowohl Serine als auch Threonine (**Tab. 3.1**). Die hohe Steigung der Diagonalen würde dabei auf ein verhältnismäßig geringes Ladung/Masse Verhältnis hindeuten, was für das Peptid C spräche. Alternativ wäre es ebenso denkbar, dass es sich bei den Peptiden VIII und IX um andere bzw. nicht um verwandte Peptide (z.B. Phosphoisomere) handelt. Während der chromatographischen Auftrennung stellte sich heraus, dass die Verwendung eines Isobutansäure enthaltenden Puffers [Scheidtmann *et al.*, 1982] die beste Auflösung produzierte (nicht gezeigt). Dies spricht zum einen für die polaren, hydrophilen Eigenschaften der entsprechenden Peptide [Scheidtmann *et al.*, 1982], wie es für das Peptid C (**Tab. 3.1**) zutrifft. Zum anderen könnte ein verhältnismäßig hoher Anteil an Histidin und Prolin (Peptid A) diese Mobilitätssteigerung bewirkt haben [Boyle *et al.*, 1991]. Die Quantifizierung von acht (bzw. neun)

repräsentativen Peptiden (I-VIII (IX)) erfolgte densitometrisch und konnte zeigen, dass deren Intensität nach IL-1 Stimulation mehrheitlich zunahm (**Abb. 2.42**). Insgesamt ermöglichte die Phosphopeptidkartierung es zu demonstrieren, dass NRF im Bereich von 1-112 nach IL-1 Stimulation zusätzlich phosphoryliert wird.

Peptid	Position	Sequenz (N C)
A	33-44	HLSTCDGQNP <u>PK</u>
B	57-68	FEPVHFV <u>ASSK</u>
C	95-112	DIYQDY <u>TQDSFSIQDGNS</u>
D	125-170	DQPVTANMYFD <u>SGNPAPSTTSQQANSQSTPEPSPSQTFPESVVAEK</u>
E	421-435	<u>SSQCHT</u> GSSPRG <u>SGK</u>
E'	421-436	<u>SSQCHT</u> GSSPRG <u>SGKK</u>
E''	421-437	<u>SSQCHT</u> GSSPRG <u>SGKKK</u>

Tab. 3.1 Mögliche Zielpeptide einer Mehrfachphosphorylierung an Serin- und Threoninresten in NRF1-112 Und NRF112-449

Die entsprechenden Phosphorylierungsstellen sind jeweils unterstrichen. Anfangs- und Endaminosäuren aller Peptide entsprechen jeweils der Position im vollständigen Protein

3.4.4.3 Phosphopeptidkartierung von NRF112-449

In Abschnitt 2.3.3.5 wurde ein weiterer Bereich von NRF (390-486) als Ziel sowohl konstitutiv aktiver als auch IL-1 aktivierter Kinasen identifiziert (**Abb. 2.26**). Da partielle Abbauprodukte die Isolation von NRF390-486 für eine weitere Aufarbeitung erschwerten, wurde die Phosphopeptidkartierung mit dem N-terminal längeren NRF112-449 durchgeführt (Abschnitt 2.5.2). Diese produzierte u.a. drei prominente Phosphopeptide (IV-VI), die derart in diagonalen Anordnung zueinander lokalisiert waren (**Abb. 2.45**), dass es sich um partiell verdaute Peptide handeln könnte. Eine Suche nach Sequenzstrukturen innerhalb NRF112-449, die aufeinander folgende Arginine bzw. Lysine aufweisen, führte zu dem Bereich von 421-437. Dieser enthält tatsächlich in Folge drei C-terminale Lysine (K435/436/437) sowie ein internes Arginin (R431). Aufgrund ihres Laufverhaltens [van der Geer & Hunter, 1994] wurden angenommen, dass die interne Spaltstelle aufgrund des benachbarten Prolins bzw. einer möglichen Phosphorylierung an S433 nicht oder nur unvollständig geschnitten wurde (**Tab. 3.2**, Peptide E, E' und E'') [Boyle *et al.*, 1991]. Hinweise auf eine Phosphorylierung an S433 konnten durch *in vitro* Mutagenese mit anschließender Phosphorylierung nicht gefunden werden (nicht gezeigt). Eine Bekräftigung der Annahme resultierte aus der Detektion der Peptide IV-VI, die als Oxidationsvarianten gedeutet wurden und entsprechend während der Chromatographie versetzt laufen (**Abb. 2.45**)

[van der Geer & Hunter, 1994]. Die densitometrische Quantifizierung schien dies mit einem den Peptiden I-III ähnlichen Intensitätenverhältnis zu bestätigen (**Abb. 2.46**).

Bei allen genannten Peptiden fiel auf, dass sie sowohl im basalen als auch im IL-1 stimulierten Zustand auftraten (**Abb. 2.45**). Darüber hinaus wurden weitere Peptide (z.B. VII, VIII) ebenfalls unter nicht stimulierten sowie nach IL-1 Stimulation detektiert, die eine vergleichsweise hohe chromatographische Mobilität zeigten (**Abb. 2.45**). Bei Betrachtung der Aminosäuresequenz von NRF112-449 wird deutlich, dass mit Ausnahme der möglichen Peptide 380-394, 396-398 sowie 412-420 im Bereich von 390-449 (Abschnitte 3.3 und 3.4.1) keine weiteren Serin bzw. Threonin enthaltenden Peptide existieren. Folglich wäre es sehr wohl möglich, dass in der Kartierung detektierte Peptide aus dem komplementären N-Terminus (112-389) stammen. **Tab. 3.1** zeigt beispielhaft das tryptische Peptid D (AS 125-170), das mit einem vergleichsweise hohen Prolin/Histidin-Anteil (ca. 15%) eine hohe chromatographische Mobilität aufweisen sollte. In der Tat verfügt dieses Peptid über mehrere potenzielle Phosphorylierungsstellen, von denen exemplarisch T153 untersucht wurde (Abschnitt 3.5).

Die bisher diskutierten Beobachtungen (**Abb. 2.7**, siehe die Abschnitte 3.3 und 3.4.1) schlossen eine Phosphorylierung dieses Bereiches aus. Eine intrinsische Fehlfaltung bzw. Fehlordnung des Proteins, im Besonderen am N- bzw. C-Terminus, könnte seine Stabilität beeinflussen [Linding *et al.*, 2003 a]. Dies könnte die Phosphorylierung beeinträchtigt und zu einem falsch negativen Ergebnis geführt haben. Möglicherweise stabilisiert in diesem Fall die C-terminale Verlängerung (390-449) die Struktur, so dass dem N-Terminus nähere Aminosäuren zugänglich werden. Die entgegen seiner größeren Masse höheren Ausbeuten und das Reinigungsverhalten von NRF112-449 gegenüber NRF112-389 (nicht gezeigt) würden diese Vermutung bestärken. Alternativ wäre es denkbar, dass der Bereich von 390-449 Kinase spezifische Bindungsmotive enthält, die erst eine korrekte und effiziente Phosphorylierung ermöglichen [Biondi & Nebreda, 2003]. Auf diesen Aspekt wird in Abschnitt 3.4.4 noch näher eingegangen werden. Insgesamt verdeutlichte der Einsatz der Phosphopeptidkartierung deren Leistungsfähigkeit für eine höhere Auflösung der Phosphorylierungsereignisse und die Bedeutung für deren Interpretation. Dies umso mehr, als die Art der verwendeten Kinaseaktivität stimulationsbedingte Unterschiede nivellieren kann.

3.4.5 Phosphorylierung von NRF-1-449 und NRF390-486 nach Stimulation durch NDV

Neben Zytokinen und bakteriellen Zellwandkomponenten (z.B. Lipopolysaccharid) vermögen auch Viren eine unspezifische Immunantwort auszulösen [Mukaida, 2000]. Die wesentliche, durch Viren induzierte Gruppe von Zielgenen stellt neben dem Chemokin IL-8 [Murayama *et al.*, 1997; Wagoner *et al.*, 2007] die der Interferone (IFN, z.B. IFN- α , - β) [Garoufalidis *et al.*, 1994] dar,

die aktiv antivirale Prozesse einleiten [Sen, 2001]. Eine Infektion durch Viren führt zur Aktivierung von Kinasewegen und resultiert in der Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, z.B. dem Interferon regulierenden Faktor (IRF-) 3 [Servant *et al.*, 2002] und IRF-5 [Barnes *et al.*, 2002]. NRF bindet an Zielstrukturen innerhalb der Promotoren dieser Gene [Nourbakhsh *et al.*, 1993] und reprimiert im basalen Zustand die Transkription [Nourbakhsh & Hauser, 1999; Nourbakhsh *et al.*, 2001]. Im Gegensatz zur Induktion von IL-8 durch IL-1 bewirkt NRF keine Koaktivierung am Promotor [Nourbakhsh & Hauser, 1999]. Eine virale Infektion bewirkte eine Dephosphorylierung von NRF *in vivo* [Niedick, 2000].

Aus der unterschiedlichen Funktion von NRF an den jeweiligen Zielpromotoren resultierte die Frage nach einer von der IL-1 Stimulation abweichenden Phosphorylierung. Wie vermutet wurde, zeigten die Experimente tatsächlich ein unterschiedliches Phosphorylierungsverhalten nach Virusinfektion (Abschnitt 2.4). Zwar bewirkte die Stimulation mit Virus zunächst einen Rückgang der Phosphorylierung von NRF im Bereich von 1-449. Dieser war im Vergleich zur IL-1 Stimulation jedoch zeitverzögert, gleichzeitig konnte eine nachfolgende Induktion nicht beobachtet werden (**Abb. 2.37**). Im Gegenteil blieb die Phosphorylierung unter dem basalen Niveau zurück (**Abb. 2.38**). Dies korrelierte mit dem Verhalten des Aminosäurebereichs von 390-486, der bereits in Abhängigkeit einer IL-1 Stimulation als Ziel aktivierter Kinasen charakterisiert worden war (siehe Abschnitt 2.3.3.5). Hier wurde gezeigt, dass eine virale Stimulation ebenfalls eine Phosphorylierung induzieren konnte (**Abb. 2.39**). Diese wurde im Vergleich zur Induktion durch IL-1 mit einem Maximum nach 15 Minuten zeitlich früher beobachtet (**Abb. 2.40**). Damit konnte ein einzelner Abschnitt von NRF (390-486) als Zielstruktur zweier unterschiedlicher zellaktivierender Prozesse identifiziert werden. Ob dabei auch jeweils identische Aminosäuren modifiziert werden, bleibt noch ungeklärt. Bemerkenswert im Zusammenhang mit der Kinetik der beteiligten Signalwege ist deren Schnelligkeit, die sogar die der Zytokin aktivierten Kinasekaskaden zu übertreffen schien (vgl. Abschnitt 2.3.3). Das Newcastle-Disease-Virus gehört zu den Paramyxoviren. Diese Virusfamilie besitzt ein umhülltes Kapsid und eine einzelsträngige negativ polarisierte RNA ((-)ssRNA) [Nagai *et al.*, 1989]. Wie Lund *et al.* zeigen konnten, wird diese durch den Toll-ähnlichen Rezeptor 7 (TLR-7) in Zellen erkannt [Lund *et al.*, 2004]. Diesem und ähnlichen Signalwegen ist jedoch gemeinsam, dass die Modifikation und die damit einhergehende Aktivierung der Transkriptionsfaktoren aufgrund der Abhängigkeit von viraler Replikation bzw. der Detektion viraler Proteine um bis zu mehrere Stunden zeitverzögert ist [Smith *et al.*, 2001; Nociari *et al.*, 2007].

Die an NRF beobachteten Modifikationen müssen folglich davon unabhängig reguliert sein. Interessanterweise konnten Zeng *et al.* zeigen, dass bereits ein Kontakt der Außenhülle von NDV mit Sialinsäure präsentierenden Zellrezeptoren IFN- α induziert [Zeng *et al.*, 2002a]. Dieser

Effekt ist spezifisch für das Glykoprotein Hämagglutinin-Neuraminidase (HN) [Zeng *et al.*, 2002b], welches als Rezeptor fungiert und an der Virus-Zellmembran-Fusion essentiell beteiligt ist [Ferreira *et al.*, 2004; Lamb *et al.*, 2006]. Ähnliches konnte an murinen Milzzellen für das Influenzavirus [Miller & Anders, 2003] sowie das Sendai Virus (SV) [Ito & Hosaka, 1983] gezeigt werden. Ferner wurde berichtet, dass NDV in Astrozyten in einer frühen Phase (<10 Minuten) Tyrosinkinasen aktiviert [Fisher *et al.*, 1994]. Eine Aktivierung der Kinaseaktivität konnte anhand der induzierten Phosphorylierung von Kernproteinen in dieser Arbeit ebenfalls beobachtet werden (**Abb. 2.35**). Eine Infektion mit Adenoviren aktiviert innerhalb von 30 Minuten die Kinasen PKA sowie die Signalwege der p38 MAPK [Suomalainen *et al.*, 2001] und den Raf-Erk Signalweg [Bruder & Kovetski, 1997]. Letzterer resultiert durch Phosphorylierung und der damit verbundenen Aktivierung der MAP-Kinase Erk in der IL-8 Genexpression [Alcorn *et al.*, 2001; Booth *et al.*, 2004]. Möglicherweise ist NRF in einer ähnlichen Weise in diese Signalkaskaden und damit verbundene Frühreaktionen der Zelle auf eine virale Infektion involviert. Eine Beteiligung der MAPK Erk wäre in diesem Fall nicht unwahrscheinlich, zumal der induziert phosphorylierte Bereich von 390-486 mit Serin 429 über eine potenzielle Phosphorylierungsstelle von MAPK verfügt. Der im Gegensatz zur IL-1 Stimulation fehlende Wideranstieg der Phosphorylierung könnte das unterschiedliche Verhalten von NRF an den jeweiligen Promotoren erklären.

3.5 Untersuchung der vorhergesagten Phosphorylierungsstellen in den NRF-Mutanten STA, Mu1 und delta1

3.5.1 Ergebnisse der *in silico* Vorhersagen

Die Verwendung von Vorhersagealgorithmen zur Aufklärung der Phosphorylierung von Proteinen hat sich als unterstützende Methode zu den herkömmlichen experimentellen Verfahren etabliert [Hjerrild *et al.*, 2004; Kobe *et al.*, 2005]. In dieser Arbeit wurden sechs Programme zur Vorhersage potenzieller Phosphorylierungsstellen in NRF verwendet (siehe Abschnitt 2.6.1). Wie gezeigt wurde, ergab die Vorhersage für das vollständige NRF sechs prominente Kandidaten, von denen drei – S35, T36 und S106 – innerhalb der aktiven Repressionsdomäne (ARD, 1-296) und weitere drei – S422, S428 und S429 – in dem neu charakterisierten Bereich (390-449) liegen. T153, das sich ebenfalls innerhalb der ARD befindet (**Tab. 2.1**), wurde später mittels Immunfärbung *in vivo* als Phosphorylierungsstelle (basal und IL-1 stimuliert) ausgeschlossen (nicht gezeigt). NRF1-112 und NRF112-449 wurden als Ziele sowohl basaler als auch IL-1 induzierter Phosphorylierung identifiziert (Abschnitte 2.2.3 und

2.3.3) und mittels Phosphopeptidkartierung weiter charakterisiert (Abschnitt 2.5 ff.). Trotz einiger Abweichungen in den einzelnen Vorhersagen zeichneten sich in Bezug auf die modifizierenden Kinasefamilien Übereinstimmungen ab (**Tab 2.1**). So deutete Serin 429 durch ein S/T-P Motiv auf mögliche Ziele Prolin gerichteter Kinasen (ProDK), wie MAPK (z.B. p38 MAPK, SAPK/JNK) bzw. Cyclin abhängige Kinasen hin. Die erste Gruppe nimmt bekanntlich in der Zytokin und Stress vermittelten Genexpression eine wesentliche Rolle ein [Karin *et al.*, 1998], wobei p38 MAPK weitere untergeordnete Kinasen aktivieren kann. So wurde gezeigt, dass die Mitogen und Stress aktivierte Kinase (MSK-) 1 unter dem Einfluss von TNF- α bzw. IL-1 β die NF- κ B und CREB abhängige Genexpression zusätzlich aktiviert [Vermeulen *et al.*, 2003; Gustin *et al.*, 2004; Schiller *et al.*, 2006]. Serin 35 und Threonin 36 wurden als potenzielle Ziele dieser Kinasegruppe (S6K) vorhergesagt (**Tab 2.1**). Die zweite Gruppe der ProDK bilden die Cyclin abhängigen Kinasen (CDK). Hier kommt CDK9 (PTEFb), eine generelle Bedeutung in der Regulation der RNA-Polymerase II vermittelten Transkription zu [Barboric *et al.*, 2001; Luecke & Yamamoto, 2005; Yamada *et al.*, 2006;], während CDK7 vermutlich duale Funktionen im Zellzyklus und der Transkriptionskontrolle ausübt [Fisher, 2005]. Die Zellzyklus unabhängige CDK5 beeinflusst die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und die Remodulation des Zellchromatins [Fu *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004]. Für CDK2 konnte ein IL-1 induzierte proinflammatorische Funktion gezeigt werden [Mukhopadhyay *et al.*, 2006]. GSK-3 (S422, S428, S429) phosphoryliert im nicht stimulierten Zustand p65 [Buss *et al.*, 2004]. Die doppelte Vorhersage für S429 könnte auf eine mögliche Integration sowohl reprimierender als auch aktivierender Signale in einer Modifikation hindeuten. Eine weitere Modifikation wurde für Serin 106 die Caseinkinasen CK1 bzw. CK2 vorhergesagt. Chanome *et al.* konnten zeigen, dass letztere durch Phosphorylierung von p65 NF κ B die IL-1 induzierte Transkription von *iNOS* verstärkt [Chantome *et al.*, 2004], dessen Promotor im basalen Zustand durch NRF reprimiert wird [Feng *et al.*, 2002].

3.5.2 Untersuchung der Alaninmutanten STA und Mu1 sowie der Deletionsmutante delta1

In den Experimenten wurde vor allem deutlich, dass die Mutation einzelner Aminosäuren einen vergleichsweise geringen Effekt verursachte. Dies kann zum einen dadurch erklärt werden, dass der Einfluss einzelner Kinasen vor dem Hintergrund der Gesamtphosphorylierung nivelliert wird. Ferner kann die Aktivität von Kinasen sich *in vitro* anders, z.B. geringer, sein als innerhalb der Zelle. Darüber hinaus kann sie von zusätzlichen Kofaktoren sowie von dem verwendeten Testsystem abhängig sein. Einzig die Deletion der Aminosäuren 421-429 führte zu einer relativ ausgeprägten Reduktion, was darauf hindeuten könnte, dass dieser Bereich tatsächlich das Ziel verschiedener Kinasen ist, die eine bzw. mehrere Aminosäuren modifizieren. Hinweise darauf lieferten Olsen *et al.*, die in einer Untersuchung des EGF induzierten Phosphoproteoms in HeLa-

Zellen ein Peptid der NRF-Sequenz (421-429) fanden. Dieses war jeweils unabhängig einzeln an S421, S422, T426 sowie S429 phosphoryliert [Gnad *et al.*, 2007; Olsen *et al.*, 2006]. EGF kann ebenfalls in geringerem Maß Erk-abhängig IL-8 induzieren [Holtmann *et al.*, 1999].

Hier zeigte die Beobachtung durch *DISPHOS*, dass die umgebende Sequenz einer potenziellen Phosphorylierungsstelle in diversen Parametern denen intrinsisch fehlgeordneter Regionen in Proteinen sehr ähnlich ist. Entsprechend häufig tritt sie in Proteinen auf, die an Prozessen der Signalübertragung beteiligt sind [Dunker *et al.*, 2002; Iakoucheva *et al.*, 2002; Linding *et al.*, 2003a]. Für alle untersuchten und positiv befundenen Phosphorylierungsstellen in NRF wurden derart fehlgeordnete Bereiche vorhergesagt (**Abb. 2.47**). Diese Regionen sind ebenfalls häufig an der Interaktion des Proteins mit anderen Proteinen, Nukleinsäuren sowie anderen Liganden beteiligt [Dunker *et al.*, 2002; Iakoucheva *et al.*, 2002]. Dies wirft weitere Fragen über die Bedeutung dieser Bereiche für die Funktion von NRF auf. Dieser Aspekt wird in Abschnitt 3.8 noch im Detail diskutiert. Insgesamt wurde gezeigt, dass die Kombination aus Vorhersagen zusammen mit *in-vitro*-Mutagenese ein erfolgreicher Ansatz zur Aufklärung der Proteinphosphorylierung sein kann. Ein nächster Schritt könnte die Erzeugung phosphospezifischer Antikörper sein, die eine distinkte Untersuchung der einzelnen Phosphorylierungsstellen und deren Kinetiken ermöglichen [Czernik *et al.*, 1991].

3.6 Reduktion der IL-1 induzierten Phosphorylierung durch den JNK-Inhibitor SP600125

Die IL-1 Stimulation von HeLa-Zellen führte zur Phosphorylierung von NRF1-112 und NRF390-486 bzw. 1-449 *in vitro* (Abschnitt 2.3.3). In den Abschnitten 3.4 und 3.5 wurde bereits auf die potenzielle Rolle der MAPK-Signalwege eingegangen. Die Zugabe von Inhibitoren der MAPK-Familie [English & Cobb, 2002] zeigte, dass selektiv der JNK-Inhibitor die IL-1 abhängige Phosphorylierung von NRF *in vitro* reduzierte (**Abb. 2.52**). Als bemerkenswert erwies sich dabei, dass diese Reduktion allein nach 30 Minuten Stimulation durch IL-1, nicht aber bereits nach 15 Minuten zu beobachten war. Somit wurde NRF gegenüber dem messbaren Aktivitätsmaximum von JNK (gemessen an Jun, **Abb. 2.15**) zeitverzögert phosphoryliert. Dies ist insofern interessant, als es die Frage aufwirft, ob *in vivo* ebenfalls eine sequentielle Phosphorylierung von Jun (AP-1) und NRF als Bestandteilen des Transkriptionskomplexes auftritt und so die koaktivierende Funktion von NRF bestimmt. MAPK sind als strukturelle Adaptoren in den Aufbau der Transkriptionskomplexe eingebunden [Edmunds & Mahadevan, 2004] und werden u.a. durch Proteinkomplex bildende Gerüstproteine (*scaffold proteins*) in der Spezifität ihrer Aktivierung reguliert [Yasuda *et al.*, 1999; Kelkar *et al.*, 2000; Mooney & Whitmarsh, 2004]. Es

ist vorstellbar, dass diese auch während der Aktivierung am Promotor sequentiell Proteinkomplexe mit unterschiedlichen Substraten bilden [Davis, 2000].

JNK und andere MAPK phosphorylieren ein minimales Konsensusmotiv (S/T-P) in ihren Substraten, benötigen jedoch Bindungsdomänen, die für die Spezifität sowie die Effizienz der Phosphorylierung sorgen [Fantz *et al.*, 2001; Barsyte-Lovejoy *et al.*, 2002; Bardwell, 2006]. Sequenzunterschiede in diesen Motiven können für die Interaktion mit unterschiedlichen Kinaseisoformen dienen und so ebenfalls für eine differentielle Kinetik verantwortlich sein [Gupta *et al.*, 1996; Bogoyevitch & Kobe, 2006]. SP600125 inhibiert die Isoformen JNK1-3 [Bennet *et al.*, 2001]. Die Datenbank ELM [Punternvoll *et al.*, 2003] sagte mehrere potenzielle MAPK-Bindungsmotive für NRF voraus, von denen eines sich unmittelbar C-terminal an den phosphorylierten Bereich von 421-433 anschloss. Eine Deletion dieses Bereiches verursachte jedoch keine Reduktion der Phosphorylierung (nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass es sich dabei nicht um ein Bindungsmotiv handelt oder dass andere Motive für eine mögliche Interaktion verantwortlich sind [Galanis *et al.*, 2001]. Denkbar wäre auch, dass NRF als Bindungsplattform für JNK dient, um Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren, denen entsprechende Interaktionsdomänen fehlen [Kallunki *et al.*, 1996].

3.7 *In vivo* Phosphorylierung von NRF

3.7.1 Radioaktive Markierung von NRF-Strep

Obwohl erwartet wurde, dass NRF *in vivo* im nicht stimulierten Zustand besonders stark phosphoryliert vorliegt, konnte kein radioaktiv markiertes NRF detektiert werden. Wie die Experimente zeigten (**Abb. 2.54A**), war die Markierung des zellulären ATP durch Aufnahme von ³²P-Orthophosphat jedoch ausreichend, um zelluläre Proteine weitgehend radioaktiv zu modifizieren [Avruch *et al.*, 1978; Garrison & Wagner, 1982]. Radioaktiv markierte endogene Proteine im MW-Bereich von NRF-Strep erschwerten auch die Detektion (**Abb. 2.54 C**). Die Konzentration an überexprimiertem NRF-Strep im Vergleich zur Konzentration endogener Proteine lässt sich trotz Immunfärbung schlecht abschätzen. Man kann jedoch schlussfolgern, dass im Fall einer relativ hohen Konzentration an NRF-Strep, seine *in vivo* Phosphorylierung mit einer geringen Stöchiometrie oder einem geringen Umsatz (*turn-over*) einhergeht. Aufgrund des im Vergleich zu den Resultaten hohen experimentellen Aufwands wurde diese Methode daher nicht weiter verfolgt.

3.7.2 Massenspektrometrische Analyse von NRF-Strep

Die Aufreinigung von NRF-Strep aus HeLa-Zellen war erfolgreich, und das Protein konnte durch MS eindeutig identifiziert werden. Es wurden jedoch keine Phosphorylierungen detektiert, obwohl das Protein in großer Menge vorlag. Niedrige Stöchiometrie der Phosphorylierung kann in dieser Methode ebenfalls eine Schwierigkeit darstellen. Eine weitere wesentliche Schwierigkeit stellt die Unterdrückung der Ionisation phosphorylierter Peptide in Gegenwart nicht phosphorylierter Spezies bzw. ihre eigene schwächere Ionisierbarkeit dar, was zur Herabsetzung der Nachweisgrenze führt [Mann *et al.*, 2002]. Dies kann durch selektive Anreicherung der Phosphopeptide mittels diverser ionischer Chromatographietechniken wie z.B. SCX (Starke Kationenaustauschermatrix) [Washburn *et al.*, 2001; Beausoleil *et al.*, 2004] kompensiert werden. Dieser Ansatz ist auch für die Analyse auf der Proteomebene geeignet. [Olsen *et al.*, 2006] (siehe 3.5).

3.8 Die Phosphorylierung von NRF im zellulären Zusammenhang – ein Modell

In der bisherigen Diskussion wurde deutlich, dass die basale Phosphorylierung von NRF unter dem Einfluss zellulärer Stimulation durch Zytokine bzw. einer viralen Infektion *in vitro* jeweils spezifischen Änderungen unterworfen ist, die auf die Involvierung unterschiedlicher Signalwege hindeuten. Dies bietet Erklärungsansätze für das jeweils unterschiedliche Verhalten von NRF an den entsprechenden Promotoren [Nourbakhsh & Hauser, 1999; Nourbakhsh *et al.*, 2001]. Die beobachtete Reinduktion der Phosphorylierung (**Abb. 2.17**), die synchron mit der in der Literatur beschriebenen maximalen Aktivierung von NF κ B ist [Griffin & Moynagh, 2006], könnte mit seiner koaktivierenden Funktion in der IL-8 Genexpression assoziiert sein [Nourbakhsh *et al.*, 2001]. Damit korreliert die Beobachtung, dass NRF sehr wahrscheinlich durch die Zytokin aktivierte Kinase JNK zu diesem Zeitpunkt phosphoryliert wird (**Abb. 2.52**), was bereits durch Nourbakhsh *et al.* vorgeschlagen wurde [Nourbakhsh *et al.*, 2001].

Weitere Untersuchungen hatten gezeigt, dass speziell zwei Bereiche in NRF Ziele der IL-1 induzierten Phosphorylierung sind: zum einen die ARD (S35/T36 und S106), die auch die Interaktion an die Rel-Homologiedomäne (RHD) von p65 NF κ B vermittelt und die sowohl im reprimierten als auch im aktivierten Zustand essentiell ist [Bartels, 2006]. Als weiterer Bereich wurden durch *in-vitro*-Mutagenese sowie Phosphopeptidkartierung die Aminosäuren 421-429 identifiziert, die das Ziel sowohl basal als auch IL-1 aktivierter Kinasen sind (**Abb. 2.45, Abb. 2.54**). Bemerkenswerterweise scheint der gesamte C-terminale Bereich von NRF jedoch für die transkriptionelle Regulation nicht notwendig zu sein [Nourbakhsh & Hauser, 1999; Nourbakhsh *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 2002]. Das impliziert, dass dort auftretende Modifikationen und die

Funktionen von NRF voneinander unabhängig sind. Der C-Terminus wurde erstmals durch Niedick *et al.* charakterisiert, die eine Beteiligung an der nukleolaren Lokalisierung sowie der Assoziation an DNA sowie dsRNA feststellten. Dabei erwies sich anhand von Deletionsexperimenten ein Bereich als besonders wesentlich, der die Aminosäuren 421-429 mit einschließt [Niedick *et al.*, 2004]. Eine Deletion dieser Aminosäuren führte jedoch zu keiner Änderung der zellulären Lokalisation, was mit den Vermutungen korreliert, dass mehrere Bereiche des C-Terminus kooperieren [Niedick *et al.*, 2004]. *In vitro* konnte in dieser Arbeit eine basale sowie IL-1 induzierte Phosphorylierung für NRF447-690 gezeigt werden (**Abb. 2.28**, **Abb. 2.29**).

Modifikationssensitive Aminosäuren sind zumeist an zugänglichen schlaufenartigen Strukturen zwischen Domänen lokalisiert und weisen häufig keine geordnete Sekundärstruktur auf [Iakoucheva *et al.*, 2004]. Gleichzeitig können diese aufgrund ihrer Plastizität als variable Kontaktplattformen mit anderen Proteinen fungieren [Dunker *et al.*, 2002; Linding *et al.*, 2003a]. Analog zu den SH2- und SH3-Domänen als Phosphotyrosin bindende Domänen existieren diverse Adaptoren, die phosphoryliertes Serin bzw. Threonin innerhalb eines bestimmten Motivs erkennen und binden. Eingegangen werden soll an dieser Stelle allein auf WW-Domänen und die Familie der 14-3-3 Proteine. Letztere spielen eine bedeutende Rolle in diversen zellulären Funktionen wie Zellzyklus, subzellulärer Lokalisation, Proteinaktivität und –interaktion [Fu *et al.*, 2000; Sekimoto *et al.*, 2004; Mhawech, 2005] sowie in der Entstehung von Krebs [Hermeking, 2003]. Interessant in Zusammenhang mit Zytokin induzierten Genexpression ist ein Bericht von Aguilera *et al.*, dass die Bindung von 14-3-3 Proteinen an die RHD von p65 notwendig für den effektiven Reexport aus dem Zellkern sei [Aguilera *et al.*, 2006] (**Abb. 3.2**). Da NRF an dieselbe Domäne bindet [Bartels, 2006], entstand die Überlegung, dass dadurch ebenfalls eine Interaktion zwischen NRF und 14-3-3 vermittelt werden könnte und auf die Dynamik von Import und Reexport von p65 Einfluss nimmt. Eine Vorhersage durch ELM [Punternvoll *et al.*, 2003] deutete zudem auf T36 innerhalb der ARD von NRF als potenzielles Ziel hin. Eine durchgeführte Koimmunpräzipitation mit überexprimiertem NRF-Strep in HeLa-Zellen konnte jedoch weder basal noch zytokinabhängig eine spezifische Interaktion nachweisen (nicht gezeigt), so dass eine Beteiligung von NRF an diesem Prozess fraglich bleibt.

WW-Domänen sind distinkte Module innerhalb von Proteinen und dienen der Protein-Protein-Interaktion [Sudol & Hunter, 2000]. Es existieren vier Untergruppen, wobei Gruppe IV phosphorylierungsabhängig die Liganden bindet und damit eine Signal gesteuerte Schalterfunktion innerhalb der Proteinnetzwerke innehat [Lu *et al.*, 1999; Ingham *et al.*, 2005]. Die Motive werden dabei durch ein phosphoryliertes S/T-P Motiv gebildet [Verdecia *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2002]. Ein solches Motiv liegt für S429 innerhalb der NRF-Sequenz vor und

tatsächlich wird durch ELM eine potenzielle Ligandenfunktion für WW(IV)-Domänen vorhergesagt. Wie bereits gezeigt wurde, wird S429 wahrscheinlich IL-1 abhängig phosphoryliert (Abschnitt 2., ferner konnten Olsen *et al.* zeigen, dass diese Aminosäure Ziel EGF aktivierter Kinasen ist [Olsen *et al.*, 2006]. Während dieser Arbeit konnte zusammen mit überexprimiertem NRF-Strep ein Protein koisoliert werden, das mittels MS als humaner Spleißfaktor FBP11 identifiziert wurde (nicht gezeigt). FBP11 ist ähnlich wie NRF in subnukleären Strukturen lokalisiert [Mizutani *et al.*, 2004; Niedick *et al.*, 2004] und bindet wie das orthologe Protein Prp40 aus Hefe sowie der homologe Elongationsfaktor CA150 an die phosphorylierte C-terminale Domäne (CTD) der RNA-Polymerase (RNAP) II [Allen *et al.*, 2002; Morris & Greenleaf, 2000; Carty *et al.*, 2000], wobei die Beteiligung der jeweiligen Domänen kontrovers diskutiert wird [Wiesner *et al.*, 2002; Gasch *et al.*, 2006]. Die CTD der RNAP II ist involviert in die phosphorylierungsabhängige Rekrutierung verschiedener Faktoren der Transkriptionselongation sowie des Spleißens, die auf diese Weise die Funktion der RNAP II beeinflussen und als „mRNA-Fabrik“ eine Verbindung zwischen der Transkription und posttranskriptionellen Prozessen herstellen [Sudol *et al.*, 2001; Bentley, 2002; Khornbliht *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2004].

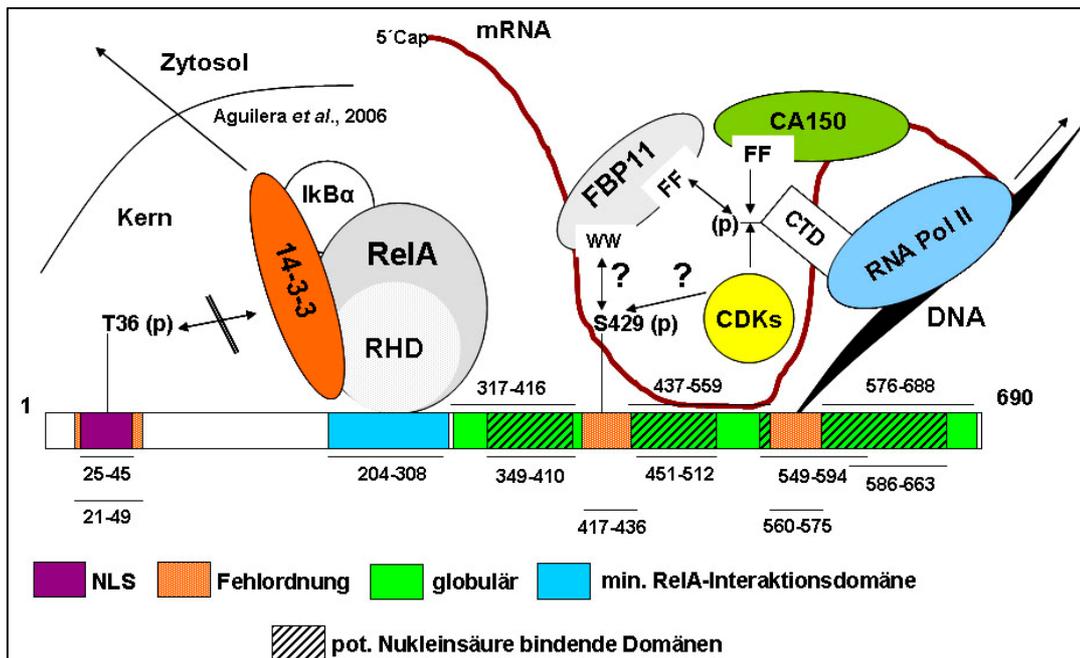


Abb. 3.2 Hypothetisches Modell der Interaktion phosphorylierter Bereiche von NRF mit Proteinen der Transkriptionsmaschinerie

Die Darstellung von NRF erfolgt linear ohne Berücksichtigung potenzieller Sekundär- und Tertiärstrukturen.

Es wäre somit vorstellbar, dass NRF über die neu charakterisierten Phosphorylierungsstellen im Bereich 421-429 (S429) für die stimulationsabhängige Vermittlung einer Interaktion der genannten Faktoten mit der CTD der RNAP II verantwortlich ist oder um eine Bindung konkurriert und auf diese Weise regulierend in verschiedene Phasen der Transkription eingreift (**Abb. 3.2**). Es wurde gezeigt, dass NFκB durch Rekrutierung von P-TEFb (CDK 9) die Phosphorylierung der CTD vermittelt und dadurch die Transkription reguliert [Barboric *et al.*, 2001; Luecke & Yamamoto, 2005]. Ferner konnte gezeigt werden, dass NRF reprimierend auf die Elongation der mRNA, indem er die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren an die CTD beeinflusst, die dafür essentiell sind [Dreikhausen *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2006].

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma
Agarose NEEO Ultra-Qualität Roti-Garose	Carl Roth GmbH & Co.
Ameisensäure (98-100%)	Merck
2'-Amino-3'-methoxyflavon (PD 98059)	Alexis
Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3)	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad
Ampicillin	Sigma
Anthra-[1-9-cd]-pyrazol-6-(2H)-on (SP 600125)	Alexis
Aqua Spüllösung DeltaSelect (steril. Wasser)	DeltaSelect GmbH
Bromphenolblau	Sigma
n-Butanol	Aldrich
Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Sigma
Coomassie Brilliant Blue (CBB)	Serva
Cytidintriphosphat (CTP)	Sigma
D-Desthiobiotin	IBA BioTAGnology
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
N- ϵ -DNP-Lysin·HCl	Sigma
Essigsäure (100%, Eisessig)	J.T. Baker
Ethanol (99%)	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Invitrogen
Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-N, N, N', N'-tetraessigsäure (EGTA)	Fluka
Ficoll	Biochrom AG
4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-	Alexis

pyridyl)-1H-imidazole (SB 203580)	
L-Glutaminsäure (Glutamat)	Gibco
Glutathion	Aldrich
Glycerol	Serva
Glycerol-2-phosphat	Sigma
Glycin	Carl Roth GmbH & Co.
Guanosintriphosphat (GTP)	Sigma
HCl, konzentriert (38%)	J.T. Baker
Hefeextrakt	Roth
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Sigma
Isobutanol	Merck
Isobuttersäure (99%)	Sigma
Isopropanol	J.T. Baker
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck
Leupeptin	Sigma
β -Mercaptoethanol	Sigma
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Sigma
Methanol (100%)	J.T. Baker
Mineralöl	Sigma
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Riedel de Haen
Natriumvanadat (Na_3VO_3)	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker
Natriumfluorid (NaF)	Sigma
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	ICN Biomedicals Inc.
Natriumpyrophosphat ($Na_4O_7P_2$, $NaPP_i$)	Sigma
Nonidet P-40 (NP-40)	Fluka
Okadainsäure (Ammoniumsalz)	Alexis
Pepstatin A	Sigma
Phenylethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phosphoserin	Sigma

Phosphothreonin	Sigma
Phosphotyrosin	Sigma
Polyethylenglykol 8000 (PEG)	Sigma
Polyethylenimin (PEI)	Aldrich
Polyvinylpyrrolidon-360 (PVP-360)	Sigma
Ponceau S	Sigma
Pyridin (99% HPLC)	Sigma
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad
Thymidintriphosphat (TTP)	Sigma
<i>trans</i> -Epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butan (E64)	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Sigma
Triton X-100	Serva
Trypanblau	PAA Laboratories GmbH
Trypton/Pepton	Roth
Tween 20	Sigma
Wasserstoffperoxid (30% w/w, H ₂ O ₂)	Aldrich
Xylencyanol FF	Sigma

4.1.2 Gebrauchsfertige Lösungen, Reagenzien und Anwendungspakete (Kits)

Lösungen

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS, 10x Konzentrat)	PAA Laboratories GmbH
Protein Assay (Bradford)	Bio-Rad
Rotiphorese Gel 30 (37.5:1, Acrylamid/Bisacrylamid)	Carl Roth GmbH & Co.
Roti®-Blot A (10x Konzentrat)	Carl Roth GmbH & Co.
Roti®-Blot K (10x Konzentrat)	Carl Roth GmbH & Co.
Roti®Load (4x Konzentrat, Probenauftragspuffer)	Carl Roth GmbH & Co.
TRIS 1M Six-Pack C, pH 7.4	Sigma

Reagenzien

Glutathion-Sepharose™ 4B	Amersham Biosciences
Strep-Tactin® Superflow (0.5 ml, 1 ml)	IBA BioTAGnology
Ninhydrin Sprühreagenz	Sigma
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce

Isotopenmarkierte Reagenzien

(γ - ³² P) ATP, 3000 Ci/mmol	Amersham/GE Healthcare
³² P- <i>ortho</i> -Phosphorsäure, 1 mCi	Hartmann

Kits

GFX™DNA & Gel Band Purification Kit	Amersham Biosciences
GFX™Micro Plasmid Prep Kit	Amersham Biosciences
Nucleobond® AX	Macherey-Nagel
OneSTrEP™ Kit	IBA BioTAGnology
QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene

4.1.3 Stamm- und Gebrauchslösungen/Puffer**Proteingelelektrophorese**

Proteingel-Laufpuffer (10x Stammlösung)	250 mM Tris pH 8.0, 2M Glycin, 1% (w/v) SDS
Coomassie-Färbelösung	0.1% CBB, 4% Methanol, 8% Essigsäure
Entfärber	25% Methanol, 7% Essigsäure, H ₂ O

Western Blot

Anodenpuffer (500 ml)	50 ml Roti®-Blot A, 100 ml Methanol, 350 ml demin. H ₂ O
Kathodenpuffer (500 ml)	50 ml Roti®-Blot K, 100 ml Methanol, 350 ml demin. H ₂ O
Phosphoblot-Puffer	25 mM Tris pH 8.0, 193 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol

TRIS-gepufferte Kochsalzlösung (TBS)	100 mM TRIS, 1.5 M NaCl, pH 7.5 (eingestellt mit HCl)
TBS-T	TBS, 0.05% Tween 20
Absättigungslösung I (Immunfärbung)	TBS-T, 1,5% BSA
Absättigungslösung II (Phosphopeptidkartierung)	100 mM Essigsäure, 0.5% PVP-360
Ponceau S Färbelösung	0.1% Ponceau S, 5% Essigsäure
Ablösungspuffer (<i>Stripping buffer</i>)	2.5 mM Glycin, 1% SDS, pH 2.0
Phosphoaminosäureanalyse	
6N HCl für partielle saure Hydrolyse (1 ml)	480 µl 38% HCl, 520 µl demin. H ₂ O
Phosphoaminosäurestandard	je 1 mg/ml Phosphoserin, Phospho-threonin und Phosphotyrosin
Elektrophorese-Puffer I (2 L)	50 ml 88% (v/v) Ameisensäure, 156 ml Eisessig, 1794 ml demin. H ₂ O, pH 1.9
Elektrophorese-Puffer II (2 L)	100 ml Eisessig, 10 ml Pyridin, 0.4 ml 500 mM EDTA, 1889.6 ml demin. H ₂ O, pH 3.5
Phosphopeptidkartierung	
Proteolyse-Puffer	50 mM NH ₄ HCO ₃ , pH 8.3
HCO ₃ H-Oxidationslösung (1 ml)	900 µl Ameisensäure, 100 µl H ₂ O ₂
Elektrophoresepuffer, pH 3.5	siehe Elektrophoresepuffer II
Chromatographiepuffer (2 L)	1250 ml Isobuttersäure, 38 ml n-Butanol, 96 ml Pyridin, 58 ml Eisessig, 558 ml demin. H ₂ O
Referenzfarbstofflösung	ε-DNP-Lysin, Xylencyanol FF (1 mg/ml), H ₂ O

Kinaseenzymtest (*kinase assay*)

Reaktionspuffer (5x Stammlösung)

250 mM TRIS pH 7.4, 50 mM MgCl₂,
5 mM DTT, 0.5% Triton X-100

Quenchpuffer

50 mM TRIS pH 7.4, 100 mM EDTA, 1 mM DTT,
1% Triton X-100, 4 mM Na₃VO₃, 20 mM β-
Glycerolphosphat, 20 mM NaF, 20 mM Na₄O₇P₂,
100 nM Okadainsäure

Waschpuffer (4x Stammlösung)

200 mM TRIS pH 7.4, 200 mM EDTA, 16 mM
Na₃VO₃, 80 mM β-Glycerolphosphat, 200 mM NaF,
80 mM Na₄O₇P₂, 200 mM NaCl, 4% Triton X-100**Agarosegelelektrophorese (DNA)**TRIS-Acetat-EDTA Laufpuffer
(TAE, 50x Stammlösung)

2 M TRIS, 0.05% Essigsäure, 0.05 M EDTA

DNA-Probenauftragspuffer (6x
Konzentrat)0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylencyanol FF,
15% Ficoll, 0.1 M EDTA**Zellkultur**

Gesamtzelllysepuffer

10 mM TRIS, 30 mM Na₄O₇P₂, 50 mM NaCl, 1%
Triton X-100, 2 mM Na₃VO₃, 50 mM NaF, 20 mM β-
Glycerolphosphat, 0.1 mM Okadainsäure, 0.1 mM
PMSF, 1 μM E 64, 1 μM Pepstatin, 0.5 mM DTT,
0.1% Avidin, pH 7.5

Zelllysepuffer A (Zytosol)

10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.3 mM
Na₃VO₃, 20 mM β-Glycerolphosphat, 400 nM
Okadainsäure, 10 μM E 64, 2.5 μg/ml Leupeptin,
0.3 mM PMSF, 1 μM Pepstatin, 5 mM DTT, pH 7.9

Zelllysepuffer B (Zytosol)

Zelllysepuffer A, 0.1% NP-40

Zelllysepuffer C (Kern)

20 mM HEPES, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2
mM EDTA, 25% (v/v) Glycerol, 5 mM DTT, 0.3 mM
Na₃VO₃, 20 mM β-Glycerolphosphat, 400 nM
Okadainsäure, 10 μM E 64, 2.5 μg/ml Leupeptin,
0.3 mM PMSF, 1 μM Pepstatin, pH 7.9

Trypsin/EDTA-Lösung 2.5% Trypsin (Gibco), 0.01% EDTA, PBS

4.1.4 DNA- und Proteinstandards

Größenstandards

Smart Ladder [bp]: Eurogentec

10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000,
800, 600, 400, 200

Precision Plus Protein™ Dual Color Standard [kDa]: Bio-Rad

250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10

Standards zur Konzentrationsbestimmung

BSA-Eichreihe [µg/ml]: BSA in PBS

50, 40, 30, 20, 10, 5, 0

4.1.5 Proteine, Enzyme und Zytokine

Proteine

Avidin IBA BioTAGnology

Bovines Serumalbumin (BSA) Sigma

StrepTactin®-HRP Konjugat IBA BioTAGnology

Proteasen

Trypsin (für Zellkultur) Gibco

Trypsin (*proteomics grade*) Roche

Nukleinsäuren modifizierende Enzyme

*Bam*HI Fermentas

*Eco*RI Fermentas

*Pvu*I Fermentas

*Xba*I Fermentas

*Xho*I Fermentas

Klenow-Fragment Fermentas

Pfu-DNA-Polymerase + Puffer, MgSO ₄	Fermentas
T4-DNA-Ligase + Puffer	Roche

Zytokine

Interleukin- (IL-) 1 β (10 μ g/ml)	Hoffman La Roche
--	------------------

4.1.6 Kulturmedien und –agar

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	Difco™ Luria Bertani Broth (Miller Becton Dickinson & Company)
Luria-Bertani-Agar (LB-Agar)	Standard I-Nähragar (Merck)
2x Yeast-Tryptone- (2x YT) Medium	16% (w/v) Trypton/Pepton, 10% (w/v) Hefeextrakt, 85 mM NaCl
TSS-Medium	10% (w/v) PEG, 50 mM MgCl ₂ , 5% (v/v) DMSO in LB-Medium, pH 6.6
Zellkulturmedium	DMEM High Glucose (PAA Laboratories GmbH) mit 100 IU/ml Penicillin, 100 UG/ml Strptomycin, 2 mM L-Glutamat, 5% (10%) (v/v) FCS
Zellkulturmedium (Biosynthetische Markierung)	DMEM High Glucose, Phosphate free (Gibco)
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 IU/ml Penicillin, 10000 UG/ml Streptomycin)	Gibco

4.1.7 Zelllinien, Bakterienstämme und Viren**Humane Zelllinien**

HeLa tTA (HeLa Bujard, HeLa B)	H. Bujard, Universität Heidelberg
HeLa ACC 57	DSMZ
HEK 273-R1	AMGEN (Leihgabe von Dr. D. Neumann)

Escherichia coli (E. coli)

XL1-Blue (DE3)	Stratagene
BL21 Star™ (DE3)	Invitrogen

Viren

Newcastle Disease Virus (NDV)	Lohmann Animal Health
-------------------------------	-----------------------

4.1.8 Plasmide und Oligonukleotide (Primer)**Plasmide**

pBLKS-NRF	PD Dr. M. Nourbakhsh
pEXPR-IBA103	IBA BioTAGnology
pGEX-4T-2	Amersham Biosciences
pGST-NRF1-112	PD Dr. M. Nourbakhsh
pGST-NRF1-112Mu1	PD Dr. M. Nourbakhsh
pGST-NRF1-112STA	S. Rother
pGST-NRF1-389	K. Wulfetange
pGST-NRF1-449	K. Wulfetange
pGST-NRF1-449Mu1	K. Wulfetange
pGST-NRF1-449STA	S. Rother
pGST-NRF1-449delta1	A. Roden
pGST-NRF112-449	K. Wulfetange
pGST-NRF390-486	S. Rother
pGST-NRF447-690	K. Wulfetange
pNRF2722Strep	W. Schaper
pNRF2722TAP	J. von der Ohe

PCR-Primer

NRF_EcoRl_dir	5'-GAT TAT ACT CAA GAC TCT TTC AGT ATA MWG CAA GAT GGG AAT TCT CAG-3'
NRF_EcoRl_rev	5'- GTT TTC TTG GTT CCA GAA TTC TCA MWG GCT AAG CAG TGA T-3'
NRF389_Xholdir	5'-GAT CAC TGC TTA GCT CGA GGT TAT MWG

	GGA ACC AAG-3'	
NRF690_ <i>Xho</i> lrev	5'-GCA TTT ACT CGA GAA ATT AGT AAG ATC TCA ATT TGC TTG AGG C-3'	MWG
Mutagene Primer		
5'delta1	5'-AAC ACA GCC CAC TTA TCC ATC TGT CAA ACC CAG AGG ATC TGG AAA GAA-3'	Eurogentec
3'delta1	5'-TTC TTT CCA GAT CCT CTG GGT TTG ACA GAT GGA TAA GTG GGC TGT GTT-3'	Eurogentec
S35_T36_A_fwd	5'-AAA GGT CAA AAA CGC CAC CTC GCG GCA TGC GAT GGT CAA AAT CCT-3'	Operon
S35_T36_A_rev	5'-AGG ATT TTG ACC ATC GCA TGC CGC GAG GTG GCG TTT TTG ACC TTT-3'	Operon
NRFPHOMU5	5'-GAG ACA TCG CCC AAG ATG CTA CTC AAG ACT CTT TCG CTA TAC AAG-3'	MWG
NRFPHOMU3	5'-CTT GTA TAG CGA AAG AGT CTT GAG TAG CAT CTT GGG CGA TGT CTC-3'	MWG

4.1.9 Verbrauchsmaterial

Bakterienkulturschalen 92 mm	Sarstedt
Centricon® Centrifugal Filter Devices, Ultracel membrane (verschiedene MWCOs)	Millipore
DC-Plastikfolien, 20x20 cm Zellulose	Merck
Einwegküvetten	Sarstedt
Einwegpipetten 2, 10, 25 ml	Sarstedt
Erlenmeyerkolben 100, 250, 500 ml	Schott
Filterpapier 3MM-Chromatographiepapier	Whatman
Filme (verschiedene Maße)	Kodak, Amersham
Kulturflaschen T75	Greiner bio-one Cellstar
Kulturschalen 94 mm, 145 mm	Greiner bio-one Cellstar
Kunststoffröhrchen 10 ml	Greiner
Kunststoffröhrchen 15 ml	Nunc
Kunststoffröhrchen 50 ml	Greiner
Mikrotiterplatten, 96-Loch	Nunc™

Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schüll
Pipettenspitzen 0.5-20 µl	Eppendorf epTIPS standard
Pipettenspitzen 10-200 µl; 100-1000 µl	Sarstedt
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Millipore Immobilon
Reaktionsgefäße 0.5 ml	Landgraf
Reaktionsgefäße 1.5 ml, 2 ml	Eppendorf
Röntgenfilme 18x24 cm	Kodak
Skalpelle	Feather
UV-Küvetten	Hellma

4.1.10 Geräte

Elektrophorese- und Transfersysteme

Proteingelkammern	(Bio-Rad) (Hoefer) (Sigma)
Western Blot Kammer	Semidry elektroblotter HEP-1/HEP-3 (Panther)
Dünnschichtelektrophoresekammer	DESAPHOR HF (Desaga GmbH, Heidelberg)
Agarosegelkammer	Med. Hochschule Hannover, Technik
Netzgeräte	Electrophoresis power supply EPS-301 (Amersham Pharmacia Biotech) Desatronic 6000/100 (Desaga GmbH)

Inkubatoren und Schüttler

Bakterien-Inkubationsschrank	B5050E (Heraeus)
Schüttler und Schwenktische	The Belly Dancer (Stovall) intelli mixer (Neolab) REAX top (Heidorph)
Schüttelinkubator (Bakterien)	Certomat H+R (B. Braun)
Zellinkubator	CO ₂ Auto Zero (Heraeus)

Kühl- und Heizsysteme

Eismaschine	Ziegra
Heizblöcke	Rotilabo®-Block-Heater H250 (Roth)

	eppendorf Thermostat 3401 (Eppendorf)
	eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf)
Kühlschrank 4°C/-20°C	Liebherr
Kühlschrank -80°C	VIP Series (Sanyo)
Kühltruhe -80°C	Advantage (Nunc)
Thermozykler	Thermocycler (Landgraf)
Vakuum-Geltrockner	Biometra
Vakuum-Kühlfalle	Refrigerator Condensation Trap (Savant Jürgens)

Darstellungs- und Dokumentationssysteme

Filmentwickler	Optimax (Protec)
Dokumentation	BioDoc Analyze (Biometra)
	Expression 1680 Pro (Epson)
Expositionskammern	X-ray 18x24 cm IEC 60406 (MS Laborgeräte GmbH)
	24x30 cm (Rego)

Mikroskope und Photometer

Mikroskope	950405 (Olympus)
	Laborlux 12 (Leitz)
Photometer	UV160A (Shimadzu)
	Microplate Reader Sunrise (Tecan)

Zentrifugen

Kühlzentrifugen	J2-21 (Beckmann)
	3K12, 3K20, 2K15 (Sigma)
Vakuum-Zentrifuge	Speed Vac SVC 100 (Savant Jürgens)
Tischzentrifugen	Biofuge pico (Heraeus)
	112 (Sigma)
	mini spin (Eppendorf)

Isotopenmesssysteme

Szintillationszähler	Perkin Elmer
β/γ-Handmonitor	LB 122 (Berthold)

Sonstige Geräte

Heißlufttrockner	TCM
Pipetten 0.5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	eppendorf Research (Eppendorf)
Pipettierhilfe	Pipetboy (Integra Biosciences)
Sterilwerkbank	Hera Safe (Heraeus Instruments)
Sonifizierer	Sonifier 250 (Branson)
UV-Tisch	Bachhofer
Wasserbäder	37°C (Köttermann) 42°C (VWR)
Wasserfiltrationsanlage	Milli Q _{UF} Plus (Millipore)

4.1.11 Computersoftware**Text- und Grafikbearbeitung**

Microsoft Office® 2003	Microsoft
Photoshop 6.0	Adobe

Quantitative Bildauswertung

Image J 1.3x	W. Rasband, USA
--------------	-----------------

Vorhersagen von Proteinphosphorylierung

Disorder-Enhanced Phosphorylation Sites Predictor (DISPHOS) 1.3	http://core.ist.temple.edu/pred/pred.html (Iakoucheva <i>et al.</i> , 2004; Dunker <i>et al.</i> , 2002)
Eukaryotic Linear Motif (ELM)	http://elm.eu.org/ (Puntervoll <i>et al.</i> , 2003)
Group-based Phosphorylation Scoring (GPS)	http://bioinformatics.lcd-ustc.org/gps_web/ (Xue <i>et al.</i> , 2005; Zhou <i>et al.</i> , 2004)
NetPhos 2.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/ (Blom <i>et al.</i> , 1999)
NetPhosK 1.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/ (Blom <i>et al.</i> , 2004)
Scansite 2.0	http://scansite.mit.edu/ (Obenauer <i>et al.</i> , 2003)

4.2 Methoden

4.2.1 Arbeiten mit humanen Zelllinien

4.2.1.1 Kultivierung von HeLa- und HEK-Zellen

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Zelllinien waren HeLa tTa (HeLa Bujard, HeLa B), HeLa ACC 57 sowie HEK 293R1. Für die Kultur in T75-Flaschen und Schalen (beide Greiner) wurde dem Kulturmedium 5% (HeLa B) bzw. 10% (HeLa ACC 57, HEK 293R1) zugesetzt. Die Zellen wurden in den jeweiligen Kulturmedien bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt unter einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre kultiviert.

Die Zellen wurden alle drei bis fünf Tage in einem Verhältnis von 1:8 bis 1:10 ausgedünnt. Dazu wurde das alte Medium abgenommen und die Zellen mit 37°C warmem PBS gewaschen. Anschließend wurden die HeLa-Zellen durch Zugabe von 1 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (4.1.3) und Inkubation (2 min, 37°C) abgelöst und entsprechend der Verdünnung in frischem, 37°C warmem Medium aufgenommen. HEK-Zellen wurden direkt im entsprechenden Volumen von frischem Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau gemischt. Mittels einer Neubauer-Zählkammer wurde die Lebendzellzahl je ml Suspension bestimmt.

4.2.1.2 Lagerung von HeLa- und HEK-Zellen

Zur Lagerung wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung aus der Kulturflasche abgelöst und in 10 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend bei Raumtemperatur abzentrifugiert (7 min, 200 x g). Das Medium wurde verworfen und die Zellen in FCS/10% (v/v) DMSO aufgenommen. Die Suspension wurde langsam auf -70°C temperiert und zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zu verwendende Zellsuspensionen wurden dem Stickstoff entnommen, bei 37°C erwärmt und anschließend auf Eis gestellt. Anschließend wurde schrittweise 1 ml FCS supplementiert. Die Suspension wurde dann in ca. 7 ml Medium/15% FCS aufgenommen. Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur (7 min, 200 x g) wurde das Zellpellet erneut in Medium/15% FCS aufgenommen und in T75-Flaschen (Greiner) ausgesät.

4.2.1.3 Transfektion von HeLa ACC 57-Zellen

In dieser Arbeit wurden die Zellen mittels der Polyethylenimin (PEI)-Methode transfiziert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen 24 Std. vor der Transfektion aus T75-Kulturflaschen abgelöst

und gezählt (siehe 4.2.1.1) und anschließend mit einer Dichte von $3 \cdot 10^6$ Zellen in 20 ml Medium (DMEM + 10% FCS) pro Zellkulturschale (145 mm) ausgesät. Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Für die Transfektion wurden jeweils 700 µl serum- und antibiotikafreies Medium vorgelegt, dieses mit 36 µl PEI-Lösung (1 µg/µl) versetzt und die Lösung gut gemischt. Anschließend wurden je 12 µg DNA zugefügt und die Transfektionslösung erneut gründlich gemischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Transfektionsgemisch durch Auftropfen zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden bis zur Zelllyse für etwa 24 h unter Standardbedingungen kultiviert und anschließend lysiert (4.2.1.7).

4.2.1.4 Stimulation von HeLa- und HEK-Zellen

Für die Stimulation durch IL-1 β bzw. NDV wurden die Zellen zunächst aus T75-Kulturflaschen abgelöst. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden jeweils $2-3 \cdot 10^6$ Zellen pro Kulturschale (94 mm) in frischem Medium (DMEM + 5% FCS) ausgesät.

Die Stimulation fand jeweils am folgenden Tag (ca. 24 Std.) statt. Im Fall einer Stimulation durch IL-1 β wurde das Medium abgenommen und durch neues Medium + 10 ng/ml IL-1 β ersetzt. Die Zellen wurden entsprechend den Zeitwerten für 15, 30, 45 und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Medium ohne IL-1 β behandelt. Für die NDV-Stimulation wurden die Zellen zunächst 3 Mal mit je 10 ml warmem FCS freiem Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen entsprechend den Zeitwerten für 15, 30, 45 und 60 Minuten in serumfreiem, Virus haltigem Medium (1:100 Verdünnung der Original NDV-Lösung) bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit virusfreiem Medium inkubiert.

Für die Vorbereitung der Zelllyse wurde das IL-1 bzw. NDV enthaltende Medium verworfen. Die Zellen wurden auf Eis gelagert und im Fall IL-1 stimulierter Zellen 2 Mal mit kaltem PBS gewaschen. Bei NDV-Stimulation erfolgte zusätzlich zum Waschen mit PBS ein vorhergehendes dreimaliges Waschen mit 10% FCS enthaltendem Medium. Im Medium und Flüssigkeitsabfällen enthaltenes Virus wurde anschließend durch Bestrahlung mit UV-Licht inaktiviert und autoklaviert.

4.2.1.5 Biosynthetische Markierung von HeLa ACC 57-Zellen mit ^{32}P -ortho-Phosphorsäure

Für die radioaktive Markierung wurden jeweils $2 \cdot 10^6$ Zellen auf vier Zellkulturschalen (94 mm) in Medium + 10% FCS ausgesät und über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag wurden jeweils drei Schalen Zellen mit pNRF2722Strep transfiziert (4.2.1.3; 6 µg DNA/Schale). Als Kontrolle wurde eine Schale untransfiziert belassen. Die Markierung der Zellen wurde ca. 24 Std. nach der Transfektion durchgeführt. Dazu wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen 3

Mal mit je 10 ml phosphatfreiem Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 1 Std. bei 37°C in phosphatfreiem Medium gehungert.

Das Medium wurde erneut entfernt und durch phosphatfreies Medium ersetzt, das mit ca. 100 µCi/ml ³²P-*ortho*-Phosphorsäure supplementiert wurde. Die Zellen wurden darin für weitere 2 Std. bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 10 ng/ml IL-1β (finale Konzentration) für 15 bzw. 30 Minuten stimuliert. Als Kontrollen wurde je eine Schale transfizierter sowie nicht transfizierter Zellen für 30 Minuten unter Zusatz eines identischen Volumens an Medium inkubiert. Anschließend wurde das radioaktive Medium verworfen und die Zellen 3 Mal mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden bis zur Lyse (4.2.1.7) auf Eis gelagert.

4.2.1.6 Fraktionierte Zelllyse von HeLa B und HEK 293R1-Zellen zur Präparation der Kernfraktion

Die fraktionierte Zelllyse wurde durchgeführt, um Kernfraktionen als Quelle der Kinaseaktivität für eine *in vitro* Phosphorylierung von GST-NRF Fusionsproteinen zu gewinnen.

Dazu wurden HeLa B bzw. HEK 293R1-Zellen nach Aussaat und ggf. Stimulation (4.2.1.4) in je 1 ml kaltem PBS von der Kulturschale abgelöst und bei 4°C abzentrifugiert (5 min, 300 x g). Die Zellen wurden anschließend in je 500 µl Puffer A resuspendiert und nach Überführung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 4°C zentrifugiert (5 min, 10000 x g). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in je 250 µl Puffer B resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen bei 4°C abzentrifugiert (5 min, 10000 x g). Der Überstand bildete die Zytosolfraktion und wurde bei -80°C gelagert. Das Zellpellet wurde in 500 µl Puffer A gewaschen und erneut abzentrifugiert (4°C, 5 min, 10000 x g). Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in je 50 µl Puffer C resuspendiert und für 45 Minuten auf Eis inkubiert, wobei nach jeweils 15 Minuten das Lysat mehrfach invertiert wurde. Im Fall von HEK 293R1-Zellen wurde das Lysat Die Zentrifugation erfolgte anschließend bei 4°C (5 min, 10000 x g). Der Überstand bildete die Kernfraktion und wurde nach Bestimmung der Proteinkonzentration (4.2.4.1) bei -80°C gelagert. Das Zellpellet wurde verworfen.

4.2.1.7 Gesamtzellyse von HeLa ACC 57-Zellen zur Aufreinigung von überexprimiertem NRF-Strep-Protein

a) aus nicht markierten Zellen:

Die Zellen wurden in je 5 ml kaltem PBS von der Kulturschale gelöst und in Kunststoffröhrchen überführt. Die Schalen wurden mit je 3 ml nachgespült und die vereinigte Suspension für 7 min

bei 5 000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in je 100 µl Lysepuffer/Schale resuspendiert und 15 min bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Lysate für 7 min bei 13 000 x g und 4°C zentrifugiert und die Überstände bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

b) aus radioaktiv markierten Zellen:

Die radioaktiv markierten Zellen wurden in jeweils 2 ml kaltem PBS von ihrer Kulturschale abgelöst und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 4°C (5 min, 300 x g) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in jeweils 60 µl Gesamtzellysepuffer (400 nM Okadainsäure, 1 mM EGTA) resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat bei 4°C zentrifugiert (5 min, 10000 x g). Der Überstand wurde abgenommen und jeweils 10% des Volumens in Proteingelauftragspuffer aufgeköcht. Der restliche Überstand wurde bis zur weiteren Aufarbeitung (4.2.4.7) auf Eis gelagert.

4.2.2 Arbeiten mit Bakterien (*Escherichia coli*)

4.2.2.1 Lagerung und Kultivierung

Die *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme XL1-Blue und BL21 wurden in LB-Medium bzw. 2 x YT-Medium bei 37°C unter Schütteln kultiviert und im Fall einer Transformation durch Plasmid-DNA mittels Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin (finale Konzentration) zum Medium selektiert.

Die Lagerung beider Stämme erfolgte im jeweiligen mit 20% (v/v) Glycerol supplementierten Kulturmedium bei -80°C. Dazu wurden die Bakterien zunächst im Kulturmedium bis zu einer OD₆₀₀ von 0.3-0.4 kultiviert und die Kultur anschließend mit dem entsprechenden Volumen Glycerol versetzt. Für die Lagerung wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

4.2.2.2 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA (Hitzeschock-Methode)

a) Herstellung hitzekompetenter Bakterien

Zunächst wurde eine Vorkultur der Bakterien (XL1-Blue, BL21) angesetzt. Dazu wurden 3 ml des jeweiligen Kulturmediums mit einem Abstrich der bei -80°C gefrorenen Bakterien (Leerstamm) beimpft und anschließend über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert.

Am folgenden Tag wurden 100 ml des gleichen Mediums mit der Vorkultur beimpft und die Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ von 0.3 bis 0.4 kultiviert. Die Bakterien wurden anschließend bei RT abzentrifugiert (10 min, 2000 x g) und in 10 ml TSS aufgenommen. Nach Inkubation für zwei

Minuten auf Eis wurden sie a` 200 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte wie in 4.2.2.1 angegeben.

b) Transformation nach der Hitzeschock-Methode

Für die Transformation durch Hitzeschock wurden jeweils 200 µl der nach a) hergestellten hitzekompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 10 ng einer Plasmid-DNA oder 5 µl eines Ligationsansatzes (4.2.3.6) bzw. einer Mutagenese-PCR (4.2.3.7) bzw. einer Plasmid-Minipräparation (4.2.3.1) versetzt und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Anschließend wurden die Bakterien für 45 Sekunden einem Hitzeschock (42°C) ausgesetzt und erneut für zwei Minuten auf Eis gelagert. Die Bakteriensuspension wurde in 800 µl Kulturmedium ohne Ampicillin aufgenommen und für 30-60 Minuten bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend bei RT abzentrifugiert (2 min, 2000 x g) und nach Abnahme von 800 µl des Überstandes in den verbliebenen 200 µl resuspendiert. Je nach Transformationseffizienz wurden 50-200 µl dieser Suspension auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen. Diese wurden für ca. 16 Std. bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

4.2.2.3 IPTG-Induktion von *E. coli* BL21 zur Produktion rekombinater GST-Fusionsproteine

Für die Produktion von GST- Fusionsproteinen in Bakterien wurden *E. coli* BL21 zunächst mit auf dem pGEX-Vektor basierenden Plasmid transformiert und in 2x YT-Medium unter Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin in einer Vorkultur herangezogen (4.2.2.1).

Am folgenden Tag wurde frisches Selektionsmedium in einer Verdünnung von 1:1000 mit der Vorkultur beimpft und unter Schütteln (180 Upm) bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0.6 inkubiert. Die Kultur wurde anschließend mit 0.5 mM IPTG versetzt und für weitere vier Stunden bei 37°C und 200 Upm oder alternativ über Nacht bei 23°C induziert. Nach Ablauf der Induktionszeit wurde die Bakterienkultur zunächst 15 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Bakterien für 20 Minuten bei 4°C und 2500 x g abzentrifugiert und bis zur Lyse auf Eis gelagert bzw. bei -80°C weggefroren.

4.2.3 Arbeiten mit DNA

4.2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (XL1-Blue)

a) Mini-Präparation

Für die Präparation wurden zunächst transformierte *E. coli* XL1-Blue in einer Vorkultur in 3 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) über Nacht bei 37°C im Schüttler herangezogen (4.2.2.1). Am folgenden Tag wurden jeweils 1,5 ml der Vorkultur in Reaktionsgefäße überführt und bei maximaler Umdrehungszahl der Tischzentrifuge abzentrifugiert.

Für die Lyse der Bakterien und die anschließende säulenchromatographische Präparation der Plasmid-DNA wurde das GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Alle Plasmide wurden in jeweils 30 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 nach einminütiger Inkubation (RT) mit der Säulenmatrix durch Zentrifugation (1 min, max. Umdrehung) eluiert. Die eluierte DNA wurde durch analytischen Restriktionsverdau charakterisiert (4.2.3.5) und ggf. für weitere Anwendungen genutzt (z.B. 4.2.4.6).

b) Maxi-Präparation

Entsprechend der Vorbereitung zur Mini-Präparation (a) wurde zunächst eine Vorkultur im Selektionsmedium angesetzt und für 6-8 Std. bei 37°C und 200 Upm im Schüttler kultiviert. Anschließend wurden mit 200-800 µl dieser Vorkultur 250 ml frisches Kulturmedium (100 µg/ml Ampicillin) beimpft und für 16 Std. bei 37°C und 180 Upm im Schüttler inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Bakterienkultur zunächst auf Eis gelagert und anschließend bei 4°C (20 min, 2500 x g) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml kaltem PBS resuspendiert, erneut abzentrifugiert (s.o.) und sofort lysiert bzw. bis zur Lyse bei -80°C gelagert.

Für die Lyse der Bakterien und die säulenchromatographische Präparation wurde das Nukleobond® AX Kit (Macherey & Nagel) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die DNA wurde durch Zugabe von 11 ml Isopropanol zum Eluat (15 ml) gefällt und anschließend in der Kühlzentrifuge bei 4°C und 10000 x g für 30 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 1 ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Die DNA wurde erneut abzentrifugiert (10 min, 15000 x g, 4°C) und nach Abnahme des Überstands für ca. 15-30 Minuten bei 37°C getrocknet. Die Aufnahme erfolgte, je nach Pelletgröße in 150-400 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7.4. Die Konzentration wurde UV-spektrometrisch bestimmt, es wurde eine Konzentration von ca. 2 mg/ml eingestellt. Bis zur entsprechenden Verwendung (z.B. 4.2.4.6; 4.2.1.3) wurde die DNA bei -20°C gelagert.

4.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Für die Konzentrationsbestimmung wurde die DNA-Lösung in Wasser verdünnt (1:200, 1:400) und ihre OD_{260} in Quarzküvetten (Hellma) photometrisch bestimmt. Zur Berechnung der Konzentration [mg/ml] wurde die jeweilige Verdünnung berücksichtigt und ein mittlerer Extinktionskoeffizient von 50 g/l cm verwendet. Zusätzlich wurde die Reinheit der DNA durch Messung des Extinktionsspektrums (320-200 nm) sichergestellt. Dabei fungierte ein Quotient aus OD_{260} und OD_{280} von ca. 1,8 als Richtwert.

4.2.3.3 Elektrophoretische Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese

DNA wurde zu analytischen bzw. präparativen Zwecken auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Für das Agarosegel wurde in der Regel 1% (w/v) Agarose in 1x TAE aufgekocht, mit 1% (v/v) Ethidiumbromid-Lösung versetzt und in die entsprechende Kammer gegossen. Zur Taschenbildung wurde ein Kamm eingesetzt und das Gel vor der Verwendung ausgehärtet. Die DNA wurde mit jeweils 1/6 Vol. 6x DNA-Auftragspuffer versetzt, in die Auftragstaschen überführt und unter Anlegen einer Spannung von 80 V aufgetrennt. Die Visualisierung der DNA geschah mittels Bestrahlung des Gels durch UV-Licht.

4.2.3.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Im UV-Licht detektierte DNA wurde auf dem UV-Tisch aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus der Agarosematrix geschah unter Verwendung des GFX™ DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences) entsprechend den Angaben des Herstellers. Nach der Aufarbeitung erfolgte vor der Elution der DNA von der Säulenmatrix ein zweiter Zentrifugationsschritt (2 min, max. Umdrehung) zur Trocknung der Säule. Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von 2 Mal 25 µl Tris-HCl, pH 8 eluiert und bei -20°C gelagert.

4.2.3.5 Restriktionsschnitte

a) analytischer Restriktionsverdau

Um DNA zu identifizieren und zu kontrollieren, wurden analytische Restriktionsschnitte durchgeführt. Dazu wurden jeweils ca. 250 ng Plasmid-DNA mit 10 U einer Restriktionsendonuklease in 10 µl des entsprechenden 1x Enzym-Puffers für ca. 1-2 Std. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (4.2.3.3).

b) präparativer Restriktionsverdau

Für die Darstellung von Klonierungsfragmenten wurde Plasmid-DNA im präparativen Maßstab geschnitten. Dazu wurden jeweils 1 µg DNA und 20 U Enzym in 20 µl Reaktionsvolumen unter Zusatz des entsprechenden Reaktionspuffers für 2 Std. bei 37°C inkubiert.

Kohäsive Enden wurden ggf. mittels Klenow-Fragment aufgefüllt. Dazu wurden nach dem Restriktionsverdau 15 µl des Ansatzes mit 1 µl dNTP-Mix (Verdünnung 1:10), 0.5 µl eines kompatiblen Puffers sowie 5U Klenow-Fragment in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde durch Inkubation des Ansatzes für 20 Minuten bei 70°C inaktiviert.

4.2.3.6 Ligation

Die Ligation dient der Verknüpfung von Klonierungsfragmenten unterschiedlicher Ursprungsplasmide. Zu diesem Zweck wurden nach erfolgtem Restriktionsverdau und ggf. einem *Klenow-Fill in* 100 ng DNA (Verhältnis 1:4 – Vektor: einzufügendes Fragment (*Insert*)) in einem 10 µl Ansatz T4-DNA-Ligase-Puffer unter Zusatz von 1 U T4-DNA-Ligase (Roche) für 16 Std. bei 16°C inkubiert.

4.2.3.7 *In vitro* Mutagenese

Mittels *in vitro* Mutagenese wurde die kodierende Sequenz unter Verwendung des QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit¹⁾ (Stratagene) und entsprechender mutagener Primer (4.1.8) verändert. Dazu wurden jeweils 125 ng der verwendeten Primer (4.1.8), 60 ng der zu mutierenden DNA, 1 µl dNTP-Mix¹⁾, 5 µl 10x Reaktionspuffer¹⁾ sowie 2.5 U *PfuTurbo* DNA-Polymerase¹⁾ auf ein Reaktionsvolumen von 50 µl gebracht. Für alle Mutagenesen wurde folgendes PCR-Schema eingehalten:

Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	95	30
	95	30
18-20	55-62 ^{**)}	60/kb ^{**)}
	68	720
∞	4	n.d.

Tab. 4.1 Zyklenschema der PCR für die *in vitro* Mutagenese von Plasmid-DNA

^{**)} Die Temperatur wurde entsprechend den Angaben des Herstellers gewählt. Pro Kilobasen (kb) des Ursprungsplasmids wurde ein Zeitsegment von 60 Sekunden eingestellt.

Nach Beendigung der Mutagenese-PCR wurde die DNA des Ursprungsplasmids durch Zugabe von 10 U der methylierungsgerichteten Restriktionsendonuklease *DpnI*¹⁾ und Inkubation für eine Stunde bei 37°C abgedaut.

4.2.3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um DNA spezifisch zu amplifizieren (z.B. für Klonierungen), wurde eine PCR durchgeführt. Dazu wurden je 2 ng der DNA-Vorlage (Plasmid-DNA) zusammen mit je 15 pmol der entsprechenden Primerpaare, 2 mM dNTP-Mix, 1x PCR-Puffer, 2 mM MgSO₄ sowie 2.5U Pfu-DNA-Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 50 µl entsprechend dem Schema (**Tab. 4.2**) inkubiert.

Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	94	300
30	94	30
	60	30
	75	120
1	75	600
1	4	∞

Tab. 4.2 Zyklenschema einer typischen Polymerase-Kettenreaktion für die Amplifikation von Plasmid-DNA

4.2.3.9 Klonierungsstrategien der verwendeten Plasmide^{*)}

4.2.3.9.1 Klonierung der Plasmide pGST-NRF1-449, pGST-NRF1-449Mu1 und pGST-NRF112-449

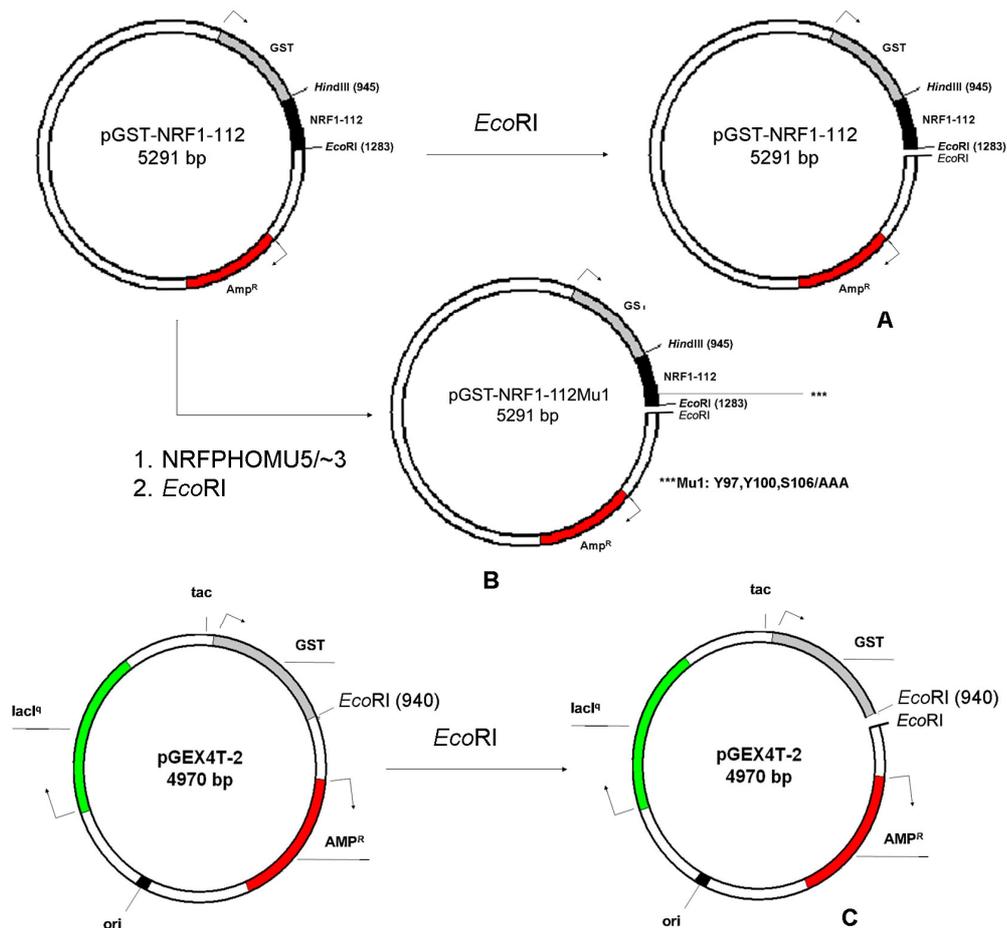


Abb. 4.1 Vorbereitung der Zielplasmide durch Linearisierung mit *EcoRI*

Um die Zielplasmide vorzubereiten, wurden diese durch Verdauung mit *EcoRI* linearisiert und aufgereinigt (4.2.3.4, 4.2.3.5). Für die Klonierung von pGST-NRF1-449Mu1 wurde zuvor am Zielplasmid pGST-NRF1-112 unter Verwendung der angegebenen Primer eine *in vitro* Mutagenese durchgeführt (4.2.3.7). Die linearisierten Zielplasmide pGST-NRF1-112, pGST-NRF1-112Mu1 und pGEX-4T-2 sind entsprechend als A, B bzw. C gekennzeichnet.

^{*)}Anmerkung: Die in den Klonierungsschemata verwendeten Größen der kodogenen Plasmidsegmente sowie die jeweiligen Farben spiegeln nicht die realen Relationen wider bzw. wurden willkürlich den jeweiligen Plasmiden entsprechend gewählt. Wegen der Übersichtlichkeit wurden einige Segmente (z.B. in den Zielplasmiden) im Verlauf der Klonierungsschemata weggelassen.

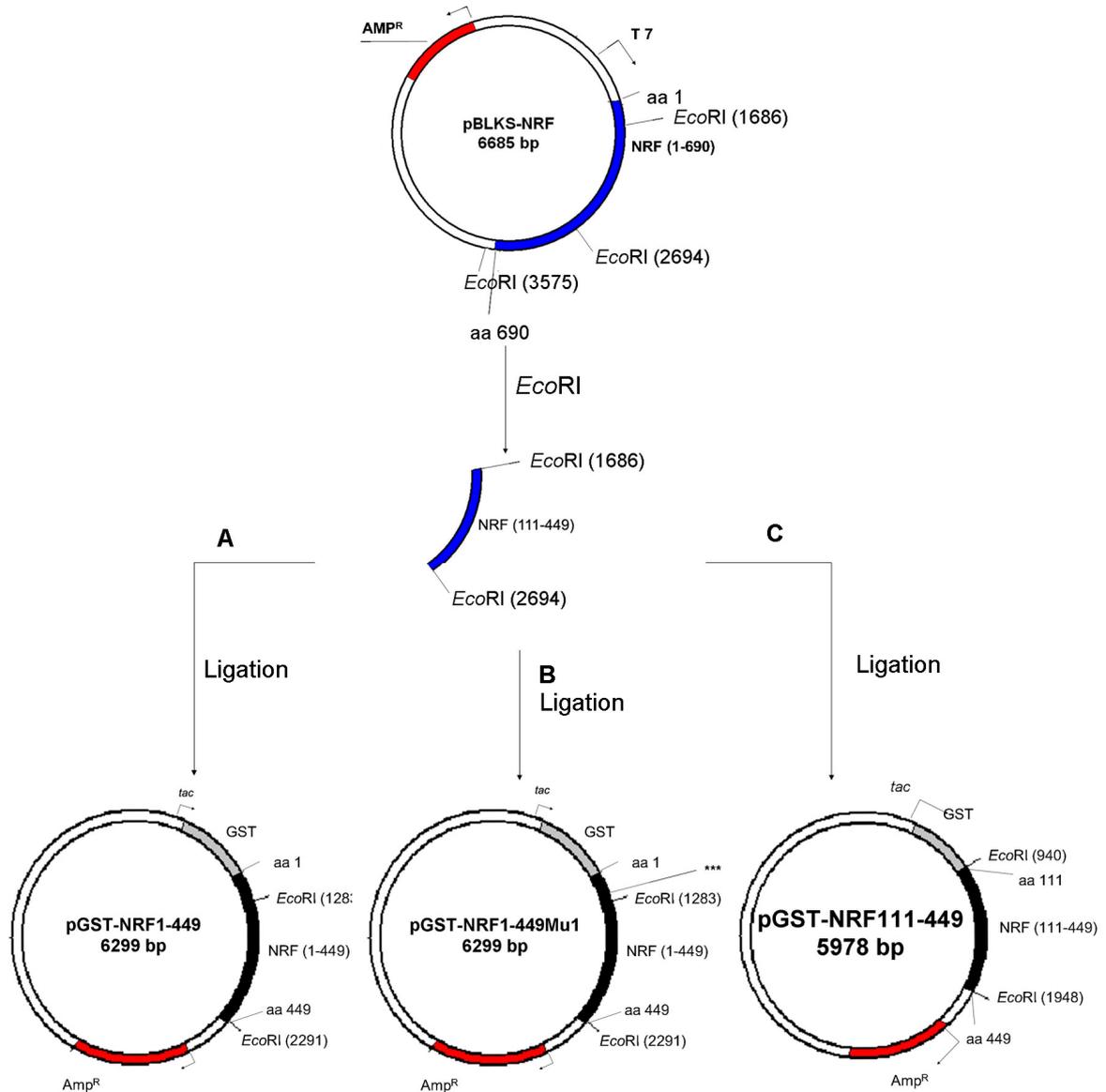


Abb. 4.2 Ligation des 1008 bp großen *EcoRI*-Fragments aus pBLKS-NRF in die Zielplasmide

Die in Abb. 4.1 dargestellten linearisierten Zielplasmide A, B und C wurden zusammen mit dem durch *EcoRI*-Verdau entstandenen und aufgereinigten Fragment (NRF112-449) aus pBLKS-NRF zu den Produktplasmiden pGST-NRF1-449, pGST-NRF1-449Mu1 bzw. pGST-NRF112-449 ligiert (4.2.3.6).

4.2.3.9.2 Klonierung des Plasmids pGST-NRF1-389

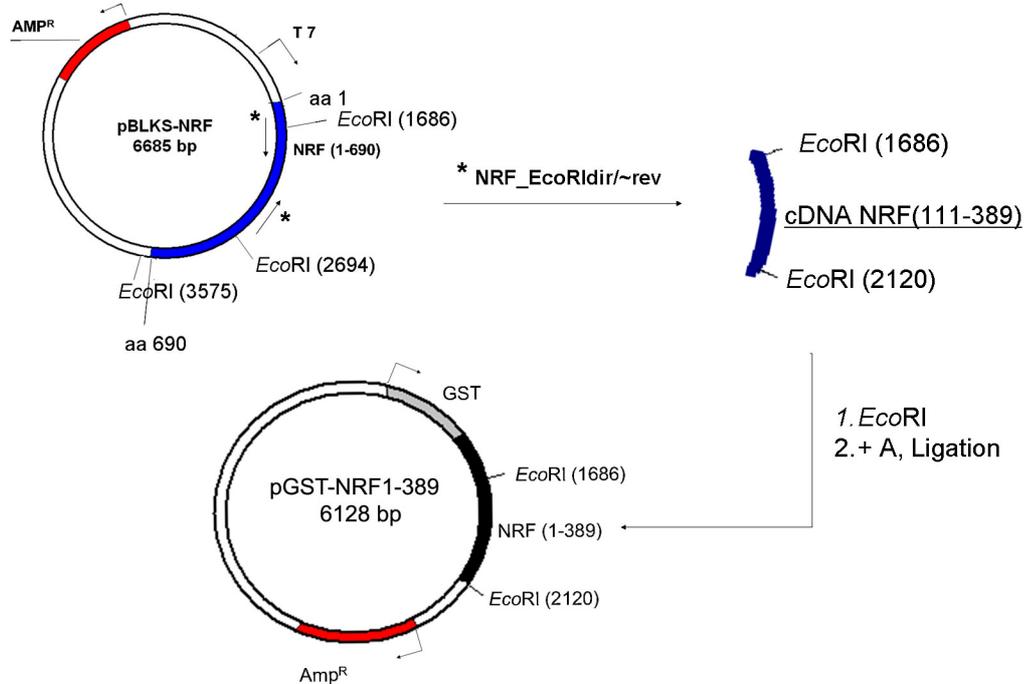


Abb. 4.3 Herstellung des Plasmids pGST-NRF1-389 durch Ligation eines aus pBLKS-NRF amplifizierten und EcoRI geschnittenen 434 bp Fragments unter Verwendung des linearisierten Zielplasmids pGST-NRF1-112

Für die Herstellung des Plasmids wurde das linearisierte Zielplasmid pGST-NRF1-112 (Abb. 4.1, A) verwendet. Das zu ligierende Fragment wurde mittels PCR auf der Vorlage von pBLKS-NRF hergestellt. Dies geschah unter Verwendung der angegebenen Primer, wodurch eine EcoRI-Schnittstelle (2120) in die DNA-Sequenz eingefügt wurde. Die amplifizierte cDNA wurde vor der Ligation aufgereinigt und mittels EcoRI verdaut (s.o.).

4.2.3.9.3 Klonierung des Plasmids pGST-NRF447-690

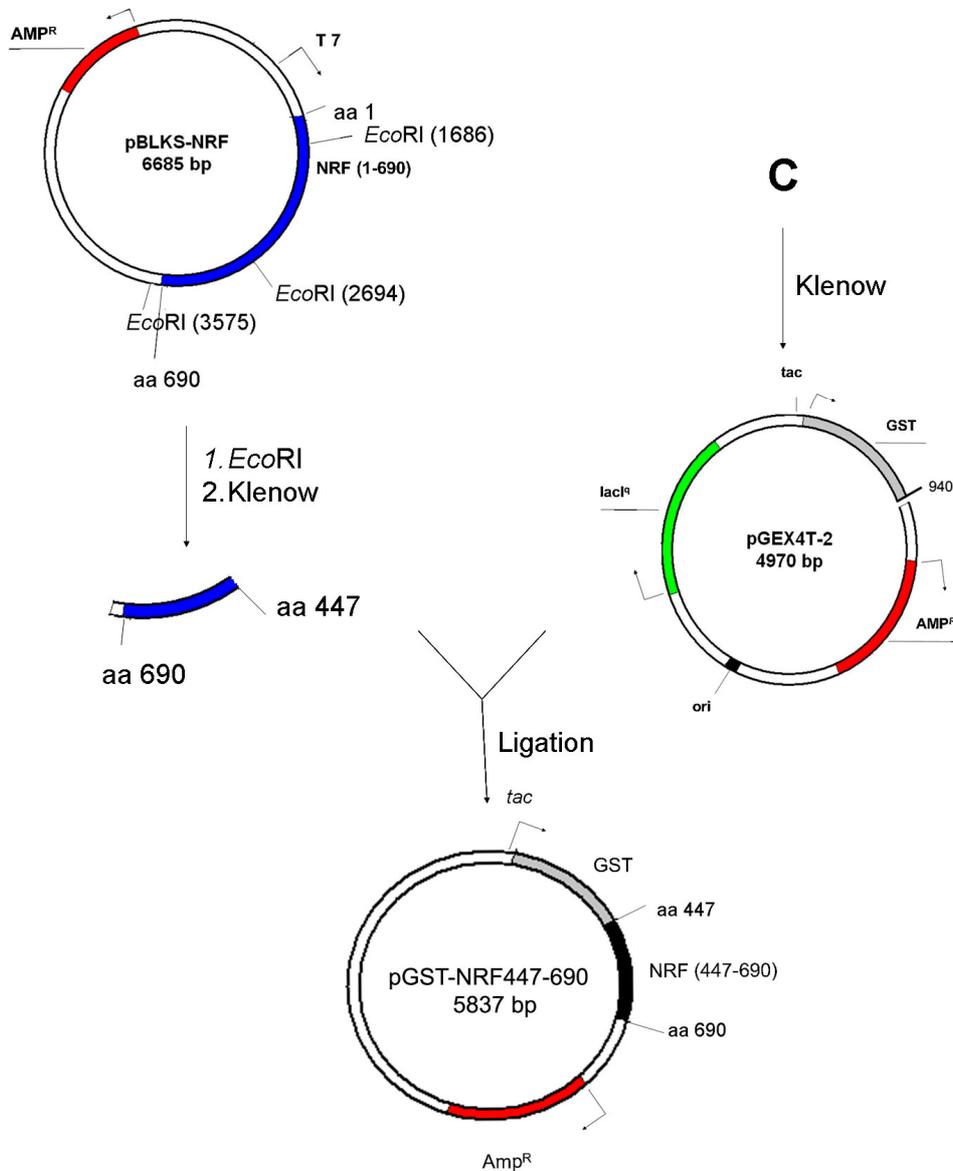


Abb. 4.4 Herstellung des Plasmids pGST-NRF447-690 durch Ligation eines *Eco*RI-Fragments aus pBLKS-NRF und dem linearisierten Zielploid pGEX-4T-2

Für die Klonierung von pGST-NRF447-690 wurden die kohäsiven Enden des 881 bp großen *Eco*RI-Fragments aus pBLKS-NRF sowie des linearisierten Zielploid C (Abb. 4.1) mittels des Klenow-Fragments aufgefüllt und ligiert (s.o.).

4.2.3.9.4 Klonierung des Plasmids pGST-NRF390-690

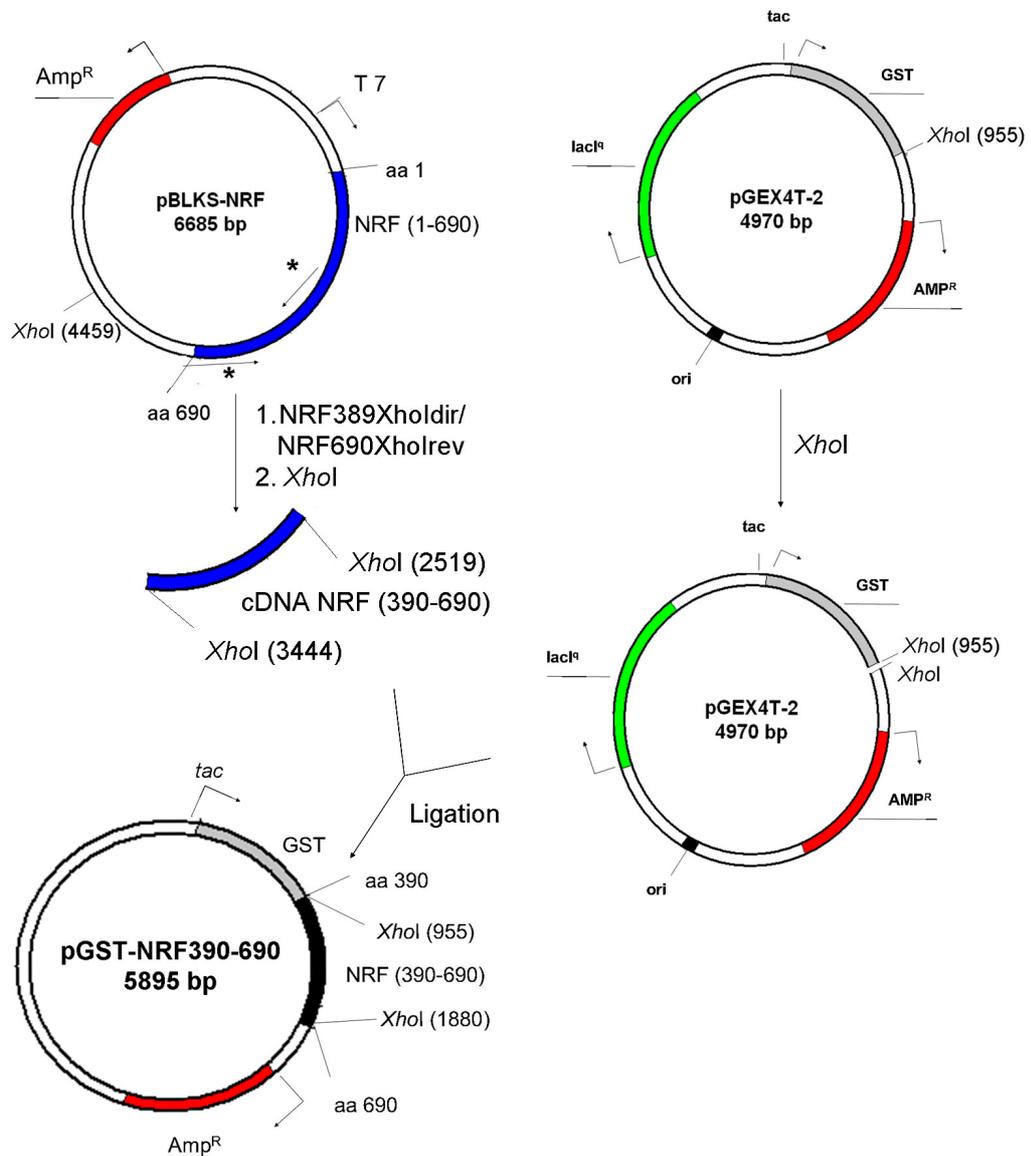


Abb. 4.5 Herstellung des Plasmids pGST-NRF390-690 durch Ligation eines 925 bp großen Fragments aus pBLKS-NRF in den pGEX-4T-2 Vektor

Für die Klonierung wurde zunächst unter Verwendung der angegebenen Primer und des Plasmids pBLKS-NRF ein cDNA-Fragment amplifiziert, aufgereinigt und mit *XhoI* verdaut. Das entstandene 925 bp große Fragment wurde mit dem linearisierten Zielplasmid pGEX-4T-2 ligiert.

4.2.3.9.5 Klonierung des Plasmids pGST-NRF390-486

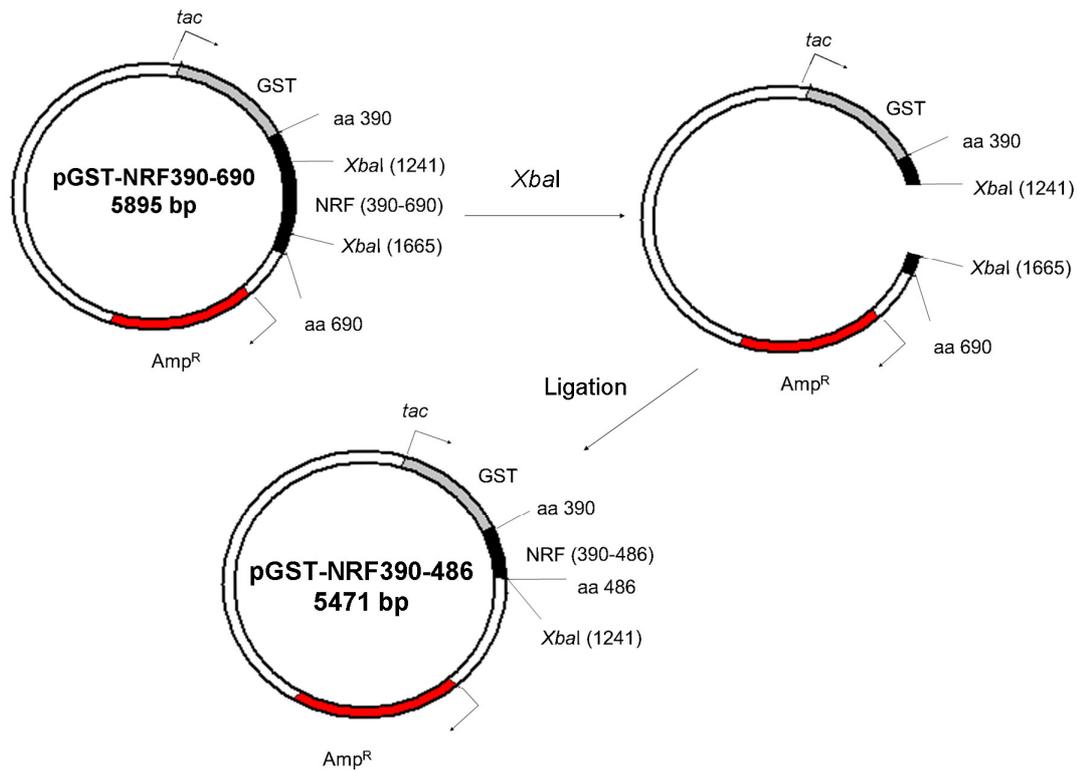


Abb. 4.6 Klonierung des Plasmids pGST-NRF390-486 durch Excision eines 424 bp großen Fragments und anschließende Religation des Vektors

Das hergestellte Plasmid pGST-NRF390-690 (4.2.3.9.4) wurde mit *XbaI* verdaut und nach Excision eines 424 bp großen Fragments selbst religiert.

4.2.3.9.6 Klonierung des Plasmids pNRF2722Strep

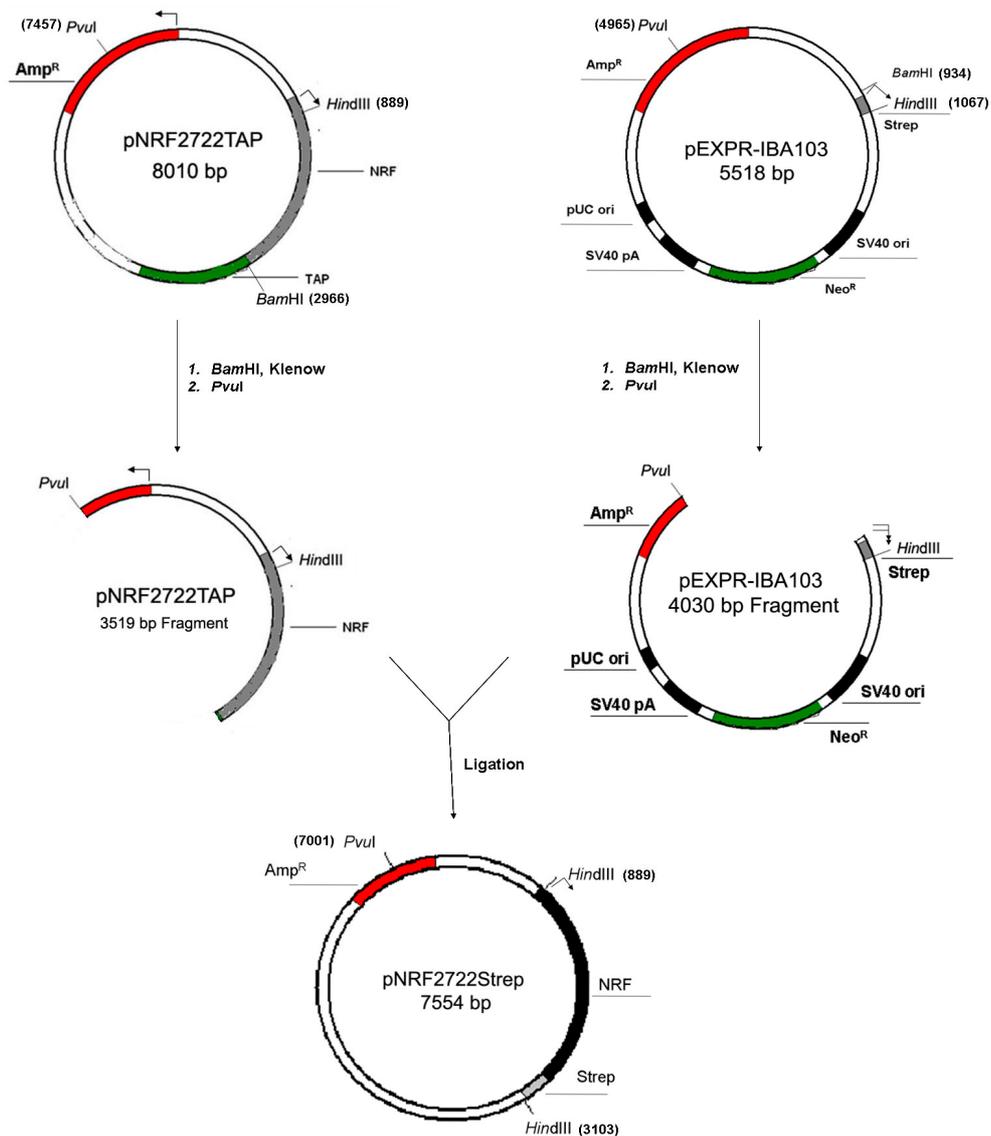


Abb. 4.7 Herstellung von pNRF2722Strep auf der Basis des eukaryontischen Expressionsvektors pEXPR-IBA103 (IBA BioTAGnology)

Für die Klonierung wurden sowohl der Zielvektor als auch das Donorplasmid zunächst mit *BamHI* linearisiert. Die kohäsiven Enden wurden mit Klenow-Fragment aufgefüllt. Anschließend wurden die Plasmide mit *PvuII* verdaut. Das die NRF-cDNA enthaltenden Fragment wurde mit dem entsprechenden Fragment aus pEXPR-IBA 103 ligiert. Beide Plasmide basieren auf dem pcDNA3-Vektor, die Selektion erfolgte über die Ampicillin-Resistenz (*Amp^R*).

4.2.4 Arbeiten mit Proteinen

4.2.4.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentrationsbestimmung wurde nach der Bradford-Methode durchgeführt. Dazu wurde zunächst eine Eichreihe aus unterschiedlichen Konzentrationen BSA in PBS erstellt (4.1.5). Jeweils 100 µl der Eichreihenwerte sowie Verdünnungen (1:200, 1:400) der Proben in PBS wurden in Vertiefungen einer 96-Loch Mikrotiterplatte (Nunc) überführt. Nach Zugabe von jeweils 100 µl 40% (v/v) Protein Assay Lösung (Bio-Rad) und Inkubation für 5 Minuten bei RT wurde die Extinktion der Eichreihe sowie der Probenverdünnungen bei einer Wellenlänge von 595 nm als Doppelbestimmungen gemessen. Zur Kontrolle wurden anhand der Konzentrationsbestimmung ermittelte Proteinmengen zusammen mit definierten Mengen an BSA über eine SDS-PAGE aufgetrennt und durch Färbung mittels CBB visualisiert (4.2.4.3; 4.2.4.5).

4.2.4.2 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Zum Aufkonzentrieren (und Entsalzen) von Proteinlösungen wurden Centricon® Centrifugal Filter devices (Millipore) verwendet. Diese wurden zunächst mit je 2 ml Wasser (Millipore) befüllt und für 10 Minuten bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Membran nach Umdrehen erneut für 5 min und 1000 x g trocken zentrifugiert. Die Membran wurde anschließend durch Befüllen der Küvette mit 1% (w/v) BSA in PBS über Nacht bei 4°C abgesättigt. Am folgenden Tag wurde das Probenreservoir mehrfach mit Wasser gespült. Anschließend wurde die Küvette mit Wasser befüllt und zentrifugiert (s.o.).

Für die Aufkonzentrierung wurde die Küvette mit der entsprechenden Probe befüllt und durch Zentrifugation bei 4°C und 5000 x g bis zum gewünschten Volumen eingengt, wobei in Abständen die Membran mit dem enthaltenen Probenvolumen gespült wurde. Nach Abschluss der Aufkonzentrierung wurde die Membran umgedreht und die Probe in einen Auffangbehälter zentrifugiert (5 min, 1000 x g).

4.2.4.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteingemischen nach dem Molekulargewicht (MW) wurde eine diskontinuierliche, denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet. Dabei setzten sich Sammel- und Trenngel folgendermaßen zusammen (**Tab. 4.3**, finale Konzentrationen):

Substanz	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid ¹⁾	10%	4.5%
Glycerol	375 mM	-
SDS	0.1%	0.1%
TEMED	0.17%	0.4%
APS	0.07%	0.07%

Tab. 4.3 Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels in der SDS-PAGE

¹⁾ Rotiphorese Gel 30 (37.5:1 Acrylamid/Bisacrylamid, Carl Roth GmbH & Co.)

Für die Polymerisation wurde das Trenngelgemisch mit Isobutanol überschichtet und für ca. 45-60 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Alkohol vom auspolymerisierten Trenngel abgenommen und Reste mittels 3MM-Filterpapier (Whatman) entfernt. Das Trenngel wurde mit dem Sammelgelgemisch überschichtet, wobei ein eingesetzter Kamm die Probenauftragstaschen erzeugte. Das Sammelgel wurde ca. 20-30 Minuten auspolymerisiert, anschließend wurde das komplette Gel bis zum Gebrauch (frühestens nach 24 Std.) feucht bei 4°C gelagert. Zur Trennung der Proteine wurde die entsprechende Probe mit ¼ Volumen an Roti®Load (Carl Roth GmbH & Co.) versetzt und für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht. Die abgekühlte Probe wurde kurz zentrifugiert (1 min, max. Umdrehung), auf das Sammelgel geladen und für 1-2 Std. bei einer angelegten Stromstärke von 45 mA/Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

4.2.4.4 Elektrophoretischer Membrantransfer von Proteinen (Western Blot, semi-dry)

a) Transfer nicht radioaktiv markierter Proteine auf PVDF-Membranen

Für weitere Analysen bzw. den spezifischen Nachweis von Proteinen wurden diese nach der elektrophoretischen Auftrennung (4.2.4.3) mittels des Semidry elektroblotter HEP-1/HEP-3 (Panther) auf eine Membran transferiert.

Zu diesem Zweck wurde das Polyacrylamidgel bis zum Transfer in Kathodenpuffer (Roti®Blot K, Carl Roth GmbH & Co.) äquilibriert. Eine PVDF-Membran gleicher Fläche wurde zunächst kurz in 100% (v/v) Methanol aktiviert, dann in Wasser (Millipore) geschwenkt und bis zum Gebrauch in Anodenpuffer (Roti®Blot A, Carl Roth GmbH & Co.) inkubiert. Aus 3MM-Filterpapier (Whatman) wurden acht Filter derselben Größe hergestellt und jeweils die Hälfte in Kathoden- bzw. Anodenpuffer inkubiert. Für den Transfer wurden die einzelnen Komponenten in Richtung Kathode-Anode folgendermaßen geschichtet: vier 3MM-Filter (Kathodenpuffer), Gel, Membran,

vier 3MM-Filter (Anodenpuffer). Luftblasen wurden ggf. herausgestrichen. Nach Schließen der Apparatur erfolgte der Transfer für 75 Minuten bei einer angelegten Stromstärke von $1\text{mA}/\text{cm}^2$.

b) Transfer radioaktiv markierter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen

Der Transfer radioaktiv markierter Proteine erfolgte prinzipiell ähnlich dem nicht markierter Proteine. Abweichend vom Roti®Blot-Puffersystem wurde ein Phosphoblot-Puffer (4.1.3) verwendet, in dem Gel, Membran sowie 3MM-Filterpapiere inkubiert wurden. Die verwendete Nitrozellulosemembran wurde zuvor kurz in Wasser (Millipore) angefeuchtet. Der Aufbau der Apparatur erfolgte analog zu a). Der Transfer der Proteine wurde für 2 Std. bei einer angelegten Stromstärke von $2\text{mA}/\text{cm}^2$ durchgeführt.

4.2.4.5 Proteinfärbungen

a) Gelfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blau (CBB)

Für die Visualisierung von Proteinen nach erfolgter SDS-PAGE wurde das Polyacrylamidgel zunächst für 30-60 Minuten bei RT in Coomassie Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde das Gel in Entfärber für 2 Std. bis über Nacht bei RT entfärbt.

b) Färbung auf Nitrozellulosemembranen mit Ponceau S

Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembranen lassen sich Proteine durch Ponceau S anfärben. Dazu wurde die Membran für fünf Minuten bei RT in einer Ponceau S Färbelösung geschwenkt und anschließend bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden in Wasser (Millipore) entfärbt.

4.2.4.6 Nachweis von NRF-Strep

Der Nachweis NRF-Strep aus Lysaten transfizierter Zellen erfolgte durch Detektion der Strepmarkierung mittels des Streptavidinderivates Strep-Tactin® (IBA BioTAGnology). Dazu wurden Rohlysate bzw. präpariertes NRF-Strep mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert (4.2.4.3; 4.2.4.4 a)).

Die Membran wurde anschließend durch Inkubation in Absättigungslösung I für eine Stunde bei RT bzw. bei 4°C über Nacht auf einem Schwenktisch abgesättigt. Die folgenden Schritte wurden unter Schwenken bei RT statt. Die Membran wurde dreimal für fünf Minuten mit TBS-T gewaschen und anschließend für eine Std. mit HRP-konjugiertem Strep-Tactin® (1:4000 in TBS-T) inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membran, zweimal TBS-T, einmal TBS, für jeweils fünf Minuten wurde die Membran mittels des SuperSignal® West pico Chemoluminescent Substrate Kits entwickelt. Zur Detektion wurde ein ECL-Film (Amersham) entsprechend den experimentellen Angaben (2.8 ff.) aufgelegt.

4.2.4.7 Präparation rekombinanter GST-NRF-Fusionsproteinen aus *E. coli* BL21

Nach der Induktion durch IPTG wurden die in *E. coli* BL21 produzierten GST-Fusionsproteine aus Lysaten präpariert. Die zu diesem Zweck verwendete Glutathion-(GSH-) Sepharose (Amersham Biosciences) wurde zunächst dreimal mit dem zehnfachen Bettvolumen PBS¹⁾ (100 µM PMSF) gewaschen. Anschließend wurde durch Zugabe des entsprechenden Volumens an PBS¹⁾ eine 50% (v/v) GSH-Sepharose hergestellt. Die Bakterienpellets wurden auf Eis aufgetaut, in 1/20 Kulturvol. PBS¹⁾ resuspendiert und a`5 ml aliquotiert. Um die Bakterien zu lysieren, wurde die Suspension auf Eis für insgesamt fünf Minuten Ultraschallpulsen (Branson Sonifier, Mikrospitze/Stufe 4) ausgesetzt. Dem Lysat wurde anschließend 1% Triton X-100 (finale Konzentration) zugefügt und dieses unter Rotation bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellwandtrümmer für 15 Minuten bei 15000 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1/100 Lysatvolumen an GSH-Sepharose versetzt und über Nacht bei 4°C über Kopf rotierend inkubiert. Am folgenden Tag wurde die GSH-Sepharose abzentrifugiert (5 min, 500 x g) und dreimal mit dem zehnfachen Bettvolumen PBS gewaschen. Die Elution der GST-Fusionsproteine erfolgte durch ein- bis dreimalige rotierende Inkubation der Sepharosematrix bei 4°C in GSH-Elutionspuffer.

4.2.4.8 Präparation von überexprimiertem NRF-Strep aus HeLa-Zellen

a) Säulenchromatographische Präparation von nicht markiertem NRF-Strep

Für die Präparation wurden zunächst die bei -80°C gelagerten Lysate auf Eis aufgetaut und für eine Std. bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert. Ein Teil des Überstandes wurde für eine Analyse (4.2.4.6) abgenommen, der restliche Überstand auf eine Strep-Tactin® Superflow Säule (1 ml) gegeben. Entsprechend den Angaben des Herstellers (IBA BioTAGnology) wurde die Säule nach Durchfluss der Probe gewaschen und das Protein anschließend fraktioniert eluiert (OneSTrEP™ Kit*). Rohlysat, Durchfluss, Wasch- und Eluatfraktionen wurden auf ihren NRF-Strep-Gehalt analysiert (4.2.4.6) und die wesentlichen Eluatfraktionen anschließend vereinigt und vor der weiteren Charakterisierung aufkonzentriert (4.2.4.2). Die Säulen wurden nach Regeneration der Säulenmatrix wiederverwendet.

b) Präparation von radioaktiv markiertem NRF-Strep (*Batch-Verfahren*)

Ausgehend von der Strep-Tactin® Superflow Säule (1 ml) wurde eine 50% Matrix hergestellt, die dreimal mit dem zehnfachen Bettvolumen Gesamtzellysepuffer äquilibriert wurde. Jeweils 20 µl Bettvolumen der äquilibrierten 50% Strep-Tactin®-Matrix wurden zum Lysat gegeben und unter Schütteln bei 4°C für zwei Std. inkubiert. Die Matrix wurde abzentrifugiert (1 min, max. Umdrehung) und viermal mit jeweils dem dreifachen Bettvolumen Waschpuffer*⁾ gewaschen,

das Protein anschließend durch Aufkochen der Matrix für 5 Minuten bei 95°C in 50 µl Roti@Load eluiert.

4.2.4.9 *In vitro* Phosphorylierung von GST-NRF-Fusionsproteinen (Kinase-Assay)

Um die Phosphorylierung von NRF (in Abhängigkeit verschiedener Stimuli) *in vitro* zu untersuchen, wurde einerseits der Kinaseenzymtest (Kinase-Assay) verwendet. Dazu wurde jeweils 2 µg rekombinantes GST-NRF-Fusionsprotein (4.2.4.7) zusammen mit 5 (10) µg Kernprotein aus HeLa B- bzw. HEK 293R1-Zellen unter Zusatz von 1/5 Vol. 5x Reaktionspuffer und 500 µM ATP/0.1 µCi/µl γ -³²P ATP (Amersham) in einem Reaktionsvolumen von 40 µl für 30 Minuten bei 30°C inkubiert (**Tab. 4.3**). Für die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurde GSH-Sepharose zunächst durch Waschen mit dem zehnfachen Bettvolumen an Quencherpuffer äquilibriert und anschließend durch Zugabe des entsprechenden Volumens Quencherpuffer eine 50% Matrix hergestellt. Je 40 µl 50% GSH-Sepharose wurden zum Reaktionsansatz gegeben und dieser unter Schütteln für weitere 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Sepharose für zwei Minuten bei max. Umdrehung in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und dreimal mit dem zehnfachen Bettvolumen an Waschpuffer gewaschen. Die Elution der Proteine geschah durch Aufkochen der GSH-Sepharose in jeweils 20 µl Roti@Load (Bio-Rad) (5 min, 95°C). Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Phosphorylierung durch Autoradiographie gegen einen Röntgenfilm (Kodak) detektiert. Eine Quantifizierung wurde mit dem Programm *Image J 1.38x* durchgeführt.

4.2.4.10 Phosphoaminosäureanalyse

Für die Untersuchung des Gehaltes der Phosphoaminosäuren (Phosphoserin, -threonin und -tyrosin) wurden die GST-NRF-Fusionsproteine analog zu 4.2.4.9 *in vitro* phosphoryliert und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt (4.2.4.3). Die einzigen Ausnahmen bildeten die Verwendung von 1 µCi/µl γ -³²P ATP (Amersham) ohne Zusatz von ATP sowie eine Reaktionszeit von 60 Minuten.

Nach erfolgter SDS-PAGE wurden die Proteine mittels CBB angefärbt (4.2.4.5) und aus dem Gel ausgeschnitten. Das enthaltene Protein wurde durch Inkubation in jeweils 100 µl 6 N HCl (1 Std., 110°C) sauer hydrolysiert. Der Reaktionsansatz wurde auf RT abgekühlt und die Salzsäure nach Zugabe von 100 µl Wasser (Millipore) in einer Vakuumzentrifuge mit Kühlfalle zur Trockene verdampft. Die Ausbeute an Aktivität wurde durch Messung der Proben im Szintillationszähler (Perkin Elmer) verfolgt. Der Rückstand wurde anschließend in ca. 10 µl Elektrophoresepuffer I aufgenommen und die cpm/µl bestimmt. Die folgenden Arbeitsschritte wurden entsprechend den Angaben von Cooper [Cooper *et al.*, 1983] durchgeführt. Jeweils

gleiche Volumina wurden zusammen mit 0.5 µl Phosphoaminosäurestandard (1 mg/ml) auf DC-Folien (20x20 cm Zellulose, Merck) aufgetropft und im Luftstrom getrocknet. Die DC-Folie wurde anschließend mit Elektrophoresepuffer I befeuchtet und die Proben bei 900 V für 30 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt (Desaphor HF, Desaga GmbH). Nach Abschluss der Elektrophorese wurde die DC-Folie im Luftstrom getrocknet und mit Elektrophoresepuffer II befeuchtet. Die Elektrophorese in der zweiten Dimension wurde 90° zur ersten Dimension für 30 Minuten bei 900 Volt durchgeführt. Die DC-Folie wurde anschließend erneut im Luftstrom getrocknet und mit einem Ninhydrin-Färbereagens besprüht. Die Entwicklung des Phosphoaminosäurestandards erfolgte bei 80°C für 5-10 Minuten. Die Detektion der radioaktiv markierten Phosphoaminosäuren geschah mittels Autoradiographie der DC-Folie gegen einen Röntgenfilm (Kodak). Für eine Quantifizierung wurden die Phosphoaminosäuren enthaltenden Bereiche ausgeschnitten und in Szintillatorflüssigkeit die Zerfälle/Minute (Dpm) gemessen.

4.2.4.11 Phosphopeptidkartierung (Phosphopeptide Mapping)

Für die Phosphopeptidkartierung radioaktiv markierten Proteins wurden GST-NRF-Fusionsproteine entsprechend den Angaben in 4.2.4.10 *in vitro* phosphoryliert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte der elektrophoretische Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (4.2.4.4) sowie die Proteinfärbung durch Ponceau S (4.2.4.5).

Die Transfereffizienz sowie die Effizienz aller weiteren Schritte wurde mittels Autoradiographie der Membran sowie des Gels vor bzw. nach dem Transfer gegen einen Röntgenfilm (Kodak) und Probenmessung im Szintillationszähler (Perkin Elmer) verfolgt. Im Anschluss wurden die Proteinbanden aus der Membran ausgeschnitten und für 30 Minuten bei 37°C in Absättigungslösung II unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde fünfmal mit je 1 ml Wasser (Millipore) und zweimal in 50 mM NH₄HCO₃ gewaschen. Anschließend wurde das Protein durch Inkubation der Membran für zwei Stunden in Proteolysepuffer mit 50 µg/ml Trypsin (Roche) und nach erneuter Zugabe von 10 µg Trypsin für weitere zwei Stunden proteolytisch verdaut. Der Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und die Membran mit Wasser gespült. Waschfraktion und Überstand wurden vereinigt und in der Vakuumzentrifuge (Savant) zur Trockene eingengt. Dieser Schritt wurde ein- bis zweimal wiederholt.

Im Anschluss wurden Methionin- und Cysteinreste der Peptide durch Perameisensäure oxidiert. Für die Darstellung von Perameisensäure wurden 900 µl Ameisensäure zusammen mit 100 µl H₂O₂ für eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend für 15 Minuten auf Eis gelagert. Die Peptidrockensubstanz wurde in 50 µl der Perameisensäure gelöst und für 60 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 400 µl Wasser (Millipore) aufgefüllt und für 30 Minuten bei -80°C gefroren. Der Ansatz wurde in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockene

eingengt, in 50 µl Elektrophoresepuffer II aufgenommen und erneut eingengt. Im Anschluss wurde die Trockensubstanz in Elektrophoresepuffer II gelöst und ihre Volumenaktivität (cpm) im Szintillationszähler gemessen.

Die Phosphopeptidkartierung in zwei Dimension mittels Dünnschichtelektrophorese und – chromatographie wurde entsprechend den Angaben von Boyle *et al.* [Boyle *et al.*, 1991] durchgeführt. Dazu wurde die Probe auf eine DC-Folie (Merck) aufgetropft und im Luftstrom eingetrocknet. Als Referenz wurden in der gleichen Höhe 0.5 µl der Referenzfarbstofflösung aufgetropft und getrocknet. Die Folie wurde anschließend mit Elektrophoresepuffer II befeuchtet und die Probe für 30 Minuten bei 1000 V elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss wurde die Folie im Luftstrom getrocknet. Die chromatographische Auftrennung erfolgte um 90° gedreht in der zweiten Dimension für 12-16 Std. in mit Isobuttersäurepuffer gefüllten Chromatographietanks. Als Laufreferenz diente erneut Referenzfarbstofflösung (0.5 µl). Die Detektion der Phosphopeptide geschah mittels Autoradiographie der getrockneten DC-Folie gegen einen Röntgenfilm (Kodak).

4.2.4.12 Massenspektrometrische (MS) Untersuchung der Proteinphosphorylierung

Für die massenspektrometrischen Untersuchungen wurde aus HeLa ACC57-Zellen präpariertes NRF-Strep (4.2.4.8 a) mittels präparativer SDS-PAGE aufgetrennt, eine parallel durchgeführte analytische SDS-PAGE, gefolgt von einem Western Blot und Detektion von NRF-Strep diente als Kontrolle. Die CBB gefärbte Proteinbande wurde aus dem präparativen Gel geschnitten und für die weiteren MS-Analysen der Firma Panatecs übergeben.

4.2.5 Computer-gestützte (*in silico*) Vorhersage von Phosphorylierungsstellen

Für die Vorhersage potenzieller Phosphorylierungsstellen innerhalb der Aminosäuresequenz von NRF wurden mehrere frei zugängliche Programme verwendet (4.1.11). Für die Vorhersage wurden die Programme jeweils mit der vollständigen NRF-Primärstruktur gespeist und den Anweisungen entsprechend verwendet.

- Aguilera,C., Fernandez-Majada,V., Ingles-Esteve,J., Rodilla,V., Bigas,A., and Espinosa,L. (2006). Efficient nuclear export of p65-IkappaBalpha complexes requires 14-3-3 proteins. *J. Cell Sci.* **119**, 3695-3704.
- Alcorn,M.J., Booth,J.L., Coggeshall,K.M., and Metcalf,J.P. (2001). Adenovirus type 7 induces interleukin-8 production via activation of extracellular regulated kinase 1/2. *J. Virol.* **75**, 6450-6459.
- Alexopoulou,L., Holt,A.C., Medzhitov,R., and Flavell,R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738.
- Allen,M., Friedler,A., Schon,O., and Bycroft,M. (2002). The structure of an FF domain from human HYPA/FBP11. *J. Mol. Biol.* **323**, 411-416.
- Aupperle,K., Bennett,B., Han,Z., Boyle,D., Manning,A., and Firestein,G. (2001). NF-kappa B regulation by I kappa B kinase-2 in rheumatoid arthritis synoviocytes. *J. Immunol.* **166**, 2705-2711.
- Avruch,J., Witters,L.A., Alexander,M.C., and Bush,M.A. (1978). Effects of glucagon and insulin on cytoplasmic protein phosphorylation in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **253**, 4754-4761.
- Bachmann,M., Hennemann,H., Xing,P.X., Hoffmann,I., and Moroy,T. (2004). The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 phosphorylates and inhibits the activity of Cdc25C-associated kinase 1 (C-TAK1): a novel role for Pim-1 at the G2/M cell cycle checkpoint. *J. Biol. Chem.* **279**, 48319-48328.
- Baggiolini,M. and Clark-Lewis,I. (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* **307**, 97-101.
- Baggiolini,M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**, 565-568.
- Barboric,M., Nissen,R.M., Kanazawa,S., Jabrane-Ferrat,N., and Peterlin,B.M. (2001). NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell* **8**, 327-337.
- Bardwell,L. (2006). Mechanisms of MAPK signalling specificity. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 837-841.
- Barksby,H.E., Lea,S.R., Preshaw,P.M., and Taylor,J.J. (2007). The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin. Exp. Immunol.* **149**, 217-225.
- Barnes,B.J., Kellum,M.J., Field,A.E., and Pitha,P.M. (2002). Multiple regulatory domains of IRF-5 control activation, cellular localization, and induction of chemokines that mediate recruitment of T lymphocytes. *Mol. Cell Biol.* **22**, 5721-5740.
- Barsyte-Lovejoy,D., Galanis,A., and Sharrocks,A.D. (2002). Specificity determinants in MAPK signaling to transcription factors. *J. Biol. Chem.* **277**, 9896-9903.
- Bartels,M. (2006). Untersuchung molekularer Mechanismen der NF-λB/NRF (NF-λB reprimierender Faktor)-Interaktion und ihre Rolle bei der Transkriptionsregulation. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Dissertation.
- Beausoleil,S.A., Jedrychowski,M., Schwartz,D., Elias,J.E., Villen,J., Li,J., Cohn,M.A., Cantley,L.C., and Gygi,S.P. (2004). Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 12130-12135.
- Bennett,B.L., Sasaki,D.T., Murray,B.W., O'Leary,E.C., Sakata,S.T., Xu,W., Leisten,J.C., Motiwala,A., Pierce,S., Satoh,Y., Bhagwat,S.S., Manning,A.M., and Anderson,D.W. (2001). SP600125, an anthracycline inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 13681-13686.

- Bentley,D. (2002). The mRNA assembly line: transcription and processing machines in the same factory. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 , 336-342.
- Biondi,R.M. and Nebreda,A.R. (2003). Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem. J.* 372, 1-13.
- Blom,N., Gammeltoft,S., and Brunak,S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 294, 1351-1362.
- Blom,N., Sicheritz-Ponten,T., Gupta,R., Gammeltoft,S., and Brunak,S. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4, 1633-1649.
- Bocker,U., Schottelius,A., Watson,J.M., Holt,L., Licato,L.L., Brenner,D.A., Sartor,R.B., and Jobin,C. (2000). Cellular differentiation causes a selective down-regulation of interleukin (IL)-1beta-mediated NF-kappaB activation and IL-8 gene expression in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 275, 12207-12213.
- Bogoyevitch,M.A. and Kobe,B. (2006). Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 1061-1095.
- Booth,J.L., Coggeshall,K.M., Gordon,B.E., and Metcalf,J.P. (2004). Adenovirus type 7 induces interleukin-8 in a lung slice model and requires activation of Erk. *J. Virol.* 78, 4156-4164.
- Boyle,W.J., van der,G.P., and Hunter,T. (1991). Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by two-dimensional separation on thin-layer cellulose plates. *Methods Enzymol.* 201, 110-149.
- Brasier,A.R., Jamaluddin,M., Casola,A., Duan,W., Shen,Q., and Garofalo,R.P. (1998). A promoter recruitment mechanism for tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 transcription in type II pulmonary epithelial cells. Dependence on nuclear abundance of Rel A, NF-kappaB1, and c-Rel transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273, 3551-3561.
- Bruder,J.T. and Kovetski,I. (1997). Adenovirus infection stimulates the Raf/MAPK signaling pathway and induces interleukin-8 expression. *J. Virol.* 71, 398-404.
- Buchberger,A., Valencia,A., McMacken,R., Sander,C., and Bukau,B. (1994). The chaperone function of DnaK requires the coupling of ATPase activity with substrate binding through residue E171. *EMBO J.* 13, 1687-1695.
- Buss,H., Dorrie,A., Schmitz,M.L., Frank,R., Livingstone,M., Resch,K., and Kracht,M. (2004). Phosphorylation of serine 468 by GSK-3beta negatively regulates basal p65 NF-kappaB activity. *J. Biol. Chem.* 279, 49571-49574.
- Carter,A.N. (1997). Assays of Protein Kinases Using Exogenous Substrates. *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Carter,R.S., Pennington,K.N., Ungurait,B.J., and Ballard,D.W. (2003). In vivo identification of inducible phosphoacceptors in the IKKgamma/NEMO subunit of human I kappa B kinase. *J. Biol. Chem.* 278, 19642-19648.
- Carty,S.M., Goldstrohm,A.C., Sune,C., Garcia-Blanco,M.A., and Greenleaf,A.L. (2000). Protein-interaction modules that organize nuclear function: FF domains of CA150 bind the phosphoCTD of RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 9015-9020.
- Chantome,A., Pance,A., Gauthier,N., Vandroux,D., Chenu,J., Solary,E., Jeannin,J.F., and Reveneau,S. (2004). Casein kinase II-mediated phosphorylation of NF-kappaB p65 subunit enhances inducible nitric-oxide synthase gene transcription in vivo. *J. Biol. Chem.* 279, 23953-23960.

- Charter,N.W., Kauffman,L., Singh,R., and Eglén,R.M. (2006). A generic, homogenous method for measuring kinase and inhibitor activity via adenosine 5'-diphosphate accumulation. *J. Biomol. Screen.* *11*, 390-399.
- Chen,Z.J. (2005). Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat. Cell Biol.* *7*, 758-765.
- Clifton,A.D., Young,P.R., and Cohen,P. (1996). A comparison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAP kinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress. *FEBS Lett.* *392*, 209-214.
- Cohen,P. (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 596-601.
- Cook,P.F., Neville,M.E., Jr., Vrana,K.E., Hartl,F.T., and Roskoski,R., Jr. (1982). Adenosine cyclic 3',5'-monophosphate dependent protein kinase: kinetic mechanism for the bovine skeletal muscle catalytic subunit. *Biochemistry* *21*, 5794-5799.
- Cooper,J.A., Sefton,B.M., and Hunter,T. (1983). Detection and quantification of phosphotyrosine in proteins. *Methods Enzymol.* *99*, 387-402.
- Czernik,A.J., Girault,J.A., Nairn,A.C., Chen,J., Snyder,G., Kebedian,J., and Greengard,P. (1991). Production of phosphorylation state-specific antibodies. *Methods Enzymol.* *201*, 264-283.
- Davis,R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* *103*, 239-252.
- Deak,M., Clifton,A.D., Lucocq,L.M., and Alessi,D.R. (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J.* *17*, 4426-4441.
- Dhanasekaran,D.N. and Johnson,G.L. (2007). MAPKs: function, regulation, role in cancer and therapeutic targeting. *Oncogene* *26*, 3097-3099.
- Dhanasekaran,N. and Premkumar,R.E. (1998). Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* *17*, 1447-1455.
- Dreikhausen,U., Hiebenthal-Millow,K., Bartels,M., Resch,K., and Nourbakhsh,M. (2005). NF-kappaB-repressing factor inhibits elongation of human immunodeficiency virus type 1 transcription by DRB sensitivity-inducing factor. *Mol. Cell Biol.* *25*, 7473-7483.
- Duclos,B., Marcandier,S., and Cozzone,A.J. (1991). Chemical properties and separation of phosphoamino acids by thin-layer chromatography and/or electrophoresis. *Methods Enzymol.* *201*, 10-21.
- Dunker,A.K., Brown,C.J., Lawson,J.D., Iakoucheva,L.M., and Obradovic,Z. (2002). Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry* *41*, 6573-6582.
- Edmunds,J.W. and Mahadevan,L.C. (2004). MAP kinases as structural adaptors and enzymatic activators in transcription complexes. *J. Cell Sci.* *117*, 3715-3723.
- English,J.M. and Cobb,M.H. (2002). Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* *23*, 40-45.
- Fantz,D.A., Jacobs,D., Glossip,D., and Kornfeld,K. (2001). Docking sites on substrate proteins direct extracellular signal-regulated kinase to phosphorylate specific residues. *J. Biol. Chem.* *276*, 27256-27265.
- Feng,X., Guo,Z., Nourbakhsh,M., Hauser,H., Ganster,R., Shao,L., and Geller,D.A. (2002). Identification of a negative response element in the human inducible nitric-oxide synthase (iNOS) promoter: The role of

- NF-kappa B-repressing factor (NRF) in basal repression of the hiNOS gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 14212-14217.
- Ferreira,L., Villar,E., and Munoz-Barroso,I. (2004). Gangliosides and N-glycoproteins function as Newcastle disease virus receptors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2344-2356.
- Firulli,B.A., Virshup,D.M., and Firulli,A.B. (2004). Phosphopeptide mapping of proteins ectopically expressed in tissue culture cell lines. *Biol. Proced. Online.* **6**, 16-22.
- Fisher,R.P. (2005). Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *J. Cell Sci.* **118**, 5171-5180.
- Fisher,S.N., Kim,Y.U., and Shin,M.L. (1994). Tyrosine kinase activation by Newcastle disease virus is required for TNF-alpha gene induction in astrocytes. *J. Immunol.* **153**, 3210-3217.
- Frangioni,J.V. and Neel,B.G. (1993). Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal. Biochem.* **210**, 179-187.
- Froese,N., Schwarzer,M., Niedick,I., Frischmann,U., Koster,M., Kroger,A., Mueller,P.P., Nourbakhsh,M., Pasche,B., Reimann,J., Staeheli,P., and Hauser,H. (2006). Innate immune responses in NF-kappaB-repressing factor-deficient mice. *Mol. Cell Biol.* **26**, 293-302.
- Fu,A.K., Fu,W.Y., Ng,A.K., Chien,W.W., Ng,Y.P., Wang,J.H., and Ip,N.Y. (2004). Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates signal transducer and activator of transcription 3 and regulates its transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 6728-6733.
- Fu,H., Subramanian,R.R., and Masters,S.C. (2000). 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 617-647.
- Galanis,A., Yang,S.H., and Sharrocks,A.D. (2001). Selective targeting of MAPKs to the ETS domain transcription factor SAP-1. *J. Biol. Chem.* **276**, 965-973.
- Garoufalis,E., Kwan,I., Lin,R., Mustafa,A., Pepin,N., Roulston,A., Lacoste,J., and Hiscott,J. (1994). Viral induction of the human beta interferon promoter: modulation of transcription by NF-kappa B/rel proteins and interferon regulatory factors. *J. Virol.* **68**, 4707-4715.
- Garrison,J.C. and Wagner,J.D. (1982). Glucagon and the Ca²⁺-linked hormones angiotensin II, norepinephrine, and vasopressin stimulate the phosphorylation of distinct substrates in intact hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **257**, 13135-13143.
- Gasch,A., Wiesner,S., Martin-Malpartida,P., Ramirez-Espain,X., Ruiz,L., and Macias,M.J. (2006). The structure of Prp40 FF1 domain and its interaction with the crn-TPR1 motif of Clf1 gives a new insight into the binding mode of FF domains. *J. Biol. Chem.* **281**, 356-364.
- Georganas,C., Liu,H., Perlman,H., Hoffmann,A., Thimmapaya,B., and Pope,R.M. (2000). Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: the dominant role for NF-kappa B but not C/EBP beta or c-Jun. *J. Immunol.* **165**, 7199-7206.
- Gilmore,T.D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680-6684.
- Gnad,F., Ren,S., Cox,J., Olsen,J.V., Macek,B., Oroshi,M., and Mann,M. (2007). PHOSIDA (phosphorylation site database): management, structural and evolutionary investigation, and prediction of phosphosites. *Genome Biol.* **8**, R250.

- Griffin,B.D. and Moynagh,P.N. (2006). Persistent interleukin-1beta signaling causes long term activation of NFkappaB in a promoter-specific manner in human glial cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 10316-10326.
- Gupta,S., Barrett,T., Whitmarsh,A.J., Cavanagh,J., Sluss,H.K., Derijard,B., and Davis,R.J. (1996). Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* *15*, 2760-2770.
- Gustin,J.A., Pincheira,R., Mayo,L.D., Ozes,O.N., Kessler,K.M., Baerwald,M.R., Korgaonkar,C.K., and Donner,D.B. (2004). Tumor necrosis factor activates CRE-binding protein through a p38 MAPK/MSK1 signaling pathway in endothelial cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol* *286*, C547-C555.
- Hayden,M.S. and Ghosh,S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* *18*, 2195-2224.
- Hayden,M.S., West,A.P., and Ghosh,S. (2006). NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* *25*, 6758-6780.
- Hermeking,H. (2003). The 14-3-3 cancer connection. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 931-943.
- Hiscott,J., Nguyen,T.L., Arguello,M., Nakhaei,P., and Paz,S. (2006). Manipulation of the nuclear factor-kappaB pathway and the innate immune response by viruses. *Oncogene* *25*, 6844-6867.
- Hjerrild,M., Stensballe,A., Rasmussen,T.E., Kofoed,C.B., Blom,N., Sicheritz-Ponten,T., Larsen,M.R., Brunak,S., Jensen,O.N., and Gammeltoft,S. (2004). Identification of phosphorylation sites in protein kinase A substrates using artificial neural networks and mass spectrometry. *J. Proteome. Res.* *3*, 426-433.
- Hjerrild,M. and Gammeltoft,S. (2006). Phosphoproteomics toolbox: computational biology, protein chemistry and mass spectrometry. *FEBS Lett.* *580*, 4764-4770.
- Hoffmann,A. and Baltimore,D. (2006). Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol. Rev.* *210*, 171-186.
- Hoffmann,A., Natoli,G., and Ghosh,G. (2006). Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* *25*, 6706-6716.
- Hoffmann,E., Dittrich-Breiholz,O., Holtmann,H., and Kracht,M. (2002). Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* *72*, 847-855.
- Holtmann,H., Winzen,R., Holland,P., Eickemeier,S., Hoffmann,E., Wallach,D., Malinin,N.L., Cooper,J.A., Resch,K., and Kracht,M. (1999). Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol. Cell Biol.* *19*, 6742-6753.
- Hunter,T. and Karin,M. (1992). The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* *70*, 375-387.
- Hunter,T. (2000). Signaling--2000 and beyond. *Cell* *100*, 113-127.
- Huxford,T., Malek,S., and Ghosh,G. (1999). Structure and mechanism in NF-kappa B/I kappa B signaling. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *64*, 533-540.
- Iakoucheva,L.M., Brown,C.J., Lawson,J.D., Obradovic,Z., and Dunker,A.K. (2002). Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. *J. Mol. Biol.* *323*, 573-584.
- Iakoucheva,L.M., Radivojac,P., Brown,C.J., O'Connor,T.R., Sikes,J.G., Obradovic,Z., and Dunker,A.K. (2004). The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* *32*, 1037-1049.

Ingham,R.J., Colwill,K., Howard,C., Dettwiler,S., Lim,C.S., Yu,J., Hersi,K., Raaijmakers,J., Gish,G., Mbamalu,G., Taylor,L., Yeung,B., Vassilovski,G., Amin,M., Chen,F., Matskova,L., Winberg,G., Ernberg,I., Linding,R., O'donnell,P., Starostine,A., Keller,W., Metalnikov,P., Stark,C., and Pawson,T. (2005). WW domains provide a platform for the assembly of multiprotein networks. *Mol. Cell Biol.* 25, 7092-7106.

Ito,Y. and Hosaka,Y. (1983). Component(s) of Sendai virus that can induce interferon in mouse spleen cells. *Infect. Immun.* 39, 1019-1023.

Jobin,C., Holt,L., Bradham,C.A., Streetz,K., Brenner,D.A., and Sartor,R.B. (1999). TNF receptor-associated factor-2 is involved in both IL-1 beta and TNF-alpha signaling cascades leading to NF-kappa B activation and IL-8 expression in human intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 162, 4447-4454.

Johnson,G.L. and Lapadat,R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.

Johnson,L.N., Lowe,E.D., Noble,M.E., and Owen,D.J. (1998). The Eleventh Datta Lecture. The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS Lett.* 430, 1-11.

Joyal,J.L., Crimmins,D.L., Thoma,R.S., and Sacks,D.B. (1996). Identification of insulin-stimulated phosphorylation sites on calmodulin. *Biochemistry* 35, 6267-6275.

Kallunki,T., Deng,T., Hibi,M., and Karin,M. (1996). c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell* 87, 929-939.

Kamps,M.P. and Sefton,B.M. (1989). Acid and base hydrolysis of phosphoproteins bound to immobilized facilitates analysis of phosphoamino acids in gel-fractionated proteins. *Anal. Biochem.* 176, 22-27.

Karin,M. and Hunter,T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.* 5, 747-757.

Karin,M. (1998). Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 851, 139-146.

Karin,M., Cao,Y., Greten,F.R., and Li,Z.W. (2002). NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer* 2, 301-310.

Kasahara,T., Mukaida,N., Yamashita,K., Yagisawa,H., Akahoshi,T., and Matsushima,K. (1991). IL-1 and TNF-alpha induction of IL-8 and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF) mRNA expression in a human astrocytoma cell line. *Immunology* 74, 60-67.

Kato,Y., Ito,M., Kawai,K., Nagata,K., and Tanokura,M. (2002). Determinants of ligand specificity in groups I and IV WW domains as studied by surface plasmon resonance and model building. *J. Biol. Chem.* 277, 10173-10177.

Kawasaki,H., Schiltz,L., Chiu,R., Itakura,K., Taira,K., Nakatani,Y., and Yokoyama,K.K. (2000). ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation. *Nature* 405, 195-200.

Kelkar,N., Gupta,S., Dickens,M., and Davis,R.J. (2000). Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3. *Mol. Cell Biol.* 20, 1030-1043.

Kobe,B., Kampmann,T., Forwood,J.K., Listwan,P., and Brinkworth,R.I. (2005). Substrate specificity of protein kinases and computational prediction of substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 1754, 200-209.

Kornblihtt,A.R., de la,M.M., Fededa,J.P., Munoz,M.J., and Nogues,G. (2004). Multiple links between transcription and splicing. *RNA*. 10, 1489-1498.

- Krause,A., Holtmann,H., Eickemeier,S., Winzen,R., Szamel,M., Resch,K., Saklatvala,J., and Kracht,M. (1998). Stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase is required for interleukin (IL)-1-induced IL-6 and IL-8 gene expression in the human epidermal carcinoma cell line KB. *J. Biol. Chem.* **273**, 23681-23689.
- Kumar,H., Kawai,T., Kato,H., Sato,S., Takahashi,K., Coban,C., Yamamoto,M., Uematsu,S., Ishii,K.J., Takeuchi,O., and Akira,S. (2006). Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *J. Exp. Med.* **203**, 1795-1803.
- Lamb,R.A., Paterson,R.G., and Jardetzky,T.S. (2006). Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures. *Virology* **344**, 30-37.
- Li,Z., David,G., Hung,K.W., DePinho,R.A., Fu,A.K., and Ip,N.Y. (2004). Cdk5/p35 phosphorylates mSds3 and regulates mSds3-mediated repression of transcription. *J. Biol. Chem.* **279**, 54438-54444.
- Lin,K.T., Lu,R.M., and Tarn,W.Y. (2004). The WW domain-containing proteins interact with the early spliceosome and participate in pre-mRNA splicing in vivo. *Mol. Cell Biol.* **24**, 9176-9185.
- Lindberg,R.A., Quinn,A.M., and Hunter,T. (1992). Dual-specificity protein kinases: will any hydroxyl do? *Trends Biochem. Sci.* **17**, 114-119.
- Linding,R., Jensen,L.J., Diella,F., Bork,P., Gibson,T.J., and Russell,R.B. (2003). Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure.* **11**, 1453-1459.
- Liu,J. and Lin,A. (2007). Wiring the cell signaling circuitry by the NF-kappa B and JNK1 crosstalk and its applications in human diseases. *Oncogene* **26**, 3267-3278.
- Loyet,K.M., Stults,J.T., and Arnott,D. (2005). Mass spectrometric contributions to the practice of phosphorylation site mapping through 2003: a literature review. *Mol. Cell Proteomics* **4**, 235-245.
- Lu,P.J., Zhou,X.Z., Shen,M., and Lu,K.P. (1999). Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* **283**, 1325-1328.
- Luecke,H.F. and Yamamoto,K.R. (2005). The glucocorticoid receptor blocks P-TEFb recruitment by NFkappaB to effect promoter-specific transcriptional repression. *Genes Dev.* **19**, 1116-1127.
- Lund,J.M., Alexopoulou,L., Sato,A., Karow,M., Adams,N.C., Gale,N.W., Iwasaki,A., and Flavell,R.A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 5598-5603.
- Luo,K., Hurley,T.R., and Sefton,B.M. (1990). Transfer of proteins to membranes facilitates both cyanogen bromide cleavage and two-dimensional proteolytic mapping. *Oncogene* **5**, 921-923.
- Luo,K.X., Hurley,T.R., and Sefton,B.M. (1991). Cyanogen bromide cleavage and proteolytic peptide mapping of proteins immobilized to membranes. *Methods Enzymol.* **201**, 149-152.
- Mann,M., Ong,S.E., Gronborg,M., Steen,H., Jensen,O.N., and Pandey,A. (2002). Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol.* **20**, 261-268.
- Manning,G., Whyte,D.B., Martinez,R., Hunter,T., and Sudarsanam,S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912-1934.
- Marshall,C.J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**, 179-185.

- McLeod, L.E., Wang, L., and Proud, C.G. (2001). beta-Adrenergic agonists increase phosphorylation of elongation factor 2 in cardiomyocytes without eliciting calcium-independent eEF2 kinase activity. *FEBS Lett.* **489**, 225-228.
- Mhawech, P. (2005). 14-3-3 proteins--an update. *Cell Res.* **15**, 228-236.
- Miller, J.L. and Anders, E.M. (2003). Virus-cell interactions in the induction of type 1 interferon by influenza virus in mouse spleen cells. *J. Gen. Virol.* **84**, 193-202.
- Mizutani, K., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2004). FBP11 regulates nuclear localization of N-WASP and inhibits N-WASP-dependent microspike formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 468-474.
- Mooney, L.M. and Whitmarsh, A.J. (2004). Docking interactions in the c-Jun N-terminal kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 11843-11852.
- Morris, D.P. and Greenleaf, A.L. (2000). The splicing factor, Prp40, binds the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **275**, 39935-39943.
- Morrison, D.K. and Davis, R.J. (2003). Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 91-118.
- Mukaida, N. (2000). Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int. J. Hematol.* **72**, 391-398.
- Mukhopadhyay, P., Ali, M.A., Nandi, A., Carreon, P., Choy, H., and Saha, D. (2006). The cyclin-dependent kinase 2 inhibitor down-regulates interleukin-1beta-mediated induction of cyclooxygenase-2 expression in human lung carcinoma cells. *Cancer Res.* **66**, 1758-1766.
- Murayama, T., Ohara, Y., Obuchi, M., Khabar, K.S., Higashi, H., Mukaida, N., and Matsushima, K. (1997). Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1- and NF-kappaB-binding sites of the interleukin-8 gene. *J. Virol.* **71**, 5692-5695.
- Nagai, Y., Hamaguchi, M., and Toyoda, T. (1989). Molecular biology of Newcastle disease virus. *Prog. Vet. Microbiol. Immunol.* **5**, 16-64.
- Niedick, I. (2000). Post-translationale Modifikation des Transkriptionsfaktors NRF. TU Braunschweig, Diplomarbeit.
- Niedick, I., Froese, N., Oumard, A., Mueller, P.P., Nourbakhsh, M., Hauser, H., and Koster, M. (2004). Nucleolar localization and mobility analysis of the NF-kappaB repressing factor NRF. *J. Cell Sci.* **117**, 3447-3458.
- Nociari, M., Ocheretina, O., Schoggins, J.W., and Falck-Pedersen, E. (2007). Sensing infection by adenovirus: Toll-like receptor-independent viral DNA recognition signals activation of the interferon regulatory factor 3 master regulator. *J. Virol.* **81**, 4145-4157.
- Nourbakhsh, M., Hoffmann, K., and Hauser, H. (1993). Interferon-beta promoters contain a DNA element that acts as a position-independent silencer on the NF-kappa B site. *EMBO J.* **12**, 451-459.
- Nourbakhsh, M. and Hauser, H. (1997). The transcriptional silencer protein NRF: a repressor of NF-kappa B enhancers. *Immunobiology* **198**, 65-72.
- Nourbakhsh, M. and Hauser, H. (1999). Constitutive silencing of IFN-beta promoter is mediated by NRF (NF-kappaB-repressing factor), a nuclear inhibitor of NF-kappaB. *EMBO J.* **18**, 6415-6425.

- Nourbakhsh, M., Oumard, A., Schwarzer, M., and Hauser, H. (2000). NRF, a nuclear inhibitor of NF-kappaB proteins silencing interferon-beta promoter. *Eur. Cytokine Netw.* *11*, 500-501.
- Nourbakhsh, M., Kalble, S., Dorrie, A., Hauser, H., Resch, K., and Kracht, M. (2001). The NF-kappa B repressing factor is involved in basal repression and interleukin (IL)-1-induced activation of IL-8 transcription by binding to a conserved NF-kappa B-flanking sequence element. *J. Biol. Chem.* *276*, 4501-4508.
- Obenauer, J.C., Cantley, L.C., and Yaffe, M.B. (2003). Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* *31*, 3635-3641.
- Ogawa, S., Lozach, J., Benner, C., Pascual, G., Tangirala, R.K., Westin, S., Hoffmann, A., Subramaniam, S., David, M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2005). Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell* *122*, 707-721.
- Olsen, J.V., Ong, S.E., and Mann, M. (2004). Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol. Cell Proteomics.* *3*, 608-614.
- Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* *127*, 635-648.
- Owens, D.M. and Keyse, S.M. (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* *26*, 3203-3213.
- Pahl, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* *18*, 6853-6866.
- Pawson, T. and Gish, G.D. (1992). SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* *71*, 359-362.
- Pawson, T. and Nash, P. (2000). Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev.* *14*, 1027-1047.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers, G.T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* *22*, 153-183.
- Perkins, N.D. (2006). Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* *25*, 6717-6730.
- Price, M.A., Cruzalegui, F.H., and Treisman, R. (1996). The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate Ternary Complex Factors and c-fos transcription in response to UV light. *EMBO J.* *15*, 6552-6563.
- Ptacek, J. and Snyder, M. (2006). Charging it up: global analysis of protein phosphorylation. *Trends Genet.* *22*, 545-554.
- Puntervoll, P., Linding, R., Gemund, C., Chabanis-Davidson, S., Mattingsdal, M., Cameron, S., Martin, D.M., Ausiello, G., Brannetti, B., Costantini, A., Ferre, F., Maselli, V., Via, A., Cesareni, G., Diella, F., Superti-Furga, G., Wyrwicz, L., Ramu, C., McGuigan, C., Gudavalli, R., Letunic, I., Bork, P., Rychlewski, L., Kuster, B., Helmer-Citterich, M., Hunter, W.N., Aasland, R., and Gibson, T.J. (2003). ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Res.* *31*, 3625-3630.
- Qi, M. and Elion, E.A. (2005). MAP kinase pathways. *J. Cell Sci.* *118*, 3569-3572.
- Rodriguez, P., Mitton, B., and Kranias, E.G. (2005). Phosphorylation of glutathione-S-transferase by protein kinase C-alpha implications for affinity-tag purification. *Biotechnol. Lett.* *27*, 1869-1873.

- Saxena, M. and Mustelin, T. (2000). Extracellular signals and scores of phosphatases: all roads lead to MAP kinase. *Semin. Immunol.* **12**, 387-396.
- Scheidereit, C. (2006). I κ B kinase complexes: gateways to NF- κ B activation and transcription. *Oncogene* **25**, 6685-6705.
- Scheidtmann, K.H., Ehle, B., and Walter, G. (1982). Simian virus 40 large T antigen is phosphorylated at multiple sites clustered in two separate regions. *J. Virol.* **44**, 116-133.
- Schiller, M., Bohm, M., Dennler, S., Ehrchen, J.M., and Mauviel, A. (2006). Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 is critical for interleukin-1-induced, CREB-mediated, c-fos gene expression in keratinocytes. *Oncogene* **25**, 4449-4457.
- Sekimoto, T., Fukumoto, M., and Yoneda, Y. (2004). 14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27(Kip1). *EMBO J.* **23**, 1934-1942.
- Sen, G.C. (2001). Viruses and interferons. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 255-281.
- Servant, M.J., Grandvaux, N., and Hiscott, J. (2002). Multiple signaling pathways leading to the activation of interferon regulatory factor 3. *Biochem. Pharmacol.* **64**, 985-992.
- Sharrocks, A.D., Yang, S.H., and Galanis, A. (2000). Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 448-453.
- Skerra, A. and Schmidt, T.G. (1999). Applications of a peptide ligand for streptavidin: the Strep-tag. *Biomol. Eng.* **16**, 79-86.
- Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
- Smith, E.J., Marie, I., Prakash, A., Garcia-Sastre, A., and Levy, D.E. (2001). IRF3 and IRF7 phosphorylation in virus-infected cells does not require double-stranded RNA-dependent protein kinase R or I κ B kinase but is blocked by Vaccinia virus E3L protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 8951-8957.
- Soloaga, A., Thomson, S., Wiggin, G.R., Rampersaud, N., Dyson, M.H., Hazzalin, C.A., Mahadevan, L.C., and Arthur, J.S. (2003). MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *EMBO J.* **22**, 2788-2797.
- Sudol, M. and Hunter, T. (2000). NeW wrinkles for an old domain. *Cell* **103**, 1001-1004.
- Sudol, M., Sliwa, K., and Russo, T. (2001). Functions of WW domains in the nucleus. *FEBS Lett.* **490**, 190-195.
- Suomalainen, M., Nakano, M.Y., Boucke, K., Keller, S., and Greber, U.F. (2001). Adenovirus-activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule-mediated nuclear targeting of virus. *EMBO J.* **20**, 1310-1319.
- Suzuki, K., Hino, M., Kutsuna, H., Hato, F., Sakamoto, C., Takahashi, T., Tatsumi, N., and Kitagawa, S. (2001). Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase cascade in human neutrophils stimulated by IL-1 β . *J. Immunol.* **167**, 5940-5947.
- Suzuki, M., Tetsuka, T., Yoshida, S., Watanabe, N., Kobayashi, M., Matsui, N., and Okamoto, T. (2000). The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-6 and IL-8 production from the TNF- α - or IL-1 β -stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *FEBS Lett.* **465**, 23-27.

- Szabo,A., Langer,T., Schroder,H., Flanagan,J., Bukau,B., and Hartl,F.U. (1994). The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the Escherichia coli Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* *91*, 10345-10349.
- Tanos,T., Marinissen,M.J., Leskow,F.C., Hochbaum,D., Martinetto,H., Gutkind,J.S., and Coso,O.A. (2005). Phosphorylation of c-Fos by members of the p38 MAPK family. Role in the AP-1 response to UV light. *J. Biol. Chem.* *280*, 18842-18852.
- Taylor,S.S., Radzio-Andzelm,E., and Hunter,T. (1995). How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase. *FASEB J.* *9*, 1255-1266.
- Thuille,N., Heit,I., Fresser,F., Krumbock,N., Bauer,B., Leuthaeusser,S., Dammeier,S., Graham,C., Copeland,T.D., Shaw,S., and Baier,G. (2005). Critical role of novel Thr-219 autophosphorylation for the cellular function of PKCtheta in T lymphocytes. *EMBO J.* *24*, 3869-3880.
- Turjanski,A.G., Vaque,J.P., and Gutkind,J.S. (2007). MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* *26*, 3240-3253.
- van der,G.P. and Hunter,T. (1994). Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by electrophoresis and chromatography on thin-layer cellulose plates. *Electrophoresis* *15*, 544-554.
- Verdecia,M.A., Bowman,M.E., Lu,K.P., Hunter,T., and Noel,J.P. (2000). Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. *Nat. Struct. Biol.* *7*, 639-643.
- Vermeulen,L., De Wilde,G., Van Damme,P., Vanden Berghe,W., and Haegeman,G. (2003). Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J.* *22*, 1313-1324.
- Viatour,P., Merville,M.P., Bours,V., and Chariot,A. (2005). Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem. Sci.* *30*, 43-52.
- Vicent,G.P., Ballare,C., Nacht,A.S., Clausell,J., Subtil-Rodriguez,A., Quiles,I., Jordan,A., and Beato,M. (2006). Induction of progesterone target genes requires activation of Erk and Msk kinases and phosphorylation of histone H3. *Mol. Cell* *24*, 367-381.
- Vilcek J and Sen GC (1996). Interferons and other Cytokines. In *Fields Virology* 375-399.
- Voss,S. and Skerra,A. (1997). Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng* *10*, 975-982.
- Wagoner,J., Austin,M., Green,J., Imaizumi,T., Casola,A., Brasier,A., Khabar,K.S., Wakita,T., Gale,M., Jr., and Polyak,S.J. (2007). Regulation of CXCL-8 (interleukin-8) induction by double-stranded RNA signaling pathways during hepatitis C virus infection. *J. Virol.* *81*, 309-318.
- Washburn,M.P., Wolters,D., and Yates,J.R., III (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* *19*, 242-247.
- Werner,S.L., Barken,D., and Hoffmann,A. (2005). Stimulus specificity of gene expression programs determined by temporal control of IKK activity. *Science* *309*, 1857-1861.
- Weston,C.R. and Davis,R.J. (2002). The JNK signal transduction pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *12*, 14-21.

- Wiesner,S., Stier,G., Sattler,M., and Macias,M.J. (2002). Solution structure and ligand recognition of the WW domain pair of the yeast splicing factor Prp40. *J. Mol. Biol.* **324**, 807-822.
- Xue,Y., Zhou,F., Zhu,M., Ahmed,K., Chen,G., and Yao,X. (2005). GPS: a comprehensive www server for phosphorylation sites prediction. *Nucleic Acids Res.* **33**, W184-W187.
- Yamada,T., Yamaguchi,Y., Inukai,N., Okamoto,S., Mura,T., and Handa,H. (2006). P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Mol. Cell* **21**, 227-237.
- Yasuda,J., Whitmarsh,A.J., Cavanagh,J., Sharma,M., and Davis,R.J. (1999). The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol. Cell Biol.* **19**, 7245-7254.
- Zeng,J., Fournier,P., and Schirmacher,V. (2002). Stimulation of human natural interferon-alpha response via paramyxovirus hemagglutinin lectin-cell interaction. *J. Mol. Med.* **80**, 443-451.
- Zeng,J., Fournier,P., and Schirmacher,V. (2002). Induction of interferon-alpha and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human blood mononuclear cells by hemagglutinin-neuraminidase but not F protein of Newcastle disease virus. *Virology* **297**, 19-30.
- Zhou,F.F., Xue,Y., Chen,G.L., and Yao,X. (2004). GPS: a novel group-based phosphorylation predicting and scoring method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 1443-1448.
- Zinck,R., Cahill,M.A., Kracht,M., Sachsenmaier,C., Hipskind,R.A., and Nordheim,A. (1995). Protein synthesis inhibitors reveal differential regulation of mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase pathways that converge on Elk-1. *Mol. Cell Biol.* **15**, 4930-4938.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sascha Rother
Wohnort: Hannover
Geburtstag: 15. Juni 1979
Geburtsort: Bad Gandersheim
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, ein Kind

Promotion

März 2005 Beginn der Dissertation zum Dr. rer. nat. am Institut für Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Anleitung von PD Dr. M. Nourbakhsh

Hochschulstudium

Januar 2005 Abschluss des Hochschulstudiums der Biochemie an der Universität Hannover mit der Diplomarbeit: „Herstellung eines rekombinanten Antikörpers gegen die Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase (IVD)“

2001 Vordiplom

1999 Beginn des Hochschulstudiums der Biochemie am Fachbereich Chemie der Universität Hannover (Wintersemester)

Schulbildung

1998 Abitur
1991-1998 Jacobson-Gymnasium-Seesen
1989-1991 Orientierungsstufe Seesen
1985-1989 Grundschule Rhüden

Sonstiges

1998-1999 Wehrersatzdienst

Liste der Publikationen

Dissertation

Bartels M., Rother S., Schweda A., Resch K., Nourbakhsh M.

Nucleofection of synthetic peptides inhibits NRF /NF-kappa B interaction and suppresses IL-8 gene expression in cells

Annual Fall Meeting of the Signal Transduction Society (STS) in Weimar/Thüringen (Poster presentation)

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Diese Arbeit wurde bisher nicht an einer anderen Universität oder einer anderen Fakultät/einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht. Weiterhin erkläre ich, dass die Dissertation nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit benutzt wurde.

Hannover, den 11.03.2008

Sascha Rother

Danksagung

Bedanken möchte ich mich zuerst bei PD Dr. Mahtab Nourbakhsh für Ihre fortwährende wissenschaftliche Betreuung und Ihre zahlreichen experimentellen Anregungen sowie praktischen Ratschläge während meiner Arbeit. Bei Prof. Jürgen Alves bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats meiner Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt auch Prof. Klaus Resch, in dessen Institut ich die Möglichkeit hatte, meine Dissertation anzufertigen, und der mich über die Beendigung der Doktorarbeit hinaus wissenschaftlich unterstützt hat.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung während meiner Arbeit (SFB 566).

Danken möchte ich ferner meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Nourbakhsh (MNO), meinen Mitdoktorandinnen und Doktoranden Myriam, Aniko, Isabelle, Sarah und Marc sowie den TAs Birgit und Regina für die drei Jahre Zusammenarbeit, Spaß und guter Laune. Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle nochmals bei Regina Ax-Smolarski und unserer Diplomandin Anke Roden, die die Aufreinigung von NRF *in vivo* etabliert und maßgeblich vorangetrieben haben.

Darüber hinaus möchte ich allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie für die stete kollegiale Arbeitsatmosphäre danken – im Besonderen PD Dr. Detlev Neumann und Marina Golombek, ohne deren Unterstützung einige der Experimente so nicht möglich gewesen wären.

Zu guter Letzt möchte ich auch meinen Familien danken. Meinen Eltern und meiner Schwester Anja, die mich in all den Jahren finanziell und moralisch unterstützt haben.

Und Eva & Janosch – für alles.

