

# **Charakterisierung der phosphorylierungsabhängigen Regulation von Ribonukleoproteinpartikeln (RNPs) durch Jun-N-terminale Proteinkinasen (JNKs)**

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

**Dipl.-Biochem. Katharina Rzeczkowski  
geboren am 19.08.1980 in Breslau**

**2010**

Referent: Prof. Dr. Walter H. Müller  
Korreferent: Prof. Dr. Michael Kracht  
Tag der Promotion: 17.08.2010

## **Danksagung**

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Kracht für die hervorragende und motivierende Betreuung bei der Anfertigung dieser Dissertation, ein interessantes Thema und seine ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Weiterhin danke ich ganz besonders Herrn Prof. Dr. Walter Müller für die freundliche Übernahme des Referates.

Mein Dank gilt weiterhin allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Michael Kracht sowie Mitarbeitern des Rudolf-Buchheim-Instituts namentlich Alex, Anneke, Axel T., Axel W., Beate, Bettina, Bianca, Prof. Brockmeier, Christiane, Christoph, Claudia, Daniela, Doris, Prof. Dreyer, Elke, Hendrik, Helmut, Heike Schneider, Heike Schubert, Holger B., Holger R., Judy, Juliane, Katja, Liane, Oliver, Peter, Petra, Sabine, Solveig, Stefanie und Ulrike für die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag, für gute Ratschläge und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ganz ausdrücklich danke ich Knut für die Unterstützung bei den Aufnahmen und der Bearbeitung der Mikroskopiebilder sowie Isabelle für die Hilfe bei der Generierung stabiler Zelllinien.

Besonders herzlich danken, möchte ich den Menschen in meinem privaten Umfeld: meinen Freunden, allen voran Alex, Anne, Conny und Julia für die besten Freunde, die man sich wünschen kann.

Zum Schluss meiner Familie, Patrick, Krysta und Norbert sowie meiner Mutter und Egon und ganz besonders Dawid für ihre liebevolle Unterstützung und Anteilnahme an meiner Arbeit.

## Zusammenfassung

Jun-N-terminale Proteinkinase (JNKs) werden durch eine große Anzahl an Stress-Stimuli wie UV-Licht, Zellgiften und osmotischem Stress, aber auch durch Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert. Dementsprechend sind JNKs an der Regulation einer Reihe von basalen Zellfunktionen wie Proliferation und Apoptose, aber auch an (patho)physiologischen Prozessen bei Tumorentstehung und chronisch entzündlichen Erkrankungen beteiligt. Die drei JNK-Gene, welche für bis zu zehn hoch homologe JNK-Isoformen kodieren, finden sich nur in höheren Eukaryoten. JNKs stellen damit den komplexesten MAP-Kinase-Signalweg dar. Demgegenüber ist die Anzahl an JNK-Effektoren, insbesondere JNK-Substraten, welche für die diversen biologischen Effekte von JNK verantwortlich sind, immer noch relativ klein. In Vorarbeiten zu dieser Promotion wurde Argonaut 2 (Ago2) als neuer JNK-Interaktionspartner identifiziert. Ago2 ist die katalytische Komponente des *RNA induced silencing complex* (RISC), welcher für die *small interfering*(si)-RNA- und micro(mi)-RNA-vermittelte mRNA-Degradation bzw. translationale Hemmung verantwortlich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Interaktion zwischen Ago2 und JNK detailliert charakterisiert. Unter Verwendung von Koimmunopräzipitationsversuchen konnte gezeigt werden, dass der Ago2/JNK-Komplex konstitutiv in der Zelle vorliegt und nach JNK-Aktivierung phosphoryliertes, aktives JNK enthält. Initial wurde eine Beteiligung von vier potentiellen JNK *docking sites* in Ago2 an der Interaktion mit JNK ausgeschlossen. Struktur-Funktions-Untersuchungen unter der Verwendung von insgesamt 22 Ago2-Mutanten zeigten, dass Ago2 sowohl über den N-Terminus, außerhalb der Aminosäuren 386-516 und der PAZ-Domäne, als auch über den C-Terminus inklusive der PIWI-Domäne mit JNK wechselwirkt. Vergleiche zwischen freiem und im Komplex vorliegendem JNK und *in vitro* Degradation zellulärer RNA vor Koimmunopräzipitationsversuchen zeigten, dass nur ein kleiner Anteil des gesamten in der Zelle vorliegenden Ago2 und JNK stabil miteinander interagieren und dass diese Interaktion neben einer Proteinwechselwirkung auch über RNA vermittelt wird.

Untersuchungen zur Phosphorylierung von rekombinantem Ago2 ergaben, dass Ago2 kein direktes JNK-Substrat ist und auch nicht JNK-abhängig phosphoryliert wird. Funktionelle Untersuchungen anhand eines Luziferase-Reportergensystems zeigten, dass die Aktivierung von JNK durch Überexpression von MEKK1 eine zwar reproduzierbare, aber mit ca. 10% nur schwache Hemmung der globalen RISC-Aktivität in intakten Zellen bewirkte. Zudem konnten zwei miRNAs (miR-186 und miR-210) identifiziert werden, deren Bindung an Ago2 unter vergleichbaren Transfektionsbedingungen partiell reduziert war.

Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass Ago2 als ein Rekrutierungsfaktor fungiert, der zur Lokalisation von JNK in distinkten subzellulären Strukturen beiträgt. Ago2 interagiert mit DCP1 $\alpha$ , einer regulatorischen Untereinheit des *Decapping*-Komplexes. Beide Proteine kolokalisieren in zytoplasmatischen Ribonukleoproteinpartikeln (RNPs), die als *processing*(P)-*bodies*

bezeichnet werden und es konnte der Nachweis erbracht werden, dass JNK mit Ago2 und DCP1 $\alpha$  in *P-bodies* kolokalisiert. Unter JNK-aktivierenden Bedingungen wies sowohl überexprimiertes als auch endogenes DCP1 $\alpha$  ein verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE auf. Die Generierung von 13 verschiedenen GFP-DCP1 $\alpha$ -Mutanten, in denen ausgewählte Serine bzw. Threonine zu Alanin mutiert waren und die anschließende Analyse dieser Varianten in der SDP-PAGE unter JNK-stimulierenden Bedingungen, führten zur Identifikation von Serin315 und Serin319 als Aminosäuren, welche potentiell durch JNK phosphoryliert werden können. Mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers gegen Serin315 konnte gezeigt werden, dass diese Aminosäure sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch JNK, jedoch nicht durch die MAP-Kinase p38 phosphoryliert wird. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass eine lang anhaltende JNK-Aktivierung durch Überexpression von MAP3-Kinasen sowie durch Stimulation mit Sorbitol oder Anisomycin zu einer Umverteilung von endogenem DCP1 $\alpha$  aus den *P-bodies* ins Zytosol führt, während eine transiente JNK-Aktivierung durch IL-1 $\alpha$  eine transiente Zunahme des Proteins in den *P-bodies* nach sich zieht. Die beobachtete Umverteilung von DCP1 $\alpha$  korrelierte dabei eindeutig mit einer Phosphorylierung des Proteins an Serin315 und Mutationsanalysen bestätigten, dass Phospho-Ser315 direkt die subzelluläre Verteilung von DCP1 $\alpha$  reguliert. So zeigte eine phosphomimetische GFP-DCP1 $\alpha$ S315D-Mutante eine verminderte *P-body*-Lokalisation und vermehrte zytosolische Verteilung, während die Mutation von Serin315 zu Alanin die Anzahl und Größe der *P-bodies* erhöhte. Die phosphorylierungsabhängige Regulation der DCP1 $\alpha$ -Verteilung in der Zelle ist funktionell wirksam, da beide Mutationen einen dominant negativen Effekt auf die IL-1 $\alpha$ -induzierte Bildung von IL-8-mRNA sowie die IL-8-Sekretion ausüben.

Zusammengefasst wurden in dieser Arbeit Komponenten und Regulationsmechanismen eines neuen posttranskriptionellen Signalweges identifiziert, der über die selektive Rekrutierung der Proteinkinase JNK in *P-bodies* phosphorylierungsabhängig die intrazelluläre (Um-)verteilung von Proteinen aus RNA-Abbauwegen reguliert. Das Phosphorylierungsmotiv in DCP1 $\alpha$  ist nur in Primaten und Nagern konserviert, so dass es sich um einen evolutionär relativ spät entstandenen Regulationsmechanismus handelt, der einen zusätzlichen posttranskriptionellen Steuerungseffekt auf die mRNA-Expression in Stress- und Entzündungssituationen ermöglicht.

Schlagwörter: JNK, Ago2, DCP1 $\alpha$ , *P-bodies*

## Abstract

Jun-N-terminal protein kinases (JNKs) are activated by a large array of stressors such as UV-light, toxic agents or osmotic stress but also by cytokines and growth factors. Hence, JNKs are involved in regulation of basic cell functions such as proliferation or apoptosis but also in (patho)physiological processes such as cancer or chronic inflammation. Three JNK genes which encode for up to ten highly homologous isoforms are only found in higher eukaryotes. Thus, JNKs comprise the MAPK pathway of highest complexity. In contrast, the number of JNK effectors, in particular JNK substrates which account for the biological effects of JNK is still fairly small. During work leading to this thesis argonaut 2 (Ago2) was identified a new JNK interacting partner. Ago2 is the catalytic core component of the RNA induced silencing complex (RISC), which is responsible for small interfering(si)-RNA- and micro(mi)-RNA-mediated mRNA degradation or translational suppression.

The starting point of this project was a detailed characterization of the Ago2/JNK interaction. Utilizing a co-immunoprecipitation assay, it was shown that the Ago2/JNK complex is constitutively formed and contains activated phosphorylated JNK. Initially the involvement of four conserved JNK docking sites found in Ago2 was excluded. Structure-function-analyses using 22 different Ago2 mutants revealed that Ago2 binds to JNK through its N-terminus outside amino acids 386-516 and the PAZ domain and through its C-terminus including the PIWI domain. Comparison of free and Ago2-bound JNK and *in vitro* degradation of cellular RNA prior to co-immunoprecipitation showed that only a small fraction of total cellular JNK binds to Ago2 and revealed that the Ago2/JNK interaction was not only protein- but also RNA-dependent.

*In vitro* kinase assays using recombinant Ago2 indicated that Ago2 was not a direct JNK substrate and was not phosphorylated in a JNK-dependent manner. Activation of JNK by overexpression of MEKK1 revealed a reproducible, but only small 10% inhibition of global RISC activity as assessed by a luciferase reporter gene system. Two micro RNAs (miR-186 and miR-210) showed a reduced binding to Ago2 under comparable conditions.

These results excluded Ago2 as a major JNK substrate and pointed to a possible role of Ago2 as recruiting factor that contributes to directing JNK to distinct subcellular structures. Ago2 was known to interact with DCP1 $\alpha$ , a subunit of the decapping complex. Both proteins had been found in ribonucleoprotein particles, known as processing(P)-bodies and in this thesis it is now shown that JNK co-localizes with Ago2 and DCP1 $\alpha$  in P-bodies. Under conditions of JNK activation ectopically expressed but also endogenous DCP1 $\alpha$  displayed altered mobilities upon SDS-PAGE. 13 different serine or threonine residues of DCP1 $\alpha$  were mutated and tested for altered mobility after JNK activation. Thereby, ser315 and ser319 were identified as JNK phospho-acceptor sites. Using a phospho-specific antibody ser315 was shown to be phosphorylated by JNK but not by p38 MAPK *in vitro* and *in vivo*. Persistent JNK activation as

achieved by overexpression of MAP3-kinases or in response to sorbitol or anisomycin led to a complete redistribution of DCP1 $\alpha$  from P-bodies into the cytoplasm. In contrast, transient JNK activation in response to IL-1 $\alpha$  led to an increase in DCP1 $\alpha$ -containing P-bodies. Redistribution of DCP1 $\alpha$  correlated unequivocally with phosphorylation at ser315 and mutations of this site proved its phosphorylation-dependent role in regulation of the subcellular distribution of DCP1 $\alpha$ . Thus, a phosphomimetic GFP-DCP1 $\alpha$ S315D mutant localized to the cytoplasm, whereas a S315A mutant increased number and size of P-bodies. Phosphorylation-dependent regulation of DCP1 $\alpha$  is functionally relevant as both mutants exerted a strong dominant negative effect on IL-1 $\alpha$  -induced mRNA synthesis and secretion of IL-8.

In summary, in this thesis components and regulatory mechanisms of a novel posttranscriptional pathway have been identified which regulates through selective recruitment of JNK into P-bodies the intracellular (re)distribution of proteins of mRNA decay pathways in a phosphorylation-dependent manner. The phosphorylation motif in DCP1 $\alpha$  is only found in primates and rodents. Hence, the mechanisms described here belong to a rather lately evolved pathway that facilitates additional posttranscriptional control of mRNA expression during stress and inflammatory situations.

Key words: JNK, Ago2, DCP1 $\alpha$ , P-bodies

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	MAP-KINASE-SIGNALWEGE	1
1.1.1	Die MAP-Kinase JNK	2
1.1.2	Substrate von JNK	4
1.1.3	Docking sites in JNK-Substraten	6
1.2	DIE ARGONAUT-PROTEINFAMILIE	7
1.2.1	Die Funktion von Ago-Proteinen bei der Regulation von Genexpression durch kleine nicht-kodierende RNAs	8
1.2.2	Posttranslationale Modifikationen von Ago-Proteinen	12
1.3	MIRNAS	13
1.4	PROCESSING BODIES (P-BODIES)	15
1.4.1	P-bodies und mRNA-Abbau und -Lagerung	16
1.4.2	P-bodies und mRNA-Stabilität	18
1.4.3	P-bodies und transiente mRNA-Speicherung	19
1.4.4	P-bodies und RNAi	19
1.4.5	P-bodies sind hochdynamische Strukturen	21
1.5	DCP1	25
1.6	FRAGESTELLUNG	27
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>29</b>
2.1	VERBRAUCHSMATERIAL	29
2.2	GERÄTE	29
2.3	CHEMIKALIEN UND LÖSUNGSMITTEL	30
2.4	ALLGEMEINE PUFFER UND LÖSUNGEN	30
2.5	KITS UND GEBRAUCHSFERTIGE REAGENZIEN UND MATERIALIEN	34
2.6	ENZYME UND ENZYMPUFFER	35
2.7	INHIBITOREN	35
2.8	STANDARDS	36
2.9	OLIGONUKLEOTIDE	37
2.10	ANTIKÖRPER UND REKOMBINANTE PROTEINE	42
2.11	BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE	45
2.12	ZELLINIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE ZELLKULTUR	47
2.13	MOLEKULARBIOLOGISCHE TECHNIKEN	47
2.13.1	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren	47
2.13.1.1	Miniplasmidpräparation	47
2.13.1.2	Maxiplasmidpräparation	48
2.13.1.3	Isolierung von RNA aus Zellen	48



2.13.1.4	Isolierung von RNA aus Lysaten und Immunkomplexen	48
2.13.1.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	49
2.13.2	<i>Trennung von Nukleinsäuren</i>	49
2.13.2.1	Agarosegelelektrophorese	49
2.13.2.2	Kapillarelektrophorese	50
2.13.3	<i>Herstellung pro-und eukaryotischer Expressionsplasmide</i>	50
2.13.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	50
2.13.3.2	Zwischenklonierung mit Hilfe der Topo <sup>®</sup> -Strategie	51
2.13.3.3	Restriktionsverdau	52
2.13.3.4	Transformation	53
2.13.3.5	Klonierung unter Verwendung der Gateway <sup>®</sup> -Rekombinations-Strategie	53
2.13.3.6	Mutagenese	54
2.13.3.7	Identifikation positiver bakterieller Klone	55
2.13.4	<i>Fluoreszenzsequenzierung von Plasmid-DNA</i>	56
2.13.5	<i>Reverse Transkription (RT)</i>	57
2.13.6	<i>Real Time PCR</i>	58
2.14	PROTEINBIOCHEMISCHE TECHNIKEN	60
2.14.1	<i>Herstellung von Ganzzelllysaten eukaryotischer Zellen</i>	60
2.14.1.1	Lysate zur Immunodetektion im Westernblot	60
2.14.1.2	Lysate für Immunodetektion im Westernblot und für Koimmunopräzipitation	60
2.14.1.3	Lysate für Messung von Reporter-genaktivität	61
2.14.2	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford</i>	61
2.14.3	<i>Koimmunopräzipitation</i>	62
2.14.4	<i>Reporter-genversuche</i>	63
2.14.4.1	Luziferase-Messung	63
2.14.4.2	$\beta$ -Galaktosidase-Messung	63
2.14.5	<i>Kinase-Versuche</i>	63
2.14.5.1	Mit Ganzzelllysaten	64
2.14.5.2	Mit immunopräzipitierter Kinase	64
2.14.5.3	Mit überexprimierter immunopräzipitierter Kinase (HA-JNK2 und FLAG-p38) und überexprimiertem immunopräzipitiertem Substrat (GFP-DCP1 $\alpha$ )	65
2.14.6	<i>Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli</i>	66
2.14.7	<i>Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue</i>	67
2.14.8	<i>Westernblot und Immunodetektion mittels ECL</i>	67
2.14.9	<i>Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen</i>	68
2.14.9.1	Induktion der Expression	68
2.14.9.2	Aufreinigung	69
2.14.10	<i>ELISA für IL-8</i>	70
2.15	MIKROBIOLOGISCHE TECHNIKEN	70

2.15.1	<i>Arbeiten mit Bakterienkulturen</i>	70
2.15.2	<i>Herstellung von Dauerkulturen</i>	70
2.16	ZELLKULTURTECHNIKEN	70
2.16.1	<i>Einfrieren und Auftauen von Zellen</i>	70
2.16.2	<i>Kultivieren und Passagieren adhärent wachsender Zellen</i>	71
2.16.3	<i>Zellzählung und Vitalitätsbestimmung</i>	71
2.16.4	<i>Stimulation und Ernten von Zellen</i>	71
2.16.5	<i>Transfektion</i>	72
2.16.5.1	<i>Transiente Transfektion mit Kalziumphosphat</i>	72
2.16.5.2	<i>Herstellung eines stabilen Transfektanten Zellpools</i>	72
2.17	ZELLBIOLOGISCHE TECHNIKEN	72
2.17.1	<i>Indirekte Immunfluoreszenz mit Kernfärbung</i>	72
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>74</b>
3.1	CHARAKTERISIERUNG DER WECHSELWIRKUNG VON JNK MIT AGO2	74
3.1.1	<i>Analyse der Interaktion von JNK und Ago2</i>	74
3.1.2	<i>Untersuchungen zur Phosphorylierung von Ago2</i>	85
3.1.3	<i>Untersuchungen zur Funktion der Ago2/JNK-Interaktion</i>	90
3.1.3.1	<i>Analyse der Bindung ausgewählter miRNAs an Ago2 in Abhängigkeit von JNK und seiner Aktivierung</i>	90
3.1.3.2	<i>Einfluss der JNK-Aktivierung auf den siRNA-vermittelten Abbau von Luziferase in HEK293 IL-1R-Zellen</i>	94
3.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR WECHSELWIRKUNG VON JNK MIT DCP1A	95
3.2.1	<i>JNK kolokalisiert mit DCP1a und beeinflusst seine Lokalisation in der Zelle sowie sein Laufverhalten in der SDS-PAGE</i>	95
3.2.2	<i>JNK, DCP1a und Ago2 lassen sich als Komplex aus intakten Zellen isolieren</i>	101
3.2.3	<i>Identifizierung von Serin315 als JNK-abhängige Phosphorylierungsstelle in DCP1a</i>	102
3.2.4	<i>Untersuchungen zur Phosphorylierung von DCP1a in vitro</i>	109
3.2.5	<i>Einfluss verschiedener Stimuli auf die Serin315-Phosphorylierung und Lokalisation von DCP1a</i>	114
3.2.6	<i>Untersuchung zum Beitrag der Serin315-Phosphorylierung an der Lokalisation von DCP1a</i>	119
3.2.7	<i>Analyse der IL-1<math>\alpha</math>-induzierten IL-8-Expression und -Sekretion in den stabil mit GFP-DCP1a-Konstrukten transfizierten Zellen</i>	123
3.2.8	<i>Identifizierung weiterer JNK-abhängig modifizierter Aminosäuren in DCP1a</i>	124
3.2.9	<i>Einfluss der posttranslationalen Modifikation an Serin319 auf die Lokalisation von DCP1a</i>	127
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>130</b>
4.1	CHARAKTERISIERUNG DER AGO2/JNK-WECHSELWIRKUNG	130
4.1.1	<i>Untersuchungen zur Identifikation der für die Ago2/JNK-Bindung wichtigen Parameter</i>	130
4.1.2	<i>Untersuchungen zur Phosphorylierung von Ago2</i>	131

4.1.3	<i>Analyse der miRNA-Assoziation an Ago2-Komplexe in Abhängigkeit von JNK und seiner Aktivierung</i>	133
4.2	CHARAKTERISIERUNG DER INTERAKTION ZWISCHEN DCP1A UND JNK	135
4.2.1	<i>Interaktion und Kolo-kalisation von Ago2 und JNK mit DCP1a</i>	135
4.2.2	<i>Charakterisierung von DCP1a als JNK-Substrat</i>	137
4.2.3	<i>Untersuchungen zur JNK-abhängigen Lokalisationsänderung von DCP1a</i>	140
4.3	ZUSAMMENFASSUNG	146
4.4	AUSBLICK	147
<b>5</b>	<b>Literatur</b>	<b>149</b>
<b>6</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>165</b>
<b>7</b>	<b>Publikationen</b>	<b>166</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Zusammenfassung der Komplexität des JNK-Signalweges	6
Abbildung 2: Strukturelle Eigenschaften von Ago-Proteinen, dargestellt anhand des Ago-Proteins aus <i>P. furiosus</i>	9
Abbildung 3: Funktionen von Ago-Proteinen bei der Regulation der posttranskriptionellen Genexpression	12
Abbildung 4: <i>P-bodies</i> in humanen Zellen	16
Abbildung 5: Dynamische Beziehung zwischen verschiedenen Ribonukleoproteinpartikeln	24
Abbildung 6: Analyse der Bindung von T7-Ago2-N, T7-Ago2-C, T7-Ago2 <sub>ΔPAZ</sub> und T7-Ago2 <sub>ΔPIWI</sub> an GFP-JNK3 mittels Koimmunopräzipitation	76
Abbildung 7: Untersuchung des Einflusses der potentiellen JNK <i>docking sites</i> 1-4 in Ago2 auf die JNK/Ago2-Interaktion	79
Abbildung 8: Schematische Darstellung der im Zuge der Diplomarbeit und Promotion für die Bindungsversuche eingesetzten Ago2-Mutanten	80
Abbildung 9: Analyse der RNA-Abhängigkeit der Ago2/JNK-Interaktion	82
Abbildung 10: Untersuchung zur Abhängigkeit der Ago2/JNK-Bindung von der JNK-Aktivierung	84
Abbildung 11: <i>In vitro</i> -Phosphorylierung von rekombinantem GST-Ago2	85
Abbildung 12: Die Phosphorylierung von GST-Ago2 wird durch den JNK-Inhibitor SP600125 gehemmt	86
Abbildung 13: Phosphorylierung von GST-Ago2 in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli und unter Einfluss unterschiedlicher Kinaseinhibitoren	87
Abbildung 14: Die Phosphorylierung von GST-Ago2 wird nicht durch Calyculin A induziert	88
Abbildung 15: GST-Ago2 ist kein JNK-Substrat	89
Abbildung 16: Isolierung ausgewählter miRNAs aus Ago2-Komplexen	94
Abbildung 17: Untersuchung des Einflusses der JNK-Aktivierung auf die siRNA-vermittelte RISC-Aktivität mittels Luziferasereportergenversuchen	95
Abbildung 18: Änderung der GFP-DCP1 $\alpha$ -Lokalisation in Abhängigkeit von JNK und seiner Aktivierung	96
Abbildung 19: Änderung der Lokalisation von endogenem DCP1 $\alpha$ nach Überexpression von JNK oder JNK-Aktivatoren	98
Abbildung 20: Verändertes Laufverhalten von endogenem und überexprimierten DCP1 $\alpha$ in der SDS-PAGE unter verschiedenen Reaktionsbedingungen	100
Abbildung 21: Analyse der Interaktion zwischen JNK, DCP1 $\alpha$ und Ago2 mittels Koimmunopräzipitation	101
Abbildung 22: Identifizierung von Serin315 als potentielle Phosphorylierungsstelle in DCP1 $\alpha$	105
Abbildung 23: Austestung verschiedener pDCP1 $\alpha$ S315-Antikörper	107
Abbildung 24: DCP1 $\alpha$ ist ein JNK-Substrat <i>in vitro</i>	110

Abbildung 25: JNK phosphoryliert DCP1 $\alpha$ an Serin315 <i>in vitro</i>	111
Abbildung 26: DCP1 $\alpha$ wird <i>in vitro</i> durch p38 phosphoryliert	112
Abbildung 27: p38 phosphoryliert DCP1 $\alpha$ nicht an Serin315	113
Abbildung 28: Kinetik der Serin315-Phosphorylierung von DCP1 $\alpha$ in Abhängigkeit verschiedener Stimuli	114
Abbildung 29: Lokalisation von endogenem DCP1 $\alpha$ , pDCP1 $\alpha$ S315 und Ago2 nach Stimulation mit Sorbitol, Anisomycin oder IL-1 $\alpha$	118
Abbildung 30: Hemmung der Phosphorylierung von GFP-DCP1 $\alpha$ an Serin315 mit SP600125	119
Abbildung 31: Untersuchung des Laufverhaltens der phosphomimetischen Mutanten GFP-DCP1 $\alpha$ S315D und GFP-DCP1 $\alpha$ S315E in der SDS-PAGE.	120
Abbildung 32: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Lokalisation von GFP-DCP1 $\alpha$ , GFP-DCP1 $\alpha$ S315A, GFP-DCP1 $\alpha$ S315D, GFP-DCP1 $\alpha$ S315E und GFP-DCP1 $\alpha$ $_{\Delta 513-582}$	122
Abbildung 33: Untersuchung zur IL-1 $\alpha$ -induzierten IL-8-Expression in den stabil mit den Konstrukten für GFP-DCP1 $\alpha$ , GFP-DCP1 $\alpha$ S315A, GFP-DCP1 $\alpha$ S315D und GFP-DCP1 $\alpha$ $_{\Delta 513-582}$ transfizierten HEK293 IL-1R- Zellen	123
Abbildung 34: Identifizierung von Serin319 als weitere potentielle Phosphorylierungsstelle in DCP1 $\alpha$	125
Abbildung 35: Untersuchung des Laufverhaltens von GFP-DCP1 $\alpha$ -Mutanten in der SDS-PAGE	127
Abbildung 36: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Lokalisation von GFP-DCP1 $\alpha$ , GFP-DCP1 $\alpha$ S319A, GFP-DCP1 $\alpha$ S319D, GFP-DCP1 $\alpha$ S315/319A und GFP-DCP1 $\alpha$ S315/319D	129
Abbildung 37: Schematische Darstellung der Mechanismen, welche die Lokalisation von DCP1 $\alpha$ beeinflussen	144
Abbildung 38: Schematische, zusammenfassende Darstellung der transkriptionellen und posttranskriptionellen Funktion von JNK	146

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswirkung der Depletion und Überexpression von Proteinen, sowie die Auswirkung diverser Stimuli auf die *P-body*-Integrität \_\_\_\_\_22

# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	log	dekadischer Logarithmus
µg	Mikrogramm	mg	Milligramm
µl	Mikroliter	min	Minuten
µmol/l	Mikromol pro Liter	ml	Milliliter
A	Ampere	mmol/l	Millimol pro Liter
AA	Acrylamid	mRNA	Boten-RNA
Abb.	Abbildung	ng	Nanogramm
Ac	Acetat	nm	Nanometer
Amp	Ampicillin	OD	optische Dichte (Absorption)
APS	Ammoniumperoxodisulfat	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
as	<i>antisense</i>	PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
ATP	Adenosintriphosphat	PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
bp	Basenpaare	pH	-log c[H <sup>+</sup> ]
BSA	Rinder-Serumalbumin	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
bzw.	beziehungsweise	PVDF	Polyvinylidenfluorid
cDNA	komplementäre DNA	RNA	Ribonukleinsäure
ca.	circa	rpm	Umdrehungen pro Minute
Ci	Curie	RT	Raumtemperatur/Reverse Transkription
d/dd	vor Nukleotiden: desoxy/didesoxy	s	Sekunden
Da	Dalton	S	Svedberg
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser	SDS	Natriumdodecylsulfat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>	se	<i>sense</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	S.E.M.	<i>standard error of the mean</i> ; Standardfehler des Mittelwertes
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SV40	Siamin Virus 40
DTT	Dithiothreitol	Tab.	Tabelle
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>	TAE	Tris-Acetat-EDTA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TAP	<i>tandem affinity purification</i>
ELISA	<i>enzym-linked Immunosorbent assay</i>	TBS	Trisgepufferte Salzlösung
FKS	fötale Kälberserum	TE	Tris-EDTA
g	Gramm	TEMED	N, N', N'-Tetramethylendiamin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>	TNF	Tumor Nekrose Faktor
GST	Glutathion-S-Transferase	TGFβ	<i>transforming growth factor β</i>
GTP	Guanosintriphosphat	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
h	Stunden	t-RNA	Transfer-RNA
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2- ethansulfon-säure	U	Enzymeinheiten
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>	UTR	<i>untranslated region</i>
IFN	Interferon	UV	Ultraviolett
IL	Interleukin	V	Volt
k	Kilo	v/v	Volumen pro Volumen
kb	Kilobasen	w/v	Gewicht pro Volumen
l	Liter	z.B.	zum Beispiel
LB	Lauria Bertoni		
LMW	<i>low molecular weight</i> (Abkürzung für Proteinstandard)		

# 1 Einleitung

## 1.1 MAP-Kinase-Signalwege

Die von der Hefe bis zum Menschen konservierten MAP(*mitogen-activated protein*)-Kinase-Signalwege nehmen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion innerhalb der Zelle ein. Sie übertragen, amplifizieren und integrieren die Signale sehr vieler extrazellulärer Stimuli und sind somit an zentralen physiologischen Prozessen wie Zellproliferation, -Differenzierung, Apoptose, Entwicklung, Immunantwort und Entzündung beteiligt. Zu den Stimuli zählen unter anderem Wachstumsfaktoren (z.B. EGF = *epidermal growth factor*), proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-1, TNF), jede Art von zellulärem Stress (z.B. osmotischer Stress) und Hormone (z.B. Insulin). Hierbei werden die verschiedenen MAP-Kinase-Signalwege bevorzugt von bestimmten Stimuli aktiviert (Widmann et al., 1999).

Jeder MAP-Kinase-Signalweg ist aus drei hintereinandergeschalteten Proteinkinasen aufgebaut. Die erste Kinase dieses Dreikomponentenmoduls ist eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP3-Kinase), welche unter anderem durch Phosphorylierung durch MAP-Kinase-Kinase-Kinase Kinasen (MAP4-Kinasen) aktiviert wird (Widmann et al., 1999). MAP3-Kinasen sind Serin/Threonin-Kinasen und phosphorylieren MAP-Kinase-Kinasen (MAP2-Kinasen) innerhalb eines konservierten Motivs in der Subdomäne VIII der Kinasedomäne (Kyriakis and Avruch, 2001). Die dualspezifischen MAP2-Kinasen phosphorylieren ihrerseits MAP-Kinasen an einem Threonin und Tyrosin innerhalb des ebenfalls konservierten Thr-X-Tyr-Motivs, welches sich auch in der Subdomäne VIII der Kinasedomäne der entsprechenden MAP-Kinase befindet (Kyriakis and Avruch, 2001; Payne et al., 1991). Für die volle Aktivität einer MAP-Kinase ist die Phosphorylierung an beiden Aminosäuren erforderlich.

In Säugern werden die MAP-Kinase-Signalwege, welche nach der jeweiligen MAP-Kinase benannt sind, anhand spezifisch konservierter Reste in dem Aktivierungsmotiv Thr-X-Tyr in vier Hauptgruppen aufgeteilt: p38 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ / $\sigma$ , JNK (*c-Jun-N-terminal kinase*)1/2/3, ERK (*extra cellular regulating kinase*)1/2 und ERK5. Es existiert ebenfalls eine Reihe an weiteren Proteinen, die eine hohe Sequenzhomologie zu den MAP-Kinasen aufweisen, wie ERK7 und ERK8 (Whitmarsh, 2007).

MAP-Kinasen sind Prolin-gerichtete Serin/Threonin-Kinasen, d.h. sie phosphorylieren in dem Sequenzmotiv P-T/S-P Serine oder Threonine, welchen in der primären Aminosäuresequenz direkt N- oder C-terminal mindestens ein Prolin benachbart ist (Alvarez et al., 1991; Davis, 2000). Zu den am besten charakterisierten Substraten von MAP-Kinasen gehören Transkriptionsfaktoren, durch deren Phosphorylierung MAP-Kinasen die Genexpression kontrollieren. Dazu kommen Proteinkinasen, Proteinphosphatasen, Scaffold- oder Adapterproteine sowie Zytoskelettproteine als weitere Substrate (Awano et al., 2008; Bogoyevitch and Kobe, 2006; Widmann et al., 1999).



### 1.1.1 Die MAP-Kinase JNK

JNK wurde zum ersten Mal durch Kyriakis und Avruch beschrieben. Sie isolierten JNK aus der Leber von Ratten, die mit Cycloheximid behandelt worden waren und konnten zeigen, dass es sich um eine Serin/Threonin-Kinase handelt, die das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP-2) phosphoryliert (Kyriakis and Avruch, 1990). Unabhängige Studien identifizierten JNK als Kinase, die nach Stimulation mit UV-Licht, Stress oder Phorbol ester durch Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierung aktiviert wird und sodann c-Jun in der N-terminalen Aktivierungsdomäne an Serin 63 und 73 phosphoryliert (Adler et al., 1992; Hibi et al., 1993; Kyriakis et al., 1991; Pulverer et al., 1991) sowie als eine Proteinkinase, die durch Interleukin-1 in Zelllinien und *in vivo* in der Leber aktiviert wird (Kracht et al., 1994b; Kracht et al., 1994a). Die Klonierung von humanem JNK (Sluss et al., 1994; Kallunki et al., 1994; Derijard et al., 1994) und JNK aus der Ratte (Kyriakis et al., 1994) führte zur Identifizierung von JNK als Mitglied der MAP-Kinasen.

Drei JNK-Gene kodieren für zehn Isoformen, die durch alternatives Spleißen generiert werden und untereinander eine Homologie von 80-90% aufweisen. Von allen drei JNK-Genen abgeleitete Spleißvarianten des äußersten 3'-Endes resultieren in JNK-Proteinen ohne und mit C-terminaler Verlängerung, die eine Größe von 45-48 kD bzw. 54-57 kD aufweisen (Typ 1 und Typ 2 JNKs). Das auf die JNK1 und 2 prä-mRNAs beschränkte Spleißen innerhalb der Subdomäne IX und X der Kinasedomäne führt in diesem Bereich zu Sequenzunterschieden und zu den JNK-Isoformen Typ  $\alpha$  und Typ  $\beta$ , welche sich in ihrer Affinität zu Substraten wie c-Jun/ATF-2 und Elk-1 und der Phosphorylierungseffizienz unterscheiden (Gupta et al., 1996). Die Expression von *jnk1* und *jnk2* ist ubiquitär, während *jnk3* in Gehirn, Herz und Testis exprimiert wird. Hierbei kommt es sehr auf die Spezifität der verwendeten Anti-JNK Antikörper an (Finch et al., 2001). Unveröffentlichte Daten aus der Arbeitsgruppe Kracht zeigen allerdings, dass in JNK1/2-defizienten Zelllinien noch UV-stimulierbare JNK-Isoformen von einem Antikörper erkannt werden, so dass JNK3 eventuell auch in Fibroblasten und Epithelzellen exprimiert werden kann (Diplomarbeit Inja Waldhauer, 2004).

Vor allem funktionelle Untersuchungen in *knock out* Maus-Modellen führten zu einem erweiterten Verständnis der Beteiligung von JNK an (patho)physiologischen Prozessen sowie an bestimmten Krankheiten. Die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen und die Einbindung von JNK in gestörte Signalnetzwerke sind dabei aber oft nur unvollständig aufgeklärt worden.

So sind *jnk1* und 2 essentiell für die Entwicklung des Gehirns. *jnk1*<sup>-/-</sup> (Dong et al., 1998), *jnk2*<sup>-/-</sup> (Yang et al., 1998) und *jnk3*<sup>-/-</sup>-Mäuse (Yang et al., 1997) sowie *jnk1*<sup>-/-</sup>/*jnk3*<sup>-/-</sup> und *jnk2*<sup>-/-</sup>/*jnk3*<sup>-/-</sup>-Mäuse (Kuan et al., 1999) sind überlebensfähig und weisen keine drastischen Abnormalitäten auf. *jnk1*<sup>-/-</sup>/*jnk2*<sup>-/-</sup>-Mäuse sind allerdings aufgrund von Dysregulationen der Apoptose im Gehirn embryonal letal (Kuan et al., 1999; Sabapathy et al., 1999). Die Embryonen weisen vor dem Schließen des Neuralrohrs in den seitlichen Kanten des Rautenhirns eine reduzierte Apoptose auf, was sich in einer Exencephalie manifestiert, während im Vorderhin eine verstärkte Apoptose sowie eine erhöhte Caspase-3-Aktivität zu beobachten ist (Kuan et al., 1999). Ein vergleichbarer Befund findet sich auch in *Drosophila melanogaster* (Sluss et al., 1996; Xia and Karin, 2004). Diese Beispiele verdeutlichen, dass JNK sowohl eine pro- als auch eine anti-apoptotische Funktion hat.

Neben ihrer Beteiligung an der Entwicklung des Gehirns, spielen JNK1 und 2 auch eine Rolle bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort. So haben sie einen Einfluss auf die Differenzierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Effektorzellen. Sowohl *jnk1*- (Dong et al., 1998) als auch *jnk2*-defiziente (Yang et al., 1998) murine CD4<sup>+</sup>-T-Zellen differenzieren bevorzugt in T<sub>H</sub>2-Effektorzellen. Zudem sind JNK1 und 2 an der Aktivierung von zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen involviert, wobei sie hier gegensätzliche Funktionen aufweisen. So ist die Expansion von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die defizient in *jnk1* sind, stark vermindert und die Expression von IL-2 und IFN- $\gamma$  ist in diesen Zellen reduziert. Im Gegensatz dazu exprimieren *jnk2*-defiziente CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erhöhte Mengen an IL-2 und IFN- $\gamma$  (Arbour et al., 2002; Conze et al., 2002).

Den JNK-Isoformen wird außerdem eine Beteiligung an neurodegenerativen (Alzheimer, Parkinson), metabolischen (Typ I und Typ II Diabetes) und chronisch entzündlichen Erkrankungen (Rheumatoide Arthritis) sowie an der Entstehung von Krebs, Arteriosklerose, Hypertrophie, angeborener Gehörlosigkeit und Ischämie zugesprochen (Johnson and Nakamura, 2007).

*jnk1*-defiziente Mäuse, die auf einer fettreichen Diät gehalten werden oder *ob/ob*-Mäuse, die genetisch bedingt zu Fettleibigkeit neigen, leiden weniger an Adipositas und weisen eine verbesserte Insulin-Resistenz und eine verstärkte Insulin-Signalweiterleitung auf als die Kontrollmäuse (Hirosumi et al., 2002).

Der JNK-Signalweg wird durch zellulären Stress (Hitzeschock, UV-Licht, oxidativer Stress, osmotischer Stress), proinflammatorische Zytokine (TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ ), Proteinsyntheseinhibitoren (Anisomycin, Cycloheximid) oder Zytostatika (Cis-Platin) aktiviert (Kyriakis and Avruch, 2001). Man könnte diese Situation auch so verallgemeinern, dass es schwieriger ist einen Stimulus zu finden, der JNK nicht aktiviert als umgekehrt. Hierbei variieren die einzelnen Stimuli hinsichtlich der Kinetik und der Stärke der Aktivierung des JNK-Signalwegs. So bewirkt die Stimulation mit IL-1 eine schnelle, aber transiente JNK-Aktivierung, während die Stimulation mit UV-Licht oder  $\gamma$ -Strahlung zu einer raschen und lang anhaltenden Aktivierung des JNK-Signalwegs führt. Bei einer Stimulation mit Zytostatika wie Cis-Platin kommt es zu einer später einsetzenden, starken und lang anhaltenden Aktivierung.

JNK wird durch die beiden MAP2-Kinasen MKK4 und MKK7 an Thr183 und Tyr185 phosphoryliert und somit aktiviert. Während MKK7 ausschließlich JNK phosphoryliert (Holland et al., 1997; Moriguchi et al., 1997; Tournier et al., 1997), kann MKK4 auch die Phosphorylierung von p38 katalysieren (Derijard et al., 1995; Lin et al., 1995). Sowohl MKK4 als auch MKK7 sind an der stressvermittelten Aktivierung von JNK beteiligt, während die durch Zytokine wie IL1 oder TNF verursachte JNK-Aktivierung hauptsächlich über MKK7, *in vivo* aber auch über MKK4, läuft (Tournier et al., 2001). Obgleich es sich bei beiden MAP2-Kinasen um dualspezifische Kinasen handelt, wird *in vitro* Thr183 bevorzugt durch MKK7 und Tyr185 durch MKK4 phosphoryliert (Lawler et al., 1998; Tournier et al., 2001).

MKK4 und MKK7 werden durch eine Vielzahl an MAP3-Kinasen aktiviert. Dazu gehören die Mitglieder der MEKK-Gruppe (MEKK1-4), der MLK-Familie (*mixed-lineage kinase*, MLK1-3,

DLK und LZK), der ASK-Gruppe (*apoptosis signaling regulating kinase*, ASK1 und 2) sowie TAK1 (*TGF $\beta$ -activated kinase 1*) und TPL (*tumor progression locus*) (Davis, 2000).

### 1.1.2 Substrate von JNK

Die bekanntesten JNK-Substrate stellen Transkriptionsfaktoren dar, über deren Phosphorylierung JNK die Expression einer Reihe von Genen kontrolliert. Das wohl am besten charakterisierte JNK-Substrat ist der Transkriptionsfaktor c-Jun, welcher von JNK in der N-terminalen Transaktivierungsdomäne an Serin63, Serin73, Threonin91 und Threonin93 phosphoryliert wird (Adler et al., 1992; Hibi et al., 1993; Morton et al., 2003). Dies führt sowohl zu einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität (Pulverer et al., 1991) als auch zu einer erhöhten Unempfindlichkeit gegenüber der Ubiquitin-abhängigen Degradation (Fuchs et al., 1996; Musti et al., 1997).

c-Jun ist ein bZIP-Protein (*basic region leucine zipper*) und bildet mit anderen bZIP-Proteinen der Jun-Familie (c-Jun, JunB, JunD), der Fos-Familie (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) und der ATF-Familie (ATF2, LRF/ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2) Homo- oder Heterodimere, die als AP-1 (*activator protein-1*) bezeichnet werden (Chinenov and Kerppola, 2001; Eferl and Wagner, 2003; Shaulian and Karin, 2002).

Von diesen Proteinen sind JunB (Li et al., 1999), JunD (Kallunki et al., 1996; Yazgan and Pfarr, 2002), ATF2 (Gupta et al., 1995; Livingstone et al., 1995) und JDP2 (Katz et al., 2001) ebenfalls JNK-Substrate. Die Phosphorylierung von JunB (Li et al., 1999), JunD (Yazgan and Pfarr, 2002) und ATF2 (Gupta et al., 1995; Livingstone et al., 1995; van Dam et al., 1995) resultiert in einer verstärkten transkriptionellen Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren. Zudem kommt es bei ATF2 ähnlich wie bei c-Jun zu einer erhöhten Stabilität des Proteins (Fuchs et al., 2000). Die funktionelle Bedeutung der JDP2-Phosphorylierung ist nicht bekannt.

AP-1-Proteine binden relativ oft an JNK. Dieser Effekt wurde unter anderem zur Konstruktion zellpermeabler Peptidinhibitoren benutzt (Bonny et al., 2005; Gaestel and Kracht, 2009; Holzberg et al., 2003).

Elk-1 ist ebenfalls ein JNK Substrat, welches nach Phosphorylierung eine gesteigerte transkriptionelle Aktivität aufweist, bedingt durch die zunehmende Komplexbildung mit dem Serum Response Faktor (Gille et al., 1995; Whitmarsh et al., 1995).

Net (Elk-3) ist ein Transkriptionsfaktor, der unter normalen Serumbedingungen hauptsächlich im Zellkern lokalisiert ist und die Transkription inhibiert. Die Phosphorylierung durch JNK an vier Serinen innerhalb der nukleären Exportbox verstärkt seinen nukleären Export und hebt somit die durch Net vermittelte Repression der Transkription auf (Ducret et al., 1999; Ducret et al., 2000).

Die Phosphorylierung der NFAT- (*nuclear factor of activated T-cells*) Proteinfamilienmitglieder NFATc3 (Chow et al., 1997) und NFATc1 $\alpha$  (Chow et al., 2000) durch JNK führt zu einer Inhibierung ihrer transkriptionellen Aktivität, indem sie die Translokation in den Zellkern aktivierter T-Zellen unterbindet, die Aktivität von NFATc2 hingegen wird erhöht (Ortega-Perez et al., 2005).

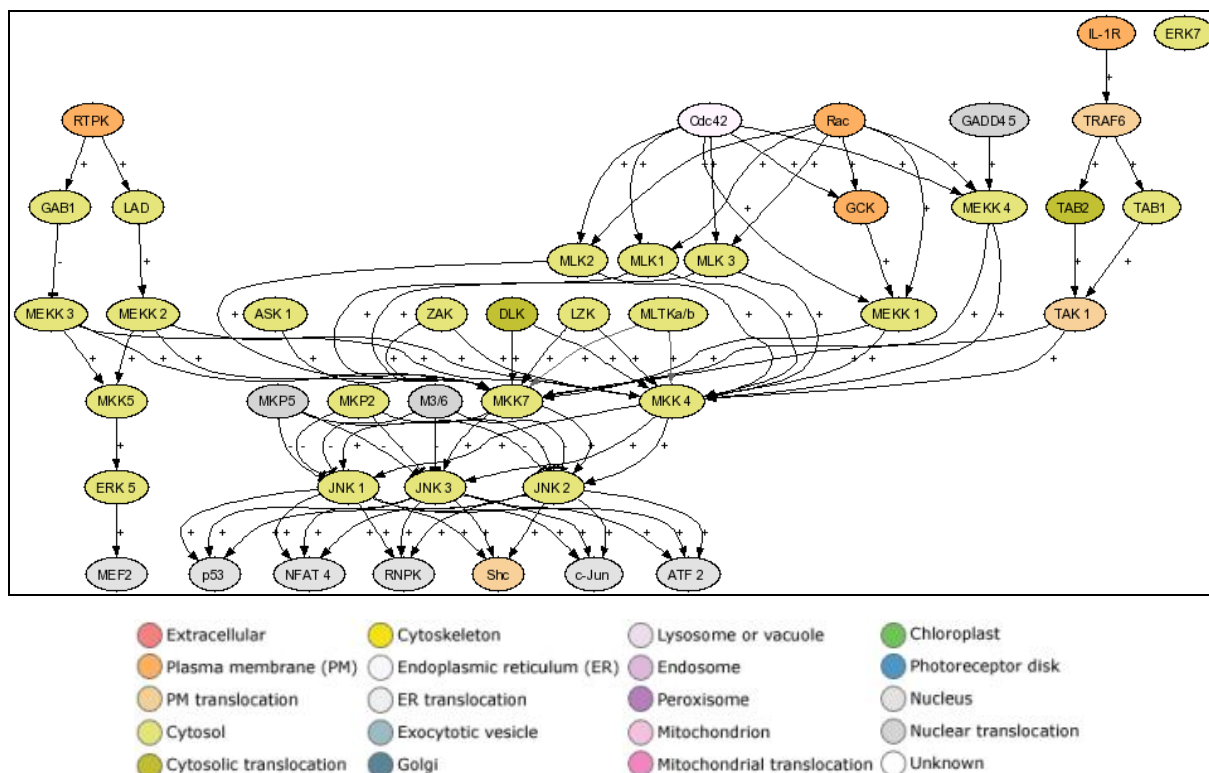
Neben einer Reihe an weiteren Transkriptionsfaktoren, wie p53 (Adler et al., 1997) und c-myc (Noguchi et al., 1999), befinden sich nukleäre Hormonrezeptoren, wie PPAR- $\gamma$ 1 (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 1*) (Camp et al., 1999), der Glucocorticoid-Rezeptor (Rogatsky et al., 1998) und die Retinsäurerezeptoren RXR $\alpha$  (Adam-Stitah et al., 1999; Lee et al., 2000) und RAR $\alpha$  (Srinivas et al., 2005) unter den JNK-Substraten.

Zu diesen zählen auch einige Proteine der Bcl-2-Familie, die eine essentielle Rolle im intrinsischen Apoptose-Signalweg spielen. Die anti-apoptotische Funktion von Bcl-xL (Kharbanda et al., 2000) und Mcl-1 (Inoshita et al., 2002) wird durch eine JNK-Phosphorylierung inhibiert. Es ist allerdings umstritten, ob die Phosphorylierung von Bcl2 seine anti-apoptotische Funktion fördert (Deng et al., 2001; Ito et al., 1997) oder inhibiert (Yamamoto et al., 1999). Die Phosphorylierung von BimL und Bmf löst die zytosolische Verankerung dieser Proteine von Dynein und Myosin V Motor-Komplexen und fördert somit ihre pro-apoptotische Aktivität (Lei and Davis, 2003). Bax wird durch die Phosphorylierung durch JNK aktiviert und transloziert zu den Mitochondrien, wo es seine pro-apoptotische Wirkung entfalten kann (Kim et al., 2006a).

JNK phosphoryliert ebenfalls die beiden Isoformen  $\xi$  und  $\sigma$  der zytosolischen 14-3-3 Anker-Proteine, welche daraufhin unter anderem gebundenes Bax freigeben und dessen Translokation zu den Mitochondrien ermöglichen (Tsuruta et al., 2004). Das an den Insulinrezeptor gebundene Protein IRS-1 (*Insulin Receptor Substrate 1*) ist ein anderes Adapter-Protein, welches durch JNK phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung an Serin 307 stört die Bindung von IRS-1 an den Insulinrezeptor und somit den durch Insulin vermittelten Signalweg (Aguirre et al., 2000).

Weitere JNK-Substrate sind Mikrotubuli-assoziierte Proteine und Intermediärfilamentproteine. So konnte gezeigt werden, dass JNK die Mikrotubuli-assoziierten Proteine 1B und 2 phosphoryliert (Chang et al., 2003; Kawachi et al., 2005; Kyriakis and Avruch, 1990) und dadurch die Mikrotubulipolymerisation unterstützt (Chang et al., 2003). Die JNK-katalysierte Phosphorylierung von SCG10 (*superior cervical ganglion 10*) reduziert seine Mikrotubulidestabilisierende Wirkung und trägt somit ebenfalls zur Mikrotubulipolymerisation bei (Neidhart et al., 2001). Die Phosphorylierung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins tau hingegen vermindert seine Fähigkeit Mikrotubulipolymerisation zu fördern (Yoshida et al., 2004).

Die bisher zitierten Arbeiten könnten den Eindruck erwecken, dass bereits sehr viele putative JNK-Substrate eindeutig identifiziert wurden. Allerdings wurden nur für einen kleinen Teil der JNK-Substrate alle Kriterien erfüllt, die heutzutage erforderlich sind, um zu belegen, dass das Substrat auch unter physiologischen Bedingungen phosphoryliert wird (Cohen, 2000; Cohen, 2010). Zudem gibt es bis jetzt noch keine proteomweiten Studien, in denen systematisch physiologisch relevante JNK-Substrate in einem gegebenen Zusammenhang identifiziert wurden. So sind bisher etwas über 50 JNK-Substrate bekannt (Bogoyevitch and Kobe, 2006), im Gegensatz zu ungefähr 160 gut dokumentierten ERK1/2-Substraten (Avruch, 2007). Es ist wahrscheinlich, dass noch eine Reihe an weiteren wichtigen JNK-Substraten existiert, wenn man sich die ausgeprägte Komplexität des JNK-Signalweges mit einer Vielzahl an aktivierenden Stimuli und dem Vorhandensein von zehn JNK-Isoformen vor Augen hält (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Schematische Zusammenfassung der Komplexität des JNK-Signalweges**

Gary L. Johnson, JNK MAPK Pathway. *Sci. Signal.* (Connections Map in the Database of Cell Signaling, as seen 25 February 2010), [http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/stkecm:CMP\\_10827](http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/stkecm:CMP_10827). Stand 2003.

### 1.1.3 Docking sites in JNK-Substraten

JNK ist eine Prolin-gerichtete Serin/Threonin-Kinase und phosphoryliert ihre Substrate so wie die anderen MAP-Kinasen auch, an einem Serin oder Threonin, auf welches unmittelbar C-terminal ein Prolin folgt. Ein Serin/Threonin-Prolin-Motiv ist in den meisten Fällen allerdings nicht ausreichend für eine effiziente Phosphorylierung durch JNK. Vielmehr werden spezifische Bindungsstellen (*docking sites*, *D-sites*) benötigt, die an der Substraterkennung und -Bindung sowie an einer effizienten und genauen Phosphorylierung beteiligt sind (Sharrocks et al., 2000).

Wird die *docking site* in c-Jun deletiert, so nimmt die Effizienz der Phosphorylierung von c-Jun *in vitro* ab und es werden bevorzugt von Serin63 und Serin73 abweichende Aminosäuren phosphoryliert (Kallunki et al., 1996).

*Docking sites* sind nicht nur auf Substrate von JNK bzw. Substrate anderer MAP-Kinasen beschränkt, sondern finden sich auch in weiteren MAP-Kinase-interagierenden Proteinen, wie MAP2-Kinasen oder MAP-Kinase-Phosphatasen. Sowohl MKK4 als auch MKK7 verfügen über *docking sites*. Während MKK4 eine klassische *docking site* besitzt (Ho et al., 2003), hat MKK7 drei dicht aufeinanderfolgende *docking sites*, die alle zur Bindung von JNK beitragen und eine effiziente Phosphorylierung sowie eine effiziente katalytische Aktivität von JNK ermöglichen (Ho et al., 2006). Ebenso enthalten die p38/JNK-spezifischen Phosphatasen MKP5 und MKP7 *docking sites* (Tanoue et al., 2001).

Die minimale Konsensussequenz einer *docking site*, wie man sie in JNK-interagierenden Proteinen findet, besteht aus einem Motiv von basischen Aminosäuren gefolgt von einem  $\Phi$ -X- $\Phi$ -Motiv im Abstand von 3-5 Aminosäuren.  $\Phi$  steht hierbei für eine hydrophobe Aminosäure, wobei es sich in den meisten Fällen um Leucin handelt. In Transkriptionsfaktoren, die durch p38 oder ERK phosphoryliert werden, können dem  $\Phi$ -X- $\Phi$ -Motiv hydrophobe Aminosäuren nachgestellt sein. Diese können das  $\Phi$ -X- $\Phi$ -Motiv zum Teil vollständig ersetzen. In p38/ERK-Interaktionspartnern, die keine Transkriptionsfaktoren sind, besteht die Konsensussequenz einer *docking site* aus hydrophoben Aminosäuren gefolgt von basischen und dem  $\Phi$ -X- $\Phi$ -Motiv. Das  $\Phi$ -X- $\Phi$ -Motiv kann auch hier wieder fehlen (Sharrocks et al., 2000). Es handelt sich hierbei allerdings um grobe Richtlinien.

Die Bindung zwischen JNK und einem Interaktionspartner muss nicht unbedingt über eine *docking site* erfolgen. Für c-Jun konnte gezeigt werden, dass neben der im N-Terminus lokalisierten *docking site*, C-terminal von der Phosphorylierungsstelle noch eine weitere Bindungsstelle für JNK existiert, welche nicht über ein *docking site* Motiv verfügt (May et al., 1998). Ebenso erfolgt die Bindung zwischen JDP2 und JNK über keine klassische *docking site* (Katz and Aronheim, 2002).

Für ERK5 konnte ebenfalls demonstriert werden, dass die Interaktion mit der MAP2-Kinase MEK5 über keine *docking site*, sondern über ein neues Bindungsmotiv bestehend aus sauren Aminosäuren vermittelt wird (Seyfried et al., 2005).

## 1.2 Die Argonaut-Proteinfamilie

Die Argonaut-Proteine bilden eine speziesübergreifende, hochkonservierte Proteinfamilie. Ihre Anzahl variiert von einem Protein in *Schizosaccharomyces pombe* (Carmell et al., 2002) bis hin zu 27 Proteinen in *Caenorhabditis elegans* (Yigit et al., 2006). Sie werden weiter in die beiden Subfamilien Ago und Piwi unterteilt, je nachdem ob sie eine größere Ähnlichkeit mit Ago1 aus *Arabidopsis thaliana* oder eine größere Ähnlichkeit mit dem Ago-Protein Piwi (*P-element induced wimpy testis*) aus *D. melanogaster* besitzen (Hutvagner and Simard, 2008). Kürzlich wurde eine neue, auf *C. elegans* beschränkte Subfamilie an Ago-Proteinen entdeckt, die WAgo-Subfamilie (Gruppe III Argonauten). Diese hat mit 18 Mitgliedern den größten Anteil an Ago-Proteinen in *C. elegans* (Yigit et al., 2006). Die Proteine der Ago-Subfamilie sind ubiquitär in Tieren, Pflanzen und *S. pombe* exprimiert, während die der Piwi-Subfamilie ausschließlich in Tieren präsent sind und wie für *D. melanogaster*, Zebrafisch und Maus gezeigt, nur in Keimzellen exprimiert werden (Hock and Meister, 2008; Sasaki et al., 2003). Im Menschen existieren acht Ago-Proteine, die von acht unterschiedlichen Genen kodiert werden. Vier davon (Ago1-4) gehören zur Ago-Subfamilie, während die übrigen vier (HIWI1, HIWI2, HIWI3 und HILI) die Piwi-Subfamilie bilden (Sasaki et al., 2003). Ago-Proteine sind durch eine PAZ-Domäne, benannt nach dem Vorkommen dieser in den Ago-Proteinen Piwi, Argonaute und Zwille, sowie einer PIWI-Domäne, benannt nach dem Protein PIWI, charakterisiert (Cerutti et al., 2000; Song et al., 2004). Vor der PIWI-Domäne liegt die N-terminale Domäne und zwischen PAZ- und PIWI-Domäne befindet sich die MID-

Domäne (Song et al., 2004). Auf die funktionelle Bedeutung dieser Domänen wird später eingegangen.

Ago-Proteine wurden zuerst in *A. thaliana* als für die Pflanzenentwicklung wichtige Proteine beschrieben (Bohmert et al., 1998; Moussian et al., 1998). Gleichzeitig wurde ihnen eine Rolle bei der Teilung von Keimstammzellen in *D. melanogaster* zugeteilt (Lin and Spradling, 1997). Intensive Untersuchungen dieser Proteine in den letzten Jahren in einer Reihe von verschiedenen Organismen haben gezeigt, dass Ago-Proteine die Hauptakteure bei der Regulation von Genexpression durch kleine nicht-kodierende RNAs sind.

### **1.2.1 Die Funktion von Ago-Proteinen bei der Regulation von Genexpression durch kleine nicht-kodierende RNAs**

Die Regulation der Genexpression durch kleine, 20-30 Nukleotid-lange, nicht-kodierende RNAs wird als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet. Sie kann sowohl auf Ebene der Transkription durch Modulation der Chromatinstruktur über epigenetische Mechanismen (Bartel, 2004; Janowski et al., 2006; Kawasaki and Taira, 2004; Kawasaki et al., 2005; Kim et al., 2006b) als auch posttranskriptional auf Ebene der mRNA-Degradation oder durch Hemmung der Translation stattfinden (Behm-Ansmant et al., 2006; Chen et al., 2009; Wu et al., 2006). Endogene, kleine nicht-kodierende RNAs kommen in vielen Varianten vor und werden in Abhängigkeit von ihrem Ursprung und ihrer Biogenese in microRNAs (miRNAs), small interfering RNAs (siRNAs) und piwiRNAs (piRNAs) unterteilt (Kim et al., 2009). In Abschnitt 1.3 wird näher auf die Klasse der miRNAs eingegangen. Reife, kleine nicht-kodierende RNAs sind doppelsträngig mit 5'-Phosphatenden und 3'-OH-Enden, die um zwei Nukleotide überhängen (Meister and Tuschl, 2004). Um ihre Funktion ausüben zu können, werden die muren, kleinen nicht-kodierenden RNAs als Einzelstrang (hierbei handelt es sich um den sogenannten *guiding strand*) in einen aus mehreren Komponenten bestehenden Effektor-Komplex, den sogenannten *RNA induced silencing complex* (RISC), eingebaut. Obwohl die bislang isolierten Effektor-Komplexe je nach Reaktionsbedingung in Größe und Zusammensetzung variieren, ist ihnen jedoch gemein, dass sie neben der kleinen nicht-kodierenden RNA mindestens ein Ago-Protein enthalten, welches essentiell für die RISC-Aktivität ist (Meister and Tuschl, 2004).

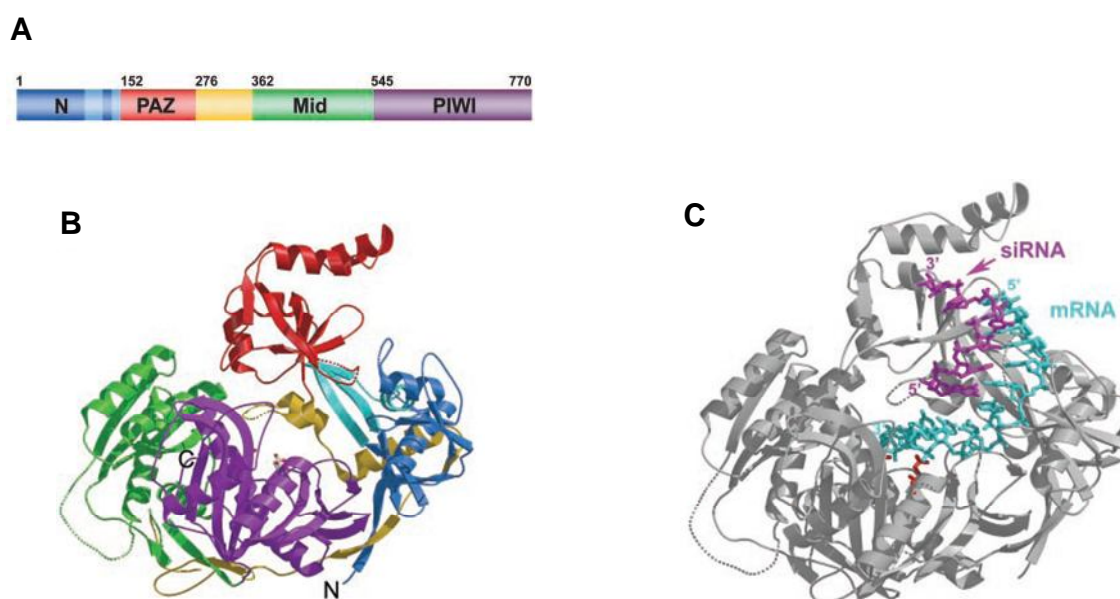
Genetische und biochemische Studien sowie Strukturuntersuchungen von ganzen Ago-Proteinen oder ihrer isolierten Domänen enthüllten, dass Ago-Proteine die kleinen nicht-kodierenden RNAs zusammen mit ihren Ziel-mRNAs binden und die katalytische Funktion im RISC ausüben. Dreidimensionale NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallstrukturuntersuchungen der PAZ-Domäne von Ago2 aus *D. melanogaster* konnten zeigen, dass die PAZ-Domäne ein Oligonukleotidbindungsmotiv enthält (Lingel et al., 2003; Song et al., 2003). Durch die Analyse der Kristallstruktur der PAZ-Domäne von humanem Ago1 und der NMR-Struktur der PAZ-Domäne von Ago2 aus *D. melanogaster* konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese Domäne spezifisch die zwei 3'-überhängenden Nukleotide der kleinen nicht-kodierenden RNA erkennt und diese in einer hydrophoben Tasche verankert (Lingel et al., 2004; Ma et al., 2004). Die 5'-

Phosphatgruppe ist in einer tiefen Tasche zwischen der MID- und PIWI-Domäne lokalisiert (Ma et al., 2005).

Ist eine siRNA oder eine miRNA nahezu oder perfekt komplementär zu ihrer Ziel-mRNA, dann wird diese zehn Nukleotide entfernt von dem 5'-Nukleotid der mi/siRNA geschnitten, wobei Produkte mit einem 5'-Phosphat- und einem 3'-OH-Ende entstehen. Aus der Kristallstruktur der Ago-Proteine aus *Pyrococcus furiosus*, *Archaeoglobus fulgidus* sowie *Aquifex aeolicus* geht hervor, dass die PIWI-Domäne eine RNase H-ähnliche Struktur aufweist und ein konserviertes DDH-Motiv besitzt (Parker et al., 2004; Rivas et al., 2005; Song et al., 2004; Yuan et al., 2005).

RNase H ist eine Endonuklease, die RNA in RNA-DNA-Hybriden schneidet. Wie beim RISC, ist die Reaktion abhängig von divalenten Kationen und hinterlässt Produkte mit einem 5'-Phosphat- und einem 3' OH-Ende. Die katalytisch aktiven Aminosäuren von RNase H-Enzymen sind drei Aspartate oder zwei Aspartate und ein Glutamat, welche das DDD/E-Motiv bilden (Chapados et al., 2001; Nowotny et al., 2005).

In Abbildung 2 sind die strukturellen Eigenschaften von Ago-Proteinen anhand des Ago-Proteins aus *P. furiosus* zusammengefasst:



**Abbildung 2: Strukturelle Eigenschaften von Ago-Proteinen, dargestellt anhand des Ago-Proteins aus *P. furiosus***

**A:** Schematische Darstellung der Proteindomänen: N (N-terminale Domäne), PAZ (Piwi Argonaute Zwillie Domäne, RNA-bindende Eigenschaften), Mid (Mid-Domäne, Inhibierung der Translationsinitiation (siehe weiter unten)), PIWI (*P-element induced wimpy testis* Domäne, Endonukleaseaktivität). **B:** Darstellung der Proteinstruktur mittels des Bändermodells. **C:** Darstellung des Proteins zusammen mit gebundener siRNA (lila) und mRNA (türkis) durch das Bändermodell. Die katalytischen Aminosäuren der PIWI-Domäne sind rot dargestellt (Song et al., 2004).

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde vermutet, dass Ago-Proteine als Endonukleasen im RISC fungieren. In weiteren Versuchen konnte dann zunächst für humanes Ago2 (hAgo2) eine Endonukleasefunktion nachgewiesen werden. So sind RISCs, die humanes Ago2 enthalten, in der Lage ihre Ziel-mRNA zu spalten und Ago2-defiziente murine embryonale Fibroblasten weisen



keine RISC-Aktivität auf (Liu et al., 2004; Meister et al., 2004; Rivas et al., 2005). Für eine minimale RISC-Aktivität werden nur hAgo2 und eine kleine nicht-kodierende RNA benötigt, wie es unter Verwendung von rekombinantem humanem Ago2 gezeigt werden konnte (Rivas et al., 2005). Mutationen des DDH-Motivs führen zu einer vollständigen Inaktivierung der RISC-Aktivität *in vivo* und *in vitro* (Liu et al., 2004; Rivas et al., 2005). Die drei humanen Ago-Proteine Ago1, Ago3 und Ago4 verfügen über keine Endonukleaseaktivität (Liu et al., 2004; Meister et al., 2004). Bei Ago1 und Ago4 weicht die Aminosäuresequenz des katalytischen Motivs von der Konsensussequenz ab, allerdings weist Ago3 das DDH-Motiv vollständig auf (Rivas et al., 2005). Neben humanem Ago2 konnte auch für Ago1 und Ago4 aus *A. thaliana* (Baumberger and Baulcombe, 2005; Qi et al., 2005; Qi et al., 2006) oder für das Ago-Protein aus *S. pombe* (Irvine et al., 2006) eine Endonukleaseaktivität nachgewiesen werden. Ago1 und Ago2 aus *D. melanogaster* enthalten ebenfalls ein vollständiges DDH-Motiv und sind als Endonukleasen katalytisch aktiv. Allerdings ist Ago1 weniger effizient als Ago2, da es die Spaltprodukte langsamer freigibt, was mit einem verminderten katalytischen Durchsatz einhergeht (Forstemann et al., 2007).

Bei einer inkompletten Sequenzübereinstimmung zwischen der im RISC gebundenen si/miRNA und ihrer Ziel-mRNA, was in Säugern der häufigere Fall ist, kommt es zur Inhibierung der Translation oft ohne Degradation der mRNA. Der dahinterstehende Mechanismus ist weniger gut verstanden und wird derzeit intensiv erforscht. Im Moment existiert eine Reihe von zum Teil kontroversen Beobachtungen zu dieser Thematik.

Es wurde zunächst angenommen, dass si/miRNAs, die nicht komplementär zu ihrer Ziel-mRNA sind, die Translation inhibieren ohne den mRNA-Level zu beeinflussen. Später konnte unter anderem am Beispiel der *let-7* und *lin-4* miRNAs aus *C.elegans* gezeigt werden, dass diese zur Degradation ihrer Ziel-mRNA führen können (Bagga et al., 2005). In *D. melanogaster* und Säugern läuft die durch miRISC verursachte Degradation über den normalen 5'-3'-mRNA-Abbauweg ab (Behm-Ansmant et al., 2006; Chen et al., 2009). Im Zebrafisch und in humanen Zellen ist der Abbau Konsequenz einer beschleunigten Deadenylierung (Chen et al., 2009; Giraldez et al., 2006; Wu et al., 2006). In humanen Zellen wurde zudem beobachtet, dass alle vier Ago Proteine der Argonaut-Unterfamilie unabhängig von einer miRNA diese Deadenylierung fördern (Chen et al., 2009). Ago2-miRNA-Komplexe sind in der Lage die Degradation von mRNA auch über die Bindung an AU-reiche Elemente zu stimulieren (Jing et al., 2005).

mRNA Degradation und translationale Hemmung können je nach miRNA/mRNA-Paar separat erfolgen oder zusammen stattfinden (Behm-Ansmant et al., 2006; Wu et al., 2006). In HEK293T-Zellen konnte gezeigt werden, dass Blockade der Translation und mRNA-Degradation voneinander entkoppelt werden können. Finden jedoch beide Mechanismen statt, dann kommt es zu einer Verstärkung des jeweiligen Effekts (Wu et al., 2006).

Es existieren unterschiedliche Meinungen hinsichtlich des Schrittes, an dem die Translation blockiert wird. Aufgrund der Beobachtungen, dass miRNA-inhibierte Ziel-mRNAs in aktiv translatierenden Polysomen lokalisiert sind (Nottrott et al., 2006; Olsen and Ambros, 1999; Petersen et al., 2006; Slegger et al., 2002; Wu et al., 2006), dass Ago2/miRNA-Komplexe mit

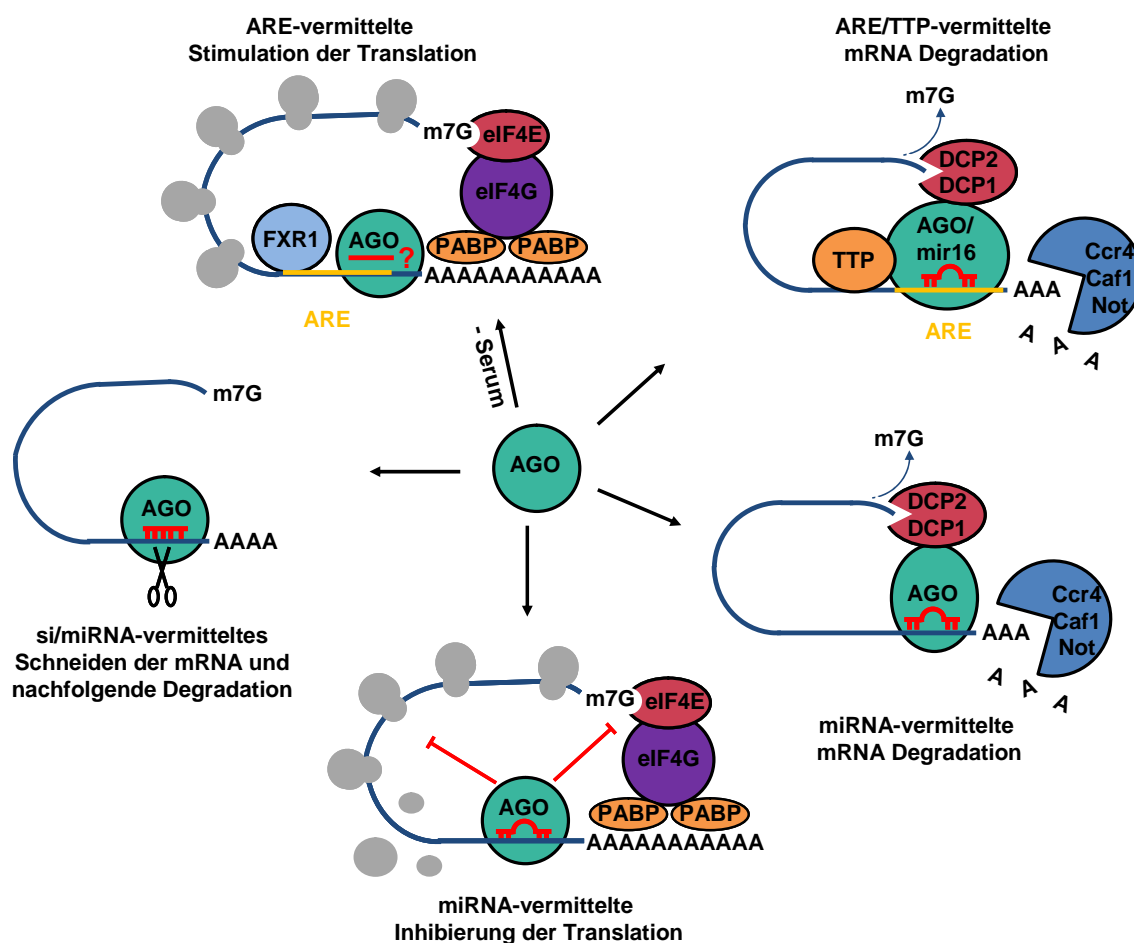
diesen kosedimentieren (Maroney et al., 2006) und dass die Translation von IRES-Reporter-mRNAs miRNA-abhängig inhibiert wird (Petersen et al., 2006), wurde die Hemmung des Elongationsschritts postuliert. Es gibt aber auch Berichte, die dafür sprechen, dass die Translationsinitiation blockiert wird. So konnte beobachtet werden, dass inhibierte Reporter-mRNAs überwiegend im freien mRNP-Pool und nicht in Polysomen lokalisiert sind (Pillai et al., 2005) und dass die Translation von IRES-Reporter-mRNAs durch miRISC nicht behindert wird (Humphreys et al., 2005; Pillai et al., 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung der Translation *in vivo* und *in vitro* sowohl vom m<sup>7</sup>-Gppp-Cap als auch vom Poly(A)-Schwanz abhängig ist (Humphreys et al., 2005; Wakiyama et al., 2007; Wang et al., 2006).

Humanes Ago2 besitzt in seiner MID-Domäne einen als MC-Domäne bezeichneten Bereich, der Sequenzhomologien zum eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor eIF4E aufweist (Kiriakidou et al., 2007). Die strukturelle Ähnlichkeit ist allerdings gering. Humanes Ago2 bindet über die MC-Domäne an das m<sup>7</sup>-Gppp-Cap, verhindert so die Interaktion mit eIF4E und blockiert dadurch die Translationsinitiation (Kiriakidou et al., 2007). Humanes Ago1, 3 und 4 sind auch in der Lage die Translation zu hemmen, allerdings wurde bislang nicht untersucht, ob sie sich dabei desselben Mechanismus bedienen wie Ago2 (Pillai et al., 2004).

Ago1 und Ago2 aus *D.melanogaster* konkurrieren, anders als hAgo2, nicht mit eIF4E um die Bindung an das m<sup>7</sup>-Gppp-Cap. Vielmehr interagiert Ago2-RISC, wenn es an seiner Ziel-mRNA gebunden vorliegt, mit eIF4E und verhindert dadurch die für die Translationsinitiation benötigte Interaktion zwischen eIF4E und dem Translationsinitiationsfaktor eIF4G. *D. melanogaster* Ago1-RISC inhibiert die Translation primär durch den ATP-getriebenen Abbau des Poly(A)-Schwanzes, was allerdings nicht mit einer Degradation der mRNA einhergeht. Zusätzlich wird die Translation durch Ago1-RISC auf der Stufe der Elongation blockiert (Iwasaki et al., 2009).

Neben ihrer inhibitorischen Funktion, können Ago Proteine die Translation aktivieren. Humanes Ago2 bindet zusammen mit FXR1 (*fragile-X-mental-retardation-related protein 1*) unter Serumentzug an AU-reiche Sequenzen und stimuliert so die mRNA-Translation (Vasudevan and Steitz, 2007). Indem sie die miRNA-Menge durch einen bislang unbekanntes Mechanismus erhöhen, greifen Ago-Proteine auch in den miRNA-Syntheseweg ein (Diederichs and Haber, 2007).

In Abbildung 3 sind die Funktionen von Ago-Proteinen bei der Regulation der posttranskriptionellen Genexpression zusammenfassend dargestellt.



**Abbildung 3: Funktionen von Ago-Proteinen bei der Regulation der posttranskriptionellen Genexpression**

Ago-Proteine können siRNAs oder miRNAs binden. Ist die Sequenz der gebundenen si/miRNA komplementär zu der Sequenz der Ziel-mRNA, dann wird die mRNA gezielt durch die Endonukleaseaktivität von Ago gespalten und anschließend degradiert. Bei nicht vollständiger Komplementarität kommt es zur Inhibierung der Translation und/oder Degradation der mRNA. Bis dato existieren unterschiedliche Berichte hinsichtlich des Schrittes, an dem die Translation blockiert wird. Für Ago2-miRNA-Komplexe konnte gezeigt werden, dass diese in der Lage sind die Degradation von mRNA auch über die Bindung an AU-reiche cis-Elemente (AREs) zu stimulieren. Neben ihrer inhibitorischen Funktion ist Ago2 in der Lage zusammen mit FXR1 unter Serumentzug über die Bindung an AU-reiche Sequenzen in der 3'-UTR von TNF $\alpha$  die Translation zu stimulieren. Bei den zuletzt genannten Beispielen handelt es sich allerdings noch um Einzelbefunde. PABP: Poly(A)-Bindeprotein, eIF4G: eukaryotischer Initiationsfaktor 4G, eIF4E: eukaryotischer Initiationsfaktor 4E, Ccr4/Caf1/Not: Deadenylyasekomplex, DCP1/2: Decapping Protein 1/2, TTP: Tristetraprolin, FXR1: *fragile-X-mental-retardation-related protein 1*. Modifiziert nach (Bhattacharyya and Filipowicz, 2007; Stefani and Slack, 2008).

### 1.2.2 Posttranslationale Modifikationen von Ago-Proteinen

Da Ago-Proteine, wie aus dem vorangegangenen Abschnitt ersichtlich ist, als multifunktionelle genregulatorische Proteine fungieren, ist es wahrscheinlich, dass ihre Aktivität durch die Interaktion mit weiteren Proteinen sowie durch posttranslationale Modifikationen reguliert wird.

Bislang sind nur wenige posttranslationale Modifikationen von Ago-Proteinen und die damit einhergehenden Funktionen bekannt.

Humanes Ago2 interagiert mit einer Untereinheit der Typ I Collagen Prolyl-4-Hydroxylase (C-P4H(I)) und kann von dieser an Prolin700 hydroxyliert werden. Die Hydroxylierung erhöht die Stabilität von Ago2, führt zu einer effizienteren siRISC-Aktivität sowie zu einer verstärkten Lokalisation von Ago2 in *Processing bodies* (zytoplasmatische Strukturen auf die in 1.4 näher eingegangen wird) (Qi et al., 2008). Die Phosphorylierung von humanem Ago2 an Serin387 durch MK2 erleichtert ebenfalls seine Lokalisation in *Processing bodies* (Zeng et al., 2008).

Die Ubiquitinierung von murinem Ago2 durch die E3 Ubiquitin-Ligase Lin-41 beeinflusst den Ago2-Abbau und somit zu einem gewissen Anteil die RISC-Aktivität (Rybak et al., 2009).

Die Ago-Proteine der Piwi-Unterfamilie aus der Maus und aus *D. melanogaster* werden durch die Protein-Methyltransferase 5 an Argininen methyliert. In *D. melanogaster* kommt es durch diese Modifikation zur Stabilisierung der Piwi-Proteine. In der Maus werden dadurch weitere Proteininteraktionen gefördert, die für die zelluläre Lokalisation der Piwi-Proteine sowie für die Ausübung ihrer Funktion, wie der Biogenese von piRNAs, wichtig sind (Heo and Kim, 2009).

### 1.3 miRNAs

Die erste Beschreibung einer miRNA erfolgte, als entdeckt wurde, dass die kleine nicht-kodierende RNA lin-4 die Entwicklung in *C. elegans* kontrolliert, indem sie die Translation der Lin-14 mRNA inhibiert (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Bald darauf wurde eine zweite, für die Kontrolle der Entwicklung in *C. elegans* wichtige miRNA beschrieben, nämlich lin-7 (Reinhart et al., 2000). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Expression von miRNAs nicht nur auf Nematoden beschränkt ist, sondern auch in höheren Metazoen vorhanden ist (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001). Zum heutigen Zeitpunkt enthält die miRNA Datenbank miRBase (<http://www.mirbase.org/>) 721 humane, 157 *D. melanogaster*, 174 *C. elegans* und 190 *A. thaliana* miRNAs.

In Säugern befinden sich die Hälfte aller miRNA-Gene in unmittelbarer Nähe zueinander und bilden eine polycistronische Transkriptionseinheit (Lee et al., 2002). Die miRNA-Gene können hierbei sowohl in nichtkodierenden als auch in Protein-kodierenden Bereichen lokalisiert sein. Sie befinden sich dabei häufiger in Introns als in Exons. Die Transkription erfolgt in der Regel durch die RNA Polymerase II (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004), wobei eine Minderheit an miRNA-Genen auch von der RNA Polymerase III transkribiert werden kann (Borchert et al., 2006). In Tieren enthalten die primären als pri-miRNAs bezeichneten Konstrukte Stamm-Schleife-Strukturen und werden von der nukleären RNase III Typ Endonuklease Drosha zur pre-miRNAs prozessiert. Drosha schneidet am Stammende der Stamm-Schleife-Struktur und produziert so Transkripte, die eine Haarnadelstruktur aufweisen (Lee et al., 2002; Lee et al., 2003). Die Katalyse erfordert den Co-Faktor *DiGeorge syndrom critical region gene 8* (DGCR8) im Menschen und Pasha in *D. melanogaster* und *C. elegans* (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Han et al., 2004; Landthaler et al., 2004). Bei miRNA-Genen, die in Introns lokalisiert sind, handelt es sich um einen ko-transkriptionellen Prozess. Während das Transkript am Spleißosom gebunden ist, wird die

Reaktion von Drosha katalysiert noch bevor das Intron vom Spleißosom entfernt wird (Kim and Kim, 2007). Einige in Introns lokalisierte miRNA-ähnliche RNAs in *D. melanogaster* und im Menschen umgehen die Prozessierung durch Drosha. Nach Herausschneiden des Introns formt dieses direkt eine der pre-miRNA ähnliche Haarnadelstruktur (Berezikov et al., 2007; Okamura et al., 2007; Ruby et al., 2007).

Die 70-100 bp langen pre-miRNAs werden dann durch Exportin5 (Lund et al., 2004) ins Zytosol transportiert und dort durch eine weitere RNase III-ähnliche Nuklease, nämlich Dicer, zu reifen 22-mer miRNA-Duplexen verarbeitet (Bernstein et al., 2001).

Anders als in Pflanzen weisen die miRNAs in Tieren häufig keine perfekte Komplementarität zu ihrer Ziel-mRNA auf. Die Bindung der miRNA erfolgt in der Regel in der 3'-UTR der mRNA. Hierbei ist eine hohe Komplementarität zwischen den Nukleotiden 2-8 (*seed region*) im 5'-Ende der miRNA und der mRNA wichtig. Ebenfalls spielt die Sekundärstruktur der Bereiche der 3'-UTR eine Rolle, welche die Bindungsstelle umgeben. Auch ist das 3'-Ende der miRNA von Bedeutung, da es eventuelle Inkomplementarität zwischen der *seed region* und der mRNA kompensieren kann (Stefani and Slack, 2008).

Es gibt einige wenige Fälle, in denen die miRNA eine hohe Komplementarität zur Ziel-mRNA aufweist und es zur Spaltung der mRNA kommt. Ein Beispiel dafür ist die murine miRNA 196, welche die Expression des Transkriptionsfaktors HOXB8 hemmt, der für die Regulation der Entwicklung wichtig ist (Yekta et al., 2004).

Eine miRNA hat in der Regel mehrere Ziel-mRNAs und eine mRNA kann wiederum durch mehrere miRNAs reguliert werden. Ungefähr 30% der proteinkodierenden Gene enthalten potentielle miRNA-Bindungsstellen in ihrer 3'-UTR und unterliegen daher einer möglichen Kontrolle durch miRNAs (Lewis et al., 2005). Zwei unabhängige Untersuchungen an ca. 5000 zellulären Proteinen zeigten, dass die Überexpression oder die Herunterregulation von miRNAs moderate Veränderungen der mRNA und Proteinspiegel von hunderten von zellulären Genprodukten bewirkten (Baek et al., 2008; Selbach et al., 2008). Daher sind miRNAs über multiple, direkte und indirekte „schwache“ Genexpressionseffekte an der Regulation einer Reihe von biologischen Prozessen, wie Entwicklung, Apoptose, Zelldifferenzierung und -Proliferation beteiligt (Bartel, 2004; Filipowicz, 2005) und ihre Dysregulation wird sowohl mit Erkrankungen des Nervensystems und des Herzens als auch mit Tumorbildung und entzündlichen Prozessen in Zusammenhang gebracht.

So besteht eine Beziehung zwischen dem Verlust des mir-20a/b-1 Clusters und Morbus Alzheimer (Hebert et al., 2008) und es wird vermutet, dass der Verlust von mir-133b zur Abnahme der dopaminergen Neuronen beiträgt, so wie es bei Morbus Parkinson beobachtet werden kann (Kim et al., 2007).

In Herzfibroblasten führt die Expression von mir-21 zur interstitiellen Fibrose und Hypertrophie (Thum et al., 2008), während in Kardiomyozyten mir-1 und mir-133 vor Hypertrophie schützen (Care et al., 2007).

Viele Krebsarten weisen ein verändertes miRNA-Expressionsmuster auf. Die miRNAs mir-155, mir-21 und mir-146 sind bei einer Reihe von Krebsarten hochreguliert und werden als Oncogene

betrachtet (Calin and Croce, 2006), während die Fähigkeit zur Expression anderer miRNAs wie mir-15 und mir-16 bei einigen Krebsarten verloren gegangen ist. Solchen miRNAs wird eine tumorsupprimierende Wirkung zugesprochen (Calin et al., 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass in TNF $\alpha$  behandelten synovialen Fibroblasten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis im Vergleich zur Kontrollgruppe die miRNAs mir-146 und mir-155 erhöht sind (Stanczyk et al., 2008). Synoviales Gewebe von Patienten mit Rheumatoider Arthritis zeigt ebenfalls eine Anreicherung der miRNAs mir-146a und mir-146b (Nakasa et al., 2008). Die Expression von mir-146 und mir-155 wird durch proinflammatorische Stimuli induziert (Nakasa et al., 2008; O'Connell et al., 2007; Stanczyk et al., 2008; Taganov et al., 2006). Hierbei ist die mir-146-Expression NF- $\kappa$ B-abhängig (Taganov et al., 2006), während an der mir-155-Expression der JNK-Signalweg beteiligt zu sein scheint, da sie sich durch den JNK-Inhibitor SP600125 hemmen lässt (O'Connell et al., 2007).

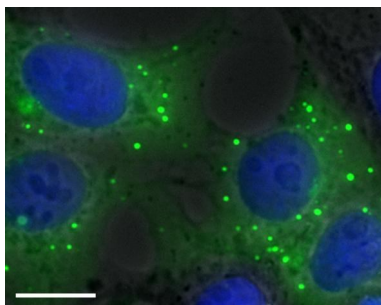
Zusammengefasst ist aufgrund der schwachen Effekte und der Möglichkeit multipler Zielgene eine direkte mechanistische Aussage zur Rolle von miRNAs nur dann möglich, wenn die direkten Ziel-RNAs durch geeignete Methoden bestimmt werden.

#### **1.4 Processing bodies (P-bodies)**

Bei *Processing bodies (P-bodies)*, auch als *GW-bodies* bekannt, handelt es sich um hochdynamische, einheitlich sphäroide, zytoplasmatische Strukturen, die sich aus Ribonukleoproteinpartikeln (RNPs) zusammensetzen und an mRNA-Degradation sowie -Lagerung beteiligt sind. *P-bodies* sind von der Hefe bis zum Säugetier konserviert (Bashkirov et al., 1997; Sheth and Parker, 2003; Eystathiou et al., 2002; Eystathiou et al., 2003; Ingelfinger et al., 2002; van Dijk et al., 2002). Sie lassen sich in Zellen multizellulärer Organismen leicht detektieren (Abbildung 4), während ihre Visualisierung in *Saccharomyces cerevisiae* häufig durch die Überexpression oder Depletion von *P-body*-Komponenten oder durch die Behandlung der Hefe-Zellen mit Stress-Stimuli verstärkt wird (Bregues et al., 2005; Sheth and Parker, 2006; Teixeira et al., 2005). Mit Hilfe von Immunogold-Elektronenmikroskopie wurde gezeigt, dass *P-bodies* in Säugetierzellen elektronendichte Strukturen mit einem Durchmesser von 100-300nm bilden, die von keiner Phospholipid-Doppelschicht umgeben werden, also keine Organellen im „klassischen“ Sinne sind (Eystathiou et al., 2002; Yang et al., 2004).

*P-bodies* wurden zum ersten Mal 1997 durch Bashkirov et al. beschrieben. Dieser klonierte die murine 5'-3'-Exoribonuklease XRNI, welche am 5'-3'-mRNA-Abbau mitwirkt und konnte zeigen, dass diese unter anderem stark angereichert in diskreten punktuellen Strukturen im Zytoplasma vorliegt (Bashkirov et al., 1997). Fünf Jahre später konnten Eystathiou et al. beobachten, dass ein Autoimmunserum von Patienten, die an motorischen und sensorischen Neuropathien litten, in der Immunfluoreszenz diskrete, runde, zytoplasmatische Strukturen anfärbt. Bei dem Protein, welches durch das Serum erkannt wurde, handelte es sich um GW182, so dass man diese Strukturen als *GW-bodies* bezeichnete (Eystathiou et al., 2002). Zeitgleich wurde entdeckt, dass die am 5'-3'-mRNA-Abbau beteiligten humanen Proteine LSM1-7 sowie DCP1 $\alpha$  (*Decapping Protein 1 $\alpha$* ) und DCP2 (*Decapping Protein 2*) ebenfalls in runden zytoplasmatischen

Strukturen angereichert sind, und dass diese identisch mit den 1997 von Bashkirov et al. beschriebenen Strukturen sind (Ingelfinger et al., 2002; van Dijk et al., 2002). Kurze Zeit später stellte sich heraus, dass die Strukturen in denen sich humanes DCP1 $\alpha$  und humanes LSM4 befinden, identisch mit den *GW-bodies* sind und dass es sich somit bei *GW-bodies* und XRN1-Strukturen um ein und dieselben Strukturen handelt (Eystathioy et al., 2003).



**Abbildung 4: *P-bodies* in humanen Zellen**

Dargestellt sind HEK293 IL-1R-Zellen, die stabil GFP-DCP1 $\alpha$  exprimieren. Balken entspricht 10 $\mu$ m.

#### 1.4.1 *P-bodies* und mRNA-Abbau und –Lagerung

In eukaryotischen Zellen wird der mRNA-Abbau in den meisten Fällen mit der Deadenylierung der mRNA durch zwei verschiedene Poly(A)-Nuklease-Komplexe eingeleitet. Der Poly(A)-Schwanz wird zunächst bis auf ungefähr 110 Nukleotide durch den Pan2-Pan3-Komplex gekürzt und anschließend durch den Caf1-Ccr4-Not-Komplex bis hin zum Oligo(A)-Schwanz abgebaut (Yamashita et al., 2005). Nach der Deadenylierung folgt entweder der 5'-3'-Abbau oder der 3'-5'-Abbau der mRNA. Beim 3'-5'-Abbau wird das Transkript durch das Exosom, einem aus mindestens 11 Exonukleasen bestehendem Komplex, degradiert. Hierbei wird die Exosom-Aktivität durch den SKI-Komplex reguliert. Beim 5'-3'-Abbau wird erst die Cap-Struktur durch DCP2 entfernt und anschließend die mRNA durch die Exonuklease XRN1 abgebaut. Das Entfernen des Caps wird durch eine Reihe weiterer Proteine direkt oder indirekt stimuliert. Dazu gehören: DCP1, EDC1, 2 (hefespezifisch), 3 (*enhancer of decapping* 1-3), Lsm1-7, Pat1, Dhh (auch bekannt als RCK/p54, Me31B oder CGH-1) und Hedls (metazoenspezifisch) (Eulalio et al., 2007a; Franks and Lykke-Andersen, 2008).

Bislang konnten alle Proteine, die am 5'-3'-mRNA-Abbau beteiligt sind, in *P-bodies* nachgewiesen werden (Bashkirov et al., 1997; Sheth and Parker, 2003; Ingelfinger et al., 2002; van Dijk et al., 2002; Squirrell et al., 2006; Behm-Ansmant et al., 2006; Ding et al., 2005; Eulalio et al., 2007b; Cougot et al., 2004; Kshirsagar and Parker, 2004; Fenger-Gron et al., 2005; Yu et al., 2005). Für die am 3'-5'-mRNA-Abbau involvierten Proteine konnte bisher keine *P-body*-Lokalisation demonstriert werden (Sheth and Parker, 2003). Aufgrund der Anreicherung der am 5'-3'-mRNA-Abbau beteiligten Proteine in *P-bodies* wird vermutet, dass dieser in *P-bodies* stattfinden kann. Diese Annahme wird durch eine Reihe von Beobachtungen gestützt. Zunächst ist die *P-body*-Bildung RNA-abhängig. Nach Behandlung von Zellen mit RNase A oder Actinomycin D, welches die Transkription inhibiert und somit die mRNA-Menge in der Zelle reduziert,

verschwinden die *P-bodies* (Cougot et al., 2004; Eulalio et al., 2007b; Teixeira et al., 2005). Die Inkubation von humanen-, *D.melanogaster*- oder Hefezellen mit Cycloheximid, welches die Elongation der Translation inhibiert und die mRNA stabilisiert, indem es ihre Freisetzung von den Polysomen verhindert, führt ebenfalls zum Verschwinden der *P-body*-Strukturen (Andrei et al., 2005; Cougot et al., 2004; Eulalio et al., 2007b; Sheth and Parker, 2003; Teixeira et al., 2005). Die Inkubation mit Puromycin hingegen, welches die Translation durch die Freisetzung der mRNA von den Polysomen blockiert und so die Menge an untranslatierter mRNA erhöht, geht einher mit der Zunahme der *P-bodies* (Eulalio et al., 2007b). Hefe-Zellen, denen die Translationsinhibitoren Dhh1 und Pat1 fehlen oder humane Zellen, in denen der Translationsinhibitor 4ET mittels siRNAs herunterreguliert wurde, zeigen auch eine Abnahme der *P-bodies*, während die Überexpression der jeweiligen Proteine zu einer Zunahme der *P-body*-Strukturen in Anzahl und oder Größe führt (Andrei et al., 2005; Coller and Parker, 2005; Ferraiuolo et al., 2005). Die drei zuletzt genannten Beispiele veranschaulichen, dass die *P-body*-Integrität nicht allein von der mRNA-Menge abhängt, sondern vielmehr von der Menge der im Zytosol frei vorliegenden nicht translatierten mRNA.

Eine weitere Beobachtung, welche *P-bodies* als den Ort der 5'-3'-mRNA-Degradation klassifiziert, ist, dass die Blockade des frühen mRNA-Abbaus, z.B. durch das Herunterregulieren von Ccr4 in humanen- und Hefezellen, von Not1 in S2-Zellen oder von Pan3 in humanen Zellen, die *P-bodies* in Größe und Anzahl stark abnehmen lässt (Andrei et al., 2005; Eulalio et al., 2007b; Sheth and Parker, 2003; Zheng et al., 2008). Wird der mRNA-Abbau allerdings auf der Ebene des *Decappings* oder danach blockiert, nehmen die *P-bodies* in Anzahl und Größe zu. Dieser Effekt konnte durch Depletieren von XRNI in humanen-, *D. melanogaster*- und Hefezellen, von DCP1 in Hefezellen sowie von DCP2 in S2- und humanen Zellen beobachtet werden (Andrei et al., 2005; Cougot et al., 2004; Eulalio et al., 2007b; Sheth and Parker, 2003; Teixeira et al., 2005; Brengues et al., 2005; Brengues et al., 2005). Die *P-body*-Bildung ist somit mit der Akkumulation von Intermediaten des RNA-Stoffwechsels korreliert wie z.B. mit der Zunahme von nicht-translatierten mRNAs, welche sich im Prozess des *Decappings* befinden.

Zudem lassen sich mRNAs sowie ihre Abbauprodukte in *P-bodies* detektieren. Wird in die 3'-UTR einer Reporter-mRNA ein Poly(G)-Abschnitt eingebaut und so ihr 5'-3'-Abbau durch Inhibierung der Exonuklease XRNI verhindert, akkumulieren die Abbau-Intermediate in *P-bodies* von Hefezellen. Reporter-mRNAs ohne Poly(G)-Abschnitt in der 3'-UTR sind ebenfalls in *P-bodies* von Hefezellen lokalisiert, die über kein XRNI verfügen oder denen Glucose entzogen wurde (Sheth and Parker, 2003; Teixeira et al., 2005; Brengues et al., 2005). Ähnliche Beobachtungen können auch in Säugerzellen gemacht werden. Der siRNA- vermittelte Abbau von XRNI in HEK293-Zellen resultiert in der Akkumulation von Poly(A)<sup>+</sup>-mRNA in *P-bodies* und eine Reporterglobin-mRNA kann in COS7-Zellen ebenfalls in diesen Strukturen beobachtet werden (Cougot et al., 2004; Kedersha et al., 2005).

Es wird vermutet, ist aber experimentell noch nicht gezeigt, dass der 5'-3'-mRNA-Abbau neben den *P-bodies* auch im Zytosol stattfinden kann, da alle am 5'-3'-mRNA-Abbau beteiligten Proteine nicht ausschließlich in *P-bodies* lokalisiert sind, sondern ebenfalls diffus im Zytoplasma vorliegen.



Außerdem stehen die meisten *P-body*-Komponenten im regen Austausch mit dem Zytoplasma und umgekehrt (siehe dazu 1.4.5). Hinzu kommt, dass die *P-body*-Integrität für den 5'-3'-mRNA-Abbau nicht erforderlich ist. In einem Hefestamm, der nicht mehr in der Lage ist *P-bodies* zu bilden, wird der mRNA-Abbau, der in Hefen zum größten Teil in 5'-3'-Richtung abläuft, nicht beeinflusst (Decker et al., 2007).

In Eukaryoten erfolgt der Abbau von mRNAs, die ein verfrühtes Stopcodon aufweisen, über den Nonsense-vermittelten mRNA-Abbau (*nonsense-mediated mRNA decay*, NMD). Dieser erfordert unter anderem die Proteine UPF1-3 (*up-frameshift*) und in höheren Eukaryoten die Proteine SMG1 (*suppressor with morphogenetic effect on genitalia 1*) und SMG5-7 (Chang et al., 2007). Ansonsten läuft der Nonsense-vermittelte mRNA-Abbau zum größten Teil über den 5'-3'-mRNA-Abbauweg ab (Chang et al., 2007), was zur Annahme führt, dass auch dieser in *P-bodies* stattfinden kann. Außerdem befinden sich einige der Proteine, welche den Nonsense-vermittelten mRNA-Abbau einleiten, unter bestimmten Reaktionsbedingungen ebenfalls in *P-bodies*. Humanes überexprimiertes SMG7, SMG5 sowie UPF1 sind in *P-bodies* lokalisiert. SMG5 und UPF1 können allerdings nur in *P-bodies* beobachtet werden, wenn sie mit SMG7 koexprimiert werden (Fukuhara et al., 2005; Unterholzner and Izaurralde, 2004). In DCP1-, DCP2- oder XRNI-defizienten Hefestämmen befinden sich überexprimiertes UPF1, UPF2 und UPF3 in *P-bodies*, wobei die Lokalisation von UPF2 und UPF3 in *P-bodies* UPF1-abhängig ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass zwei Reporter-mRNAs mit einem verfrühten Stopcodon UPF1-abhängig in *P-bodies* lokalisiert waren (Sheth and Parker, 2006).

Zusammenfassend lässt sich aus den oben geschilderten Beobachtungen eine Sequenz der Ereignisse ableiten, die *P-body*-Bildung und mRNA-Abbau miteinander verknüpfen: Zunächst erfolgt eine Deadenylierung und sodann das *Decapping* gefolgt vom 5'-3' Abbau.

### 1.4.2 *P-bodies* und mRNA-Stabilität

Die signal-gesteuerte Regulation der mRNA-Halbwertszeit über AU-reiche cis-Elemente (AREs) ist eng mit den Mechanismen des mRNA-Abbaus verknüpft (Barreau et al., 2005; Zhang et al., 2002).

Da die ARE-bindenden Proteine TTP (Tristetraprolin), BRF (*butyrate response factor*)1 und 2 sowie ARE-mRNAs in *P-bodies* lokalisiert sind (Franks and Lykke-Andersen, 2007; Stoecklin and Anderson, 2007) und der ARE-vermittelte mRNA-Abbau in 5'-3'- und 3'-5'-Richtung erfolgen kann, wird angenommen, dass zumindest der 5'-3' Abbau in *P-bodies* ablaufen kann.

Wie beim allgemeinen mRNA-Abbau sind weder beim Nonsense-vermittelten noch beim ARE-vermittelten mRNA-Abbau mikroskopisch sichtbare *P-bodies* erforderlich (Eulalio et al., 2007b; Rehwinkel et al., 2005; Stoecklin et al., 2006).

### 1.4.3 *P-bodies* und transiente mRNA-Speicherung

Neben ihrer Funktion als Ort, an welchem mRNAs abgebaut werden können, wird den *P-bodies* auch die Aufgabe zur Lagerung translationsinhibierter mRNAs zugeschrieben, die unter bestimmten Bedingungen wieder der Translation zugeführt werden können. Die mRNA für den kationischen Aminosäuretransporter 1 (CAT-1) enthält in ihrer 3'-UTR mehrerer Bindungsstellen für die leberspezifische miRNA mir-122. In Huh7-Zellen ist die durch mir-122 translationsinhibierte CAT-1-mRNA unter normalen Bedingungen mir-122 abhängig in *P-bodies* lokalisiert. Unter bestimmten Stressbedingungen, wie der Behandlung der Zellen mit Thapsigargin (Stress des Endoplasmatischen Retikulums), Arsenit (oxidativer Stress) oder dem Entzug von Aminosäuren, transloziert die CAT-1-mRNA aus den *P-bodies* an die Polysomen und wird translatiert. Hierbei erfordert die Aufhebung der mir-122-vermittelten translationalen Hemmung und die damit einhergehende Translokation der CAT-1-mRNA aus den *P-bodies* an die Polysomen das ARE-bindende Protein HuR (Bhattacharyya et al., 2006). In Hefen konnte gezeigt werden, dass in ungestressten Zellen eine an Polysomen assoziierte Reporter-RNA nach Glucose-Entzug von diesen abdissoziiert und in die *P-bodies* geht. Nach erneuter Zugabe von Glucose findet eine Umverteilung der Reporter-mRNA aus den *P-bodies* an die Polysomen statt (Brenques et al., 2005).

Bei diesen beiden Beispielen handelt es sich um die einzigen Berichte, die *P-bodies* als Ort für mRNA-Speicherung klassifizieren, so dass diese Funktion von *P-bodies* zum jetzigen Zeitpunkt schwächer belegt ist, als ihre Rolle beim mRNA-Abbau.

### 1.4.4 *P-bodies* und RNAi

In den letzten Jahren kristallisierte sich immer deutlicher eine Verbindung zwischen RNAi und *P-bodies* heraus. So sind die humanen Ago-Proteine 1-4, neben ihrer diffusen Verteilung im Zytosol auch in *P-bodies* lokalisiert (Jakymiw et al., 2005; Leung et al., 2006; Liu et al., 2005b; Liu et al., 2005a; Sen and Blau, 2005). Die humanen Ago Proteine der Piwi-Familie hingegen befinden sich nicht in *P-bodies* (Liu et al., 2005b). Die Lokalisation von humanem Ago2 in diesen zytoplasmatischen Strukturen erfordert seine Fähigkeit kleine RNAs zu binden, aber nicht seine katalytische Aktivität (Liu et al., 2005b). Das in der Piwi-Domäne von humanem Ago2 evolutionär konservierte Serin752 spielt ebenfalls eine Rolle bei der *P-body*-Lokalisation. Jedoch ist nicht bekannt, wie diese Aminosäure zur Lokalisation von Ago2 in den *P-bodies* beiträgt (Zhou et al., 2009). Neben der bereits erwähnten Phosphorylierung von humanem Ago2 an Serin387 (Zeng et al., 2008) sowie seiner Hydroxylierung an Prolin700 (Qi et al., 2008) ist die Aktivität des Chaperon-Proteins HSP90 (Pare et al., 2009) wichtig für eine *P-body* Lokalisation.

Abgesehen von Ago-Proteinen befinden sich auch miRNAs, siRNAs sowie ihre Ziel-mRNAs in *P-bodies* (Jagannath and Wood, 2009; Jakymiw et al., 2005; Kedersha et al., 2005; Leung et al., 2006; Lian et al., 2007; Liu et al., 2005b; Pauley et al., 2006). Für siRNAs konnte gezeigt werden, dass ihre Lokalisation in den *P-bodies* unabhängig von einer Ziel-mRNA ist, dass sie als doppelsträngige siRNAs in den *P-bodies* ankommen und die Proteinmenge des *P-body*-Proteins GW182 erhöhen (Jagannath and Wood, 2009; Jakymiw et al., 2005). In murinen und humanen

Zellen führt die Transfektion von siRNAs in Abhängigkeit von einer Ziel-mRNA zu einer *P-body*-Zunahme in Größe und Anzahl (Lian et al., 2007). Die Lokalisation durch miRNAs inhibierter mRNAs in *P-bodies* ist abhängig von der Bindung der jeweiligen miRNA an ihre Ziel-mRNA (Liu et al., 2005b).

Ago-Proteine sind nicht nur in *P-bodies* lokalisiert, sondern kolokalisieren und interagieren auch mit *P-body*-Proteinen. Humanes Ago2 und Ago1 interagieren mit DCP1 $\alpha$ , DCP2 sowie mit RCK/p54 (Chu and Rana, 2006; Liu et al., 2005b). Humanes Ago2 bindet ebenfalls an GW182. Zudem scheinen GW182 sowie RCK/p54 sowohl in humanen als auch in *D. melanogaster* Zellen eine entscheidende Rolle bei der RISC-Aktivität zu spielen, welche durch miRNAs vermittelt wird, die nicht perfekt komplementär zur Ziel-mRNA sind. Das Herunterregulieren dieser Proteine mittels siRNA hat eine Abschwächung der miRNA-vermittelten RISC-Aktivität zur Folge (Chu and Rana, 2006; Eulalio et al., 2007b; Liu et al., 2005a; Rehwinkel et al., 2005). In einem *in vitro* Ansatz erhöhte die Zugabe von GW182 die miRISC-vermittelte Translationsinhibierung (Wakiyama et al., 2007).

RCK/p54 hat in humanen- und *D. melanogaster*-Zellen keinen Einfluss auf die RISC-Aktivität, welche durch siRNAs vermittelt wird, die perfekt komplementär zur Ziel-mRNA sind (Chu and Rana, 2006; Eulalio et al., 2007b; Jagannath and Wood, 2009; Lian et al., 2007; Serman et al., 2007), während für die Beteiligung von GW182 an der siRNA-vermittelten RISC-Aktivität unterschiedliche Berichte existieren. Einige Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass das Herunterregulieren von GW182 eine Abnahme der siRNA-vermittelten RISC-Aktivität bewirkt (Jakymiw et al., 2005; Lian et al., 2007), während andere keinen (Jagannath and Wood, 2009; Serman et al., 2007) oder einen moderaten Effekt (Chu and Rana, 2006; Liu et al., 2005a; Rehwinkel et al., 2005) auf die siRNA-vermittelte RISC-Aktivität beobachten konnten.

Das Depletieren von RCK/p54 oder GW182 geht einher mit dem Verschwinden von *P-body*-Strukturen, so dass die Vermutung nahe liegt, dass RNA-Interferenz die Anwesenheit von *P-bodies* erfordert. Sowohl die miRNA-vermittelte als auch die siRNA-vermittelte RISC-Aktivität sind ohne mikroskopisch sichtbare *P-bodies* uneingeschränkt vorhanden. In humanen- sowie in *D. melanogaster*-Zellen hat das Herunterregulieren von LSM1, was zum Verlust der *P-bodies* führt und daher mit einer vollständigen Abnahme von Ago2 aus den *P-bodies* einhergeht, weder einen Einfluss auf die miRNA- noch einen Einfluss auf die siRNA-vermittelte RISC-Aktivität (Chu and Rana, 2006; Eulalio et al., 2007b). Dieses ist auch konsistent mit der Tatsache, dass nur 1-5% des gesamten zellulären Ago2 in *P-bodies* nachgewiesen werden können (Leung et al., 2006). Die Messung der RISC-Aktivität in den genannten Beispielen erfolgte auf unterschiedliche Art und Weise. Häufig wurde ein Luziferasereporter eingesetzt und die Luziferaseaktivität gemessen (Chu and Rana, 2006; Eulalio et al., 2007b; Liu et al., 2005a; Rehwinkel et al., 2005). Ebenfalls wurden die mRNA-Mengen mit Hilfe von Northernblots oder Real Time PCR bestimmt (Eulalio et al., 2007b; Jagannath and Wood, 2009; Rehwinkel et al., 2005). Auch wurde die RISC-Aktivität anhand der Änderung der Proteinmenge des Zielproteins im Westernblot oder in der Immunfluoreszenz abgeschätzt (Chu and Rana, 2006; Jakymiw et al., 2005; Lian et al., 2007; Serman et al., 2007).

Die *P-body*-Bildung in humanen- sowie in *D. melanogaster*-Zellen ist unter anderem vielmehr von einem funktionsfähigen RNAi-Signalweg abhängig und der damit einhergehenden Generierung einer signifikanten Fraktion an nicht translatierten Ribonukleoproteinpartikeln. So resultiert das Herunterregulieren von Drosha oder DGCR8 in Hela-Zellen mittels siRNA in einer Abnahme von pre-miRNAs und reifer miRNAs und führt zu einer Reduktion der *P-bodies* in Anzahl und Größe (Pauley et al., 2006). In *D. melanogaster* kommt es ebenfalls zu einer Verringerung der *P-body*-Anzahl und -Größe, wenn Drosha oder Pasha, aber auch Dicer-1, Dicer-2, Ago1 oder Ago2 herunterreguliert werden (Eulalio et al., 2007b). Das Depletieren von humanem Ago2 hingegen hat keinen Einfluss auf die *P-body*-Menge oder -Größe (Lian et al., 2007).

Ogleich die aufgeführten Beispiele einen eindeutigen Zusammenhang zwischen *P-body*-Strukturen und RNA-Interferenz aufzeigen, ist die Bedeutung dieser Verbindung noch weitestgehend unerforscht.

#### **1.4.5 *P-bodies* sind hochdynamische Strukturen**

Wie bereits aus 1.4.1 ersichtlich, sind *P-bodies* dynamische Strukturen, welche durch eine Reihe von Stimuli, vor allem solchen, die den Pool an nicht translaterter Polysomen-freier RNA in der Zelle ändern, induziert oder bis auf ein mikroskopisch nicht mehr sichtbares Maß reduziert werden. Des Weiteren ändert sich die Anzahl und Größe der *P-bodies* nach Herunterregulieren oder nach Überexpression einer Reihe von *P-body*-Proteinen, aber auch von Proteinen, die nicht in *P-bodies* lokalisiert sind, jedoch den Pool an Ribosomen-freier translationsinhibierter mRNA beeinflussen. In Tabelle 1 sind die Auswirkungen der Depletion und Überexpression von *P-body*-Proteinkomponenten sowie die Auswirkung diverser Stimuli auf die *P-body*-Integrität zusammengefasst.

<b><i>P-body</i>-Komponente</b>	<b>Funktion</b>	<b>Effekt auf die <i>P-body</i>-Integrität nach Depletion oder Überexpression</b>	<b>Referenz</b>
XRNI	5'-3'-Exonuclease	Depletion: Zunahme der <i>P-body</i> -Größe und -Anzahl (Mensch, <i>Sc</i> , <i>Dm</i> )	1, 2, 6, 7
GW182	miRNA-Signalweg	Depletion: Abnahme der <i>P-bodies</i> (Mensch)	1
DCP2	<i>Decapping</i> Enzym	Depletion: Zunahme in <i>P-body</i> -Größe und -Anzahl (Mensch), Zunahme der <i>P-body</i> -Größe ( <i>Dm</i> ); Überexpression: Abnahme der <i>P-bodies</i> (Mensch)	1, 2
DCP1	Regulatorische Untereinheit des <i>Decapping</i> -Enzyms	Depletion: Zunahme in <i>P-body</i> -Größe und -Anzahl ( <i>Sc</i> )	1
Hedls	<i>Decapping</i> Co-Aktivator	Depletion: Abnahme der <i>P-bodies</i> (Mensch, <i>Dm</i> ); Überexpression: Zunahme der <i>P-body</i> -Größe und -Anzahl (Mensch)	1
Pat1	<i>Decapping</i> Co-Aktivator	Depletion: Leicht Abnahme der <i>P-body</i> -Größe ( <i>Sc</i> ); Überexpression: Zunahme der <i>P-body</i> -Größe und -Anzahl ( <i>Sc</i> )	1
EDC3	<i>Decapping</i> Co-Aktivator	Überexpression: Abnahme der <i>P-bodies</i> (Mensch)	1
LSm1-7	<i>Decapping</i> Co-Aktivator Komplex	Depletion: Abnahme der <i>P-bodies</i> (Mensch), für LSm1 u. 3 <i>Dm</i> ), Zunahme der <i>P-body</i> -Anzahl ( <i>Sc</i> )	1,2
LSm14	Potentieller <i>Decapping</i> Co-Aktivator	Depletion: Abnahme der <i>P-bodies</i> (Mensch)	1
RCK/p54	<i>Decapping</i> Co-Aktivator, Regulation der Translation	Depletion: Abnahme der <i>P-bodies</i> (Mensch, <i>Sc</i> , <i>Dm</i> ); Überexpression: Zunahme der <i>P-body</i> -Größe und -Anzahl (Mensch), Abnahme der <i>P-bodies</i> ( <i>Sc</i> )	1,2
eIF4E-T	Repressor der Translation	Depletion: Abnahme der <i>P-bodies</i> (Mensch)	1
SMG7	NMD	Überexpression: Zunahme der <i>P-body</i> -Größe (Mensch)	1
UPF2	NMD	Depletion: Zunahme der <i>P-body</i> -Größe ( <i>Sc</i> )	1
UPF3	NMD	Depletion: Zunahme der <i>P-body</i> -Größe ( <i>Sc</i> )	1
Ago1/2	si/miRNA Signalweg	Depletion: Abnahme der <i>P-bodies</i> ( <i>D.m</i> )	2
Caf1-Ccr4-Not-Komplex	Deadenylierung	Depletion: Abnahme der <i>P-bodies</i> (Mensch, <i>Sc</i> )	1
<b>Nicht -<i>P-body</i>-Komponenten</b>			
Drosha	miRNA Biogenese	Depletion: Abnahme der <i>P-bodies</i> (Mensch, <i>Dm</i> )	1,3
DGCR8	miRNA Biogenese	Depletion: Abnahme der <i>P-bodies</i> (Mensch, <i>Dm</i> )	1,3
Dicer1	miRNA Biogenese	Depletion: Abnahme der <i>P-bodies</i> ( <i>Dm</i> )	2
Dicer2	miRNA Biogenese	Depletion: Abnahme der <i>P-bodies</i> ( <i>Dm</i> )	2
<b>Stimuli</b>			
RNase A	RNA Degradation	Abnahme der <i>P-bodies</i> (Mensch, <i>Dm</i> , <i>Sc</i> )	2, 4, 5
Actinomycin D	Inhibierung der Transkription	Abnahme der <i>P-bodies</i> (Mensch, <i>Dm</i> , <i>Sc</i> )	2, 4, 5
Puromycin	Inhibierung der Translation	Zunahme der <i>P-bodies</i> (Mensch, <i>Dm</i> )	2, 12
Cycloheximid	Inhibierung der Translation	Abnahme der <i>P-bodies</i> (Mensch, <i>Dm</i> , <i>Sc</i> )	2, 4, 5, 6, 7
Arsenit	Oxidativer Stress	Zunahme der <i>P-bodies</i> (Mensch)	8, 9, 10
Hitzeschock	Stress	Zunahme der <i>P-bodies</i> (Mensch)	10
UV-Licht	Stress	Zunahme der <i>P-bodies</i> ( <i>Sc</i> )	5
Hypo-/Hyperosmolarität	Osmotischer Stress	Zunahme der <i>P-bodies</i> ( <i>Sc</i> )	5
Glucosentzug	Inhibierung der Translation	Zunahme der <i>P-bodies</i> ( <i>Sc</i> )	5, 11
Nocodazol	Mikrotubulidestabilisierung	Zunahme der <i>P-bodies</i> (Mensch)	12
Vinblastin	Mikrotubulidestabilisierung	Zunahme der <i>P-bodies</i> (Mensch)	12

**Tabelle 1: Auswirkung der Depletion und Überexpression von Proteinen, sowie die Auswirkung diverser Stimuli auf die *P-body*-Integrität**

Veränderte Tabelle nach (Eulalio et al., 2007a). 1: (Eulalio et al., 2007a), 2: (Eulalio et al., 2007b), 3:(Pauley et al., 2006), 4: (Cougot et al., 2004), 5: (Teixeira et al., 2005), 6:(Andrei et al., 2005), 7:(Sheth and Parker, 2003), 8:(Lian et al., 2007), 9: (Serman et al., 2007), 10:(Kedersha et al., 2005), 11:(Brenques et al., 2005), 12: (Aizer et al., 2008) *Dm: D. melanogaster, Sc: S. cerevisiae.*

Die Größe und Anzahl der *P-bodies* ist auch abhängig vom Zellzyklus. In der G1- und frühen S1-Phase sind nur einige wenige und kleine *P-bodies* zu beobachten, die in der späten S- und G2-Phase in Größe und Anzahl zunehmen. Unter dem Lichtmikroskop sind während der Mitose keine *P-bodies* sichtbar, allerdings lassen sich in diesem Stadium des Zellzyklus unter dem Elektronenmikroskop *P-bodies* mit einem Durchmesser von 50nm erkennen (Yang et al., 2004). Damit besteht die Möglichkeit, dass *P-bodies* durch Weitergabe von RNAs an die Tochterzellen die Genexpression epigenetisch beeinflussen.

Die Bildung von *P-bodies* sowie die Expression von GW182 sind in proliferierenden im Vergleich zu ruhenden Zellen erhöht (Yang et al., 2004) und in Hefezellen nimmt mit zunehmender Zelldichte die Anzahl der *P-bodies* ab, während ihre Größe zunimmt (Teixeira et al., 2005).

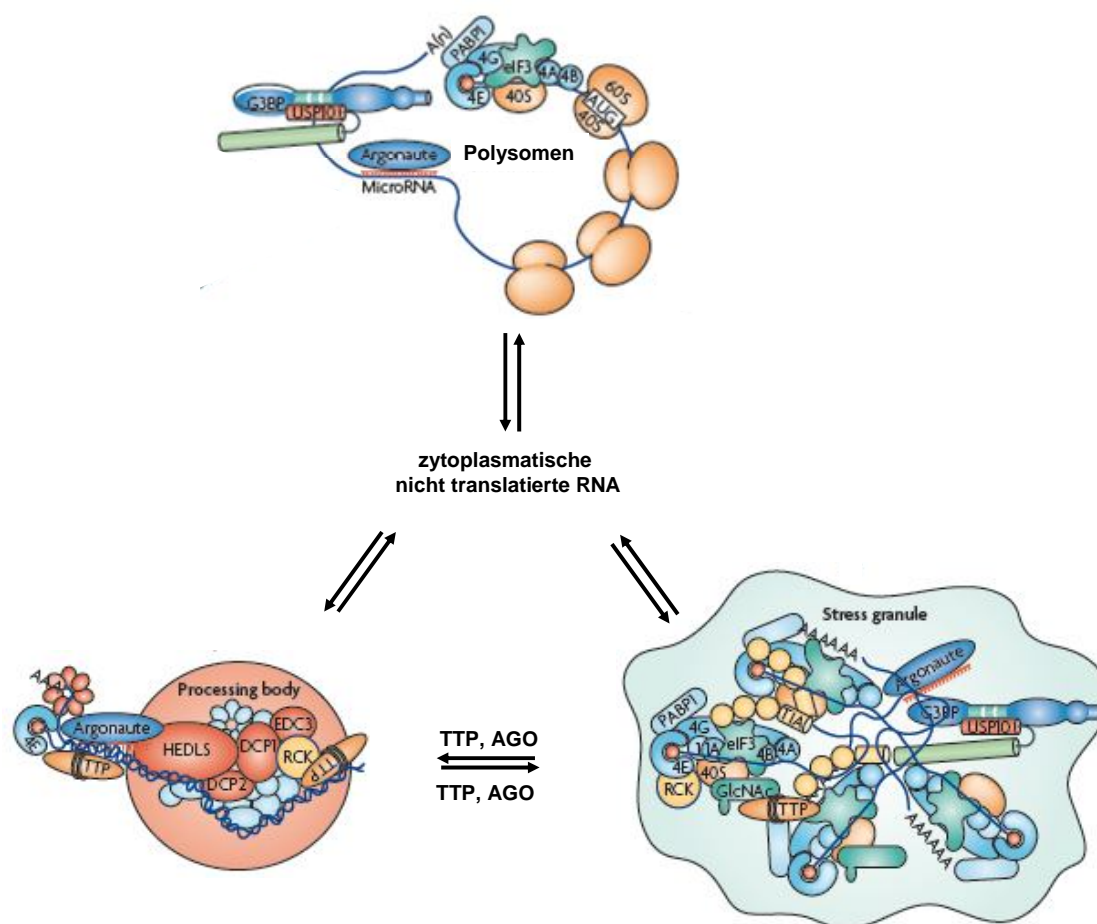
Mit Hilfe von Photobleaching-Experimenten wurde die Dynamik einzelner *P-body*-Komponenten genauer untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein Teil von DCP1 $\alpha$  und DCP1 $\beta$  immobilisiert in den *P-bodies* vorliegt, während sich ein anderer Teil im ständigen Austausch mit dem Zytosol befindet (Aizer et al., 2008; Kedersha et al., 2005; Leung et al., 2006). Hierbei hängt die Austauschrate für DCP1 $\alpha$  von der *P-body*-Größe ab und ist bei großen geringer als bei kleinen *P-bodies* (Kedersha et al., 2005). Auch bei Lsm6, 4ET, eIF4E sowie bei den Ago Proteinen 1-4 gibt es sowohl eine in den *P-bodies* lokalisierte Fraktion, als auch eine die im Austausch mit dem Zytosol steht (Andrei et al., 2005; Leung et al., 2006). Die Mehrheit an GW182- und FAST-Proteinen liegt immobilisiert in den *P-bodies* vor und nur ein geringer Teil ist am Austausch mit dem Zytosol beteiligt (Kedersha et al., 2005). Bei DCP2 handelt es sich um eine adynamische *P-body*-Komponente, die überhaupt nicht im Austausch mit dem Zytosol steht (Aizer et al., 2008).

Nicht nur einzelne *P-body*-Komponenten sind dynamisch, vielmehr ist die gesamte *P-body*-Struktur beweglich. *P-bodies* führen saltatorische Bewegungen aus, die häufig räumlich begrenzt sind oder seltener gerichtet sein können. Diese Bewegungen sind mit der Interaktion von *P-bodies* mit dem Mikrotubuli-Netzwerk zu erklären. Die wenigen unbeweglichen *P-bodies* in der Zelle sind an Aktinfilamente assoziiert. Die Behandlung der Zellen mit Nocodazol oder Vinblastin, welche an die Tubulinmonomere binden und so die Mikrotubuli destabilisieren, führt zur Reduktion der *P-body*-Beweglichkeit sowie zur Zunahme ihrer Anzahl (Aizer et al., 2008). Aufgrund ihrer Beweglichkeit können *P-bodies* zu größeren Strukturen fusionieren (Aizer et al., 2008; Yang et al., 2004). Sie sind ebenfalls in der Lage mit Stress Granula (SG) (siehe unten) zu verschmelzen, vor allem nach Überexpression von TTP, BRF1 oder CPEB1 (*cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 1*) (Kedersha et al., 2005; Wilczynska et al., 2005).

SGs sind eine zweite Klasse von RNP-enthaltenen zytoplasmatischen Strukturen, die sich unter bestimmten Stressbedingungen wie Hitzeschock oder oxidativem Stress in Zellen bilden (Kedersha et al., 2005). Sowohl *P-bodies* als auch SGs entstehen nur an nicht Polysomen-assoziierte mRNA und enthalten eine Reihe gemeinsamer Proteine wie FAST, XRNI, eIF4E

(Kedersha et al., 2005), TTP, BRF1 (Stoecklin et al., 2004), BRF2 (Kedersha et al., 2005) und Ago1-4 (Leung et al., 2006). Es handelt sich hierbei allerdings um zwei unterschiedliche Strukturen. Im Gegensatz zu *P-bodies* erfordert die Bildung von SGs die Phosphorylierung an eIF2 $\alpha$  (Kedersha et al., 1999) und sie sind in nicht gestressten Zellen nicht zu finden (Kedersha et al., 2005). SGs zeichnen sich durch das Vorhandensein der Translationsinitiationsfaktoren eIF3, eIF4A und eIF4G sowie des Poly(A)-Bindepoteins 1 (PABP-1) und der kleinen ribosomalen Untereinheiten aus. *P-bodies* hingegen werden durch die Komponenten des 5'-3'-mRNA-Abbau-Apparats definiert. SGs besitzen eine irreguläre Form, die sich dauernd ändert. Zudem sind mit mehreren Mikrometern größer als *P-bodies* und nicht so beweglich wie diese (Anderson and Kedersha, 2008). Da diese Strukturen außer XRN1 keine weiteren mRNA-abbauenden Proteine enthalten, werden sie nicht mit mRNA-Abbau in Zusammenhang gebracht, sondern vielmehr als Ort betrachtet, an dem translationsinhibierte polysomenfreie mRNA sortiert, umgestaltet und exportiert wird, um erneut translatiert, abgebaut oder gelagert zu werden.

In der folgenden Abbildung 5 ist die Beziehung zwischen den verschiedenen Ribonukleoproteinpartikeln in der Zelle zusammengefasst:



**Abbildung 5: Dynamische Beziehung zwischen verschiedenen Ribonukleoproteinpartikeln**

mRNA kann in der Zelle in vier verschiedenen Zuständen existieren. Sie kann sich im Translationsprozess an den Polysomen, im translational inhibierten Zustand im Zytoplasma, in *P-bodies* oder in Stress Granula befinden. Der Abfall der Polysomen von der mRNA und der damit verbundene Translationsstop wird durch Kürzung des poly(A)-

Schwanzes oder durch Translationsinhibitoren herbeigeführt. Die zytoplasmatische, translationsinhibierte mRNA kann erneut in den Translationsprozess gelangen. Solche mRNPs können allerdings auch Faktoren, welche am mRNA-Abbau beteiligt sind, wie DCP1/2, Hedls oder EDC3 rekrutieren und mit diesen in *P-bodies* aggregieren. In den *P-bodies* müssen sie nicht zwangsläufig abgebaut werden, sondern es besteht die Möglichkeit, dass sie wieder der Translation zugeführt werden. Die sich im Zytosol befindenden mRNPs können auch mit TIA1 und TIAR (TIA) interagieren, welche zusammen mit G3BP-USP10 die Bildung von Stress Granula fördern. Auch die in Stress Granula lokalisierten mRNAs können für eine erneute Translation an die Polysomen translozieren. Es ist wahrscheinlich, dass zwischen *P-bodies* und Stress Granula ein Austausch von mRNPs stattfindet. So ist eine Reihe von Proteinen wie Ago oder TTP sowohl in *P-bodies* als auch in Stress Granula lokalisiert. G3BP: *GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein*, USP10: *ubiquitin-specific processing protease 10*, GlcNAc: *O-linked N-acetylglucosamine*. Die übrigen Abkürzungen sind dem Text zu entnehmen. Modifiziert nach (Anderson and Kedersha, 2009).

## 1.5 DCP1

DCP1 wurde zum ersten Mal durch Beelman et al. beschrieben, die zeigen konnten, dass dieses Protein in *S. cerevisiae* wichtig für die Entfernung des mRNA-Caps ist (Beelman et al., 1996). Mit Hilfe eines In-Gel-assays und eines *Decapping-assays* mit radioaktiv an ihrem Cap markierter mRNA konnte dann demonstriert werden, dass aus *S. cerevisiae* hoch aufgereinigtes DCP1 *in vitro* *Decapping*-Aktivität besitzt. Aufgrund dieser Beobachtung wurde DCP1 als *Decapping*-Enzym in Hefen betrachtet (LaGrandeur and Parker, 1998). Kurze Zeit später wurde das Protein DCP2 in *S. cerevisiae* entdeckt, welches ebenfalls *in vitro* und *in vivo* *Decapping*-Aktivität aufwies und mit DCP1 koimmunopräzipitierte. So konnte unter Verwendung eines spezifisch gegen die Cap-Struktur gerichteten Antikörpers demonstriert werden, dass in einem Dcp2-defizienten Hefestamm eine am Cap-radioaktiv markierte Reporter-mRNA überwiegend mit Cap-Struktur vorlag. Die Durchführung eines *in vitro* *Decapping-assay* mit erneut radioaktiv markierter mRNA zeigte, dass *Decapping*-Aktivität mit DCP2 koimmunopräzipitierte (Dunckley and Parker, 1999). Weitere Untersuchungen enthüllten, dass es sich sowohl in der Hefe als auch im Menschen bei DCP2 um die katalytische und bei DCP1 um eine regulatorische Untereinheit des *Decapping*-Enzyms handelt.

So ist rekombinantes Hefe- und rekombinantes humanes DCP2 in der Lage das Cap zu entfernen, während rekombinantes DCP1 die Entfernung des Caps nicht katalysiert (Steiger et al., 2003). Zudem enthält Hefe-DCP2 eine klassische Nudix-Domäne mit einem konservierten Nudix-Motiv, welches in einer Klasse von Pyrophosphatasen gefunden wird (Dunckley and Parker, 1999; She et al., 2006). Humanes DCP2 verfügt ebenfalls über ein Nudix-Motiv (van Dijk et al., 2002; Wang et al., 2002). Mutationen im Nudix-Motiv führen zur Beeinträchtigung bis hin zum vollständigen Verlust der *Decapping*-Aktivität des humanen- und Hefe-DCP2 (Dunckley and Parker, 1999; She et al., 2006; Steiger et al., 2003; van Dijk et al., 2002; Wang et al., 2002). Hefe-DCP1 verstärkt die Aktivität von DCP2 und erlaubt eine effiziente Cap-Entfernung unter Bedingungen unter denen DCP2 eine geringe Aktivität besitzt (She et al., 2006; Steiger et al., 2003).

Die Röntgenkristallstrukturanalyse von DCP1 aus *S. cerevisiae* zeigt, dass es eine Ähnlichkeit zu den Domänen der EVH1/WH1 Familie aufweist. Diese Domänen besitzen Prolin-reiche-Sequenz-Bindungsstellen (PRS), die kritische aromatische Aminosäuren beinhalten über die



prolinreiche Proteine gebunden werden können. Der Vergleich der an der Oberfläche liegenden Aminosäuren von DCP1 aus *S.cerevisiae* mit weiteren eukaryotischen DCP1-Sequenzen zeigt zwei strukturell konservierte Regionen (Region1 und Region2). Eine weitere stark hydrophobe Region ist im DCP1 aus der Hefe und in menschlichen DCP1-Proteinen konserviert. Die Region1 entspricht der Bindungsstelle für prolinreiche Sequenzen, wie sie in EVH1/WH1-Domänen vorkommt und wird als Bindungsstelle für regulatorische Proteine betrachtet. Die beiden anderen Regionen sind essentiell für die Regulation der *Decapping*-Aktivität von DCP2, da Mutationen der konservierten Aminosäuren in diesen Regionen, die *Decapping*-Aktivität von DCP2 beeinträchtigen, ohne allerdings die Bindung zwischen DCP1 und DCP2 zu beeinflussen (She et al., 2004). Röntgenkristallstrukturuntersuchungen und Kleinwinkelröntgenstreuungsuntersuchungen eines DCP1-DCP2n (C-terminal trunke DCP2-Version)-Komplexes aus *S.pombe* zeigen, dass die Interaktion zwischen DCP1 und DCP2 über die N-Termini der Proteine erfolgt und dass die drei strukturell konservierten Regionen in DCP1 nicht an der Bindung beteiligt sind (She et al., 2008). DCP2 liegt in einer offenen wie geschlossenen Konformation vor. Hierbei ist die geschlossene Konformation die katalytisch aktive, da Mutationen der Aminosäuren, die für das Einnehmen dieser Konformation verantwortlich sind, mit dem Verlust der katalytischen Aktivität von DCP2 einhergehen. DCP2 braucht sowohl ein Substrat als auch DCP1 um eine geschlossene Konformation einzunehmen. Dabei wird der Übergang von offener zu geschlossenen Konformation durch das Substrat induziert und durch die Bindung von DCP1 stabilisiert (She et al., 2008).

Im Menschen existieren die zu DCP1 aus *S.cerevisiae* homologen Proteine hDCP1 $\alpha$  und hDCP1 $\beta$ , welche durch zwei unterschiedliche Gene kodiert werden (van Dijk et al., 2002). Sie besitzen in ihrem N-Terminus zwei konservierte Regionen, die zu 26% identisch mit dem N- und C-Terminus von DCP1 aus *S.cerevisiae* sind (Lykke-Andersen, 2002). Der C-Terminus der humanen DCP1-Proteine ist weniger gut konserviert und fehlt in DCP1 aus *S.cerevisiae* (van Dijk et al., 2002). hDCP1 $\alpha$  und hDCP1 $\beta$  sind über ihre N-Termini zu 68% und über ihre gesamte Länge zu 31% identisch (Lykke-Andersen, 2002). Bislang liegen keine Daten vor, die zeigen, dass hDCP1 $\alpha$  und hDCP1 $\beta$  unterschiedliche Funktionen ausüben, so dass in den meisten Fällen hDCP1 $\alpha$  in Experimenten eingesetzt wird (Aizer et al., 2008; Fenger-Gron et al., 2005).

Die regulatorische Funktion der humanen DCP1-Proteine bei der Entfernung des Caps durch DCP2 ist weniger gut verstanden als die des Hefehomolog. Lykke-Andersen et al. konnten zeigen, dass überexprimiertes hDCP1 $\alpha$  und hDCP2 RNA-unabhängig koimmunopräzipitieren (Lykke-Andersen, 2002). Fenger-Gron et al. konnten zudem demonstrieren, dass anders als bei der Interaktion zwischen den DCP-Proteinen aus der Hefe, für eine stabile Bindung zwischen hDCP1 $\alpha$  und hDCP2 ein drittes Protein namens Hedls erforderlich ist. Hedls interagiert mit DCP2 und wesentlich schwächer mit DCP1 $\alpha$  und führt nach Überexpression zu einer stabilen Interaktion zwischen DCP1 $\alpha$  und DCP2 sowie zu einer Stabilisierung von DCP2. Der Mechanismus über den Hedls die Bindung zwischen DCP1 $\alpha$  und DCP2 fördert, muss allerdings noch geklärt werden (Fenger-Gron et al., 2005). Die Notwendigkeit der Anwesenheit von Hedls für eine stabile hDCP1 $\alpha$ /hDCP2-Interaktion kann eine Erklärung dafür sein, dass anders als

rekombinantes Hefe-DCP1, rekombinantes hDCP1 $\alpha$  nicht in der Lage ist die Aktivität von rekombinantem hDCP2 zu stimulieren (Lykke-Andersen, 2002; van Dijk et al., 2002). hDCP1 $\alpha$  ist jedoch für die Aktivität von DCP2 wichtig, da in HEK-Zellen überexprimierte DCP1 $\alpha$ -Mutanten, von denen gezeigt wurde, dass sie in Hefen die *Decapping*-Aktivität beeinträchtigen, zu einem Verlust der *Decapping*-Aktivität von DCP2 führen ohne die Bindung zu DCP2 zu beeinflussen (Lykke-Andersen, 2002). hDCP1 $\alpha$  bildet asymmetrische, trimere Komplexe über einen Bereich in seiner C-terminalen Domäne (As 539-582), der zwischen Metazoen konserviert ist. Die Trimer-Bildung ist wichtig für die Interaktion mit DCP2 sowie Hedls und somit für eine effiziente *Decapping*-Aktivität. Zudem spielt sie eine wesentliche Rolle bei der Akkumulation von hDCP1 $\alpha$  in *P-bodies* (Tritschler et al., 2009).

Neben seiner Funktion beim mRNA-Abbau, wird humanem DCP1 $\alpha$  eine Rolle als transkriptioneller Co-Aktivatoren im TGF $\beta$ -Signalweg zugesprochen. Es konnte gezeigt werden, dass hDCP1 $\alpha$  mit SMAD4 interagiert und nach Aktivierung durch TGF $\beta$  oder BMP4 (*bone morphogenic protein 4*) SMAD4-abhängig in den Kern transloziert. hDCP1 $\alpha$  besitzt intrinsische, TGF $\beta$ -induzierbare transkriptionelle Aktivität, die in Säugetierzellen von SMAD4 und p300/CBP abhängig ist. Zudem resultiert die Aufhebung der SMAD4/hDCP1 $\alpha$ -Bindung in einer verminderten transkriptionellen Aktivität von SMAD4 (Bai et al., 2002).

## 1.6 Fragestellung

JNK übt die meisten seiner Funktionen über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie c-Jun aus und kann dadurch nach Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 oder Stress unter anderem die Expression sekundärer proinflammatorischer Zytokine wie CCL2 regulieren. Der Beitrag von JNK an posttranskriptionellen Regulationsmechanismen ist weniger gut erforscht, auch wenn bekannt ist, dass JNKs an der ARE-vermittelten Stabilisierung von mRNAs beteiligt sind. In der Arbeitsgruppe Kracht konnte Ago2 als neues JNK-interagierendes Protein identifiziert und so eine interessante Verbindung zwischen zwei Proteinen geschaffen werden, die eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Genexpression auf unterschiedlichen Ebenen ausüben.

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die Bindung zwischen JNK und Ago2 näher zu charakterisieren, vor allem da zu Beginn dieser Arbeit keine Signaltransduktionsmechanismen beschrieben waren, welche die Ago2-Funktionen regulieren.

Im Zuge der Diplomarbeit wurde bereits versucht die Interaktionsdomäne von Ago2 über die es an JNK bindet einzugrenzen. Diese Arbeiten sollten an dieser Stelle fortgesetzt werden. Unter anderem sollte überprüft werden, ob die vier potentiellen MAP-Kinase *docking sites* in Ago2 an der JNK-Bindung beteiligt sind und ob die Interaktion zwischen Ago2 und JNK RNA-abhängig ist. Ago2 ist ein RNA-bindendes Protein und seine Bindung an eine Reihe von Proteinen wird über RNA vermittelt.

Weiterhin sollte der offensichtlichen Frage nachgegangen werden, ob Ago2 durch JNK oder JNK-abhängig phosphoryliert wird und ob JNK und seine Aktivierung die Ago2-RISC-Aktivität beeinflussen.

In Vorarbeiten zu dieser Promotion durchgeführte *screening*-Experimente zeigten, dass eine kleine Anzahl an miRNAs in JNK1/2<sup>-/-</sup> murinen embryonalen Fibroblasten (JNK1/2<sup>-/-</sup> MEFs) im Vergleich zu c-Jun Wildtyp murinen embryonalen Fibroblasten (c-JUN Wt MEFs) verändert exprimiert vorlagen. Die Bindung einiger dieser miRNAs an Ago2-Komplexe sollte unter JNK-stimulierenden Bedingungen in HEK 293 IL1-R-Zellen analysiert werden.

Der Ago2/JNK-Komplex sollte zudem mit Hilfe von indirekter Immunfluoreszenz untersucht werden. Da bekannt ist, dass Ago2 unter anderem in *P-bodies* lokalisiert ist, sollte zu diesem Zweck GFP-DCP1 $\alpha$  als *P-body*-Marker verwendet werden.

Im Zuge der Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte ein Einfluss von JNK und seiner Aktivierung auf die Lokalisation von GFP-DCP1 $\alpha$  in der Zelle beobachtet werden. Da die Mechanismen, welche die Lokalisation von *P-body* Proteinen in der Zelle beeinflussen, noch sehr unerforscht sind, war es von Interesse die im Rahmen dieser Arbeit gemachte Beobachtung weiter zu verfolgen. Hierbei sollte untersucht werden, ob DCP1 $\alpha$  mit JNK interagiert und ob und an welcher/welchen Aminosäure(n) es durch JNK oder JNK-abhängig phosphoryliert wird. Zu diesem Zeitpunkt war lediglich beschrieben, dass DCP1 $\alpha$  aus der Hefe konstitutiv phosphoryliert wird, allerdings verfügen Hefen über keine zu JNK homologe Kinase.

Falls diese Untersuchungen erfolgreich verlaufen, sollte(n) die Phosphorylierungstelle(n) näher auf ihre Funktion hin charakterisiert werden. Dabei sollte vor allem überprüft werden, ob die Phosphorylierung für die beobachtete JNK-abhängige Lokalisationsänderung von GFP-DCP1 $\alpha$  verantwortlich ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verbrauchsmaterial

Alle verwendeten Plastikwaren und Einwegmaterialien wie EppendorfgeläÙe, Falcontubes oder Pipettenspitzen wurden von den Firmen Brand, Eppendorf, Greiner, Neolab, Nunc, Omnilab, Roth oder Sarstedt bezogen.

### 2.2 GeräÙe

#### Elektrophorese-, Westernblot- und Fotografiestysteme

Biometra BioDoc Analyze UV-Transilluminator

Biotec Fisher PHERO-STAB 0632 SpannungsgeräÙ

Hoefer Mighty Small, SE250/260 Gelelektrophorese-Apparatur

Mupi-One Elektrophoresekammer

Schleicher&Schuell *Semi-Dry-Blotter*

Sigma Vertikale duale Elektrophoresekammer

#### Mikroskope und Photometer

Agilent 2100 Bioanalyzerm, Agilent Technologies

Leica DM IRE2

Leitz Diavert

Leitz Laborlux 11

Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer

Shimadzu Spektralphotometer UV-160A

Zeiss Axiovert 200M mit Kameraausstattung

#### Verschiedenes

EG&G Berthold Lumat LB 9507 Luminometer

Eppendorf Thermomixer 5436

Heidolph Vortex-GeräÙ

Landgraf Thermocycler

Lauda C6 CS Wasserbad

Biometra TProfessional

Perkin Elmer ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (DNA-Sequenzier)

Protoc Optimax Filmentwicklermaschine

7500 Fast Real Time PCR System, Applied Biosystem

Ziegra Eismaschine

*ELISA-Reader* (Firma Dynatech)

#### Waagen

Chyo Electronic Balance MP-3000  
Sartorius *analytic*

### Zellkultur

GFL Wasserbad  
Heraeus Brutschrank CO<sub>2</sub> Autozero  
Heraeus Sterilwerkbank Lamin Air HB 2472

### Zentrifugen

Beckmann J2-21 Centrifuge  
Beckmann L8-70M Ultracentrifuge  
Beckmann TL-100 Ultracentrifuge  
Heraeus Biofuge Fresco  
Heraeus Biofuge Pico  
Sorvall RC2B  
Sorvall RT6000 Refrigerated Centrifuge (DuPont)  
Sigma 4K15  
Sigma 6K10

## **2.3 Chemikalien und Lösungsmittel**

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nichts anderes vermerkt ist, von den Firmen Baker, Biomol, Fluka, Invitrogen, Merck, Pharmacia, Promega, Serva und Sigma bezogen (Qualitätsstufe "p.a.", "Für die Molekularbiologie" oder "*cell culture grade*").

## **2.4 Allgemeine Puffer und Lösungen**

ATP-Puffer (pH 7,4)	150mol/l Tris 30mmol/l MgCl <sub>2</sub>
Auskochpuffer für Dialyseschlauch	10mol/l EDTA 100mol/l NaHCO <sub>3</sub>
<i>Coomassie Brilliant Blue</i> -Lösung	0,1% (w/v) <i>Coomassie Brilliant Blue G 250</i> 50% (v/v) Methanol 20% (v/v) Essigsäure
Dialysepuffer	20mol/l Tris 100mol/l NaCl mit HCl auf pH 7,4 einstellen

---

4×DNA-Auftragspuffer	50% (v/v) Glycerol 1mmol/l EDTA (pH 8) 0,25% (w/v) Bromphenolblau
Elutionspuffer	20mmol/l Glutathion 50mmol/l Tris mit HCl auf pH 7,4 einstellen
Entfärberlösung	30% (v/v) Methanol 1% (v/v) Ameisensäure
2×HEBS (sterilfiltriert)	0,28mol/l NaCl 0,05mol/l HEPES 1,5mmol/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,05 mit 5mol/l NaOH einstellen 1%(v/v) Ameisensäure
Hochsalzpuffer (pH 8,0) (Für Isolierung von miRNAs)	10mmol/l Tris 1000mmol/l NaCl 1% (v/v) NP-40 20mmol/l β-Glycerophosphat 0,1mmol/l Natriumvanadat 0,1mmol/l EDTA 10mmol/l Natriumfluorid In einfacher Konzentration werden diesem kurz vor Gebrauch frisch zugesetzt: 2mmol/l DTT
IP-Puffer für Kinaseversuche	1×TBS 1%(v/v) Triton X-100 1mmol/l Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 2mol/l DTT 50mmol/l NaF
10×Laemmli-Laufpuffer	0,5mol/l Tris 1,92mol/l Glycin 0,5% SDS
4×Laemmli-Auftragspuffer	100mmol/l Tris (pH 8,8) 8% (w/v) SDS

---

	24% (v/v) Glycin 16% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol 0,02% (w/v) Bromphenolblau
LB-Medium	10g BactoTrypton 5g Hefeextrakt 10g NaCl mit ddH <sub>2</sub> O auf 1l auffüllen und autoklavieren
LB-Platten	18,5g Standard I-Nähragar (Merck) mit ddH <sub>2</sub> O auf 0,5l auffüllen und autoklavieren
Luziferase-Reagenz	200mmol/l Tricin 10,7mmol/l (MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Mg(OH) <sub>2</sub> * 5H <sub>2</sub> O 26,7mmol/l MgSO <sub>4</sub> 333mmol/l DTT 10mg Coenzym A 5,931mg Na-Luziferin 5,3mmol/l ATP
Lysepuffer für Reportergenversuche	100mmol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100mmol/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2% (v/v) TritonX-100 Unmittelbar vor Gebrauch hinzufügen: 1 $\mu$ g/ml Pepstatin 10 $\mu$ g/ml Leupeptin 1mmol/l PMSF
PBS	137mmol/l NaCl 2,7mmol/l KCl 4,3mmol/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,4mmol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Sammelgelpuffer	1mol/l Tris (pH 6,8)
10 $\times$ <i>Semi Dry</i> Blotpuffer	30,25g Tris 144,2g Glycin 20% Methanol
4 $\times$ Speziallysepuffer (pH 7,05)	40mmol/l Tris

	<p>120mmol/l Natriumpyrophosphat  200mmol/l NaCl  200mmol/l NaF  8mmol/l <math>\text{Na}_3\text{VO}_4</math>  4% (v/v) Triton X-100  80mmol/l <math>\beta</math>-Glycerophosphat  In einfacher Konzentration werden diesem kurz vor Gebrauch frisch zugesetzt:  0,5mmol/l PMSF  0,5<math>\mu\text{g}</math>/ml Leupeptin  0,5<math>\mu\text{g}</math>/ml Pepstatin  1<math>\mu\text{mol}</math>/l Microcystin</p>
<p>4<math>\times</math>TAP-Binde -und IgG-Lyse-Puffer  (Für Koimmunopräzipitation)</p>	<p>40mmol/l Tris pH 8,0  1200mmol/l NaCl  0,4% (v/v) NP-40  80mmol/l <math>\beta</math>-Glycerophosphat  0,4mmol/l Natriumvanadat  0,4mmol/l EDTA  40mmol/l Natriumfluorid  Dem4<math>\times</math>Puffer werden kurz vor Gebrauch frisch zugesetzt:  1mmol/l DTT  1mmol/l PMSF  1<math>\mu\text{mol}</math>/l Pepstatin  2,5<math>\mu\text{g}</math>/l Leupeptin</p>
<p>4<math>\times</math>TAP-Binde -und IgG-Lyse-Puffer  (Für Isolierung von miRNAs)</p>	<p>40mmol/l Tris/ pH 8,0  1200mmol/l NaCl  4% (v/v) NP-40  80mmol/l <math>\beta</math>-Glycerophosphat  0,4mmol/l Natriumvanadat  0,4mmol/l EDTA  40mmol/l Natriumfluorid  In einfacher Konzentration werden diesem kurz vor Gebrauch frisch zugesetzt:  2mmol/l DTT  100U/ml <i>RiboLock</i><sup>™</sup> RNAse Inhibitor (Fermentas)  1<math>\times</math>Protease Inhibitor Cocktail (Roche)</p>



TAE-Puffer	4mmol/l Tris 0,11% (v/v) Essigsäure 1mmol/l EDTA
TBS-Puffer (pH 7,4)	10mmol/l Tris 1,54mol/l NaCl
TBST-Puffer	TBS-Puffer mit 0,05% (v/v) Tween 20
Trenngelpuffer	1mol/l Tris (pH 8,8)
Tris/NaCl-Puffer (pH 8,0) (Für Isolierung von miRNAs)	20mmol/l Tris 150mmol NaCl
TSS-Lösung	10% (w/v) Polyethylenglycol 6000 5% (v/v) DMSO 50mmol/l $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ in LB-Medium

## 2.5 Kits und gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien

Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies
Bradford-Kit	Protein Assay Dye Reagent, Bio Rad
DDT	GibcoBRL
dNTP Set	New England Biolab, Fermentas
Dialyse Schlauch	Spectrapor MWCO 6000-8000
DuoSet ELISA Development System Human IL-8	R&D Systems
ECL-Filme	GE Healthcare
ECL Western blotting detection reagent and analysis system	GE Healthcare
Filterpapier	Whatman
Gateway LR Clonase II Enzym Mix	Invitrogen
GFX Micro Plasmid Prep Kit	GE Healthcare
GSH-Sepharose	GE Healthcare
Hank's BSS	PAA
Immobilion Western Chemiluminescent HRP-Substrate	Millipore
Luminescent $\beta$ -Galactosidase Detection Kit II	BD Biosciences Clontech
mirVana miRNA Isolation Kit	Ambion
NucleoBond PC500 (Maxi Prep Kit)	Macherey-Nagel

NucleoSpin RNA II Kit	Macherey-Nagel
pENTR/D-TOPO Cloning Kit	Invitrogen
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems
Optical 96-Well Fast Thermal Cycling Plates	Applied Biosystems
Protein A-Sepharose	GE Healthcare
Protein G-Sepharose	GE Healthcare
PVDF-Membran	Millipore
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen
Röntgenfilme Biomax-ML, Biomar-MR	Kodak
Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems
TaqMan MicroRNA Reverse Transcripton Kit	Applied Biosystems
TaqMan 2×Universal PCR Master Mix ,	Applied Biosystems
No AmpErase UNG	
Vivaspin 2 ml Concentrator RC, 10000 MWCO	Vivascience
$\gamma$ - <sup>32</sup> P-ATP	GE Healthcare
Zellkulturmaterial	Nunc

## 2.6 Enzyme und Enzympuffer

<i>DpnI</i> (10U/ $\mu$ l)	MBI Fermentas
<i>EcoRI</i> (20U/ $\mu$ l)	MBI Fermentas
<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5U/ $\mu$ l)	MBI Fermentas
Proteinase K (600-1000U/ml)	MBI Fermentas
RNase A (10mg/ml, >5000U/mg Protein)	MBI Fermentas
<i>SalI</i> (20U/ $\mu$ l)	MBI Fermentas
<i>Taq</i> -Polymerase (5U/ $\mu$ l)	MBI Fermentas
MMLV Reverse Transkriptase (200U/ml)	MBI Fermentas

Zu den meisten Enzymen gab es die entsprechenden Puffer derselben Firmen, in denen die jeweiligen Enzyme nach Herstellerangaben eingesetzt worden sind.

## 2.7 Inhibitoren

Calyculin A	Cell Signaling
PD98059	Alexis Bichemicals
SB203580	Calbiochem
SC-514	Biomol
SP600125	Tocris Bioscience
Wortmannin	Alexis Biochemicals

RNase Inhibitor 20U/ $\mu$ l

Applied Biosystems

RNase Inhibitor RiboLock 40U/ $\mu$ l

MBI Fermentas

## 2.8 Standards

### DNA-Standards

O'GeneRuler™ 100bp DNA Ladder [Größe der Fragmente in bp:  
1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80]

MBI Fermentas

O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder [Größe der Fragmente in bp:  
10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000,  
750, 500, 250]

MBI Fermentas

### Protein-Standards

#### *Low Molecular Weight Calibration Kit for Electrophoresis*

Amersham Biosciences

Gewicht	Protein
97kD	Phosphorylase B
66kD	Albumin
45kD	Ovalbumin
30kD	Carboanhydrase
20kD	Trypsininhibitor
14kD	$\alpha$ -Lactalbumin

#### *Prestained Protein Molecular Weight Marker*

MBI Fermentas

Gewicht	Protein
120kD	$\beta$ -Galaktosidase
84kD	Kälberserumalbumin
47kD	Ovalbumin
34kD	Carboanhydrase
26kD	$\beta$ -Lactoglobulin
20kD	Lysozym

#### *PageRuler™ Unstained Protein Ladder*

MBI Fermentas

Gewicht	Protein
200kD	nicht bekannt
150kD	

120kD  
100kD  
85kD  
70kD  
60kD  
50kD  
40kD  
30kD  
25kD  
20kD  
15kD  
10kD

*Unstained Protein Molecular Weight Marker*

MBI Fermentas

Gewicht	Protein
116kD	$\beta$ -Galaktosidase
66,kD	Kälberserumalbumin
45kD	Ovalbumin
35kD	Lactat-Dehydrogenase
25kD	Restriktionsenzym Bsp98I ( <i>E.coli</i> )
18,4kD	$\beta$ -Lactoglobulin
14,4 kD	Lysozym

## 2.9 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma MWG bezogen.

### Mutageneseprimer

Primer zur Herstellung von pCMVT7Ago2 <sub>$\Delta$ PAZ</sub>

Name	Sequenz
Ago2se $\Delta$ PAZ	5' -CAGCCAGTAATCGAGTTTGT... GGACAAAGATGTATTAAAAAATTAACG-3'
Ago2as $\Delta$ PAZ	5' -CGTTAATTTTTTAATACATCTTTGTCC... AACAAACTCGATTACTGGCTG-3'

Primer zur Herstellung von pCMVT7Ago2 <sub>$\Delta$ PIWI</sub>

Name	Sequenz
Ago2se $\Delta$ PIWI	5' -GAACACGTATGCGGGCCTGCAG... GATAAGGAACATGACAGTGCTGAAG-3'
Ago2as $\Delta$ PIWI	5' -CTTCAGCACTGTCATGTTCCCTTATC...

	CTGCAGGCCCGCATACGTGTTC-3'
--	---------------------------

Primer zur Herstellung von pCMVT7Ago2-C<sub>Δ513-523</sub> und pCMVT7Ago2-C<sub>Δ513-523, Δ562-571</sub>

Name	Sequenz
Ago2 <sub>se</sub> Δ513-523	5' -CGGCACCTGAAGAACACGTAT... GGCAAGACGCCCGTGTAC-3'
Ago2 <sub>as</sub> Δ513-523	5' -GTACACGGGCGTCTTGCC... ATACGTGTTCTTCAGGTGCCG-3'

Primer zur Herstellung von pCMVT7Ago2-C<sub>Δ562-571</sub> und pCMVT7Ago2-C<sub>Δ513-523, Δ562-571</sub>

Name	Sequenz
Ago2 <sub>se</sub> Δ562-571	5' -ACGCCACAGACCCTGTCC... GGAGGCGTGAACAACATCC-3'
Ago2 <sub>as</sub> Δ562-571	5' -GGATGTTGTTACGCCTCC... GGACAGGGTCTGTGGCGT-3'

Primer zur Herstellung von pCMVT7Ago2-C<sub>Δ513-570</sub>

Name	Sequenz
Ago2 <sub>se</sub> Δ513-570	5' -GACAGCGTGGAGCCCATGTTC... CTGGGAGGCGTGAACAAC-3'
Ago2 <sub>as</sub> Δ513-570	5' -GTTGTTACGCCTCCAG... GAACATGGGCTCCACGCTGTC-3'

Primer zur Herstellung von pCMVT7Ago2-N<sub>ds1mut1</sub> und pCMVT7Ago2-N<sub>ds1mut</sub>

Name	Sequenz
Ago2 <sub>se</sub> ds1mut1	5' -CAAGGACAGGCACGCGGCGGTTGCGCGCTACCCCCACCTCCC-3'
Ago2 <sub>as</sub> ds1mu1	5' -GGGAGGTGGGGGTAGCGCGCAACC GCCCGCTGCCTGTCTTG-3'
Ago2 <sub>se</sub> ds1mut	5' -GTGGCCAGTATTTGCGGACGCGGCCGCGGCGGTTGCGCGC-3'
Ago2 <sub>as</sub> ds1mut	5' -GCGCGCAACC GCCCGCGGCCGCGTCCGCGAAATACTGGGCCAC-3'

Primer zur Herstellung von pCMVT7Ago2-N<sub>ds2mut1</sub> und pCMVT7Ago2-N<sub>ds2mut</sub>

Name	Sequenz
Ago2 <sub>se</sub> ds2mut1	5' -GCAGAAACACACCTACGCTCCCGCGGAGGTCTGTAACATTG-3'
Ago2 <sub>as</sub> ds2mu1	5' -CAATGTTACAGACCTCCGCGGGAGCGTAGGTGTGTTTCTGC-3'
Ago2 <sub>se</sub> ds2mut	5' -GTCGGACAGGAGCAGGCAGCCACCTACGCTCCCGCG-3'
Ago2 <sub>as</sub> ds2mut	5' -CGCGGGAGCGTAGGTGGCTGCCTGCTCCTGTCCGAC-3'

Primer zur Herstellung von pEGFP-DCP1αS60/62A

Name	Sequenz
DCP1 $\alpha$ se S60/62A	5' -CGTATATCGAAGGGCAGCTGCCCTTACCATGG-3'
DCP1 $\alpha$ as S60/62A	5' -CCATGGTAAGGGGCAGCTGCCCTTCGATATACG-3'

Primer zur Herstellung von pEGFP-DCP1 $\alpha$ S142/144A

Name	Sequenz
DCP1 $\alpha$ se S142/144A	5' -GCTCGGGACAAACAGGCTCCCGCCAGGCCAATGGCTGC-3'
DCP1 $\alpha$ as S142/144A	5' -GCAGCCATTGGCTGGGCGGGAGCCTGTTTGTCCCGAGC-3'

Primer zur Herstellung von pEGFP-DCP1 $\alpha$ S179/180A

Name	Sequenz
DCP1 $\alpha$ se S179/180A	5' -GGTGACTCAAATATCGCCGCCCTGGGTTACAGCC-3'
DCP1 $\alpha$ as S179/180A	5' -GGCTGTAACCCAGGGCGGCGATATTTGAGTCACC-3'

Primer zur Herstellung von pEGFP-DCP1 $\alpha$ T289/290A

Name	Sequenz
DCP1 $\alpha$ se T289/290A	5' -CCAGCCTGAAATCGCCGCCCGGTGCTAATC-3'
DCP1 $\alpha$ as T289/290A	5' -GATTAGCACCGGGCGGCGATTTTCAGGCTGG-3'

Primer zur Herstellung von pEGFP-DCP1 $\alpha$ S315A und pEGFP-DCP1 $\alpha$ S315/319A

Name	Sequenz
DCP1 $\alpha$ se S315A	5' -CTACACAATCCCGTTGGCCCTGTTCTCAGTCCC-3'
DCP1 $\alpha$ as S315A	5' -GGGACTGAGAACAGGGGCCAACGGGATTGTGTAG-3'

Primer zur Herstellung von pEGFP-DCP1 $\alpha$ S315D und pEGFP-DCP1 $\alpha$ S315/319D

Name	Sequenz
DCP1 $\alpha$ se S315D	5' -CTACACAATCCCGTTGGACCCTGTTCTCAGTCCC-3'
DCP1 $\alpha$ as S315D	5' -GGGACTGAGAACAGGGTCCAACGGGATTGTGTAG-3'

Primer zur Herstellung von pEGFP-DCP1 $\alpha$ S315E und pEGFP-DCP1 $\alpha$ S315/319E

Name	Sequenz
DCP1 $\alpha$ se S315E	5' -CTACACAATCCCGTTGGAGCCTGTTCTCAGTCCC-3'
DCP1 $\alpha$ as S315E	5' -GGGACTGAGAACAGGCTCCAACGGGATTGTGTAG-3'

Primer zur Herstellung von pEGFP-DCP1 $\alpha$ S319A und pEGFP-DCP1 $\alpha$ S315/319A

Name	Sequenz
DCP1 $\alpha$ se S319A	5' -CCCTGTTCTCGCTCCCACTCTGCCAGCTG-3'
DCP1 $\alpha$ as S319A	5' -CAGCTGGCAGAGTGGGAGCGAGAACAGGG-3'

Primer zur Herstellung von pEGFP-DCP1 $\alpha$ S319D und pEGFP-DCP1 $\alpha$ S315/319D

Name	Sequenz
DCP1 $\alpha$ se S319D	5' - CCTGTTCTCGATCCCACTCTGCCAGCTG - 3'
DCP1 $\alpha$ as S319D	5' - CAGCTGGCAGAGTGGGATCGAGAACAGG - 3'

Primer zur Herstellung von pEGFP-DCP1 $\alpha$ S319E und pEGFP-DCP1 $\alpha$ S315/319E

Name	Sequenz
DCP1 $\alpha$ se S319E	5' - CCTGTTCTCGAGCCCACTCTGCCAGCTG - 3'
DCP1 $\alpha$ as S319E	5' - CAGCTGGCAGAGTGGGCTCGAGAACAGG - 3'

Primer zur Herstellung von pEGFP-DCP1 $\alpha$ S334A

Name	Sequenz
DCP1 $\alpha$ se S334A	5' - CAGGTTCCCCCGCCTTACCTCGAAACAGC - 3'
DCP1 $\alpha$ as S334A	5' - GCTGTTTCGAGGTAAGGCGGGGGAACCTG - 3'

Primer zur Herstellung von pEGFP-DCP1 $\alpha$ T347/348A

Name	Sequenz
DCP1 $\alpha$ se T347/348A	5' - GCAGGCAGTGAAGGCCGCGCCTAGACAGAGG - 3'
DCP1 $\alpha$ as T347/348A	5' - CCTCTGTCTAGGCGCGGCCTTCACTGCCTGC - 3'

Primer zur Herstellung von pEGFP-DCP1 $\alpha$ S353A

Name	Sequenz
DCP1 $\alpha$ se S353A	5' - CGCCTAGACAGAGGGCTCCACTCCTGAACC - 3'
DCP1 $\alpha$ as S353A	5' - GGTTCAGGAGTGGAGCCCTCTGTCTAGGCG - 3'

Primer zur Herstellung von pEGFP-DCP1 $\alpha$ T401A

Name	Sequenz
DCP1 $\alpha$ se T401A	5' - CAGAACTCAGGTTGGCCCCACAGCATGACC - 3'
DCP1 $\alpha$ as T401A	5' - GGTTCATGCTGTGGGCCAACCTGAGTTTCTG - 3'

Primer zur Herstellung von pEGFP-DCP1 $\alpha$ S422A

Name	Sequenz
DCP1 $\alpha$ se S422A	5' - GGTAGCCAGCTTTGCTCCGGCAGCTGGTCAG - 3'
DCP1 $\alpha$ as S422A	5' - CTGACCAGCTGCCGGAGCAAAGCTGGCTACC - 3'

Primer zur Herstellung von pEGFP-DCP1 $\alpha$ S522/523/525A

Name	Sequenz
------	---------

DCP1 $\alpha$ se S522/523/525A	5' - CCTTGAGAGGAAAGCCGCGCC CCTGCTCCTCTAACTATTGG - 3'
DCP1 $\alpha$ as S522/523/525A	5' - CCAATAGTTAGAGGAGCAGGGGCGGC GGCTTTCCTCTCAAGG - 3'

Primer zur Herstellung von pEGFP-DCP1 $\alpha$ T531A

Name	Sequenz
DCP1 $\alpha$ se T531A	5' - CTCCTCTAACTATTGGAGCGCCAGAAAGTCAGAG - 3'
DCP1 $\alpha$ as T531A	5' - CTCTGACTTTCTGGCGCTCCAATAGTTAGAGGAG - 3'

Klonierungsprimer:

Primer für Klonierung von pDESTDCP1 $\alpha$  und pDESTDCP1 $\alpha$ S315A

Name	Sequenz
pDESTDCP1 $\alpha$ se	5' - CACCGGATTC AAGAAGGCGGCGCTGAG - 3'
pDESTDCP1 $\alpha$ as	5' - GAATTCTCTGCTCCAGTCATAGGTTG - 3'

Sequenzierprimer:

Name	Sequenz
DCP1 $\alpha$ se 505-525	5' - GAGAGGAATCAGATGGGTGAC - 3'
DCP1 $\alpha$ se 1006-1026	5' - CCTCGAAACAGCACCATGATG - 3'
Ago2se 1858-1875	5' - GAAGAAGCCCTCCATTGC - 3'
Ago2se 2251-2268	5' - CACGAAAATCACCCACCC - 3'
Ago2se <i>Eco</i> RI 1589-1612	5' - GCGCGAATCCATGCTGGTGGTGGTCATCCTGCCCCGGC - 3'
Ago2se <i>Eco</i> RI 1273-1291	5' - ATAATAGAATTCATGAAAGCTATTGCGACCCCTGTC - 3'
Ago2se <i>Eco</i> RI 808-833	5' - ATAATAGAATTCATGACGGACTGTGGGCAGATGAAGAG GAA - 3'
Ago2se <i>Eco</i> RI 385-408	5' - ATAATAGAATTCATGAAGGTGTCCATCAAGTGGGTG TCC - 3'
CMV	5' - AATCAACGGGACTTTCC - 3'

TaqMan MicroRNA Assays, TaqMan Assays on Demand Applied Biosystems

Name	Assay ID
hsa-mir-23b	000400
hsa-mir-135a	000460
hsa-mir-141	000463
hsa-mir-146a	000468
hsa-mir-186	002285
hsa-mir-210	000512



hsa-mir-214	002306
RNU6B	001093
IL-8	Hs00174103_m1
$\beta$ -Aktin	Hs99999903_m1

#### siRNA-Oligonukleotide

Name	Sequenz
Luziferase	5' -CGUACGCGGAAUACUUCGAUU- 3' 3' -UUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU (MWG Biotech)

## 2.10 Antikörper und rekombinante Proteine

- anti-phospho-p38-Antikörper (Thr180/Tyr185) (Biosource)  
polyklonaler affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Immunisierung erfolgte mit einem synthetischen phospho-Thr180/Tyr182-Peptid, abgeleitet von humanem p38
- anti-p38-Antikörper (SAK7) ( Prof. Dr. J. Saklatvala, London, England)  
Kanninchenserum (nicht aufgereingt), immunisierendes Peptid abgeleitet vom C-Terminus von p38 $\alpha$  (ISFVPLDQEEMES)
- anti-Ago2-Antikörper (Abnova Corporation)  
monoklonaler affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Maus, Immunisierung erfolgte mit vollständigem rekombinantem humanem Ago2
- anti-Ago2-Antikörper ( Upstate (Millipore))  
polyklonaler affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, immunisierendes rekombinantes Peptid abgeleitet von den N-terminalen Aminosäuren des humanen Ago2 (Aminosäuren7-48), Antikörper aufgereinigt an Protein A
- anti-Aktin-Antikörper (Merck)  
monoklonaler affinitätsaufgereingter Antikörper aus Maus, Immunisierung erfolgte mit Zytoskelettprotein aus Huhn
- anti-c-myc-Antikörper (Roche)  
monoklonaler affinitätsaufgereingter Antikörper aus Maus, Immunisierung erfolgte mit Peptid der Aminosäuren 408-439 aus humanem c-myc, Antikörper aufgereinigt an Protein G
- anti-DCP1 $\alpha$ -Antikörper (Abnova)

monoklonaler affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Maus, Immunisierung erfolgte mit rekombinantem Peptid der Aminosäuren 186-286 aus humanem DCP1 $\alpha$

- anti-phospho-DCP1 $\alpha$  (Ser315) (Eurogentec)

polyklonaler affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kanninchen, Antikörper erhalten durch Immunisierung mit einem synthetischen phospho-Ser315-Peptid, welches zusätzlich die Ser315-umgebenen Aminosäuren von humanem DCP1 $\alpha$  enthält (TYTIPL-P-SPVLSPT)

- anti-phospho-DCP1 $\alpha$  (Ser315) A und B (PickCell)

polyklonaler affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kanninchen, Antikörper erhalten durch Immunisierung mit einem synthetischen phospho-Ser315-Peptid, welches zusätzlich die Ser315-umgebenen Aminosäuren von humanem DCP1 $\alpha$  enthält (NEKHAPTYTIPL-P-SPVLSPTLPAEAPTAQV)

- anti-FLAG-Antikörper (Sigma)

monoklonaler affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Maus

- anti-GFP-Antikörper (Roche)

Mischung aus zwei monoklonalen Antikörpern aus Maus (Klone 7.1 und 13.1) gegen GFP; Immunisierung von Mäusen mit partiell gereinigtem rekombinanten *Aequorea victoria* GFP als Immunogen

- anti-HA-Antikörper (Roche)

monoklonaler, affinitätsgereinigter Antikörper aus Maus, erkennt Nonapeptidsequenz (YPYDVPDYA) aus dem Influenza Hemagglutinin Protein

- anti-Maus IgG-Cy3-Antikörper (aus Esel), anti-Kanninchen IgG-Cy3-Antikörper (aus Esel) (Chemicon International)
- anti-Kanninchen IgG (ganzes Molekül)-FITC-Antikörper (aus Ziege), anti-Maus IgG (ganzes Molekül)-FITC-Antikörper (aus Ziege) (Sigma)
- anti-Maus IgG-POD-Antikörper (aus Schaf) und anti-Kaninchen IgG-POD-Antikörper (aus Esel) (Pharmacia)
- anti-Maus IgG TrueBlot, anti-rabbit IgG TrueBlot, HRP-konjugierter Sekundärantikörper (Bioscience)
- Maus Immunglobulin-Gemisch und Kanninchen Immunglobulin-Gemisch (Santa Cruz)

- anti-JNK-Antikörper (AB681) ( Prof. Dr. J. Saklatvala, London, England)  
polyklonaler Antikörper aus Huhn, generiert gegen GST-JNK, erkennt alle JNK Isoformen
- anti-JNK-Antikörper (Cell Signaling Technology)  
polyklonal aufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, der totale JNK/SAPK-Mengen erkennt, Immunisierung erfolgte mit einem Fusionsprotein, welches das gesamte p54/JNK enthält, Antikörper aufgereinigt an Protein A
- anti-JNK-Antikörper (D-2, Santa Cruz)  
monoklonaler, affinitätsgereinigter Antikörper aus Maus, Immunisierung erfolgte mit vollständigem humanem JNK2 (Aminosäuren 1-424)
- anti-JNK-Antikörper (SAK9) ( Prof. Dr. J. Saklatvala, London, England)  
Kaninchenserum (nicht aufgereinigt), immunisierendes Peptid abgeleitet von C-Terminus von p54SAPK $\alpha$  aus Ratte und humanem JNK2 $\alpha$ 2 (Aminosäuren 409-423: DSSLDASTGPLEGCR)
- anti-phospho-JNK-Antikörper (Thr183/Tyr185) (Cell Signaling Technology)  
polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Antikörper erhalten durch Immunisierung mit einem synthetischen phospho-Thr183/Tyr185-Peptid, welches zusätzlich die Thr183/Tyr185-umgebenen Aminosäuren von humanem p54/JNK enthält, Antikörper aufgereinigt an Protein A
- anti-phospho-c-JUN-Antikörper (Ser73) (Cell Signaling Technology)  
polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Antikörper erhalten durch Immunisierung mit einem synthetischen phospho-Ser73-Peptid, welches zusätzlich die Ser73-umgebenen Aminosäuren von humanem c-JUN enthält, Antikörper aufgereinigt an Protein A
- anti-T7-Antikörper (Novagen)  
monoklonaler Antikörper aus Maus, gerichtet gegen die 11 Aminosäuren MetAlaSerMetThrGlyGlyGlnGlnMetGly
- anti-Tubulin-Antikörper (TU-02 ,Santa Cruz)  
monoklonaler affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Maus, Immunisierung erfolgte mit vollständigem  $\alpha$ -Tubulin aus dem Schwein (Aminosäuren 1-451)
- anti-TAK1-Antikörper (M579, Santa Cruz)  
polyklonaler affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kanninchen, Immunisierung erfolgte mit rekombinantem vollständigem murinem TAK1 (Aminosäuren 1-579)

- GST-Ago2

Prof. Dr. L. Joshua-Tor, New York, USA

- GST-c-Jun1-135

Prof. Dr. M. Kracht, Gießen, Deutschland

- GST-DCP1 $\alpha$

Im Zuge der Arbeit aus pEGFP-Vektor in pDEST15-Vektor umkloniert

- GST-DCP1 $\alpha$ S315A

Im Zuge der Arbeit aus pEGFP-Vektor in pDEST15-Vektor umkloniert

- humanes, rekombinantes IL-1 $\alpha$

Prof. Dr. J. Saklatvala, London, England

## 2.11 Bakterienstämme und Plasmide

Zur Klonierung wurden folgende *E. coli*-Stämme verwendet:

- TOP10

Genotyp: F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *deoR* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1* *nupG*

- XL1 Blue

Genotyp: F<sup>+</sup> *Tn10* (*Tet*<sup>r</sup>) *proA* +B + *lacI*<sup>P</sup>  $\Delta$ (*lacZ*)M15I *recA1* *gyrA96* (*Naf*) *tbi-1* *bsdR17* (*r<sub>k</sub>* *m<sub>k</sub>*) *glnV44* *relA1* *lac*

Die Expression von GST-DCP1 $\alpha$  und GST-DCP1 $\alpha$ S315A erfolgte in dem *E. coli*-Stamm:

- BL21-AI (Invitrogen)

Genotyp: F<sup>-</sup> *ompT* *hsdSB* (rB-mB-) *gal* *dcm* *araB::T7RNAP-tetA*

Zur Vermehrung und Erhaltung von pDEST15 wurde folgender gegen CcdB-Effekte resistenter *E. coli*-Stamm eingesetzt:

- One Shot<sup>®</sup> *ccdB* Survival<sup>™</sup> 2 T1<sup>R</sup> (Invitrogen)

Genotyp: F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *ara* $\Delta$ 139  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1* *nupG* *fhuA::IS2*

Verwendete Antibiotika:

Ampicillin (100 $\mu$ g/ml finale Konzentration), Kanamycin (50 $\mu$ g/ml finale Konzentration)

Folgende bereits vorhandene Plasmide wurden in dieser Arbeit eingesetzt:

pCMVT7-Ago2-FL	Prof. Dr. M. Kracht, Gießen, Deutschland
pCMVT7-Ago2-N	Prof. Dr. M. Kracht, Gießen, Deutschland
pCMVT7-Ago2-C	Prof. Dr. M. Kracht, Gießen, Deutschland
pEGFP-DCP1 $\alpha$	Prof. Dr. H. Holtmann, Hannover, Deutschland
pEGFP-DCP1 $\alpha_{\Delta 513-582}$	Prof. Dr. H. Holtmann, Hannover, Deutschland
pEGFP-JNK3	Prof. Dr. M. Kracht, Gießen, Deutschland
peVHA-JNK2	Prof. Dr. M. Kracht, Gießen, Deutschland
peVHA-JNK2 <sub>K55R</sub>	Prof. Dr. M. Kracht, Gießen, Deutschland
pCMV-FLAG-p38	Prof. Dr. M. Gaestel, Hannover, Deutschland
pCMV-FLAG-p38 <sub>T180A/Y182F</sub>	Prof. Dr. M. Gaestel, Hannover, Deutschland
pCDNA3.1MKK62E	Prof. Dr. M. Kracht, Gießen, Deutschland
pEGFP-TAK1	Prof. Dr. M. Kracht, Gießen, Deutschland
pCS2MT-MYC-TAB1	Prof. K. Matsumoto, Nagoya, Japan
pCDNA3.1TAK1 <sub>kd</sub> TAB1 <sub>ad</sub>	Prof. Dr. H. Sakurai, Toyama, Japan
pQBI-MEKK1(998-2743)-BFP	Prof. Dr. M. Kracht, Gießen, Deutschland
pCS3MT	Dr. P. Holland, London, England
pCDNA3.1	Invitrogen
pSV- $\beta$ -Gal	Promega
pGL2-Control	Promega
pBSPAC $\Delta$ P	PD Dr. Nourbakhsh, Hannover, Deutschland
pENTR/D TOPO	Invitrogen
pDEST15	Dr. Rainer Niedenthal

Im Rahmen dieser Arbeit generierte Plasmide:

pCMVT7-Ago2 <sub><math>\Delta</math>PAZ</sub>	pEGFPDCP1 $\alpha$ S319A
pCMVT7-Ago2 <sub><math>\Delta</math>PIWI</sub>	pEGFPDCP1 $\alpha$ S319D
pCMVT7-Ago2 <sub>ds1mut1</sub>	pEGFPDCP1 $\alpha$ S319E
pCMVT7-Ago2-N <sub>ds1mut</sub>	pEGFPDCP1 $\alpha$ S315/319A
pCMVT7-Ago2-N <sub>ds2mut1</sub>	pEGFPDCP1 $\alpha$ S315/319D
pCMVT7-Ago2-N <sub>ds2mut</sub>	pEGFPDCP1 $\alpha$ S315/319E
pCMVT7-Ago2-C <sub><math>\Delta</math>513-523</sub>	pEGFPDCP1 $\alpha$ S334A
pCMVT7-Ago2-C <sub><math>\Delta</math>562-571</sub>	pEGFPDCP1 $\alpha$ T347/348A
pCMVT7-Ago2-C <sub><math>\Delta</math>513-523</sub>	pEGFPDCP1 $\alpha$ S353A
pCMVT7-Ago2-C <sub><math>\Delta</math>513-523, 562-571</sub>	pEGFPDCP1 $\alpha$ T401A
pCMVT7-Ago2-C <sub><math>\Delta</math>513-570</sub>	pEGFPDCP1 $\alpha$ S422A
pEGFPDCP1 $\alpha$ S60/62A	pEGFPDCP1 $\alpha$ S522/523/525A
pEGFPDCP1 $\alpha$ S140/142A	pEGFPDCP1 $\alpha$ T531A
pEGFPDCP1 $\alpha$ S179/180A	pENTR/D TOPO DCP1 $\alpha$

pEGFPDCP1 $\alpha$ T289/290A  
pEGFPDCP1 $\alpha$ S315A  
pEGFPDCP1 $\alpha$ S315D  
pEGFPDCP1 $\alpha$ S315E

pENTR/D TOPO DCP1 $\alpha$ S315A  
pDEST15DCP1 $\alpha$   
pDEST15DCP1 $\alpha$ S315A

## 2.12 Zelllinien und Zusätze für die Zellkultur

- HEK293 IL-1R:

humane, adenovirus-transformierte, embryonale Nierenzelle, stabil transfiziert mit dem Typ I IL-1 Rezeptor, Prof. Dr. K. Matsumoto, Nagoya, Japan

- c-Jun Wt murine embryonale Fibroblasten
- JNK1/2<sup>-/-</sup> murine embryonale Fibroblasten

D-MEM-Vollmedium: 10% (v/v) FKS,

2mmol/l L-Glutamin

1mmol/l Natriumpyruvat

100U/ml Penicillin

100 $\mu$ g/ml Streptomycin

GibcoBRL

## 2.13 Molekularbiologische Techniken

### 2.13.1 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

#### 2.13.1.1 Miniplasmidpräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen lässt sich in vier Schritte unterteilen:

- Anzuchten und Ernten einer Bakterienkultur
- Aufbrechen der Zellen und Freisetzung des Zellinhaltes
- Entfernung aller Bestandteile aus dem Zellextrakt außer der DNA
- Anreicherung der entstandenen DNA-Lösung

Für die Lyse der Bakterien zur Gewinnung niedermolekularer DNA wird am häufigsten die Methode der alkalischen Lyse angewandt. Die hier verwendeten Protokolle der Firmen Amersham Biosciences (Minipräparation) und Macherey-Nagel (Maxipräparation) stellen eine Abwandlung dieser Prozedur dar. Dabei erfolgt die weitere Aufarbeitung der DNA über Anionen-Austauscher-Säulen

Für die Miniplasmidpräparation wurden die Bakterien, welche das gewünschte Plasmid enthalten, in 5ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft. Die Bakteriensuspension wurde über Nacht bei 37°C und 180rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden von der Bakteriensuspension 1-3ml für die Miniplasmidpräparation eingesetzt. Die Präparation erfolgte mit dem *GFX™ Micro Plasmid Prep Kit* von Amersham genau nach Herstellerangaben. Die DNA wurde je nach gewünschter Konzentration mit 30-50µl ddH<sub>2</sub>O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.13.1.2 Maxiplasmidpräparation

Die das gewünschte Plasmid tragenden Bakterien wurden aus einer Glycerindauerkultur oder aus der Kultur, welche für die Miniplasmidpräparation angesetzt worden ist, in 150ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C und 180rpm wurde die gesamte Bakteriensuspension für die Präparation des Plasmids unter Verwendung des *NucleoBond® PC500 Maxi Kits* von Macherey-Nagel eingesetzt. Die Präparation erfolgte genau nach den Angaben des Herstellers. Die getrocknete Plasmid-DNA wurde in 200-500µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.13.1.3 Isolierung von RNA aus Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus HEK293 IL-1R-Zellen erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des *NucleoSpin® RNA II Kits* von Macherey-Nagel

### 2.13.1.4 Isolierung von RNA aus Lysaten und Immunkomplexen

Die Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Lysaten sowie Immunkomplexen erfolgte mit dem *mirVana™ miRNA Isolation Kit* der Firma Ambion. Die dahinterstehende Prozedur vereint die Vorteile einer organischen- mit den Vorteilen einer Festphasen-Extraktion. Die Probe wird zunächst mit einem denaturierenden Lysepuffer versetzt, welcher RNAs stabilisiert und RNasen deaktiviert. Nach einer Extraktion mit saurem Phenol:Chloroform, durch welche die meisten zellulären Bestandteile, wie DNA, entfernt werden, schließt sich die Aufreinigung über einen Glasfaserfilter an. Hierbei kann je nach gewähltem Protokoll, Gesamt-RNA (schließt kleine RNAs <200nt mit ein) oder RNA, die an kleinen RNAs angereichert ist, isoliert werden.

Zunächst wurden die unter 2.14.3 beschriebenen Koimmunopräzipitationsproben sowie die dazugehörigen Lysate, welche 300-555µg Protein in einem Volumen von 100µl (aufgefüllt mit Lysepuffer) enthielten mit folgender Reaktionslösung versetzt:

2µl 100% β-Mercaptoethanol (final 2%)

1µl 20% SDS (final 0,2%)

1µl 0,5M EDTA, pH 8,0 (final 5µM)

Die Proben wurden für 5min bei 65°C erhitzt und anschließend nach kurzem Abkühlen mit 1µl Proteinase K (600-1000U/ml) versetzt. Nach einer Inkubation von 1h bei 37°C wurde die Proteinase K für 1h bei 65°C deaktiviert. Zu den Ansätzen wurden daraufhin 400µl *Lysis/Binding Buffer* aus dem *mirVana™ miRNA Isolation Kit* gegeben. Die weitere Präparation erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung des Protokolls für die Isolation von Gesamt-RNA.

Die Lysate, welche vor der RNA-Isolation mit RNase A behandelt wurden (siehe 2.14.1.2) sowie die dazugehörigen Kontrolllysate enthielten eine Proteinmenge von 1mg in einem Volumen von 200µl. Diese wurden direkt mit 400µl *Lysis/Binding Buffer* versetzt, ohne vorherige Behandlung mit der β-Mercaptoethanol- und SDS-haltigen Reaktionslösung oder der Proteinase K.

### 2.13.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung für DNA und RNA erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei 260nm. Bei dieser Wellenlänge liegt das Absorptionsmaximum der aromatischen Ringe der Basen. Um etwaige Verunreinigungen von Proteinen detektieren zu können, erfolgte die Aufnahme der Spektren stets in einem Bereich von 220-330nm, wobei das Verhältnis der Absorption bei 260nm und 280nm ermittelt wurde. Diese Ratio sollte für DNA zwischen 1,75 und 1,9 liegen, da die DNA bei Werten <1,75 zu stark mit Proteinen und bei Werten >1,9 mit RNA verunreinigt ist. Für RNA sollte die Ratio idealerweise 2,0 betragen. Der Berechnung der Konzentration wurden folgende Verhältnisse zugrunde gelegt:

$$1 \text{ OD}_{260\text{nm}} \cong 40\mu\text{g RNA/ml}$$

$$1 \text{ OD}_{260\text{nm}} \cong 50\mu\text{g DNA/ml}$$

## 2.13.2 Trennung von Nukleinsäuren

### 2.13.2.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Identifikation, Trennung und Reinigung von DNA-Fragmenten verwendet. Die DNA-Fragmente werden ihrer Größe nach getrennt. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente von ihrer Konformation und Größe sowie von der Dichte des Gels und der angelegten Spannung ab. Die DNA wandert aufgrund der negativen Phosphatgruppen zur Anode hin. Durch den Einsatz von DNA-Standards kann die Größe und die Konzentration der Fragmente abgeschätzt werden. Die DNA-Fragmente werden durch Zugabe von Ethidiumbromid zum Gel oder durch Anfärben des Gels in einem Ethidiumbromidbad nach der Elektrophorese sichtbar gemacht. Das Ethidiumbromid interkaliert aufgrund seiner planaren Struktur in DNA. Es kann mit UV-Licht (254-366nm) angeregt werden und emittiert dann Licht im orange-roten Bereich (590nm). Die Fluoreszenz wird durch die Bindung an die DNA verstärkt, so dass die DNA auch bei freiem Ethidiumbromid im Gel gut zu erkennen ist.



Es wurden 0,8-1,5%-ige Gele gegossen. Zur Herstellung eines x%-igen Gels wurden x g Agarose durch mehrmaliges kurzes Aufkochen im Mikrowellenherd in 100 ml 1×TAE-Puffer gelöst. Verdampftes Wasser wurde wieder hinzugefügt. Nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C wurden zum Gel 10 µl einer Ethidiumbromid-Stammlösung (10mg/ml) gegeben und anschließend wurde das Gel in die vorbereitete Gelelektrophoresekammer gegossen. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde es mit TAE-Puffer überschichtet, und die zuvor mit 10×Auftragspuffer versetzten Proben und 5 µl eines DNA-Standards wurden aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei ca. 100V bis das im Auftragspuffer vorhandene Bromphenolblau die gewünschte Strecke durchlaufen hat. Die anschließende Detektion der Banden fand am *Bio-Doc-Analyzer* der Firma Biometra statt.

### 2.13.2.2 Kapillarelektrophorese

Die Überprüfung des RNase A Verdaus erfolgte mit dem *Agilent 2100 BioAnalyzer* unter Verwendung des *Agilent RNA 6000 Nano Kits*. Hierfür wurde 1 µl des Probenvolumens auf den Nano Chip pipettiert, welcher einen Satz an miteinander verbundenen Mikrokapillaren enthält. Aufgrund eines angelegten elektrischen Feldes bewegten sich die Proben durch die Mikrokapillaren, wobei die fluoreszenzmarkierten RNA-Fragmente ihrer Größe nach separiert und anhand der Fluoreszenz detektiert wurden. Die Ergebnisse wurden aufgezeichnet und mit der *Agilent 2100 BioAnalyzer* Software analysiert.

## 2.13.3 Herstellung pro-und eukaryotischer Expressionsplasmide

### 2.13.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur exponentiellen Amplifikation von Nucleinsäuren durch thermostabile DNA-Polymerasen *in vitro*. Dazu wird die DNA zunächst hitzedenaturiert. Anschließend binden zwei Oligonukleotide als Startermoleküle (Primer), die komplementär zu den 3'-Enden des Zielsegments sind, bei niedriger Temperatur an die einzelsträngige DNA (Annealing). Bei einer Temperatur, die zwischen der zur Denaturierung und der für das Annealing verwendeten Temperatur liegt, werden die Primer verlängert (Extension) und somit das zwischen den Primern liegende DNA-Fragment gebildet. Die Abfolge aus Denaturierung, Annealing und Extension wird als Zyklus bezeichnet. Durch mehrmalige Wiederholung eines solchen Zyklus wird das gewünschte DNA-Fragment vervielfältigt.

Es wurden PCRs mit der Taq- und mit der Pfu-Polymerase durchgeführt. Die Taq-Polymerase weist nur eine 5'-3'-Polymerisationsaktivität auf, während die Pfu-Polymerase neben der 5'-3'-Polymerisationsaktivität auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität (*proof-reading*-Aktivität) besitzt.

Mit der Pfu-Polymerase wurden die DNA-Fragmente generiert, welche in den Vektor pENTR™/D-TOPO® zwischenkloniert werden sollten, da man aufgrund der 5'-3'-Exonukleaseaktivität des Enzyms nur *blunt end* PCR-Produkte erhält, was für die Klonierung in den Vektor eine Voraussetzung ist.

Die Etablierung der PCR-Bedingungen erfolgt in den meisten Fällen mit der Taq-Polymerase.

Die PCR wurde nach folgendem Protokoll unter Benutzung des folgenden Programms durchgeführt:

Template	50ng
10× PCR-Puffer (enthält 20mM MgSO <sub>4</sub> )	1×
Primer <i>sense</i>	0,5mmol/l
Primer <i>antisense</i>	0,5mmol/l
dNTP-Mix	0,2mmol/l pro Nukleotid
Taq- oder Pfu-Polymerase	2,5U
ddH <sub>2</sub> O	ad. 25µl

Profil	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Denaturierung	95	1	30
Annealing	x	1	
Elongation	72	0,5min/kb (Taq-Polymerase); 1-2min/kb (Pfu-Polymerase)	
Terminale Elongation	72	12	1

Nach beendeter PCR wurden die Proben auf 4°C abgekühlt.

Die Annealingtemperatur ist von der Sequenz der verwendeten Primern abhängig und wurde experimentell bestimmt. Dazu wurde mit der 4+2 Regel (4 °C pro C oder G und 2 °C pro A oder T) für jeden Primer eine Annealingtemperatur errechnet. Die PCR wurde dann mit den entsprechenden Primern und der errechneten Annealingtemperatur sowie mit zwei Annealingtemperaturen, die unterhalb der errechneten lagen und mit zwei Annealingtemperaturen, welche darüber lagen, durchgeführt. Zwischen den einzelnen Annealingtemperaturen war jeweils eine Differenz von 2°C.

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese

### 2.13.3.2 Zwischenklonierung mit Hilfe der Topo<sup>®</sup>-Strategie

Die unter Einsatz der Pfu-Polymerase generierten PCR-Produkte wurden unter Verwendung des *pENTR™/D-TOPO® Cloning Kits* der Firma Invitrogen in den Vektor *pENTR™/D-TOPO* ligiert. Der Vektor liegt linearisiert vor enthält an seinen Enden eine über Phosphodiesterbindung kovalent gebundene Topoisomerase I des *Vaccinia* Virues. Werden PCR-Produkt und Vektor gemischt, dann kommt es innerhalb weniger Minuten zu einer spontanen Ligation unter Abspaltung der Topoisomerasen ohne Zusatz jeglicher Restriktionsenzyme.

#### Klonierungsreaktion

Für die Ligation wurde folgender Ansatz pipettiert:

0,5-4  $\mu\text{l}$  frisches PCR-Produkt (molare Ratio PCR-Produkt: TOPO<sup>®</sup>-Vektor : 0,5:1-2:1)  
1  $\mu\text{l}$  Salzlösung  
1  $\mu\text{l}$  TOPO<sup>®</sup> Vektor  
ad. 6  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O

Dieser Reaktionsansatz wurde für 5min bei RT inkubiert. Anschließend folgte die Transformation in chemisch kompetente One Shot<sup>™</sup> TOP10 Bakterien.

### Transformation

Dazu wurden 2  $\mu\text{l}$  der Klonierungsreaktion zu den Bakterien gegeben und es wurde vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 30min auf Eis wurden die Bakterien einem Hitzeschock von 30s bei 42°C ausgesetzt. Danach wurde der Transformationsansatz sofort wieder auf Eis gestellt und zu diesem wurden 250  $\mu\text{l}$  eines auf RT vorgewärmten SOC Mediums gegeben. Die Bakteriensuspension wurde anschließend bei 250rpm und 37°C für 1h geschüttelt. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf vorgewärmte Kanamycin-LB-Platten (finale Konz.: 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die weitere Klonierung der PCR-Produkte aus dem pENTR<sup>™</sup>/D-TOPO Vektor in den Zielvektor erfolgte wie unter 2.13.3.5 aufgeführt über Rekombination.

### **2.13.3.3 Restriktionsverdau**

Bei Restriktionsenzymen handelt es sich um Endonukleasen bakteriellen Ursprungs, welche die Phosphodiesterbindung beider Stränge eines DNA-Doppelstranges hydrolytisch spalten. Die Restriktionsenzyme werden in drei Typen eingeteilt, wobei die Restriktionsenzyme des Typs II am häufigsten in der Gentechnik zum Einsatz kommen. Sie besitzen meist eine palindrome Erkennungssequenz von 4-8 Basen. Die Spaltstelle liegt innerhalb oder nahe der Erkennungssequenz. Bei der Spaltung eines DNA-Doppelstranges mit Restriktionsenzymen können stumpfe Enden (*blunt ends*) oder kohäsive Enden (*sticky ends*) entstehen.

Mit der Hilfe von Restriktionsenzymen können z.B. DNA-Fragmente schnell aus Plasmiden herausgeschnitten und in die gewünschten Zielvektoren eingefügt werden.

Für einen analytischen Verdau wurde folgender Ansatz pipettiert:

1  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA oder 5  $\mu\text{l}$  von der Miniplasmidpräparation  
5U Restriktionsenzym  
2  $\mu\text{l}$  10×Puffer  
ad. 20  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde für ½-2h bei 37°C inkubiert und zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen.

#### 2.13.3.4 Transformation

Zur Transformation wurden chemisch kompetente *E.coli* Stämme eingesetzt, die unter 2.11 gesondert aufgeführt sind.

Ein Aliquot der kompetenten Bakterien (100µl) wurde auf Eis aufgetaut und mit dem gesamten Ligationsansatz bzw. mit 10-100ng eines zirkulären Plasmids vermischt. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis, während der sich die DNA an die Bakterienmembran anlagert, wurden die Zellen für 45s einem 42°C-Hitzeschock ausgesetzt, durch welchen sie die DNA aufnehmen. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 5min. Die Bakterien wurden anschließend mit 900µl LB-Medium ohne Antibiotikum versetzt und im Schüttelinkubator für ca. 1h bei 37°C kultiviert. Je nach Verwendungszweck wurden mit der Vorkultur direkt antibiotikahaltige Flüssigkulturen beimpft oder der Transformationsansatz wurde zur Selektion von Einzelklonen auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgebracht und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

#### 2.13.3.5 Klonierung unter Verwendung der Gateway®-Rekombinations-Strategie

Anders als bei der klassischen Klonierung über Restriktionsverdau und Ligation beruht die Gateway®-Klonierung auf sequenzspezifischer Rekombination durch spezifische Rekombinasen und umgeht dabei einige Probleme der klassischen Klonierung. So können z.B. nicht immer die gewünschten Restriktionsenzyme verwendet werden, wenn das zu klonierende Gen Schnittstellen für diese enthält. Außerdem sind zum Teil viele Aufreinigungsschritte notwendig, welche die Effizienz schmälern.

Die Gateway-Klonierung bedient sich des Rekombinationssystems des Bakteriophagen λ. Nach Infektion rekombiniert die λ-DNA mit der DNA von *E. coli* über homologe Sequenz die als *attP* (*attachment site phage*) im Phagen und als *attB* (*attachment site bacteria*) im Bakterium bezeichnet werden. Das so in das Bakteriengenom integrierte Phagenchromosom wird nun von den Sequenzen *attL* (*attachment site left*) und *attR* (*attachment site right*) eingeschlossen, welche sich aus DNA Sequenzen von *attB* und *attP* zusammensetzen. Über eine reverse Reaktion zwischen *attL* und *attR* kann die Phagen DNA wieder herausgeschnitten werden. Dabei werden die originalen *attB* und *attP* Sequenzen wieder hergestellt.

Bei der Gateway-Klonierung wird das Zielgen zunächst in einen sogenannten Entry-Vektor zwischenkloniert, welcher die DNA-Sequenzen *attL1* und *attL2* besitzt, die das Zielgen flankieren. Anschließend wird das Zielgen in den Destination-Vektor überführt. Dieses passiert durch homologe Rekombination zwischen *attL1* und *attL2* des Entry-Vektors mit *attR1* und *attR2* des Destination-Vektors. Dieser Schritt entspricht sozusagen der Phagen genom-Excisionsreaktion. Die *attL*-sowie die *attR*-Sequenzen unterscheiden sich leicht, so dass *attL1* nur mit *attR1* und *attL2* mit *attR2* rekombiniert und die Klonierung gerichtet verläuft. Nach der Rekombinationsreaktion erhält man sein gewünschtes Expressionsplasmid und ein Nebenprodukt, welches das *ccdB*-Gen enthält, was vom Destination-Vektor übertragen wurde. Das Produkt dieses Gens wirkt sich auf die im Labor üblicherweise verwendeten

Bakterienstämme toxisch aus und trägt somit neben der unterschiedlichen Resistenz von Entry- und Destination-Vektor zur Selektion positiver Klone bei.

Als Entry-Vektor wurde der bereits unter 2.13.3.2 erwähnte pENTR™/D-TOPO verwendet und als Destinationsvektor der prokaryotische Expressionsvektor pDEST15.

#### Rekombinationsreaktion

Folgender Ansatz wurde pipettiert:

Entry-Vektor (150ng/Reaktion)	1-7µl
Destination-Vektor (150ng/µl)	1µl
TE-Puffer, pH 8,0	ad 8µl
LR Clonase™ II Enzym Mix	2µl

Vor Zugabe des Enzym Mix wurde dieser zweimal kurz gevortext. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 1h bei 25°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzym Mix erfolgte durch die Zugabe von 1µl der Proteinase K Lösung (2µg/µl) und anschließender Inkubation für 10min bei 37°C.

#### Transformation

Für die Transformation wurden One Shot™ TOP10 Bakterien verwendet. Dazu wurde 1µl des Rekombinationsansatzes vorsichtig mit den Bakterien vermischt. Nach einer Inkubation von 30min auf Eis, folgte ein Hitzeschock für 30s bei 42°C. Danach wurde der Transformationsansatz sofort wieder auf Eis gestellt und zu diesem wurden 450µl eines auf RT vorgewärmten SOC Mediums gegeben. Diese Suspension wurde anschließend bei 200rpm und 37°C für 1h geschüttelt. 100µl des Transformationsansatz wurden auf vorgewärmte Ampicillin-LB-Platten (finale Konz.: 100µg/µl) ausgestrichen, welche dann über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.

#### **2.13.3.6 Mutagenese**

Die Herstellung von Punkt- oder Deletionsmutanten erfolgte nach dem *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* Protokoll der Firma Stratagen. Zur Herstellung der Deletionsmutanten wurde dieses leicht abgewandelt.

Bei diesem Verfahren wird die Punktmutation bzw. Deletion durch Primer, welche die Mutation enthalten oder welche aus Sequenzen aufgebaut sind, die den zu deletierenden Bereich flankieren, in einer PCR direkt in das in einem Vektor befindliche Gen eingefügt. Anschließend wird die methylierte Matrizen-DNA (DNA aus Bakterien wird in den meisten Stämmen methyliert) selektiv durch eine *DpnI*-Verdau aus dem Reaktionsansatz entfernt, während die neu synthetisierte unmethylierte DNA, welche die Mutation enthält, in Bakterien transformiert wird.

Der Einzelstrangbruch, der durch die Inkorporation der Primer nach Synthese vorliegt, wird in den Bakterien repariert.

Folgender Ansatz wurde für eine Mutagenese-PCR pipettiert:

Template	50ng
10× PCR-Puffer (enthält 20mM MgSO <sub>4</sub> )	1×
Primer <i>sense</i>	125ng
Primer <i>antisense</i>	125ng
dNTP-Mix	0,2mmol/l pro Nukleotid
ddH <sub>2</sub> O	ad. 50µl
Pfu-Polymerase	2,5U

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

Profil	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Denaturierung	95	0,5 (3)	1
Denaturierung	95	0,5 (0,25)	16(18)
Annealing	55 (x)	1	
Elongation	72 (68)	1min/kb Plasmid	

Die in Klammern stehenden Bedingungen wurden bei der Herstellung von Deletionsmutanten angewandt. Die Annealingtemperatur wurde 2°C höher gewählt als die Schmelztemperatur des „Primerkopfes“ (Teil des Primers, welcher Sequenz enthält, die vor der gewünschten Deletion liegt). Die Berechnung der Schmelztemperatur des Primerkopfes sowie des vollständigen Primers erfolgte mit dem Programm Primer Express Version 3.0.

Die Schmelztemperatur der vollständigen Deletionsprimer sowie der Punktmutationsprimer betrug in der Regel  $\geq 78^\circ\text{C}$ . Die Berechnung der Schmelztemperatur der Punktmutationsprimer erfolgt allerdings mit der Formel:  $T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \%mismatch$

Hierbei stellt N die Primerlänge dar. Diese lag zwischen 25 und 45 Basenpaaren und der Primer enthielt die gewünschte Mutation relativ in der Mitte der Sequenz. Für Deletionen wurden Primer mit einer Länge von eher 45 Basenpaaren gewählt. Es wurde darauf geachtet, dass die Primer einen minimalen GC-Gehalt von 40% aufwiesen und an ihren Enden eine oder mehrere G- oder C-Basen enthielten.

### 2.13.3.7 Identifikation positiver bakterieller Klone

Um zu prüfen, welche der bakteriellen Einzelklone tatsächlich ein PCR-Insert bzw. die gewünschte Mutation trug, wurden von den gewachsenen Einzelkolonien antibiotikahaltige 5ml-Flüssigkulturen angelegt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Je nach Konstrukt wurden nach Isolation der Plasmide zur Identifikation positiver Einzelklone

verschiedene Strategien gewählt. Es wurde entweder wie unter 2.13.3.3 beschrieben ein analytischer Restriktionsverdau durchgeführt oder es wurde wie unter 2.13.3.1 aufgeführt eine PCR-Reaktion unter Verwendung der Klonierungsprimer durchgeführt. Die Überprüfung eingeführter Mutationen erfolgte durch Sequenzierung des entsprechenden Plasmids. Zusätzlich wurde jedes klonierte Konstrukt mittels Sequenzierung auf seine Richtigkeit hin überprüft.

#### 2.13.4 Fluoreszenzsequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode von Sanger. Bei dieser Methode wird die zu sequenzierende DNA mit dem entsprechenden Primer, einer DNA-Polymerase, den dNTPs und mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (ddNTPs) in einer PCR eingesetzt. Neben den Desoxynukleotiden werden auch statistisch die fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide eingebaut. Diese besitzen sowohl am C2 als auch am C3 des Zuckers keine Hydroxygruppe, was dazu führt, dass es nach deren Einbau zum Abbruch der Synthese des Stranges kommt, da keine freie 3'-Hydroxygruppe vorhanden ist, welche mit der 5'-Triphosphatgruppe eines dNTP reagieren kann. Nach einer bestimmten Zeit erhält man eine Population von basenspezifisch terminierten Reaktionsprodukten, die sich in ihrer Länge um nur eine Base unterscheiden. Nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung der Produkte kann man anhand der Reihenfolge der Fluoreszenzen die DNA-Sequenz ermitteln.

Die für die Sequenzierung durchgeführte PCR hatte folgende Zusammensetzung:

Plasmid-DNA	400ng
Primer	5pmol
Premix	4 $\mu$ l
HPLC-H <sub>2</sub> O	ad. 20 $\mu$ l

Das für die PCR verwendete Programm lautete:

Profil	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Denaturierung	96	30	25
Annealing	x	15	
Elongation	60	240	

Nach beendeter PCR wurde die Probe auf 4 °C abgekühlt. Die gewählte Annealingtemperatur war von dem jeweiligen Primer abhängig.

Ago2se 1858-1875:	x=51°C
Ago2se 2251-2268:	x=51°C
Ago2se <i>Eco</i> RI 1589-1612:	x=67°C
Ago2se <i>Eco</i> RI 1273-1291:	x=53°C

Ago2se <i>Eco</i> RI 385-408:	x=58°C
Ago2se <i>Eco</i> RI 808-833:	x=50°C
CMV:	x=55°C

Es folgte die Aufreinigung des PCR-Produkts bei RT. Hierfür wurde zu der Probe 80µl Wasser und 10µl Natriumacetat (3 M, pH 4,6) gegeben und anschließend wurde die DNA mit 250µl 96%-igem Ethanol ausgefällt. Die gefällte DNA wurde für 15min bei 13000rpm abzentrifugiert und mit 250µl 70%-igem frisch angesetzttem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 10min bei 13000rpm wurde die DNA bei RT getrocknet. Anschließend wurde sie in 25µl TSR (*Template Suppression Buffer*) aufgenommen und für 2min bei 95°C inkubiert. Nachdem die Lösung kurz gevortext und anzentrifugiert worden ist, folgte die Sequenzierung im 310 *Abi Prism™ Genetic Analyzer*.

Zu einem späteren Zeitpunkt dieser Arbeit wurden die Sequenzierungen von der Firma Agowa durchgeführt.

### 2.13.5 Reverse Transkription (RT)

Bei einer RT wird die RNA durch Reverse Transkriptasen oder RNA-abhängige DNA-Polymerasen in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

Die Reverse Transkription der miRNAs erfolgte durch die MuLV Reverse Transkriptase *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* der Firma Applied Biosystems unter Einsatz von spezifisch gegen die jeweilige miRNA gerichteten Stem-loop Primern, welche eine größere Spezifität und Effizienz als herkömmliche RT-Primer aufweisen.

Ein 15µl RT-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

0,15 µl	100mM dNTPs	Master Mix
1µl	MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/µl)	
1,5	10x Reverse Transcription Buffer	
0,19µl	RNase Inhibitor (20U/µl)	
4,16µl	Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	
5µl	Gesamt-RNA	
3µl	Primer	

Von der Gesamt-RNA, welche aus den Lysaten isoliert worden ist, wurden 8-10ng eingesetzt. Die Konzentration der aus den Immunkomplexen isolierten Gesamt-RNA war so gering, dass sie nicht exakt bestimmt werden konnte.

Es wurde zunächst der Master Mix pipettiert, gevortext, abzentrifugiert und mit der RNA-Probe versetzt. Nach erneuter Durchmischung und Zentrifugation (10s, 2000rpm) wurde die Primerlösung hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde gevortext, abzentrifugiert (10s,



2000rpm) und 5min auf Eis inkubiert, bevor die Reaktion im Thermocycler unter Verwendung des folgenden Temperaturprofils durchgeführt wurde:

Temperatur (°C)	Zeit (min)
16	30
42	30
85	5
4	∞

Die Proben wurden direkt in die Real Time PCR eingesetzt oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 gelagert.

Zur Reversen Transkription der gesamten Zell-mRNA wurde ein Gemisch aus Zufalls-Hexamer-Primern und die MMLV (Moloney-Maus-Leukämie-Virus) Reverse Transkriptase verwendet.

Ein 20µl RT-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

14,5µl	1µg RNA in Nuklease-freiem H <sub>2</sub> O
4 µl	5×RT-Puffer
0,5µl	Random Primer Hexamer
0,5µl	dNTP (10mM)
0,5µl	MMLV Reverse Transkriptase

Die Reverse Transkription wurde im Thermocycler unter Verwendung des folgenden Temperaturprofils durchgeführt:

Temperatur (°C)	Zeit (min)
23	10
37	60
95	5
4	∞

Die Proben wurden direkt in die Real Time PCR eingesetzt oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 gelagert.

### 2.13.6 Real Time PCR

Die Real Time PCR ermöglicht eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen. Die Firma Applied Biosystems bietet für die Detektion und akkurate Quantifizierung von mRNAs und miRNAs vorgefertigte und validierte Anwendungen

an, die sogenannten *TaqMan Assays on Demand* bzw. *TaqMan MicroRNA Assays*. Hierbei erfolgt die Quantifizierung der PCR-Produkte über die Verwendung sogenannter TaqMan-Sonden, die neben herkömmlichen PCR-Reagenzien in die Reaktion eingesetzt werden. Die Sonde ist am 5'-Ende mit dem Reporterfarbstoff FAM (Fluorencin) und am 3'-Ende mit dem nicht fluoreszierenden Quencher TAMRA (Tetramethylrhodamine) versehen. Während der PCR bindet die Sonde spezifisch an eine komplementäre Sequenz des Matrizenstranges, welche zwischen den Primerbindungsstellen lokalisiert ist. In diesem Zustand wird aufgrund der räumlichen Nähe zwischen Reporter und Quencher, die Fluoreszenz des Reporters aufgrund von FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) unterdrückt. Trifft die DNA-Polymerase während der Synthese des komplementären DNA-Stranges auf die Sonde wird diese verdrängt, wodurch sich eine Y-förmige Sekundärstruktur ausbildet. Diese aktiviert die 5'-3'-Exonuklease der DNA-Polymerase und führt zur Degradation der Sonde. Dadurch wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher unterbrochen, FRET kann nicht länger stattfinden, und der Reporter sendet ein Fluoreszenzsignal aus. Der Zyklenzahl entsprechenden zunehmenden Amplifikation der PCR-Produkte steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem zusätzlichen Zyklus an. Gemessen wurden die Real Time PCR-Daten mit dem *ABI PRISM 7500 Sequence Detection System*.

Bei der Durchführung der *TaqMan MicroRNA Assays* hatte ein 20µl Real Time PCR-Ansatz folgende Zusammensetzung:

10µl TaqMan 2x Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG  
 7,67µl Nuklease-freies H<sub>2</sub>O  
 1µl 20x TaqMan MicroRNA Assay Mix  
 1,33µl RT-Produkt

Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet:

Profil	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Zyklen
Aktivierung der AmpliTaqGold® Polymerase	95	10	1
Denaturierung	95	0,25	40-50
Annealing/Elongation	60	1	

Der verwendete PCR-Modus war 9600 Emulation.

Bei der Durchführung der *TaqMan Assays on Demand* hatte ein 20µl Real Time PCR-Ansatz folgende Zusammensetzung:

10µl TaqMan FAST 2x Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG  
 7µl Nuklease-freies H<sub>2</sub>O  
 1µl TaqMan Assays on Demand

2 $\mu$ l RT-Produkt

Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet:

Profil	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklen
Aktivierung der AmpliTaqGold® Polymerase	95	20	1
Denaturierung	95	3	40-50
Annealing/Elongation	60	30	

Der verwendete PCR-Modus war 7500 Fast.

Die zu untersuchenden Proben wurden im 96-Loch-Maßstab als Doppel- oder Dreifachwerte pipettiert.

Die Auswertung der Daten erfolgte unter anderem als relative Quantifizierung nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

## 2.14 Proteinbiochemische Techniken

### 2.14.1 Herstellung von Ganzzelllysaten eukaryotischer Zellen

Die Herstellung von Ganzzelllysaten erfolgte zur Messung von Reportergergenaktivitäten zur Immunodetektion im Westernblot sowie zur Durchführung von Koimmunopräzipitation und Kinase-Versuchen. Für die Lyse der Zellen wurde je nach Verwendungszweck unterschiedliche Lysepuffer und –Protokolle angewandt. Alle Schritte der Zellyse wurden auf Eis durchgeführt um eine Degradation zellulärer Proteinen zu verhindern.

#### 2.14.1.1 Lysate zur Immunodetektion im Westernblot

Die Zellyse erfolgte unter Einsatz des Speziallysepuffers, der das Detergenz Triton X-100 in einer relativ hohen Konzentration von 1% enthält, um sicher zu stellen dass die Zellen vollständig lysiert werden und die Proteinkonzentration somit hoch ist.

Die Zellen wurden in einem der Zellmenge entsprechenden Volumen an Speziallysepuffer resuspendiert (für ein optisch 100% konfluentes 6-Loch 50 $\mu$ l). Es folgte eine Inkubation der in dem Speziallysepuffer resuspendierten Zellen für 15min. Während dieser Zeit wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen gevortext. Nach einer Zentrifugation von 15min bei 13000rpm wurde der Protein enthaltende Überstand abgenommen.

#### 2.14.1.2 Lysate für Immunodetektion im Westernblot und für Koimmunopräzipitation

Untersuchung von Proteininteraktionen:

Um Proteininteraktionen zu untersuchen wurde der relativ milde TAP-Lyse- und IgG-Binde-Puffer, der final eine NP-40-Konzentration von nur 0,1% aufweist.

Die Zellen wurden zunächst je nach Zellmenge in einem entsprechendem Volumen Tris-Puffer (5mM, pH 8,0) resuspendiert (für zwei 175cm<sup>2</sup> Flaschen 500-600µl). Nach einer Inkubation von 15min auf Eis in diesem hypoosmolaren Puffer wurde die Zellsuspension mit einem entsprechenden Volumen 4×TAP-Lyse- und IgG-Binde-Puffer (pro ml 4× Puffer folgende Zusätze: 4µl DTT (1mol/l), 20µl PMSF (200mmol/l), 4µl Pepstatin (1mmol/l), 2µl Leupeptin (5mg/ml), 1µl Microcystin (1µmol/l) versetzt. Die Zellen wurden für 20min auf Eis lysiert und anschließend zum vollständigen Zellaufbruch viermal durch eine *20-Gauge* und viermal durch eine *26-Gauge Nadel* gepresst. Das Lysat wurde dann für 20min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert und der Protein enthaltende Überstand abgenommen.

Die Herstellung der Lysate, welche für den RNase A Verdau verwendet wurden, erfolgte ebenso, mit der Ausnahme, dass ein 4×TAP-Lyse- und IgG-Binde-Puffer verwendet wurde, welcher kein Natriumvanadat enthielt und eine NaCl-Konzentration von 400mM aufwies (final 100mM).

#### Isolierung von miRNAs

Die Zellen wurden in 1×TAP-Lyse- und IgG-Binde-Puffer resuspendiert (pro 175cm<sup>2</sup> Flasche 1ml). Im Vergleich zu dem TAP-Lyse- und IgG-Binde-Puffer, welcher für die Untersuchung der Proteininteraktion verwendet wurde, enthielt dieser final 1% NP-40, sowie einen Proteaseinhibitormix von Roche und die doppelte Konzentration an DTT (2mM anstatt 1mM). Zusätzlich wurden pro ml Puffer 100U des RNase-Inhibitors *RiboLock™* der Firma Fermentas hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 20min auf Eis wurden die lysierten Zellen abzentrifugiert (20min, 13000rpm) und der Überstand mit den Proteinen abgenommen.

#### **2.14.1.3 Lysate für Messung von Reporter-genaktivität**

Die Lyse erfolgte exakt wie für die Lysate zur Immunodetektion im Western-Blot beschrieben. Der eingesetzte Lysepuffer enthielt jedoch weniger Triton X-100, so dass die Bedingungen schonender waren.

#### **2.14.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung und einer damit verbundenen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 zu 595nm. Die Farbtintensität ist abhängig von basischen Aminosäuren, insbesondere Arginin, und von aromatischen Aminosäuren. Mit dieser Methode lassen sich Proteinmengen von wenigen µg nachweisen.

Für die Bestimmung der Konzentration ist es bei dieser Methode erforderlich eine Eichkurve aufzunehmen. Für die Eichgerade wurde hier Rinder-Serumalbumin (BSA) in einem Konzentrationsbereich von 0-35 mg/ml verwendet.

Es wurde von jeder Probe und von jedem BSA-Standard eine Dreifachbestimmung in einer 96-Loch-Platte durchgeführt. Dabei wurden jeweils 100µl der zuvor mit PBS entsprechend verdünnten Probe mit 100µl des Bradford-Reagenzes versetzt. Ebenso wurde mit den BSA-Standard-Lösungen verfahren. Ungefähr 5min nach Zugabe des Bradford-Reagenzes wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595nm in einem *Elisa Reader* gemessen.

### 2.14.3 Koimmunopräzipitation

#### Proteininteraktion

Die Koimmunopräzipitation dient zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Hierbei wird mittels eines Antikörpers über Protein A- oder Protein G-Sepharose das jeweilige Antigen aus einer Proteinlösung (z.B. Zell-Lysat) isoliert. Zusätzlich zum Antigen selbst können unter geeigneten Bedingungen auch Bindungspartner des Antigens präzipitiert werden und somit die Interaktion von Proteinen nachgewiesen werden.

Das Lysat, welches eine Proteinmenge von 0,5-2mg enthielt, wurde mit dem für die Lyse verwendeten Lysepuffer auf ein Volumen von 300µl aufgefüllt. Anschließend wurde zu dem verdünnten Lysat 1µg des entsprechenden Antikörpers gegeben. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C unter konstantem Rotieren, wurde das Lysat mit 30µl Protein G-Sepharose versetzt, welche zuvor durch dreimaliges Waschen mit je 1ml Lysepuffer äquilibriert wurde. Es folgte eine Inkubation für 2-3h unter konstantem Rotieren (20rpm) bei 4°C. Alternativ wurde der Antikörper über Nacht an die Protein G-Sepharose immobilisiert, gefolgt von einer Inkubation des immobilisierten Antikörpers mit dem Lysat. Die Protein G-Sepharose wurde anschließend abzentrifugiert (1min, 13000rpm) und dreimal mit je 1ml des entsprechenden Lysepuffers gewaschen. Die Elution der immobilisierten Proteine erfolgt durch Aufkochen der Protein G-Sepharose in 40µl 1×Laemmli-Puffer für 10min bei 95°C. Die Eluate wurden mittels SDS-Page untersucht.

Um die RNA-Abhängigkeit einer Proteininteraktion zu untersuchen wurde das Lysat auf drei gleiche Ansätze aufgeteilt. Ein Ansatz wurde für 30min bei 37°C mit RNase A in einer Konzentration von 0,1 µg/µl (0,5U/µl) inkubiert. Mit dem zweiten Ansatz wurde ebenso verfahren, nur das anstelle der RNase A ein entsprechendes Volumen eines 50mM Tris-HCL (pH 7,4), 50% Glycerol Puffers (Puffer, in dem RNase A gelöst ist) eingesetzt wurde. Der letzte Ansatz wurde unbehandelt gelassen. Von jedem Ansatz wurde Lysat mit einem Proteingehalt von 1mg abgenommen aus dem anschließend Gesamt-RNA isoliert wurde (siehe 2.13.1.4). Das restliche Lysat (0,8-2mg) wurde dann für die Koimmunopräzipitation eingesetzt.

#### Isolierung von miRNA

Je Ansatz wurden 2mg Proteinextrakt mit Lysepuffer auf 500µl aufgefüllt und mit 2µg T7-Antikörper bzw. mit 2µg eines murinen Immunglobulingemisches versetzt. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C unter ständiger Rotation (20rpm). Anschließend wurde jeder Ansatz mit 30µl Protein G-Sepharose versetzt, welche zuvor mit dem Lysepuffer äquilibriert worden ist. Nach weiteren 2-3h bei 4°C auf dem Überkoprotierer, wurde nach Zentrifugation

(1min, 13000rpm, 4°C) der Überstand abgenommen und die Protein G-Sepharose zuerst zweimal mit Lysepuffer, dann zweimal mit einem Hochsalzpuffer und abschließend einmal mit einem Tris/NaCl-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde quantitativ von der Protein G-Sepharose entfernt, welche anschließend in 120µl Tris/NaCl Puffer aufgenommen wurde. Davon wurden 40µl abgenommen mit 13,3µl 4×Laemmli-Puffer versetzt und der Überstand im Westernblot auf eine gleichmäßige Immuno- und Koimmunopräzipitation der Proteine hin untersucht. Zu den restlichen 80µl wurden 20µl Tris/NaCl Puffer pipettiert. Aus diesen Ansätzen wurde anschließend wie unter 2.13.1.4 beschrieben Gesamt-RNA isoliert.

## 2.14.4 Reportergenversuche

Mit Hilfe von Reportergenversuchen wurde in dieser Arbeit die siRNA-vermittelte RISC-Aktivität gemessen. Als Reportergene wurden hierbei die Enzyme Luziferase und  $\beta$ -Galaktosidase verwendet, deren Aktivität leicht zu bestimmen ist.

### 2.14.4.1 Luziferase-Messung

Luziferase setzt unter ATP-Verbrauch mit CoA den Farbstoff Luziferin um, wobei es durch Chemilumineszenz zur Aussendung von Licht kommt.

Die Bestimmung der Luziferaseaktivität erfolgte als Doppelwert. 20µl Lysat wurden in einem Messröhrchen vorgelegt und in das Luminometer gestellt. Das Gerät injizierte 100µl Luziferase-Reagenz und startete 5s später die Messung der Chemilumineszenz für 10 sec.

In dieser Arbeit wurde das Luziferase-Reportergenplasmide pGL2-Control eingesetzt, bei dem das Reportergen unter der Kontrolle eines SV40 Promotors steht.

### 2.14.4.2 $\beta$ -Galaktosidase-Messung

Da die Transfektionseffizienz einen Einfluss auf die Messwerte von Reportergenversuchen hat, wurde ein zweites, konstitutiv exprimiertes Reportergen zu Normalisierung kotransfiziert. Dazu wurde das Plasmid pSV- $\beta$ -Gal verwendet, bei dem ein bakterielles  $\beta$ -Galaktosidasegen unter der Kontrolle eines SV40 Promotors exprimiert wird. Die Galaktosidaseaktivität wurde ebenfalls durch Messung der Chemilumineszenz eines umgesetzten Substrates bestimmt.

Zur Inaktivierung der endogenen  $\beta$ -Galaktosidase wurden 20µl Lysat 1h bei 50°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und wieder auf Raumtemperatur erwärmt.

Zur Messung wurden 7,5µl Lysat in ein Luminatorröhrchen vorgelegt und mit 25µl eines  $\beta$ -Galaktosidasepuffer-Substratgemisches (pro 7,5µl Lysat: 25µl Reaktionspuffer + 0,5µl Substratlösung) für 30min bei RT inkubiert. Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte direkt im Anschluss für 10s. Jede Probe wurde als Doppelwert gemessen.

## 2.14.5 Kinase-Versuche

Um die Phosphorylierung von Ago2 und DCP1 $\alpha$  zu untersuchen, wurden *in vitro* Kinase-Versuche durchgeführt.

### 2.14.5.1 Mit Ganzellysaten

Die Lyse der Zellen erfolgte mit dem Speziallysepuffer wie unter 2.14.1.1 beschrieben. Ein Reaktionsansatz enthielt:

30µg Speziallysat ad. 10µl Speziallysepuffer  
(ohne Proteaseinhibitoren)  
2-3µg GST-Fusionsprotein (Kinasesubstrat)  
ad. 10µl ddH<sub>2</sub>O

10µl ATP-Mix, bestehend aus:

15µmol/l ATP
8µCi <sup>32</sup> P-ATP
ad. 10µl ATP-Puffer (150mmol/l Tris pH 7,4, 30mmol/l MgCl <sub>2</sub> )

In den Ansätzen in denen Inhibitoren eingesetzt wurden, erfolgt vor dem Zusammenpipettieren des Reaktionsansatzes eine Vorinkubation des Lysats mit dem entsprechenden Inhibitor für 20min bei RT. Folgende Inhibitoren und finale Konzentrationen wurden eingesetzt:

SP600125: 20µmol/l  
SB203580: 2µmol/l  
SC-514: 50µmol/l  
PD98059: 50µmol/l  
Wortmannin: 100nmol/l

Die Lösung mit dem GST-Fusionsprotein sowie der ATP-Mix enthielten ebenfalls den jeweiligen Inhibitor in der entsprechenden Konzentration, so dass es zu keiner Verdünnung der Inhibitorkonzentration kam.

Nach einer Inkubation von 15min bei RT wurde zu den Ansätzen 30µl GSH-Sepharose gegeben, welche zuvor zweimal mit je 1ml Speziallysepuffer (ohne Proteaseinhibitoren aber mit 1mM DTT) äquilibriert wurde. Es folgte eine Inkubation für 30min bei 30°C unter einer Durchmischung im Thermomixer bei 1200rpm. Die GSH-Sepharose wurde anschließend abzentrifugiert und dreimal mit je 1ml Speziallysepuffer gewaschen. Schließlich wurden die Ansätze in 30µl 1x Laemmli-Puffer für 10min bei 95°C aufgeköcht und die Proteine durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde Coomassie-gefärbt, entfärbt, getrocknet und die Phosphorylierung der Proteine durch Autoradiographie detektiert.

### 2.14.5.2 Mit immunopräzipitierter Kinase

Nach Lyse der Zellen mit Speziallysepuffer wurden pro Ansatz 1-2mg Protein mit dem IP-Puffer auf 500µl aufgefüllt und mit 1µg Antikörper (bei JNK 2-3µl SAK9) gegen die Proteinkinase von Interesse oder gegen ihr *tag* vermischt. Nach einer Inkubation von 2-3h auf dem Überkoprotierer (20rpm) bei 4°C, wurde zu den Ansätzen je 30µl Protein G-Sepharose hinzugegeben. Diese wurde zuvor dreimal mit je 1ml IP-Puffer äquilibriert. Es folgte die

Inkubation für eine weitere Stunde auf dem Überkopfrötierer bei 4°C. Alternativ wurde der Antikörper über Nacht an die Protein G-Sepharose immobilisiert und erst dann mit dem Lysat inkubiert. Anschließend wurde die Protein G-Sepharose abzentrifugiert (1min, 10000g, 4°C), dreimal mit je 1ml IP-Puffer gewaschen und 2/3 davon mit dem Kinasereaktionsgemisch versetzt. 1/3 wurde direkt in 30µl 1x Laemmli-Puffer aufgekocht und im Westernblot auf eine gleichmäßige Immunopräzipitation untersucht.

Das Kinasereaktionsgemisch setzte sich zusammen aus:

10µl IP-Puffer

2-3µg GST-Fusionsprotein (Kinasesubstrat)

ad. 10µl ddH<sub>2</sub>O

10µl ATP-Mix, bestehend aus:

15µmol/l ATP

8µCi <sup>32</sup>P-ATP

ad. 10µl ATP-Puffer (150mmol/l Tris pH 7,4,  
30mmol/l MgCl<sub>2</sub>)

Nach einer Inkubation von 30min bei 20°C unter konstantem Schütteln im Thermomixer (1200rpm), wurden die Ansätze mit 10µl 4x Laemmli-Puffer versetzt, 10min bei 95°C aufgekocht und nach einem Zentrifugationsschritt (1min, 10000g) wurden die im Überstand befindlichen Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde Coomassie-gefärbt, entfärbt, getrocknet und autoradiographiert.

#### **2.14.5.3 Mit überexprimierter immunopräzipitierter Kinase (HA-JNK2 und FLAG-p38) und überexprimiertem immunopräzipitiertem Substrat (GFP-DCP1α)**

Die Lyse der Zellen die entweder mit dem Expressionsplasmid für die Kinase oder mit dem Expressionsplasmid für das Substrat transfiziert waren, erfolgte mit dem Speziallysepuffer. Anschließend wurden die Lysate pro Ansatz mit 30µl Protein G-Sepharose versetzt, an welche über Nacht ein spezifischer Antikörper gegen die Kinase bzw. gegen das Substrat immobilisiert worden ist. Hierbei wurde für die Immunopräzipitation von GFP-DCP1α pro Ansatz 2µg eines GFP-Antikörpers und 4,1-4,5mg Protein eingesetzt. Die Immunopräzipitation von JNK erfolgte mit 3µl des SAK9 Antikörpers und 5,5mg Protein, während für die Immunopräzipitation von p38 je 3µl SAK7-Antikörper und 9mg Protein eingesetzt wurden. Die Immunopräzipitation fand in einem Volumen von 500µl statt, welches durch IP-Puffer aufgefüllt wurde.

Nach einer Inkubation von 2,5h bei 4°C auf dem Überkopfrötierer (20rpm), wurde die Protein G-Sepharose abzentrifugiert und dreimal mit je 1ml IP-Puffer gewaschen. Während des letzten Waschschritts wurde jeweils ein Ansatz, welcher die immunopräzipitierte Kinase mit einem Ansatz, der das immunopräzipitierte Substrat enthielt, vereinigt. Nach Entfernung der Waschlösung (1min, 10000g, 4°C), wurde die Protein G-Sepharose mit dem Kinasereaktionsgemisch versetzt, bestehend aus 20µl IP-Puffer, 20µl Wasser sowie 20 µl ATP-



Mix (135 $\mu$ M ATP in ATP-Puffer). Anschließend erfolgte eine Inkubation von 30min bei 20°C unter konstantem Schütteln im Thermomixer (1200rpm). Nach Zugabe von 15 $\mu$ l 4x Laemmli-Puffer wurden die Proben für 10min bei 95°C aufgeköcht, die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Phosphorylierung von GFP-DCP1 $\alpha$  mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers detektiert.

### 2.14.6 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli

In einem Polyacrylamidgel werden die Proteine in Abhängigkeit von ihrer Gesamtladung und ihrer Größe aufgetrennt. Wird der Größenunterschied verschiedener Proteine durch die Ladung ausgeglichen, so können sich diese mit gleicher Geschwindigkeit auf die Anode zubewegen. Unter Verwendung von SDS (Natriumdodecylsulfat), welches alle nicht kovalenten Bindungen innerhalb eines Proteins zerstört, das Protein dadurch denaturiert und negative Ladungen in die denaturierte Polypeptidkette einführt, stellt die Beweglichkeit der Proteine eine Funktion der Logarithmen ihrer Molekulargewichte dar, so dass die Proteine nur nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Es wurden abhängig von der Größe der aufzutrennenden Proteine 6-10%-ige Trenngelle sowie 5%-ige Sammelgelle verwendet. Die Herstellung der Gelle erfolgte nach dem folgenden Schema, wobei exemplarisch nur die Zusammensetzung für ein 10%-iges Trenngel gezeigt ist. Bei einer anderen Prozentigkeit des Gels wurde die Menge der eingesetzten Acrylamid-Stammlösung entsprechend angepasst.

Das Trenngel und das Sammelgel hatten folgende Zusammensetzung:

	Sammelgel [5 %]	Trenngel [10 %]
ddH <sub>2</sub> O [ml]	5,61	3,32
50 % Glycerol [ml]	0,9	2,16
Sammelgel Puffer pH 6,8 [ml]	1,26	-
Trenngel Puffer pH 8,8 [ml]	-	9,2
30 % AA [ml]	1,68	8
2 % SDS [ml]	0,5	1,2
40 % APS [ml]	0,03	0,072
TEMED [ml]	0,02	0,048
Gesamt [ml]	10	24

Die in der Tabelle angegebenen Mengen wurden zur Herstellung eines großen Gels verwendet. Für ein kleines Gel wurden entsprechend kleinere Volumina der einzelnen Bestandteile in demselben Verhältnis zueinander eingesetzt.

Zunächst wurde das Trenngel gegossen, welches nach dem Auspolymerisieren mit dem Sammelgel überschichtet wurde. Die Proben wurden mit der entsprechenden Menge an 4xLaemmli-Auftragspuffer versetzt, zur Denaturierung der Proteine 10min bei 95°C aufgeköcht,

kurz anzentrifugiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. In der Regel wurden 100 $\mu$ g Protein aufgetragen. Vom jeweiligen Marker wurden 20 $\mu$ l eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke in Abhängigkeit der Größe der verwendeten Gele.

Gele mit 7cm Trennstrecke: 35mA pro Gel

Gele mit 12cm Trennstrecke: 50mA pro Gel

Die Elektrophorese wurde beendet, sobald der in dem 4 $\times$ Laemmli-Auftragspuffer vorhandene Farbstoff Bromphenolblau aus dem Gel herausgelaufen war. Das Gel wurde dann je nach Verwendung entweder direkt mit dem Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue* angefärbt, für einen Westernblot eingesetzt oder getrocknet und für das Durchführen einer Autoradiographie benutzt

#### **2.14.7 Färbung von Polyacrylamidgelen mit *Coomassie Brilliant Blue***

Das Anfärben und Fixieren von Proteinbanden erfolgte mit einer *Coomassie Brilliant Blue* G250-Lösung. *Coomassie Brilliant Blue* G250 ist ein Triphenylmethanfarbstoff der sich an basische Seitenketten von Aminosäuren anlagert und die Proteine dadurch unspezifisch anfärbt. Mit dieser Methode können 100ng bis 1 $\mu$ g Protein nachgewiesen werden

Die Gele wurden für 10min mit der *Coomassie Brilliant Blue* Lösung inkubiert und dann über Nacht mit einer Entfärberlösung (Destain-Lösung) behandelt, um die Hintergrundfärbung zu entfernen und die Proteinbanden sichtbar zu machen. Anschließend wurden die Gele auf einem Geltrockner getrocknet.

#### **2.14.8 Westernblot und Immunodetektion mittels ECL**

Der Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran erfolgte im *semi dry*-Verfahren. Dazu wurde eine auf das Gel zugeschnittene, nach Herstellerangaben voraktivierte PVDF-Membran luftblasenfrei auf das Gel gelegt und von oben und unten in jeweils zwei Lagen Filterpapier (Dicke 1,2mm) eingelegt, welches zuvor in 1x Blot-Puffer mit 20% Methanol getränkt wurde. Beim Aufbau des Blots wurde vor allem darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen bilden, welche den Transfer vom Gel auf die Membran behindern. Es wurde für 2h bei 0,75mA/cm<sup>2</sup> geblottet. Anschließend wurde der Proteintransfer durch Färben der Membran mit *Coomassie Brilliant Blue* überprüft und die Membran zu Dokumentationszwecken am *Bio-Doc-Analyzer* der Firma Biometra fotografiert. Nach Entfärben der Membran mit 100% Methanol wurde diese kurz mit bidestilliertem Wasser abgespült und für 5min in TBST inkubiert. Um unspezifische Proteinbindungsstellen der Membran zu besetzen, wurde diese über Nacht bei 4°C oder für 1h bei RT in 2% oder 5% Magermilch (angesetzt in TBST), geblockt. Die Detektion der gewünschten Proteine erfolgte mit Hilfe zweier Antikörper, wobei der erste Antikörper spezifisch an das nachzuweisende Antigen bindet. Dieser wurde über Nacht bei 4°C in einer Verdünnung von 1:500 bis 1:10000 in 5% Magermilch in TBST oder in 5% BSA in TBST auf die Membran gegeben. Anschließend wurde der Blot zuerst zweimal kurz mit TBST gespült und dann viermal für je 5min in TBST gewaschen, um den

nicht gebundenen primären Antikörper zu entfernen. Dann wurde der Blot für 1-3h bei RT mit dem zweiten Antikörper (1:2000-1:3000 in 2% oder 5 % Magermilch) inkubiert. Der Sekundärantikörper besitzt Spezies- oder Subklassen-Immunglobulinspezifität für den Primärantikörper. Außerdem ist an den zweiten Antikörper eine *horseradish peroxidase* gekoppelt, welche die Umsetzung des ECL-Reagenzes katalysiert, wobei die dabei frei werdende Energie in Form von Licht abgegeben wird.

Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran erneut zweimal kurz und viermal für je 5min in TBST gewaschen, um den ungebundenen zweiten Antikörper zu entfernen. Es folgte eine Behandlung der Membran mit dem ECL-Reagenz nach Herstellerangaben.

### 2.14.9 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

In dieser Arbeit wurden vier verschiedene GST(Glutathion-S-Transferase)*tag*-Proteine, GST-c-Jun1-135, GST-Ago, GST-DCP1 $\alpha$  und GST-DCP1 $\alpha$ S315A, bakteriell exprimiert und anschließend über GSH-Sepharose aufgereinigt.

#### 2.14.9.1 Induktion der Expression

Die Expression der GST-DCP1 $\alpha$ -Proteine erfolgte aus dem Vektor pDEST15 heraus im Bakterienstamm BL21-AI. Die Expression steht hierbei unter der Kontrolle eines T7 Promotors, und erfordert somit die Anwesenheit der T7-RNA-Polymerase. Bei dem verwendeten Bakterienstamm ist das Gen für die T7-RNA-Polymerase stabil ins Chromosom integriert und steht unter der Kontrolle des *araBAD* Promotors. Durch Zugabe von Arabinose wird die T7-RNA-Polymerase-Expression induziert und somit ebenfalls die Expression der DCP1 $\alpha$ -Proteine. c-Jun1-135 und Ago2 sind in pGEX-Vektoren kloniert und ihre Expression erfolgt unter der Kontrolle eines *tac*-Promotors und kann durch Zugabe von IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranose, ein Galaktose-Derivat) induziert werden. GST-c-Jun1-135 wurde im Bakterienstamm BL21(DE3)pLysS exprimiert und GST-Ago2 im Bakterienstamm BL21-RIPL-NT9.

Alle drei Bakterienstämme sind defizient in den beiden Proteasen *lon* und *OmpT*, was zu einer erhöhten Stabilität und damit Ausbeute der exprimierten Proteine führt. GST-Ago2 wurde zudem mit dem Chaperon HSP90 koexprimiert, was eine korrekte Faltung des Proteins begünstigen, somit die Bildung von Einschlusskörpern (*conclusion bodies*) minimieren und dadurch die Ausbeute des Proteins erhöhen soll.

Die Bakterien, welche das gewünschte GST-Fusionsprotein exprimieren, wurden in 100ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C und 180rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden für die Hauptkultur vier Erlenmeyerkolben mit je 500ml LB-Medium und dem jeweiligen Antibiotikum beschickt und mit der Vorkultur so beimpft, dass die optische Dichte der Bakteriensuspension, gemessen bei

600nm, bei ca. 0,03 lag. Diese Hauptkultur wurde so lange bei 37°C und 180rpm inkubiert, bis die OD der Bakteriensuspension einen Wert von 0,6 erreicht hatte. Es folgte die Induktion der Expression durch Zugabe von 1mM IPTG bzw. 0,2% Arabinose. Nach weiterer Inkubation bei 37°C und 180rpm für 3h (bei GST-c-Jun, GST-DCP1 $\alpha$ ) bzw. bei RT über Nacht (GST-Ago2) wurden die Bakterienzellen für 10min bei 5000 $\times$ g pelletiert und der Überstand verworfen. Jedes Pellet wurde dann in 40ml PBS (+ 1mM DTT + 1mM PMSF) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 5000 $\times$ g für 10min wurden die Pellets in 10ml PBS + DTT + PMSF vereinigt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum nächsten Tag bei – 20°C gelagert.

#### **2.14.9.2 Aufreinigung**

Die eingefrorene Bakteriensuspension wurde bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und mit 0,1% NP-40 sowie 1mg/ml Lysozym versetzt. Durch das Einfrieren und anschließende Auftauen der Bakterien lysieren die meisten von ihnen. Zur vollständigen Lyse der Bakterien wurde die Bakteriensuspension allerdings mit der dicken Spitze des Ultraschalgeräts „Branson-Sonifier 250“ sonifiziert (250W, 6x45s, jeweils 45s Pause). Anschließend wurde das Lysat zum Abtrennen von nicht lysierten Zellen und unlöslichen Zellbestandteilen für 30min bei 20000rpm und 4°C zentrifugiert.

Währenddessen wurde die GSH-Sepharose viermal in PBS + DTT +PMSF gewaschen (1min, 16100 $\times$ g, 4°C). Für 2l Bakterienkultur wurde 1ml GSH-Sepharose eingesetzt. Zum Binden des GST-Fusionsproteins an die GSH-Sepharose wurde der nach der Zentrifugation erhaltene Überstand zusammen mit der äquilibrierten GSH-Sepharose in ein 15ml Bluecap überführt und bei 4°C für 30min langsam rotiert.

Zur Elution wurde die GSH-Sepharose bei 4°C und 1800rpm für 10min abzentrifugiert, viermal mit je 1,5 ml PBS + DTT + PMSF gewaschen (1min, 16100 $\times$ g, 4°C), à 500  $\mu$ l aufgeteilt und viermal mit je 600 $\mu$ l Elutionspuffer für 10min bei RT geschüttelt (1200rpm). Die vier erhaltenen Eluate wurden vor der weiteren Aufarbeitung mittels SDS-PAGE auf das Vorhandensein des gewünschten GST-Fusionsproteins überprüft.

Die Eluate wurden dann abhängig von der Menge an GST-Fusionsprotein, welches sie enthielten, vereinigt und um das überschüssige Glutathion zu entfernen über Nacht im Dialyseschlauch, welcher zuvor in entsprechendem Puffer ausgekocht worden ist, bei 4°C dialysiert. Am nächsten Tag wurden die dialysierten Eluate unter Einsatz von Centricons aufkonzentriert. Dazu wurde das Centricon zuerst mit 500 $\mu$ l bidestilliertem Wasser gewaschen (10min, 4900 $\times$ g). Anschließend wurde das jeweilige Eluat auf die Membran des Centricons pipettiert und durch Zentrifugation bei 4900 $\times$ g bis auf ein Volumen von 200-300 $\mu$ l eingengt.

Mit den aufkonzentrierten Eluaten wurden eine Bradford-Bestimmung und anschließend eine SDS-PAGE durchgeführt. Die Proteinlösung wurde zur Langzeitlagerung bei -20 °C mit 50% Glycerol versetzt

### **2.14.10 ELISA für IL-8**

Die Bestimmung der Konzentration des Chemokins IL-8 (CCI-8) erfolgte mittels eines *sandwich* ELISAs der Firma R&D System exakt nach Herstellerangaben (*IL-8 duo set kit*). Als Standard diente eine aus acht Werten bestehende Eichreihe von humanem IL-8 mit Konzentrationen von 9,8-2500pg/ml.

## **2.15 Mikrobiologische Techniken**

### **2.15.1 Arbeiten mit Bakterienkulturen**

Die Bakterien wurden abends in 5ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180rpm inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden am nächsten Morgen 100ml LB-Medium so beimpft, dass die optische Dichte 0,06 betrug. Diese Bakteriensuspension wurde dann so lange bei 37°C und 180rpm inkubiert bis sie eine optische Dichte von 0,6 erreicht hatte. Anschließend wurden die Bakterien bei 3000rpm und 4°C 10min lang abzentrifugiert und das erhaltene Pellet wurde in 1/10 Zellvolumen TSS-Puffer (*transformation and storage solution*) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde sofort auf Eis gegeben und à 200µl aliquotiert. Danach wurden die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### **2.15.2 Herstellung von Dauerkulturen**

Die dauerhafte Aufbewahrung von Bakterien erfolgte bei -80°C in Glycerin.

Zur Herstellung der Glycerindauerkulturen wurde 1ml Bakteriensuspension mit 1ml Glycerin gut gemischt. Die optische Dichte der Bakteriensuspension gemessen bei 600nm lag dabei ungefähr bei 0,8.

## **2.16 Zellkulturtechniken**

### **2.16.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren wurden die mit Medium abgelösten Zellen bei 500×g für 5min bei RT sedimentiert, in 1ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und in ein vorgekühltes Kryoröhrchen überführt.

Die Kryoröhrchen wurden anschließend über Nacht in einem auf 4°C vorgekühlten, mit Isopropanol befüllten Nalgene-*Cryo Freezing Container* in einen -80°C Tiefkühlschrank gestellt und zur längeren Lagerung in einem Dewargefäß mit flüssigem Stickstoff aufbewahrt

Die Zellen wurden zügig im Wasserbad aufgetaut, in 10ml Medium überführt und zur Entfernung des im Einfriermedium vorhandenen DMSO bei 1000×g für 5min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 3ml Medium resuspendiert und in die gewünschte Zellkulturflasche überführt, in der frisches Medium vorgelegt wurde.

### 2.16.2 Kultivieren und Passagieren adhärent wachsender Zellen

Die verwendeten Zelllinien sind adhärent und wurden in 25, 75 oder 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und einer wassergesättigten Atmosphäre in DMEM-Vollmedium (10% (v/v) FKS, 2mmol/l L-Glutamin, 1mmol/l Natriumpyruvat, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin) kultiviert.

Die Passage der Zellen erfolgte alle drei bis vier Tage, sobald die Zellen einen zusammenhängenden Zellrasen bildeten. Bei den HEK293 IL-1R Zellen wurde zu diesem Zweck das Medium dekantiert, neues Medium zugefügt, die Zellen abgeschlagen und resuspendiert. Um die c-Jun Wt MEFs und die JNK1/2<sup>-/-</sup> MEFs abzulösen, wurden diese zweimal mit PBS gewaschen und für 5min mit Trypsin/EDTA inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von frischem Medium gestoppt und die Zellen ebenfalls resuspendiert.

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in eine neue Kulturflasche, in der frisches Medium vorgelegt wurde, überführt.

### 2.16.3 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch in einem Hämocytometer (Neubauer Zählkammer), indem die Zellsuspension 1+1 mit Trypanblau (0,8% (v/v) in PBS) versetzt wurde. Lebende Zellen sind in der Lage Trypanblau aktiv auszuscheiden, während tote oder geschädigte Zellen dies nicht mehr vermögen und blau angefärbt werden. In den vier Großquadranten wurden die lebenden Zellen gezählt und anschließend wurde die Zellzahl mit folgender Formel bestimmt:

(Summe der Zellen aller Großquadrate/4) x 10000 x Verdünnungsfaktor = Zellen/ml

### 2.16.4 Stimulation und Ernten von Zellen

Die Stimulation der Zellen erfolgte mit IL1 $\alpha$  (final 10ng/ml), Anisomycin (final 10µg/ml), Sorbitol (0,5M) oder UV-Licht für die im Ergebnisteil angegebenen Zeiten. IL1 $\alpha$  und Anisomycin wurden direkt in das Vollmedium der Zellen gegeben. Für die Stimulation der Zellen mit Sorbitol wurde das Medium abgenommen und durch sorbitolhaltiges Medium ersetzt. Erfolgte die Stimulation mit UV-Licht dann wurden die Zellen für 1min durch UV-Licht bestrahlt und anschließend für die gewünschten Zeiten weiter bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei der Behandlung der Zellen mit den Kinaseinhibitoren SP600125 (final 20µM) oder SB203850 (final 2µM) wurden die Zellen mit diesen für 30 min vorinkubiert, bevor ein Stimulus erfolgte.

Fand die Stimulation oder Inhibierung in  $\mu$ -Slides VI statt, wurde aus der entsprechenden Kammer 100µl Medium abgenommen, mit der entsprechenden Substanz vermischt und erneut auf die Zellen gegeben.

Zum Ernten der Zellen wurden diese zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in PBS abgeschabt, anschließend für 10min bei 500xg und 4°C abzentrifugiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

## 2.16.5 Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in Zellen. Man unterscheidet zwischen einer transienten Transfektion, bei der das Plasmid in den Zellkern gelangt und für einige Tage das gewünschte Gen exprimiert wird, und einer stabilen Transfektion, bei der das eingeschleuste Expressionsplasmid in die chromosomale DNA integriert wird. Es gibt verschiedene Transfektionsmethoden wie die DEAE-Dextran-Technik, die Elektroporation, die Liposomen-vermittelte Transfektion oder die hier verwendete Kalziumphosphat-Methode.

### 2.16.5.1 Transiente Transfektion mit Kalziumphosphat

Bei Kalziumphosphat-Methode wird die DNA mit einer phosphathaltigen Pufferlösung und Kalziumchlorid gemischt. Es bilden sich feine Kalziumphosphatkristalle aus, die sich auf der Zelloberfläche der Zellen niederschlagen mit denen sie in Kontakt kommen. Über Endocytose gelangen die Kristalle dann in die Zelle.

Die folgenden Angaben gelten für jeweils ein Loch einer 6-Loch Platte. Erfolgte die Transfektion der Zellen in anderen Kulturgefäßen, wurden die einzelnen Volumina der Kulturfläche angepasst. Am Vortag der Transfektion wurden pro Loch  $4 \times 10^5$  Zellen in 2ml Medium ausgesät. Für jedes Loch wurden 225µl 2xHEBS, 250µl H<sub>2</sub>O und die gewünschte Menge DNA gemischt, die Bildung der Präzipitate erfolgte durch vorsichtige Zugabe von 31,5µl einer kalten 2mol/l CaCl<sub>2</sub>-Lösung. Die Suspension wurde auf die Zellen pipettiert und diese dann für mindestens 4h im Brutschrank inkubiert. Zum Entfernen der Präzipitate wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 2ml frischem Medium versehen und für weitere 24-48h kultiviert

### 2.16.5.2 Herstellung eines stabilen Transfektanten Zellpools

In dieser Arbeit wurden HEK293 IL-1R Zellen mit verschiedenen pEGFP-DCP1 $\alpha$ -Konstrukten stabil transfiziert. Unter Verwendung der Kalziumphosphat-Methode wurden hierfür pro 6-Loch 5µg des jeweiligen Plasmids mit 1µg des Puromycin-Plasmids pBSPAC $\Delta$ P kotransfiziert. Nach 48h wurden die Zellen aus drei Löchern vereinigt und in eine 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Es folgte eine Selektion mit Puromycin (1µg/ml), dessen Resistenzgen auf dem pBSPAC $\Delta$ P-Plasmid liegt.

## 2.17 Zellbiologische Techniken

### 2.17.1 Indirekte Immunfluoreszenz mit Kernfärbung

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz können Proteine und damit Strukturen in der Zelle unterm Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Die Zellen werden hierfür zunächst mit einem primären gegen die Zielstruktur gerichteten Antikörper inkubiert. Dieser wird dann durch einen Sekundärantikörper, welcher mit einem Fluorochrom versehen ist und Spezies- oder Subklassen-Immunglobulinspezifität für den Primärantikörper besitzt, erkannt. In dieser Arbeit wurden Cy3- sowie FITC-gekoppelt Sekundärantikörper verwendet. Um die Antikörper

aufzunehmen, muss die Membran der Zellen permeabilisiert werden, daher kann nur mit fixierten, toten Zellen gearbeitet werden.

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die Zellen in  $\mu$ -Slids VI ausgesät. Dazu wurden die zu 80% optisch konfluenten Zellen eines 6-Lochs in 2,5ml Medium aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden dann 30 $\mu$ l in die Kammer eines  $\mu$ -Slides VI überführt. Nach 1h in Kultur, wurden 100 $\mu$ l Medium hinzugefügt. 48h später wurde das Medium entfernt, und die Zellen zweimal mit je 150 $\mu$ l Hanks Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5min mit 100 $\mu$ l 4%-igem Paraformaldehyd fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Zellen zweimal für je 5min mit jeweils 150 $\mu$ l Hanks Puffer gewaschen und dann in 100 $\mu$ l 10%igem Serum geblockt. Das Serum stammte immer aus dem Tier, indem auch der Sekundärantikörper generiert wurde. Die Verdünnung des Serums erfolgte mit Hanks Puffer, welcher 0,1% Saponin enthielt. Dieses diente zur Permeabilisierung der Zellen. Es folgte die Inkubation der Zellen mit 100 $\mu$ l Primärantikörperlösung für 2h bei RT. Der Antikörper wurde hierbei 1:50-1:200 in Hanks/0,1%Saponin Puffer verdünnt. Vor der Inkubation mit 100 $\mu$ l Sekundärantikörperlösung für weitere 2h im Dunkeln, wurden die Zellen dreimal für 10min mit jeweils 150 $\mu$ l Hanks/0,1%Saponin Puffer gewaschen. Die Cy3-gekoppelten Antikörper wurden in einer Konzentration von 1,25 $\mu$ g/ml eingesetzt, während die FITC-gekoppelten Antikörper in einer Konzentration von 1 $\mu$ g verwendet wurden. Die Verdünnung erfolgte wie beim Primärantikörper in Hanks/0,1%Saponin Puffer. Die Zellen wurden anschließend dreimal für 5min mit jeweils 150 $\mu$ l Hanks Puffer gewaschen und dann einer Hoechst-Färbung unterzogen. Hierfür wurden die Zellen für 5min in 100 $\mu$ l einer 1 $\mu$ M Hoechst-Lösung (Verdünnung in Hanks Puffer) inkubiert. Hoechst 33342 (Bisbenzimid) interkaliert dabei zwischen benachbarten Basen der DNA. Die Zellen wurden dann innerhalb von 5min zweimal mit Hanks Puffer gewaschen und fürs Mikroskopieren mit 50 $\mu$ l einer 30%-igen Glycerollösung versetzt.

Die so hergestellten Proben sind für mehrere Wochen bis Monate stabil und können für die mikroskopischen Untersuchungen verwendet werden. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte dem ungeachtet relativ zeitnah zur Herstellung der Proben. Die Fluoreszenzbilder wurden am LeicaDM IRE2 Mikroskop mit der DFC 350 Kamera von Leica aufgenommen. Das Prozessieren der Rohdaten erfolgte mit der FW4000 und Leica Deblur Software.



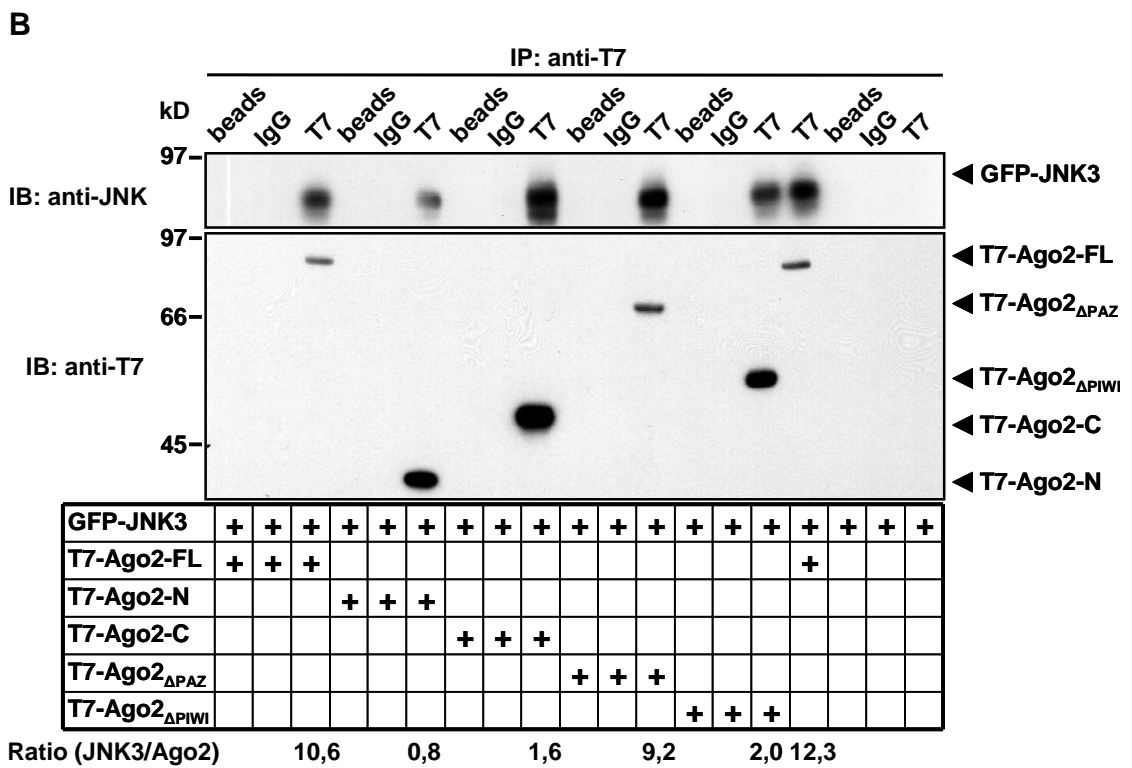
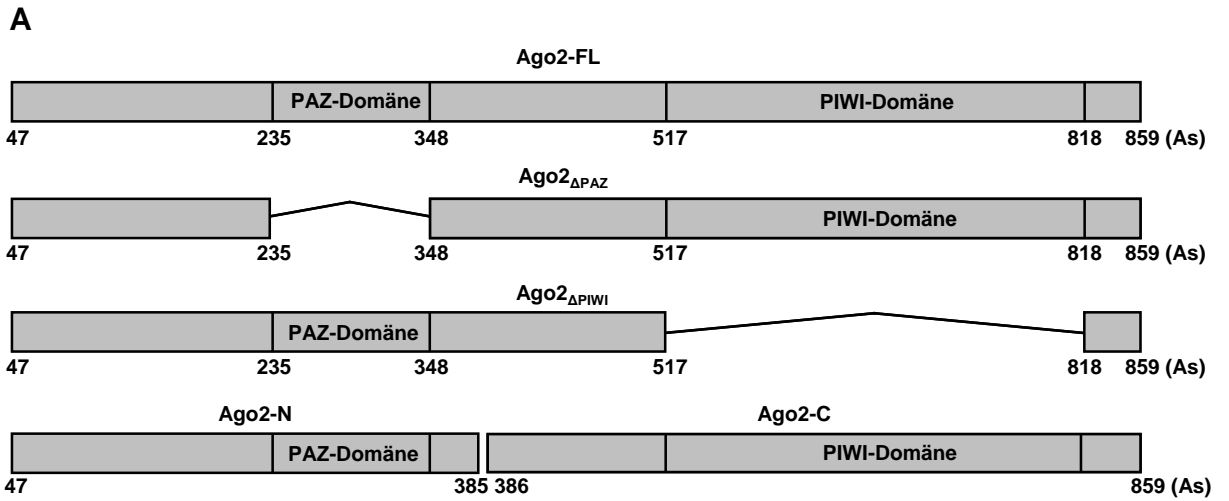
## 3 Ergebnisse

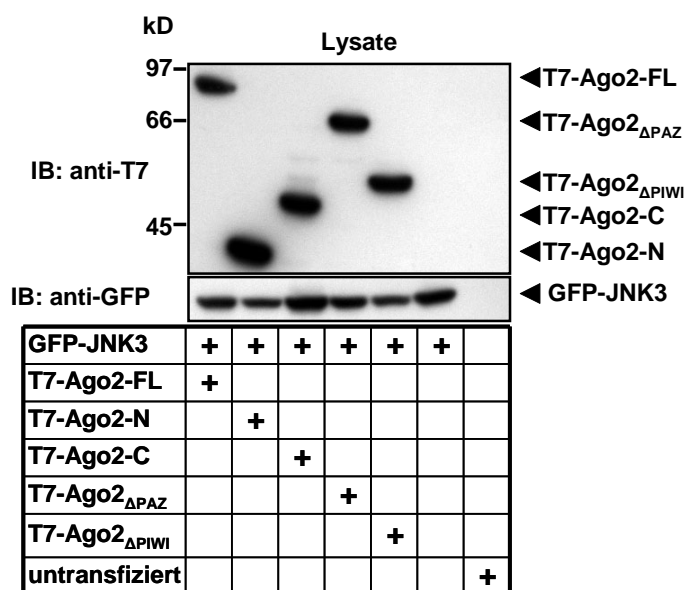
### 3.1 Charakterisierung der Wechselwirkung von JNK mit Ago2

#### 3.1.1 Analyse der Interaktion von JNK und Ago2

Aus Vorarbeiten von Dr. David Holzberg und aus eigenen Ergebnissen, die während der Diplomarbeit erhoben wurden, lagen in der Arbeitsgruppe bereits Daten vor, die zeigten, dass humanes Ago2 über Bereiche in seinem N-Terminus und in seinem C-Terminus mit JNK interagiert. Sowohl ein N-terminales- (As 47-385) als auch ein C-terminales- (As 386-859) T7-getaggttes Fragment von Ago2 wiesen in GST-*pull-down assays* und in der Koimmunopräzipitation eine Bindung an JNK auf. Das N-terminale und das C-terminale Fragment werden im weiteren als Ago2-N und Ago2-C und das *full length* Ago2 als Ago2-FL bezeichnet. Obwohl es nicht gelang endogenes JNK und Ago2 mit jeweils zwei unterschiedlichen Antikörpern koimmunozupräzipitieren, wurde die Entscheidung getroffen detaillierte Struktur-Funktionsuntersuchungen durchzuführen, denn es zeigte sich, dass die Koimmunopräzipitation von Epitop-getaggttem Ago2 und JNK hochspezifisch war, da niemals eine Bindung von JNK an Protein G Sepharose-*beads* oder Mausimmunglobuline nachgewiesen werden konnte. JNK wurde als GFP-Fusionsprotein exprimiert, da dieses Protein aufgrund seiner Größe nicht von der schweren Kette des Primärantikörpers in der Koimmunopräzipitation und nachfolgendem Westernblot überdeckt wurde. Hinsichtlich der Bindung an Ago2 verhielt sich GFP-JNK3 wie JNK2-TAP-*tag*, über welches endogenes Ago2 als Bindungspartner von Dr. David Holzberg ursprünglich identifiziert worden war. Außerdem war aus der Diplomarbeit bekannt, dass auch GST-*tags* keinen störenden Einfluss auf die Bindung an Ago2 in zellfreien Systemen hatten.

Um die Beteiligung des N- und C-Terminus von Ago2 an der Interaktion mit JNK zu bestätigen, wurde eine N-terminale- sowie eine C-terminale Deletionsmutante von T7-Ago2 generiert und die Bindung dieser Proteine an GFP-JNK3 mittels Koimmunopräzipitation untersucht. Hierfür wurden im Kontext des Ago2-FL einmal die PAZ-Domäne (As235-348) und einmal die PIWI-Domäne (As517-818) deletiert. Die daraus resultierenden Proteine werden als Ago2<sub>ΔPAZ</sub> und Ago2<sub>ΔPIWI</sub> bezeichnet. Neben Ago2<sub>ΔPAZ</sub> und Ago2<sub>ΔPIWI</sub> wurden erneut Ago2-N und Ago2-C in der Koimmunopräzipitation eingesetzt.





**Abbildung 6: Analyse der Bindung von T7-Ago2-N, T7-Ago2-C, T7-Ago2<sub>ΔPAZ</sub> und T7-Ago2<sub>ΔPIWI</sub> an GFP-JNK3 mittels Koimmunopräzipitation**

**A:** Schematische Darstellung der für die Koimmunopräzipitation verwendeten Ago2-Fragmente, As=Aminosäuren, PAZ: *Piwi Argonaute Z*wille Domäne, PIWI: *P-element induced wimpy testis* Domäne **B:** Je zwei 175cm<sup>2</sup>-Flaschen mit HEK293 IL-1R-Zellen wurden mit jeweils 45μg pEGFP-JNK3 allein oder zusammen mit je 45μg des jeweiligen pCMVT7-Ago2 Konstrukts transfiziert. Die Menge an Gesamt-DNA wurde durch die Zugabe des Leervektors pCS3MT auf 90μg eingestellt. Nach weiteren 24h in Kultur wurden die Zellen für 30min mit 10ng/ml IL-1α stimuliert und anschließend geerntet und lysiert. Die überexprimierten T7-Ago2-Fragmente wurden aus den Lysaten mit 1μg eines T7-Antikörpers immunopräzipitiert. Um unspezifische Bindung von GFP-JNK3 an den Antikörper oder an die Protein G-Sepharose abschätzen zu können, wurden jeweils auch ein Ansatz ohne Antikörper (*beads*) und ein Ansatz mit einem Maus-Immunglobulingemisch (IgG) durchgeführt. Die Präzipitate wurden anschließend auf die Anwesenheit der immunopräzipitierten T7-Ago2-Fragmente und des koimmunopräzipitierten GFP-JNK3 im Westernblot untersucht. Zur Kontrolle der Expression der Proteine wurden die Lysate der transfizierten Zellen ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Westernblot untersucht.

Sowohl die PAZ- und PIWI-Deletionsmutante als auch das N- und C-terminale Fragment von Ago2 binden an GFP-JNK3 in der Koimmunopräzipitation. Wie anhand der in Abbildung 6B dargestellten JNK3/Ago2-Ratios ersichtlich wird, interagieren sowohl das C-terminale Fragment (T7-Ago2-C), das N-terminale Fragment (T7-Ago2-N) als auch die PIWI-Deletionsmutante (T7-Ago2<sub>ΔPIWI</sub>) deutlich schwächer mit GFP-JNK3 als das *full length* Protein. Die Deletion der PAZ-Domäne hingegen hat nur einen geringen Einfluss auf die Bindung an JNK3.

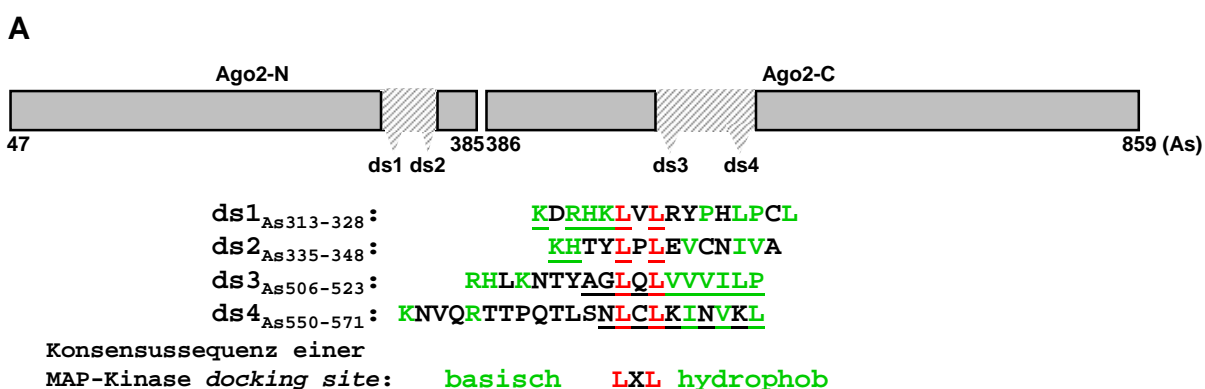
Diese Daten bestätigen, dass Ago2 sowohl über den N-Terminus, überwiegend über Bereiche außerhalb der PAZ-Domäne, als auch über den C-Terminus inklusive der PIWI-Domäne mit JNK interagiert.

Um die Interaktionsdomäne(n) von Ago2 an JNK einzugrenzen, wurden bereits im Zuge der Diplomarbeit sieben überlappende T7-getaggte Proteinfragmente von Ago2 generiert und die Bindung dieser an JNK mittels *GST-pulldown assays* und Koimmunopräzipitation *in vitro* und *in vivo* untersucht. Bis auf ein Fragment, welches die Aminosäuren 386-561 umfasst, zeigten alle

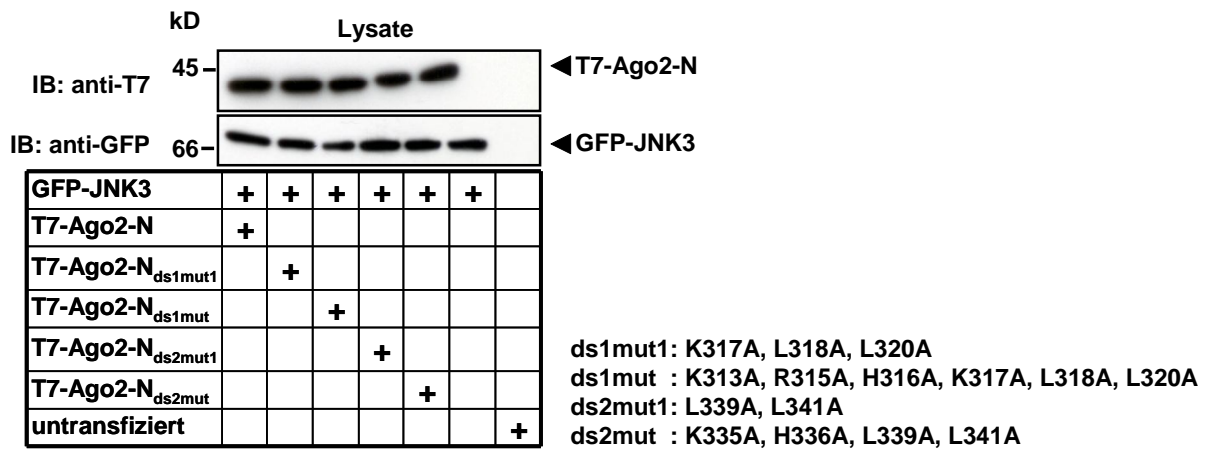
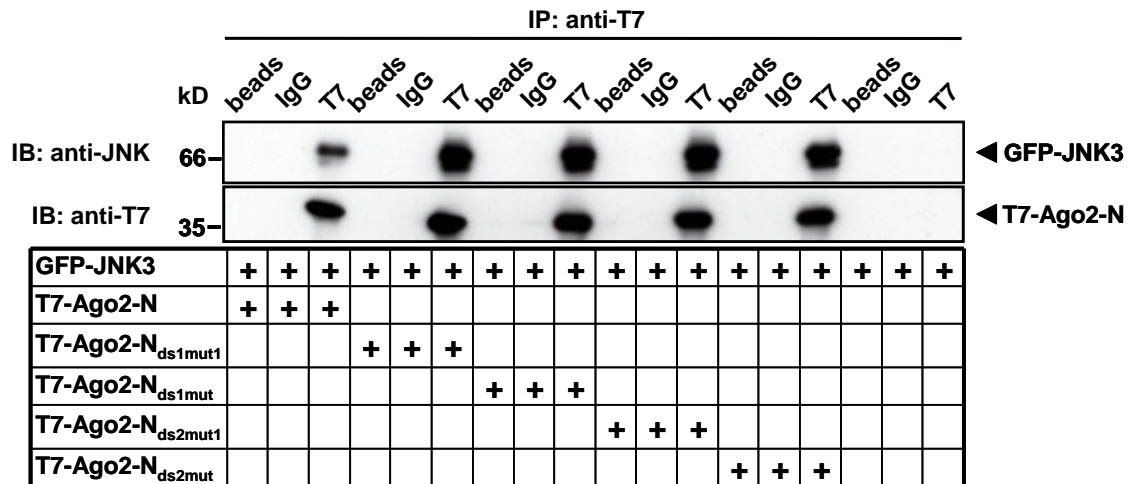
anderen Fragmente eine JNK-Interaktion. Zu den Fragmenten, die eine Bindung aufwiesen, gehörten auch solche, die potentielle MAP-Kinase-Bindestellen, sogenannte *docking sites*, enthielten. Auf die Merkmale von *docking sites* wurde bereits in der Einleitung (Abschnitt 1.1.3) eingegangen.

Wie in Abbildung 7 dargestellt, enthält Ago2 vier potentielle MAP-Kinase *docking sites*. Um den Einfluss der potentiellen MAP-Kinase *docking sites* auf die Ago2-JNK-Interaktion zu untersuchen, wurden diese im Kontext des N-terminalen und C-terminalen Ago2-Fragments mutiert oder deletiert. Anschließend wurde die Bindung der daraus resultierenden T7-Ago2-Mutanten an GFP-JNK3 mittels Koimmunopräzipitation überprüft.

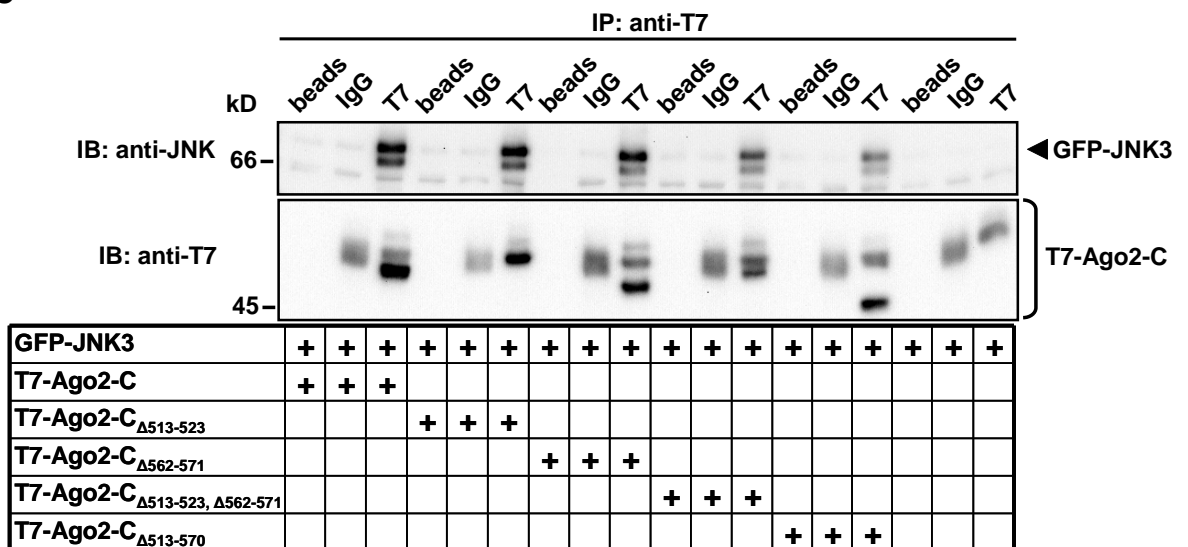
In T7-Ago2-N wurden einmal in der *docking site* 1 und einmal in der *docking site* 2 die Leucine des  $\Phi$ -X- $\Phi$ -Motivs sowie die vorangehenden basischen Aminosäuren zu Alanin mutiert. Die dabei entstandenen Mutanten werden als T7-Ago2-N<sub>ds1mut</sub> und T7-Ago2-N<sub>ds2mut</sub> bezeichnet. Die Mutation jeder dieser beiden *docking sites* erfolgte in zwei Schritten, wodurch zwei weitere Mutanten generiert wurden: T7-Ago2-N<sub>ds1mut1</sub>, in der die beiden Leucine und das Lysin317 zu Alanin mutiert sind und T7-Ago2-N<sub>ds2mut1</sub>, in der die beiden Leucine zu Alanin mutiert sind. Im C-terminalen T7-Ago2-Fragment wurde der Bereich der *docking site* 3 deletiert, welcher die Aminosäuren 513-523 umfasst. Dadurch wurden das  $\Phi$ -X- $\Phi$ -Motiv sowie die nachfolgenden hydrophoben Aminosäuren entfernt. Ebenso wurden die Aminosäuren 562-571 in T7-Ago2-C deletiert und somit das  $\Phi$ -X- $\Phi$ -Motiv und die hydrophoben Aminosäuren der potentiellen *docking site* 4. Es wurden Einfachmutanten, T7-Ago2-C<sub>Δ513-523</sub> und T7-Ago2-C<sub>Δ562-571</sub>, sowie eine Doppelmutante, T7-Ago2-C<sub>Δ513-523,Δ562-571</sub>, hergestellt. Ausgehend vom C-terminalen Fragment wurde zusätzlich eine Deletionsmutante generiert, welcher der Bereich zwischen der *docking site* 3 und 4 einschließlich beider *docking sites* fehlt. Diese wird als T7-Ago2-C<sub>Δ513-570</sub> bezeichnet.

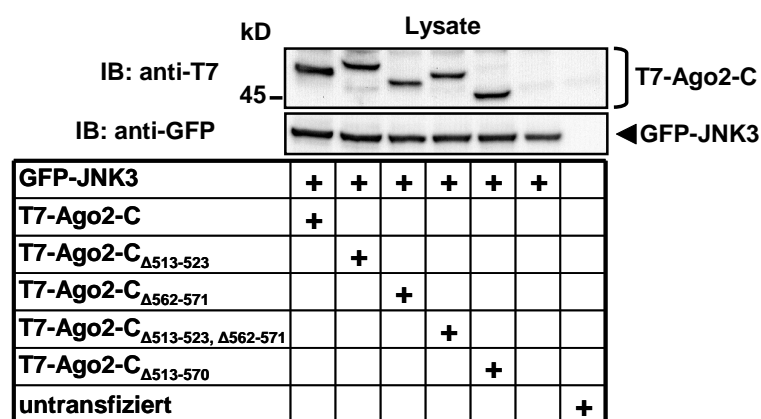


**B**



**C**





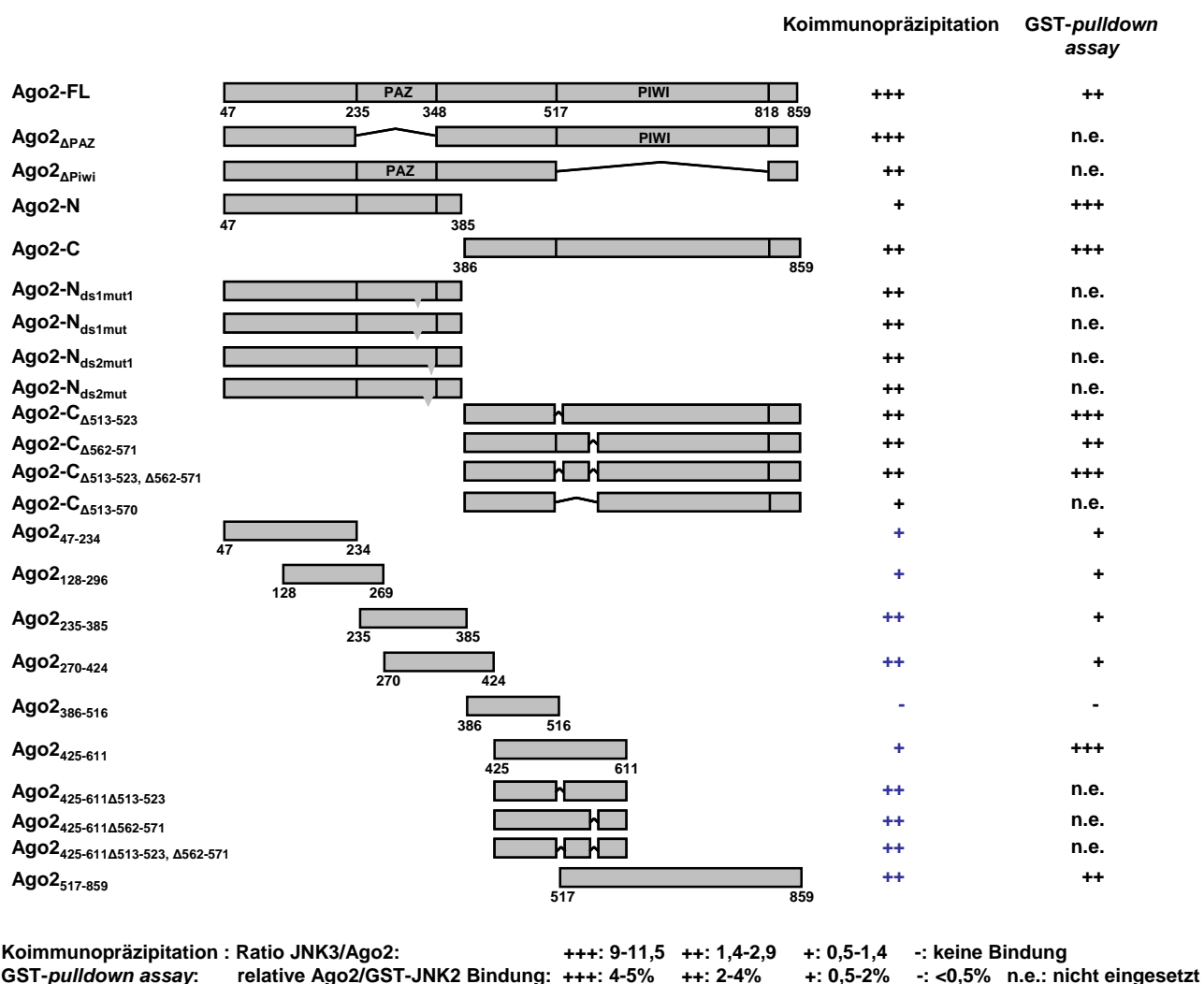
**Abbildung 7: Untersuchung des Einflusses der potentiellen JNK *docking sites* 1-4 in Ago2 auf die JNK/Ago2-Interaktion**

**A:** Schematische Darstellung der potentiellen JNK *docking sites* 1-4 in Ago2-N und Ago2-C. Die basischen und hydrophoben Aminosäuren sind in grün dargestellt, die Leucine des  $\Phi$ -X- $\Phi$ -Motivs in rot. Die Aminosäuren, die mutiert oder deletiert wurden, sind unterstrichen. **B:** Untersuchung der Bindung von T7-Ago2-N<sub>ds1mut1</sub>, T7-Ago2-N<sub>ds1mut1</sub>, T7-Ago2-N<sub>ds2mut1</sub> und T7-Ago2-N<sub>ds2mut1</sub> an GFP-JNK3 mittels Koimmunopräzipitation. Zur Vorgehensweise siehe Beschriftung unter Abbildung 6B. **C:** Untersuchung der Bindung von T7-Ago2-C<sub>Δ513-523</sub>, T7-Ago2-C<sub>Δ562-571</sub>, T7-Ago2-C<sub>Δ513-523, Δ562-571</sub> und T7-Ago2-C<sub>Δ513-570</sub> an GFP-JNK3 mittels Koimmunopräzipitation. Zur Vorgehensweise siehe Beschriftung unter Abbildung 6B.

Berücksichtigt man die unterschiedliche Immunopräzipitation der T7-Ago2-Fragmente, weisen mit Ausnahme von T7-Ago2-C<sub>Δ513-570</sub> alle anderen Mutanten mit Mutationen der potentiellen *docking sites* eine verstärkte Bindung an GFP-JNK3 auf. Die potentiellen JNK *docking sites* 1-4 sind somit nicht an der Interaktion zwischen Ago2 und JNK beteiligt. Die abgeschwächte Bindung der Mutante T7-Ago2-C<sub>Δ513-570</sub> ist nicht mit der Deletion der potentiellen *docking sites* 3 und 4 zu erklären, sondern vielmehr mit der Deletion des Bereichs dazwischen. Die Mutante T7-Ago2-C<sub>Δ513-523, Δ562-571</sub>, in der Teile beider *docking sites* entfernt wurden, zeigt keine verringerte JNK-Bindung.

In Abbildung 8 sind alle Ago2-Mutanten zusammengefasst, welche im Zuge der Diplomarbeit und der Promotion in GST-*pull-down assays* und Koimmunopräzipitationsversuchen eingesetzt wurden, um die Bindung an JNK zu analysieren. Für die Koimmunopräzipitationsversuche wurde, wann immer es möglich war, die Bindungsstärke durch Ratio-Bildung zwischen koimmunopräzipitiertem GFP-JNK3 und der jeweiligen T7-Ago2-Mutante abgeschätzt. Bei den GST-*pull-down assays* wurde die relative Bindung der *in vitro* translatierten Ago2-Mutanten an GST-JNK2 im Verhältnis zur Inputbande (1/10 der Menge der jeweiligen in dem GST-*pull-down assay* eingesetzten *in vitro* translatierten Ago2-Mutante) ermittelt. Die so abgeschätzte Bindung zwischen den Ago2-Mutanten und JNK ist in Abhängigkeit von ihrer Stärke mit ein bis drei Kreuzen dargestellt. Bei den blauen Kreuzen konnten die immunopräzipitierten Ago2-Mutanten aus technischen Gründen nicht detektiert werden und daher wurde hier die Bindungsstärke zwischen den Ago2-Mutanten und JNK über das Verhältnis der unterschiedlich von den Ago2-

Mutanten koimmunopräzipitierten JNK-Mengen ermittelt. Als Referenz diente hierbei die durch Ago2-FL koimmunopräzipitierte JNK-Menge.

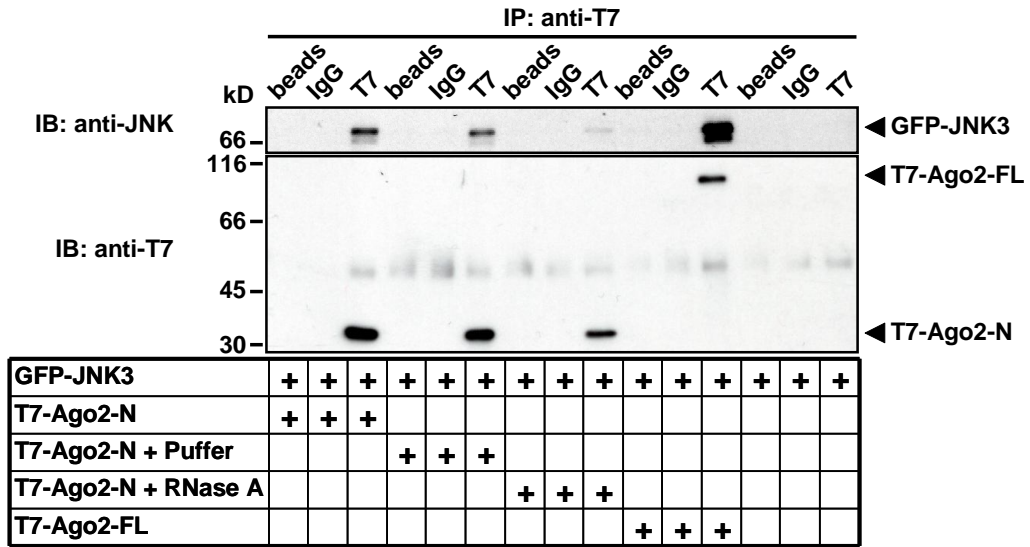


**Abbildung 8: Schematische Darstellung der im Zuge der Diplomarbeit und Promotion für die Bindungsversuche eingesetzten Ago2-Mutanten**

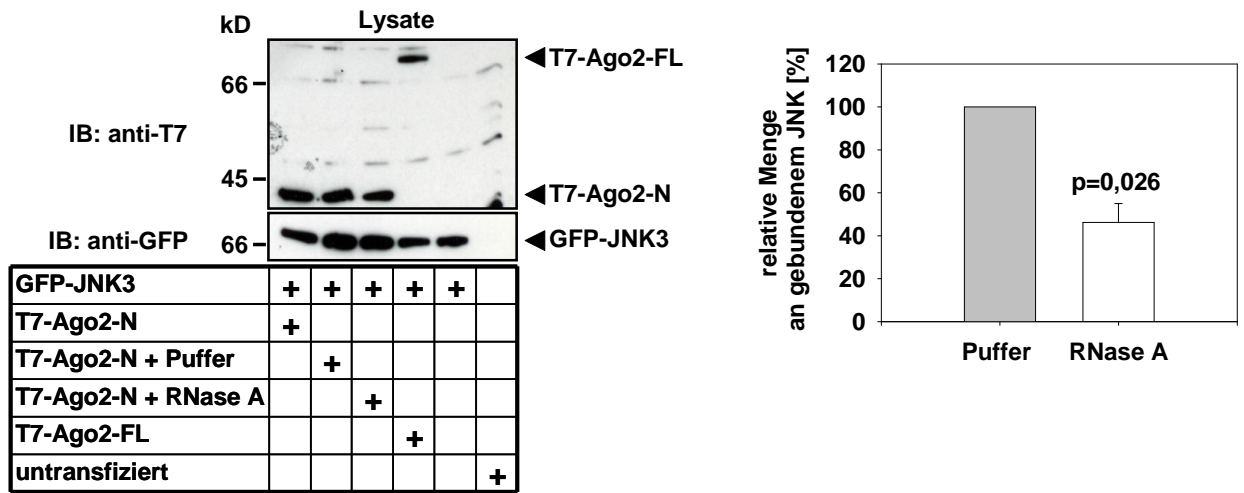
Bis auf ein T7-Ago2-Fragment wiesen alle weiteren Mutanten von Ago2 sowohl in Koimmunopräzipitationsexperimenten als auch in GST-pulldown assays eine JNK-Interaktion auf. Die Vermutung lag somit nahe, dass neben der direkten Protein-Protein-Wechselwirkung noch eine weitere Komponente an der Bindung zwischen Ago2 und JNK beteiligt sein muss.

Da Ago2 ein RNA-bindendes Protein ist, wurde untersucht ob die Ago2/JNK-Interaktion RNA-abhängig ist (Abbildung 9).

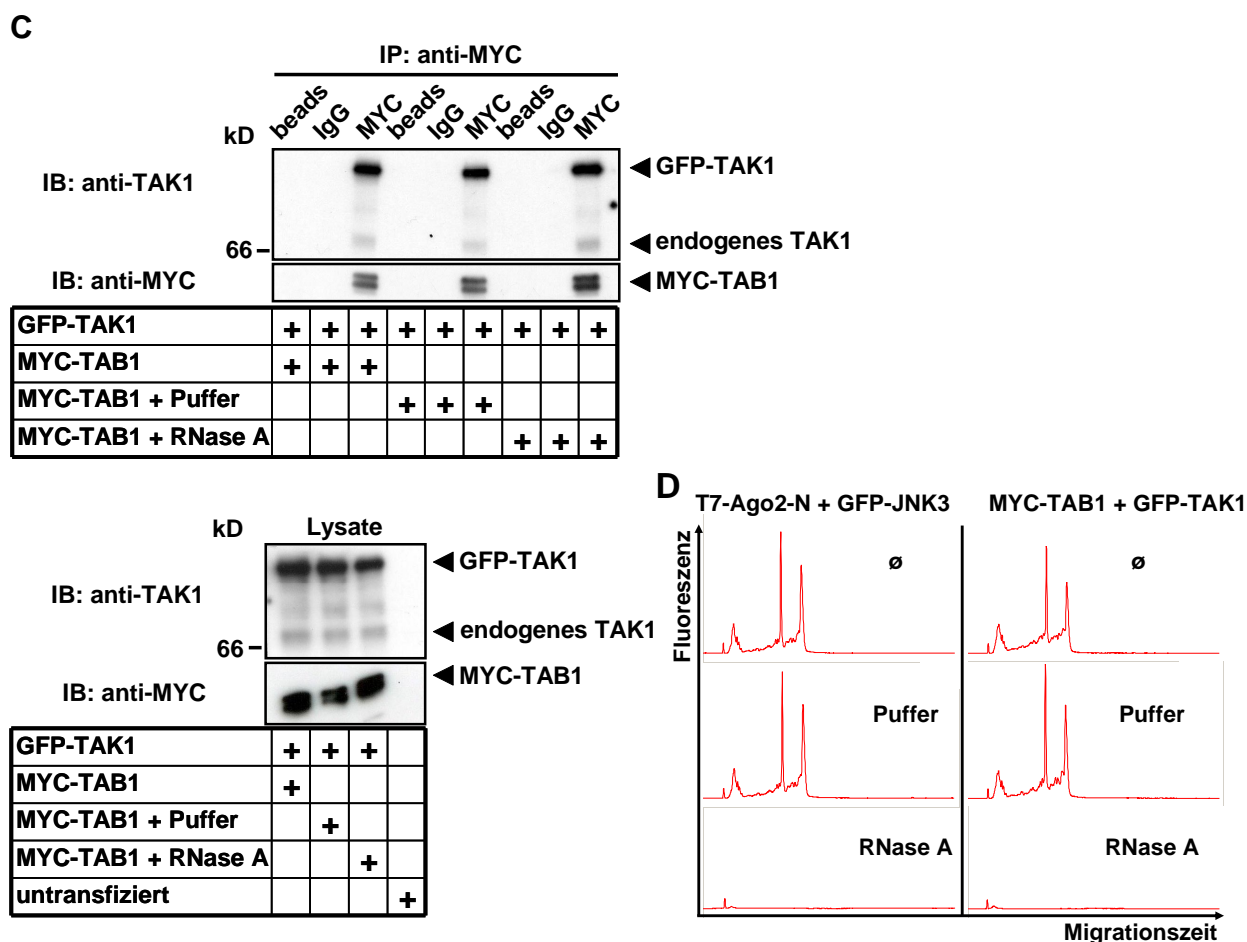
**A**



**B**







**Abbildung 9: Analyse der RNA-Abhängigkeit der Ago2/JNK-Interaktion**

**A:** Je zwei 175cm<sup>2</sup>-Flaschen mit HEK293 IL-1R-Zellen wurden mit jeweils 45µg pEGFP-JNK3 allein oder zusammen mit je 45µg pCMVT7-Ago2-N oder pCMVT7-Ago2-FL transfiziert. Die Gesamt-DNA wurde durch die Zugabe des Leervektors pCS3MT auf 90µg eingestellt. Nach weiteren 24h in Kultur wurden die Zellen für 30min mit 10ng/ml IL-1 $\alpha$  stimuliert und anschließend geerntet und lysiert. Das Lysat der HEK293 IL-1R-Zellen, das mit pCMVT7-Ago2-N und pEGFP-JNK3 kotransfiziert war, wurde auf drei Ansätze aufgeteilt. Ein Ansatz wurde für 30min bei 37°C mit RNase A in einer Konzentration von 0,1 µg/µl (0,5U/µl) inkubiert. Mit dem zweiten Ansatz wurde ebenso verfahren, nur dass anstelle der RNase A ein entsprechendes Volumen eines 50mM Tris-HCL (pH 7,4), 50% Glycerol-Puffers (Puffer, in dem RNase A gelöst ist) eingesetzt wurde. Der letzte Ansatz wurde unbehandelt gelassen. Von jedem Ansatz wurde Lysat mit einem Proteingehalt von 1mg abgenommen, aus dem anschließend Gesamt-RNA isoliert wurde. Die überexprimierten T7-Ago2-Fragmente wurden aus den restlichen Lysaten mit 1µg eines T7-Antikörpers immunopräzipitiert. Die Präzipitate wurden anschließend auf die Anwesenheit der immunopräzipitierten T7-Ago2-Fragmente und des koimmunopräzipitierten GFP-JNK3 im Westernblot untersucht. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurden die Lysate der transfizierten Zellen ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Westernblot überprüft. **B:** Quantifizierung der relativen Koimmunopräzipitationseffizienz aus drei unabhängigen Experimenten, (n=3) ( $\pm$  S.E.M.) **C:** Je zwei 175cm<sup>2</sup>-Flaschen mit HEK293 IL-1R-Zellen wurden mit jeweils 45µg pEGFP-TAK1 und 45µg pCS2MT-MYC-TAB1 transfiziert. Das weitere Vorgehen entsprach bis auf wenige Ausnahmen dem unter A beschriebenen. So wurde das MYC-TAB1 mit 1µg eines MYC-Antikörpers immunopräzipitiert. Die Präzipitate wurden im Westernblot auf die Anwesenheit von MYC-TAB1 und GFP-TAK1 untersucht. **D:** Kapillarelektrophorese der RNAs, die bei beiden Koimmunopräzipitationsexperimenten (A, C) aus dem unbehandelten Zellextrakt ( $\emptyset$ ), dem mit Puffer inkubierten Zellextrakt (Puffer) sowie dem mit RNase A behandelten Zellextrakt (RNase A) isoliert wurden. Die Kapillarelektrophorese erfolgte wie unter 2.13.2.2 beschrieben.

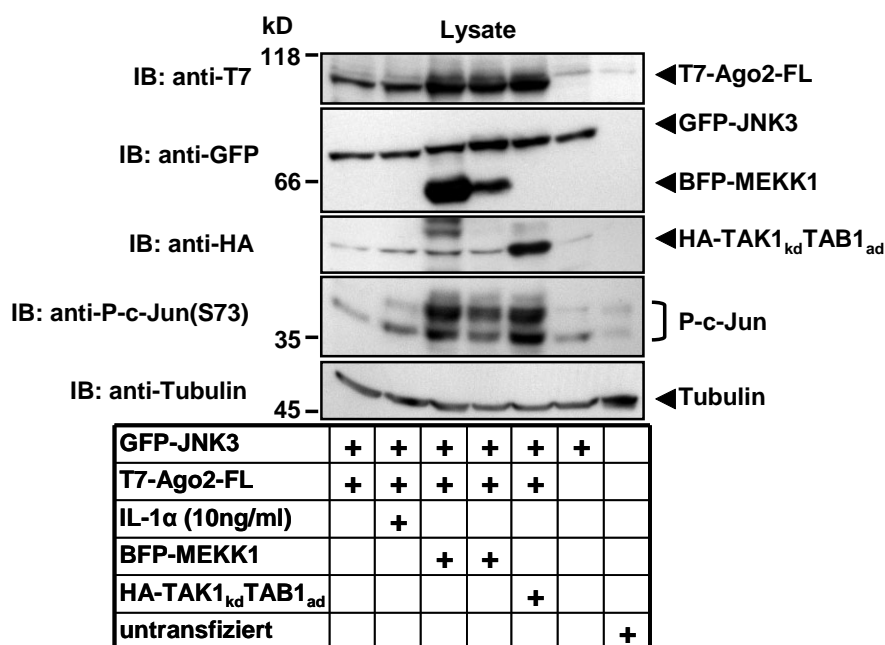
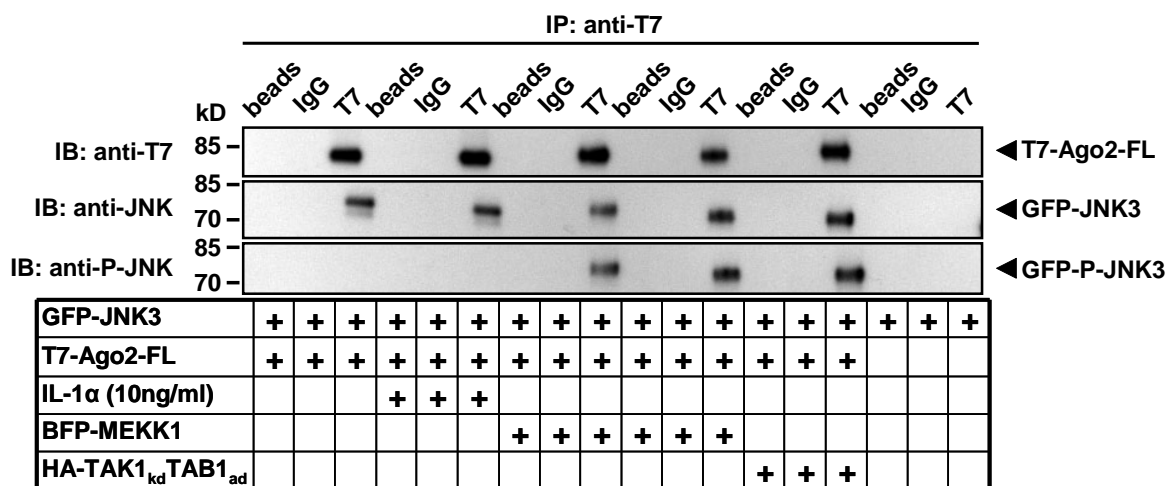
Hierfür wurden Zellslysate von HEK293 IL-1R-Zellen, die mit den Expressionsplasmiden für T7-Ago2-N und GFP-JNK3 kotransfiziert waren, mit RNase A behandelt. Anschließend wurde die Bindung zwischen T7-Ago2-N und GFP-JNK3 mittels Koimmunopräzipitation überprüft.

Für diese Versuche wurde das N-terminale T7-Ago2-Fragment gewählt, da dieses die PAZ-Domäne enthält, welche entscheidend für die RNA-bindenden Eigenschaften von Ago-Proteinen ist. Um die RNA quantitativ im Zellextrakt zu verdauen, wurde RNase A eingesetzt, da diese Endonuklease bei niedrigen Salzkonzentrationen (0-100mM NaCl) unspezifisch ist und Einzelstrang-RNA, Doppelstrang-RNA wie auch RNA in RNA-DNA-Hybriden schneidet. Dementsprechend wurde für die Lyse der Zellen sowie für das Waschen der Immunopräzipitate Puffer mit einer NaCl-Konzentration von 100mM verwendet.

Obgleich schon die alleinige Inkubation des Zellextrakts bei 37°C eine leichte Verminderung der Ago2/JNK-Interaktion zur Folge hatte, kann man unter RNase A Reaktionsbedingungen im Vergleich zum Pufferkontrollansatz eine spezifische 54%-ige Abnahme der Ago2/JNK-Bindung beobachten (Abbildung 9A, B). Die Bindung zwischen Ago2 und JNK ist somit RNA-abhängig. Die Spezifität der RNA-Abhängigkeit der Ago2/JNK-Interaktion wird dadurch demonstriert, dass die Bindung zwischen GPF-TAK1 und MYC-TAB1, einem stabil unter vergleichbaren Bedingungen detektierbaren und *upstream* gelegenen Proteinkomplex aus dem JNK Signalweg, durch die Behandlung des Zellextrakts mit RNase A nicht beeinflusst wird (Abbildung 9C).

Um den RNase A Verdau zu kontrollieren, wurde in beiden Versuchen aus dem unbehandelten, aus dem mit Puffer bei 37°C inkubierten sowie aus dem mit RNase A behandelten Zellextrakt Gesamt-RNA isoliert und die Degradation der RNA mit dem Agilent 2100 Bioanalyser untersucht. Das RNA Profil der unbehandelten und der mit Puffer bei 37°C inkubierten Proben zeigte keinen Unterschied. Die Behandlung der Zellextrakte mit RNase A führt zu einer quantitativen Degradation zellulärer RNAs, ersichtlich am Verschwinden der *peaks* für die 18S und 28S rRNA (Abbildung 9D).

Des Weiteren wurde untersucht ob die Ago2/JNK-Interaktion abhängig von der Aktivierung und somit Phosphorylierung von JNK ist (Abbildung 10). Hierfür wurden erneut Koimmunopräzipitationsexperimente mit Zellextrakten aus HEK293-IL-1R-Zellen, die mit den Expressionsplasmiden für GFP-JNK3 und T7-Ago2-FL transfiziert waren, durchgeführt. Um JNK zu aktivieren, wurden die Zellen entweder mit IL-1 $\alpha$  behandelt oder mit Plasmiden, die für die MAP3-Kinase MEKK1 oder für das Fusionsprotein TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub> kodieren, kotransfiziert. Bei diesem Fusionsprotein ist die katalytische Domäne von TAK1 an die aktivierende Domäne von TAB1 fusioniert. Dieses Fusionsprotein ist wie der Komplex aus TAK1 und TAB1 ein starker JNK-Aktivator und wurde auch in weiteren Experimenten verwendet (Sakurai et al., 2002).



**Abbildung 10: Untersuchung zur Abhängigkeit der Ago2/JNK-Bindung von der JNK-Aktivierung**

Zehn 175cm<sup>2</sup>-Flaschen mit HEK293 IL-1R-Zellen wurden mit jeweils 30µg pCMVT7Ago2-FL und 30µg pEGFP-JNK3 transfiziert. Zwei der zehn 175cm<sup>2</sup>-Flaschen wurden mit entweder jeweils 30µg oder 3µg pQbisMEKK1 oder 30µg pCDNA3HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> kotransfiziert. Die Menge an Gesamt-DNA wurde für jede Flasche durch die Zugabe von pCS3MT auf 90µg eingestellt. Nach weiteren 24h in Kultur wurden zwei der vier Flaschen, die nur mit pCMVT7Ago2-FL und pEGFP-JNK3 kotransfiziert waren, für 30min mit 10ng/ml IL-1α stimuliert. Anschließend wurden alle Zellen geerntet und lysiert. Die Koimmunopräzipitation erfolgte wie unter Abbildung 6A beschrieben.

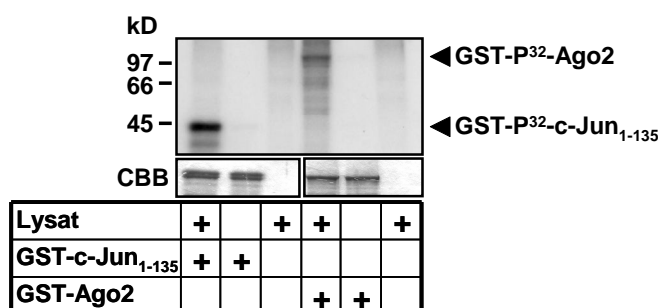
Die mit den Expressionsplasmiden für BFP-MEKK1 oder für HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> kotransfizierten Zellen zeigten eine starke JNK-Aktivierung, erkennbar an der Phosphorylierung von c-Jun im Westernblot. Nach Stimulation mit IL-1α konnte allerdings nur eine schwache c-Jun-Phosphorylierung und kein P-JNK im Immunkomplex beobachtet werden. Wie sich herausstellte, waren die verwendeten HEK293-IL-1R-Zellen zu dem Zeitpunkt abgeschwächt IL-1α-responsiv, so dass nicht geklärt werden konnte, ob unter IL-1α-Behandlung P-JNK mit Ago2

assoziiert ist, oder ob hier ein Unterschied zu MEKK1 und TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Transfektanten vorlag.

Aus dem Koimmunopräzipitationsexperiment ist ersichtlich, dass unter JNK-stimulierenden Bedingungen die Bindung zwischen Ago2 und JNK unverändert ist. Es handelt sich hierbei also um eine konstitutive, von der JNK-Phosphorylierung unabhängige, Interaktion. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Ago2/JNK-Komplex auch phosphoryliertes JNK enthält.

### 3.1.2 Untersuchungen zur Phosphorylierung von Ago2

Es wurde zunächst überprüft, ob Ago2 phosphoryliert werden kann. Hierzu wurde ein *in vitro* Kinase-Versuch mit rekombinantem GST-Ago2 durchgeführt (Abbildung 11). Als Kontrolle wurde rekombinantes GST-c-Jun<sub>1-135</sub> eingesetzt.

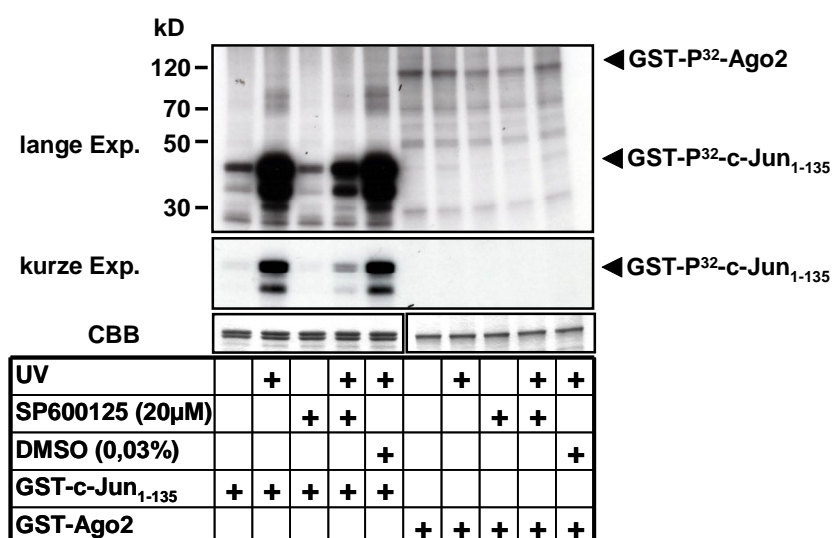


**Abbildung 11: *In vitro*-Phosphorylierung von rekombinantem GST-Ago2**

GST-Ago2 bzw. GST-c-Jun<sub>1-135</sub> wurden unter Kinase-Versuch-Reaktionsbedingungen mit Lysat von HEK293 IL-1R-Zellen und <sup>32</sup>P- $\gamma$ -ATP inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mit GSH-Sepharose aus dem Reaktionsansatz isoliert, mit Laemmli-Auftragspuffer eluiert und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde Coomassie-gefärbt, entfärbt, getrocknet und autoradiographiert. Es wurde auch jeweils ein Ansatz ohne Lysat und ein Ansatz ohne entsprechendes Substrat durchgeführt. CBB: Coomassie Brilliant Blue.

Rekombinantes GST-Ago2 wird spezifisch durch Kinasen im Lysat *in vitro* phosphoryliert, da nur in dem Ansatz, welcher Lysat und GST-Ago2 enthält, eine Phosphorylierung detektierbar ist.

Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung durch einen JNK-aktivierenden Stimulus induzierbar ist, wurde der Versuch mit Lysaten unstimulierter und mit Lysaten UV-stimulierter HEK293 IL-1R-Zellen wiederholt. Zusätzlich wurde überprüft, ob der niedermolekulare JNK-Inhibitor SP600125 die Phosphorylierung von GST-Ago2 hemmt (Abbildung 12).

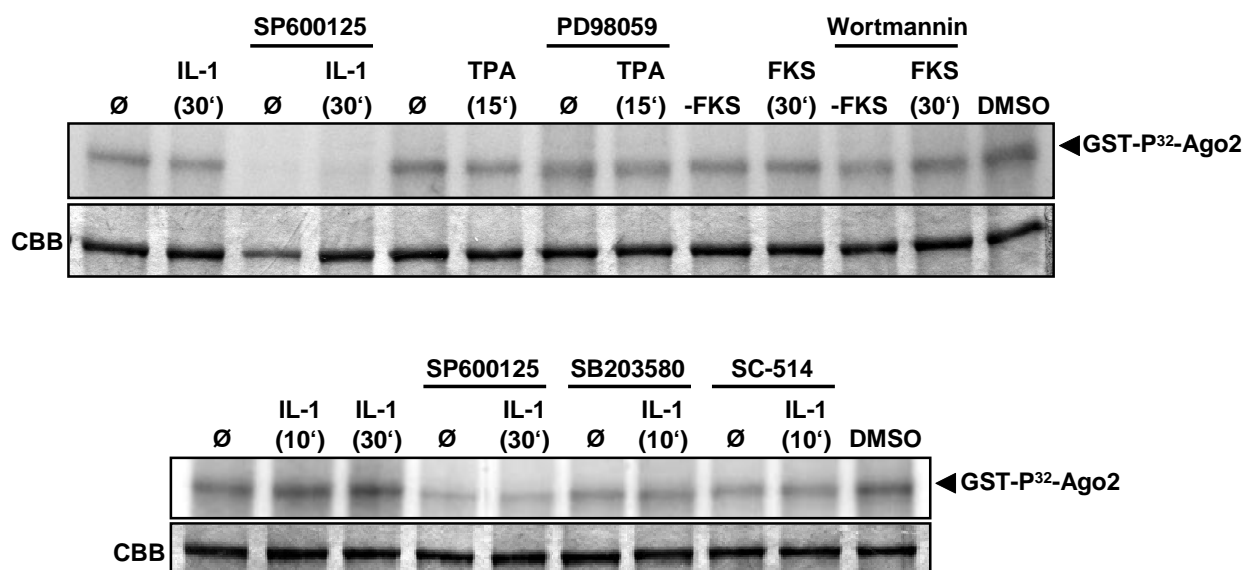


**Abbildung 12: Die Phosphorylierung von GST-Ago2 wird durch den JNK-Inhibitor SP600125 gehemmt**

Es wurde verfahren wie unter Abbildung 11 beschrieben. Neben dem Lysat aus unbehandelten HEK293 IL-1R-Zellen wurde auch Zellextrakt aus HEK293 IL-1R-Zellen, die für eine Minute mit UV-Licht behandelt wurden, gefolgt von einer 30min Inkubation im Brutschrank, eingesetzt. In den Ansätzen, in denen der SP600125 Inhibitor eingesetzt wurde, erfolgte vor der Durchführung des Kinase-Versuchs eine Inkubation der entsprechenden Lysate mit dem Inhibitor für 20min bei RT. Exp.: Exposition.

Anders als bei dem etablierten JNK-Substrat GST-c-Jun<sub>1-135</sub> ist die Phosphorylierung von GST-Ago2 nicht UV-Licht-induzierbar. Ebenso wie die basale und UV-Licht-induzierte Phosphorylierung von GST-c-Jun<sub>1-135</sub> kann sie allerdings durch den JNK-Inhibitor SP600125 partiell gehemmt werden, was eine Beteiligung des JNK-Signalweges an der Phosphorylierung von GST-Ago2 nicht ausschließt.

Als nächstes wurde mit Hilfe weiterer Inhibitoren untersucht, inwieweit andere Kinase-Signalwege an der Phosphorylierung von GST-Ago2 beteiligt sind (Abbildung 13). Neben der erneuten Verwendung des Inhibitors SP600125, wurden die Inhibitoren PD98059 und SB203580 eingesetzt. PD98059 hemmt die MAP2-Kinasen MEK1, 2 und 5 und somit die ERK1/2/5-Signalwege, während SB203580 p38 inhibiert. Zusätzlich wurde der PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase)-Inhibitor Wortmannin und der IKK $\beta$ -Inhibitor SC-514 eingesetzt. Die für diesen Versuch verwendeten HEK293 IL-1R Zellen wurden entweder unstimuliert gelassen oder mit IL-1, TPA oder FCS stimuliert. Durch die gewählten Stimuli und Stimulationsdauern wurde sichergestellt, dass die Aktivierung der zu untersuchenden Kinase am stärksten war.



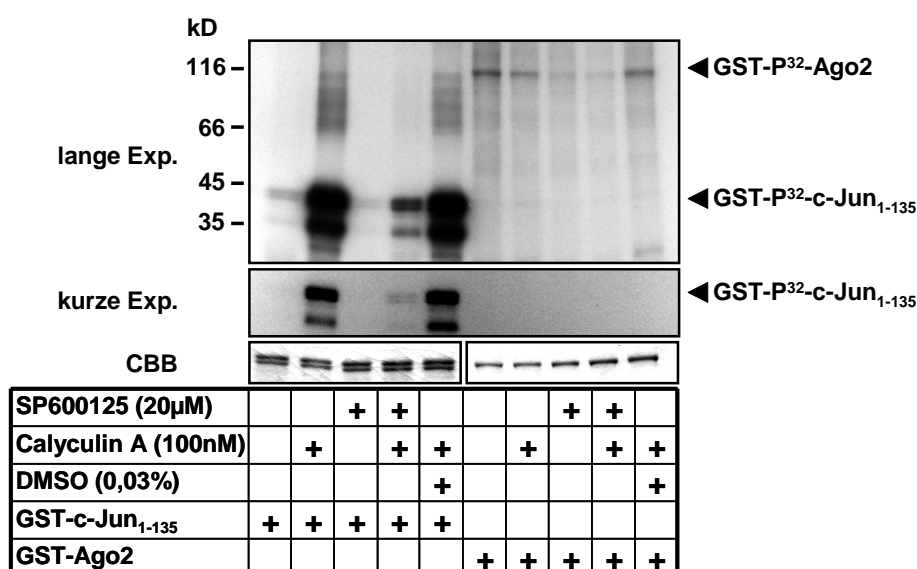
**Abbildung 13: Phosphorylierung von GST-Ago2 in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli und unter Einfluss unterschiedlicher Kinaseinhibitoren**

Die Durchführung erfolgte analog zu der unter Abbildung 11 beschriebenen. Für den Kinase-Versuch wurden Zellextrakte aus unbehandelten, aus mit 10ng/ml IL-1 $\alpha$  behandelten oder aus mit 100ng/ml TPA behandelten HEK293 IL-1R-Zellen verwendet. Die Inkubation der Zellen mit IL-1 $\alpha$  erfolgte für 10 bzw. 30min, die Inkubation der Zellen mit TPA für 15min. Zusätzlich wurden für diesen Versuch HEK293 IL-1R-Zellen verwendet, die für 24h ohne FKS kultiviert wurden. Diese wurden direkt geerntet oder zuerst für 30min mit 10%FKS stimuliert. In den Ansätzen in denen ein Inhibitor eingesetzt wurde, erfolgte vor der Durchführung des Kinase-Versuchs eine Inkubation der entsprechenden Lysate mit dem jeweiligen Inhibitor für 20min bei RT. Folgende Inhibitorkonzentrationen wurden eingesetzt: SP600125: 20 $\mu$ M, SB203580: 2 $\mu$ M, SC-514: 50 $\mu$ M, PD98059: 50 $\mu$ M, Wortmannin: 100nM.

Die Phosphorylierung von GST-Ago2 wird erneut durch den JNK-Inhibitor SP600125 deutlich gehemmt. Ebenso kann mit SB203580 sowie mit SC-514 ein Hemmeffekt auf die GST-Ago2-Phosphorylierung beobachtet werden. Der durch den p38- und IKK $\beta$ -Inhibitor hervorgerufene Hemmeffekt ist schwächer, als der durch den JNK-Inhibitor verursachte, wobei die SC-514-abhängige Inhibierung etwas stärker ist, als die SB203580-abhängige. Es ist anzumerken, dass die Hemmung der GST-Ago2-Phosphorylierung durch den p38-Inhibitor in Wiederholungsexperimenten noch schwächer ausfiel als im unter Abbildung 13 dargestellten Versuch. In einigen Fällen war sogar kein Hemmeffekt zu erkennen. Der Einsatz von PD98059 sowie Wortmannin hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von GST-Ago2, ebenso wird die Phosphorylierung durch die verwendeten Stimuli nicht induziert.

Nach diesen Experimenten konnte die Beteiligung des JNK-, des p38- sowie des NF $\kappa$ B-Signalweges an der *in vitro* Phosphorylierung von GST-Ago2 nicht ausgeschlossen werden. Desweiteren konnte kein Stimulus gefunden werden, der die Phosphorylierung induziert.

Es wurde daher in einem weiteren Kinase-Versuch untersucht, ob die Phosphorylierung von GST-Ago2 durch die Behandlung der Zellen mit dem Phosphatase-Inhibitor Calyculin A verstärkt wird. Calyculin A inhibiert die Aktivität der Proteinphosphatasen PP1 und PP2A.

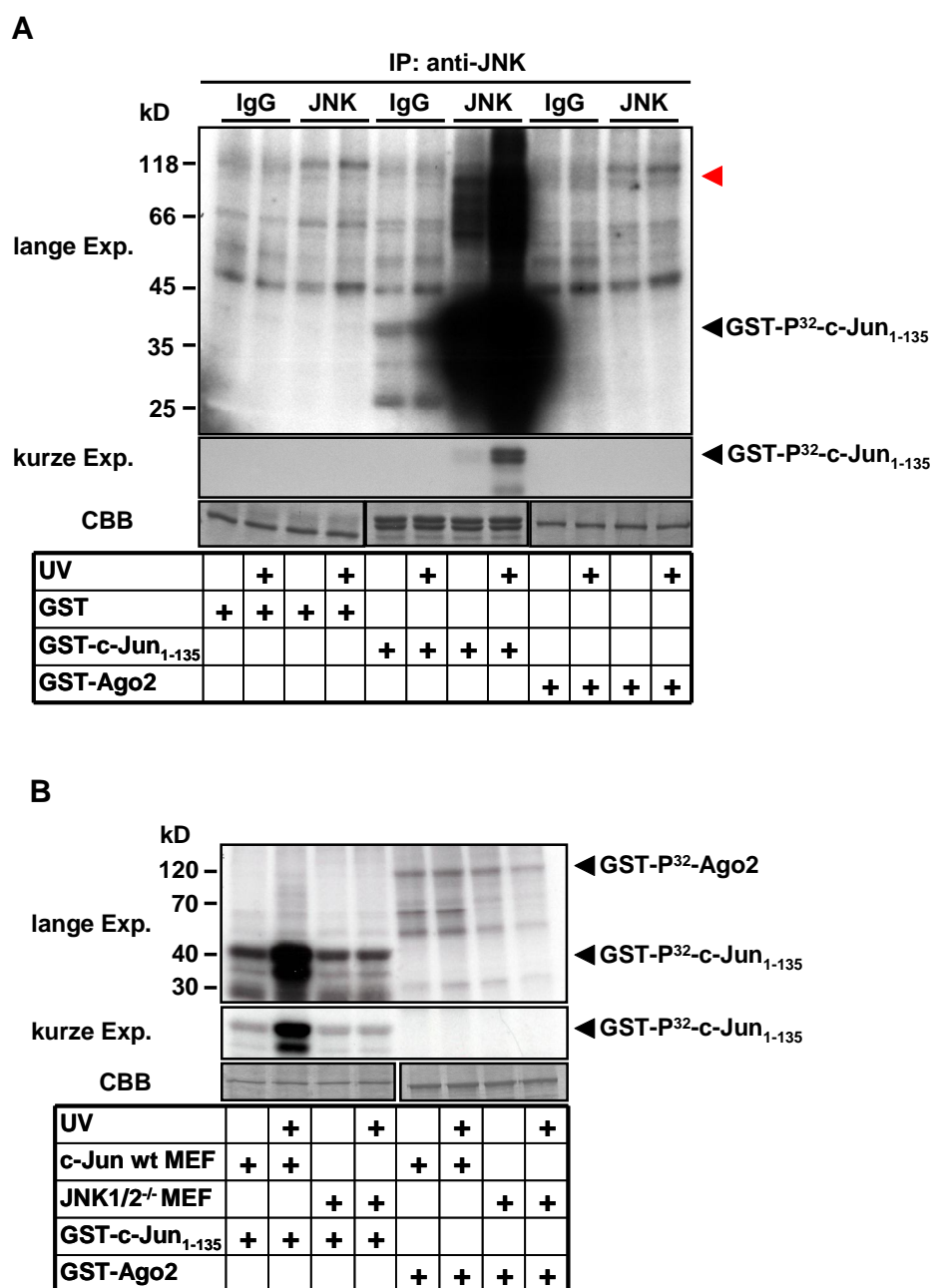


**Abbildung 14: Die Phosphorylierung von GST-Ago2 wird nicht durch Calyculin A induziert**

Die Durchführung entspricht der unter Abbildung 11 beschriebenen. Es wurden Lysate von unbehandelten oder von für 30min mit 100nM Calyculin A behandelten HEK293 IL-1R-Zellen verwendet.

Wie man Abbildung 14 entnehmen kann, wird die Phosphorylierung von GST-Ago2 durch die Vorbehandlung der Zellen mit Calyculin A nicht verstärkt. Unter diesen Bedingungen wird allerdings endogenes JNK aktiviert, erkennbar an der induzierten Phosphorylierung von GST-c-Jun<sub>1-135</sub> sowie an der Hemmung durch SP600125.

Um die Frage zu beantworten, ob Ago2 ein JNK-Substrat ist, wurde ein Kinase-Versuch mit GST-Ago2 und immunopräzipitiertem JNK aus unstimulierten sowie aus mit UV-Licht stimulierten HEK293 IL-1R-Zellen durchgeführt. Auf dem Autoradiogramm in Abbildung 15A lassen sich in den Ansätzen mit GST-Ago2, in denen JNK immunopräzipitiert wurde, zwei schwache Phosphobanden erkennen (markiert durch roten Pfeil), die man alleine aufgrund der Laufgeschwindigkeit im Gel phosphoryliertem GST-Ago2 zuordnen kann. Allerdings handelt es sich hierbei nicht um phosphoryliertes GST-Ago2, sondern vielmehr um unspezifische Phosphobanden, da diese ebenfalls in den entsprechenden Ansätzen zu finden sind, in denen GST als Substrat eingesetzt wurde. GST-Ago2 wird somit nicht direkt durch JNK phosphoryliert. Dieses Ergebnis wird durch einen weiteren Kinase-Versuch mit Ganzzelllysaten aus c-Jun Wildtyp murinen embryonalen Fibroblasten (c-Jun Wt MEFs) und aus JNK1/2 defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (JNK1/2<sup>-/-</sup>MEFs) unterstützt (Abbildung 15B). Die Phosphorylierung von GST-Ago2 ist unabhängig davon, ob als Kinasequelle das Lysat der c-Jun Wt MEFs oder das Lysat der JNK1/2<sup>-/-</sup> MEFs eingesetzt wird. Die UV-Licht-induzierte Phosphorylierung von GST-c-Jun<sub>1-135</sub> hingegen ist durch das Fehlen von JNK1 und JNK2 bis auf das Niveau der basalen Phosphorylierung verringert. Die basale Phosphorylierung ist allerdings unverändert.



**Abbildung 15: GST-Ago2 ist kein JNK-Substrat**

**A:** Je eine 175cm<sup>2</sup> Flasche mit HEK293 IL-1R-Zellen wurde entweder unstimuliert gelassen oder für 1min mit UV-Licht stimuliert und für weitere 30min im Brutschrank inkubiert. Nach Ernte und Lyse der Zellen wurde JNK mit einem JNK-Antikörper immunopräzipitiert und unter Kinase-Versuch-Reaktionsbedingungen mit <sup>32</sup>P- $\gamma$ -ATP und GST, GST-c-Jun<sub>1-135</sub> oder GST-Ago2 inkubiert. Es wurde jeweils auch ein Kontrollansatz mit Kaninchenimmunglobulinen durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurde deren Phosphorylierungsstatus mittels Autoradiographie des Coomassie-gefärbten, getrockneten Gels detektiert. **B:** Die Durchführung erfolgte analog zu der unter Abbildung 11 beschriebenen. Es wurden Lysate aus unbehandelten oder aus mit UV-Licht stimulierten c-Jun Wt MEFs bzw. JNK1/2<sup>-/-</sup> MEFs eingesetzt.



### 3.1.3 Untersuchungen zur Funktion der Ago2/JNK-Interaktion

#### 3.1.3.1 Analyse der Bindung ausgewählter miRNAs an Ago2 in Abhängigkeit von JNK und seiner Aktivierung

Durch *screening*-Experimente, die in der Arbeitsgruppe von Dr. Sabine Wolter durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu c-Jun Wt MEFs in JNK1/2<sup>-/-</sup> MEFs von 111 miRNAs, die mit einem auf genspezifischen Primern basierten RT-PCR-System von ABI mittels Real Time PCR untersucht und quantifiziert wurden, 12 miRNAs herauf- oder herunterreguliert waren. Bei den 12 miRNAs handelt es sich um mir-23b, mir-135a, mir-141, mir-146, mir-186, mir-99a, mir-200a, mir-205, mir-210, mir-214, mir-223 und mir-335. Die Deletion beider JNK-Gene hat allerdings in diesen MEFs massive Änderungen des gesamten Transkriptomts zur Folge (M. Kracht, O. Dittrich-Breiholz, unveröffentlichte *Microarray*-Experimente), so dass dieses Zellsystem für eine weitere Analyse direkter Effekte von JNK auf Ago2 ungeeignet erschien.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde die Bindung einiger dieser miRNAs an Ago2 in Abhängigkeit von der Überexpression und Aktivierung von JNK in HEK293 IL-1R-Zellen untersucht. Hierfür wurden erneut Koimmunopräzipitationsexperimente, wie sie unter 3.1.1 beschrieben sind, durchgeführt. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit dem Expressionsplasmid für T7-Ago2-FL allein oder zusammen mit dem Expressionsplasmid für GFP-JNK3 und/oder für BFP-MEKK1. Die Kotransfektion der MAP3-Kinase MEKK1 sollte eine starke JNK-Aktivierung bewirken, welche im Westernblot unter Abbildung 16B an der Phosphorylierung von c-Jun erkennbar ist. Nach der Immunopräzipitation von T7-Ago2-FL wurde ein Teil des jeweiligen Immunopräzipitats sowie ein Teil des Überstands im Westernblot untersucht. Aus den restlichen Immunokomplexen sowie aus den für die Immunopräzipitation verwendeten Lysaten (Input-Kontrollen) wurde Gesamt-RNA, die auch kleine RNA-Spezies wie miRNAs enthält, isoliert. Die relative Menge der miRNAs 23b, 135a, 141, 146a, 186, 210, 214 und 335 wurde anschließend in der quantitativen Real Time PCR unter Verwendung spezifischer auf TaqMan Sonden basierenden *MicroRNA-Assays* bestimmt. Aufgrund genspezifischer, einen *hairpin*-enthaltender Primer in der RT-Reaktion, werden mit diesen *MicroRNA-Assays* ausschließlich bereits prozessierte, reife miRNAs gemessen.

In den jeweiligen Ansätzen ist sowohl die Immunopräzipitation von T7-Ago2-FL als auch die Koimmunopräzipitation von GFP-JNK3 vergleichbar (Abbildung 16B), was eine wichtige Information insofern darstellt, als dass die unter Abbildung 16A gezeigten Effekte klein sind. Wie man anhand des T7-Ago2-FL-Signals in den Überständen erkennen kann, handelt es sich um eine verhältnismäßig quantitative Immunopräzipitation. Interessant ist auch, dass nur ein Bruchteil des im Lysat vorhandenen GFP-JNK3 an das immunopräzipitierte Ago2 bindet, was für die Annahme spricht, dass JNK lediglich mit einem kleinen Teil des gesamten Ago2 assoziiert ist.

Die Balkengraphen in Abbildung 16A zeigen die relativen Mengen der untersuchten miRNAs in den unterschiedlichen Ago2-Komplexen und in den entsprechenden Lysaten, berechnet nach der

$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Hierbei wurde für die Berechnung der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte, der Ct-Wert des Input-Ansatzes, der nur T7-Ago2 enthielt, herangezogen. Die so ermittelten  $\Delta\text{Ct}$ -Werte für die jeweilige miRNA in den jeweiligen Proben wurden auf die entsprechenden Input-Ansätze bezogen.

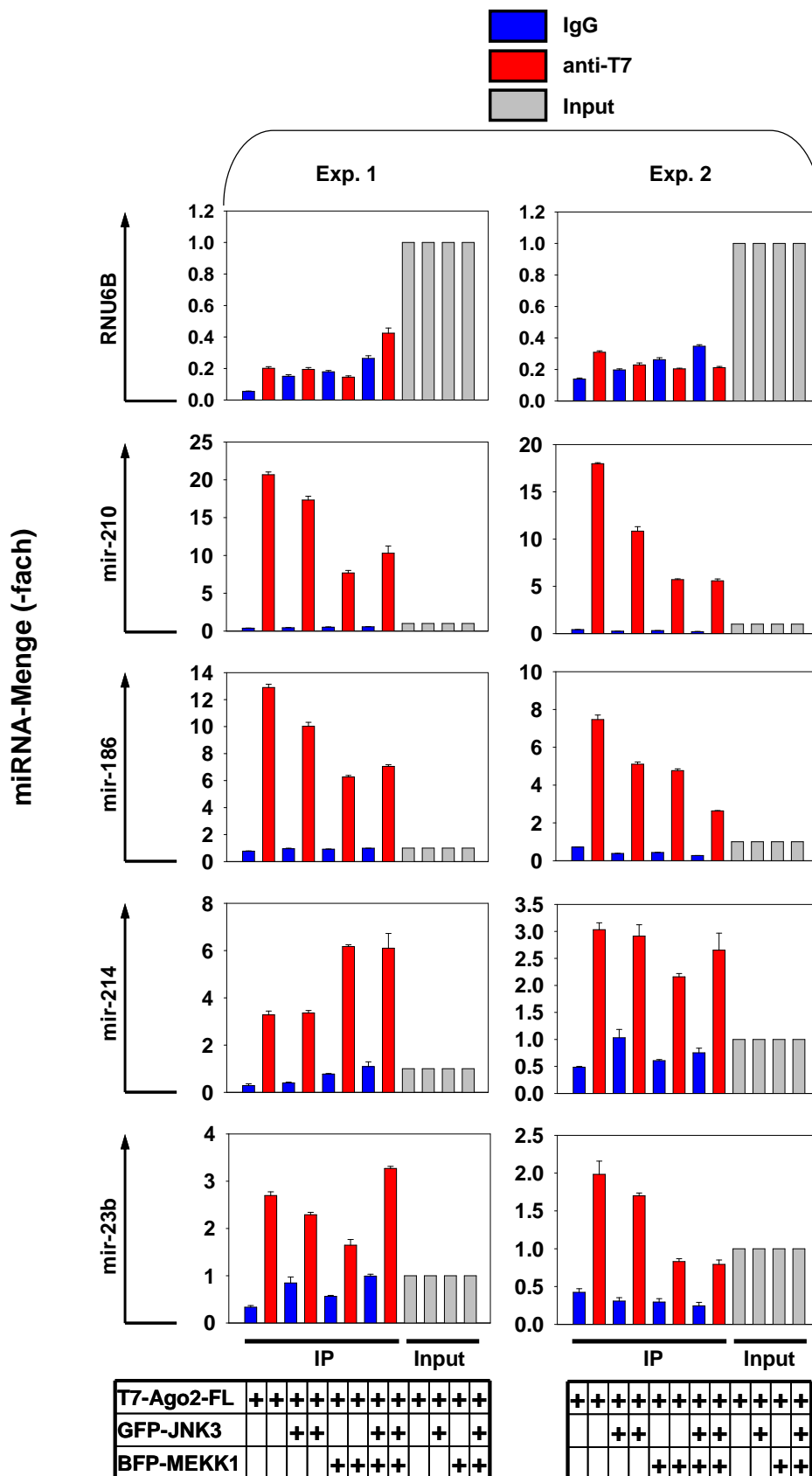
Die miRNAs mir-135a, mir-141 und mir-335 konnten weder in den Komplexen noch in den Lysaten nachgewiesen werden, was dadurch zu erklären ist, dass sie in HEK293 IL-1R-Zellen überhaupt nicht oder nur schwach exprimiert werden. Die Expression dieser miRNAs war bereits in den JNK1/2<sup>-/-</sup> MEFs sowie in den c-Jun Wt MEFs schwach. Die miRNA mir-146a konnte sowohl in den Lysaten als auch in den Komplexen gemessen werden. Allerdings war die Menge dieser miRNA sehr gering und die Ct-Werte dementsprechend hoch, so dass zwischen den technischen Replikaten große Abweichungen vorlagen und eine vernünftige Auswertung nicht möglich war. Die restlichen miRNAs konnten mittels Real Time PCR gut nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Kontrollimmunglobulinen sieht man eine deutliche Anreicherung aller gemessenen miRNAs nach Immunopräzipitation von T7-Ago2-FL, während ribosomale RNAs, repräsentiert durch RNU6B, nicht an Ago2 binden. Diese Daten verdeutlichen die spezifische Anreicherung bestimmter RNA-Spezies an Ago2.

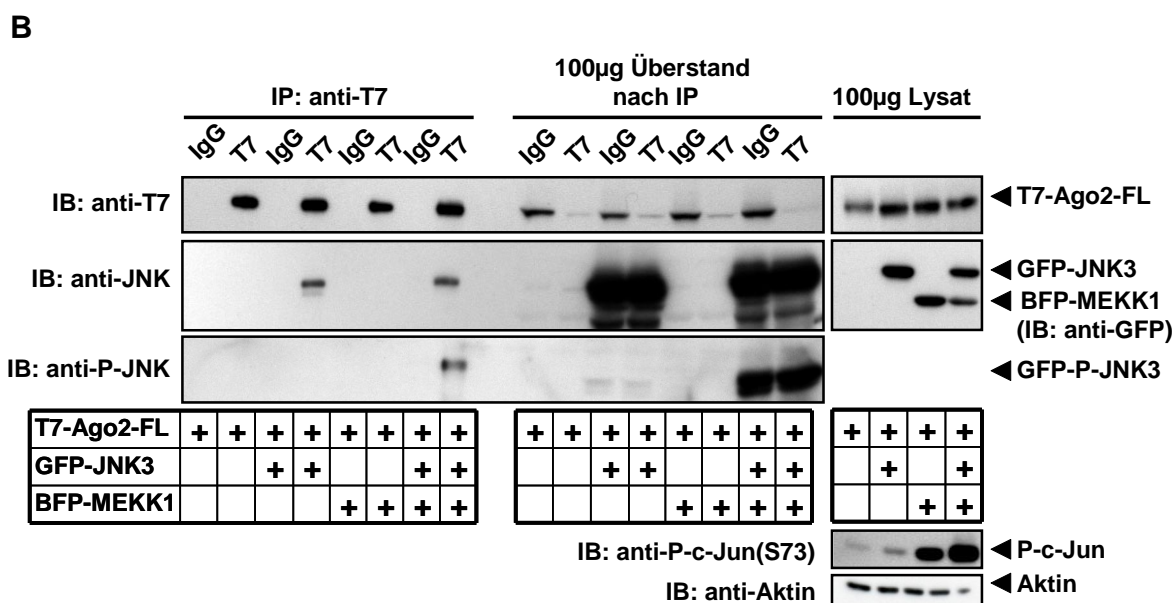
Unter JNK-Stimulationsbedingungen kann man eine 2-3,2-fache Abnahme der Menge von miRNA mir-210 im Komplex beobachten. Diese Abnahme ist unabhängig davon, ob BFP-MEKK1 allein oder mit GFP-JNK3 koexprimiert wird. Die alleinige Expression von GFP-JNK3 führt zu einer geringeren Abnahme von mir-210 im Komplex. Im ersten Experiment ist die Abnahme 1,2-fach im zweiten 1,7-fach. Die für mir-186 erhaltenen Daten sind ähnlich. Die Überexpression von BFP-MEKK1 allein oder zusammen mit GFP-JNK3 führt zu einer 1,6-2,8 fachen Verringerung der Menge dieser miRNA im Komplex. Wird GFP-JNK3 alleine überexprimiert, kann man eine 1,3-1,5-fache Abnahme beobachten. Die Ergebnisse, die in den beiden Experimenten für die miRNAs mir-23b und mir-214 erhalten wurden, sind weniger konsistent. Im ersten Experiment kommt es unter JNK-Stimulationsbedingungen zu einer nahezu zweifachen Zunahme der Menge der miRNA mir-214 im Komplex. Die Überexpression von GFP-JNK3 hat keinen Einfluss. Im zweiten Experiment hingegen ist die Menge von mir-214 in allen Ago2-Komplexen fast gleich bis auf den Ansatz, in dem BFP-MEKK1 koexprimiert wurde. Hier nimmt die Menge der miRNA mir-214 im Komplex leicht um den Faktor 1,4 ab. Im Experiment 2 sind die Ergebnisse, die man für die miRNA mir-23b erhält, vergleichbar mit denen für mir-186 und mir-210. Im Experiment 1 führt die Koexpression von BFP-MEKK1 und GFP-JNK3 allerdings nicht zu einer Abnahme der Menge von mir-23b im Komplex, sondern zu einer Zunahme. Die in Experiment 1 und 2 erhaltenen unterschiedlichen Ergebnisse für mir-23b und mir-214 lassen sich nur schwer erklären und nur durch die Wiederholung dieser Experimente lässt sich herausfinden, welches Szenario das richtige ist. Eine mehrfache Wiederholung der Versuche fand bereits im Rahmen dieser Arbeit statt, allerdings konnte bislang in keinem der Wiederholungsexperimente eine zufriedenstellende, gleichmäßige Immunopräzipitation des überexprimierten Ago2 erzielt werden. Wie bereits erwähnt, ist aufgrund der schwachen Effekte die Gleichmäßigkeit der Immunopräzipitation eine zwingende Voraussetzung für die Untersuchung der miRNAs.

---

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass JNK und vor allem die Aktivierung von JNK die Abnahme der Menge einiger miRNAs in Ago2-Komplexen bewirken, gezeigt an den Beispielen für mir-186 und mir-210. Inwiefern die Bindung weiterer miRNAs in dieser Art und Weise durch den JNK-Signalweg beeinflusst wird, muss mit weiterführenden Experimenten und auch unter Bedingungen physiologischer JNK-Aktivierung untersucht werden.

A





**Abbildung 16: Isolierung ausgewählter miRNAs aus Ago2-Komplexen**

**A:** Relative Mengen der aus den Ago2-Komplexen isolierten miRNAs.  $\pm$  S.E.M aus drei technischen Replikaten. Zur Erläuterung siehe Text. **B:** Überprüfung der Gleichmäßigkeit des immunopräzipitierten T7-Ago2-FL und des koimmunopräzipitierten GFP-JNK3 im Westernblot. Zur Erläuterung siehe Text.

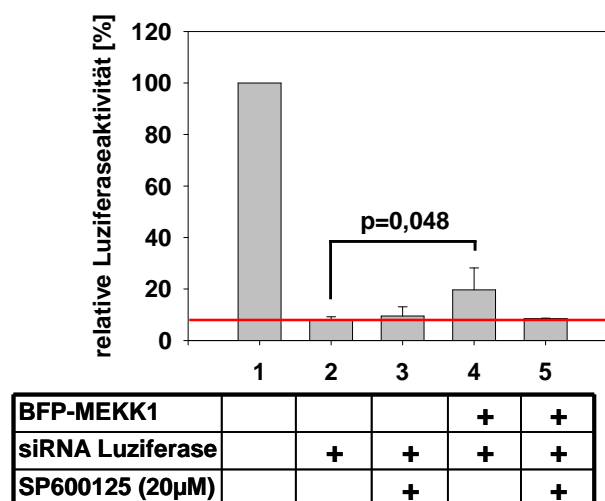
### 3.1.3.2 Einfluss der JNK-Aktivierung auf den siRNA-vermittelten Abbau von Luziferase in HEK293 IL-1R-Zellen

Um den Einfluss der JNK-Aktivierung auf die siRNA-vermittelte RISC-Aktivität zu untersuchen, wurden Luziferasereporterexperimente durchgeführt (Abbildung 17).

Die Transfektion einer spezifischen siRNA gegen Luziferase-mRNA hat eine 92%-ige Abnahme der Luziferaseaktivität zur Folge. Die Aktivierung des JNK-Signalweges durch die Überexpression von BFP-MEKK1 führt zu einer Verminderung der siRNA-vermittelten RISC-Aktivität um 10%. Diese Abnahme kann durch die Hemmung der induzierten JNK-Aktivität mit Hilfe des JNK-Inhibitors SP600125 vollständig aufgehoben werden. Die Hemmung der konstitutiven JNK-Aktivität durch den JNK-Inhibitor SP600125 hat keinen Einfluss auf den siRNA-vermittelten Abbau von Luziferase. Die Überexpression von BFP-MEKK1 aktiviert nicht nur endogene Gene, die NF- $\kappa$ B und AP-1 *sites* enthalten, sondern auch die SV40-Promotoren der Reportergenkonstrukte. Um auf diesen Effekt zu normalisieren und um die Effekte der JNK-Aktivierung auf die RISC-Aktivität messen zu können, wurden daher die Luziferaseaktivitäten der Ansätze 4 und 5 auf die Luziferaseaktivität eines Ansatzes bezogen, der nur mit dem Expressionsvektor für BFP-MEKK1 kotransfiziert war und nicht mit der siRNA.

Die nach JNK-Aktivierung und -Inhibierung gemessenen Effekte auf die RISC-Aktivität sind zwar klein, allerdings waren sie über fünf Versuche hinweg absolut reproduzierbar. Die Aktivierung des JNK-Signalweges hat somit einen, wenn auch geringen, Einfluss auf die siRNA-vermittelte RISC-Aktivität. Da, wie unter 3.1.3.1 beschrieben, die Aktivierung von JNK die Abnahme der Bindung bestimmter miRNAs an Ago2-Komplexe nach sich zieht, ist durchaus

denkbar, dass auch die Luziferase-siRNA nach Aktivierung des JNK-Signalweges vermindert an Ago2-Komplexe bindet und somit dadurch die RISC-Aktivität verringert wird. Allerdings konnte das im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr überprüft werden.



**Abbildung 17: Untersuchung des Einflusses der JNK-Aktivierung auf die siRNA-vermittelte RISC-Aktivität mittels Luziferasereporterexperimenten**

In 6-Loch-Platten ausgesäte HEK293 IL-1R-Zellen wurden pro 6-Loch mit 50ng pGL2-Control, 0,5µg SV40-β-Gal sowie 0,5µg pEGFP transfiziert. Je nach Ansatz wurden zusätzlich 0,5µg pQBIMEKK1 und/oder 100nmol einer spezifisch gegen Luziferase-mRNA gerichteten siRNA transfiziert. Die Menge an Gesamt-DNA wurde pro 6-Loch mit pCS3MT auf 2,88µg eingestellt. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung einiger Proben mit 20µM SP600125 für 4h. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Diese wurde auf die β-Galaktosidaseaktivität normiert. Dargestellt ist die relative Luziferaseaktivität aus fünf unabhängigen Transfektionen (±S.E.M.).

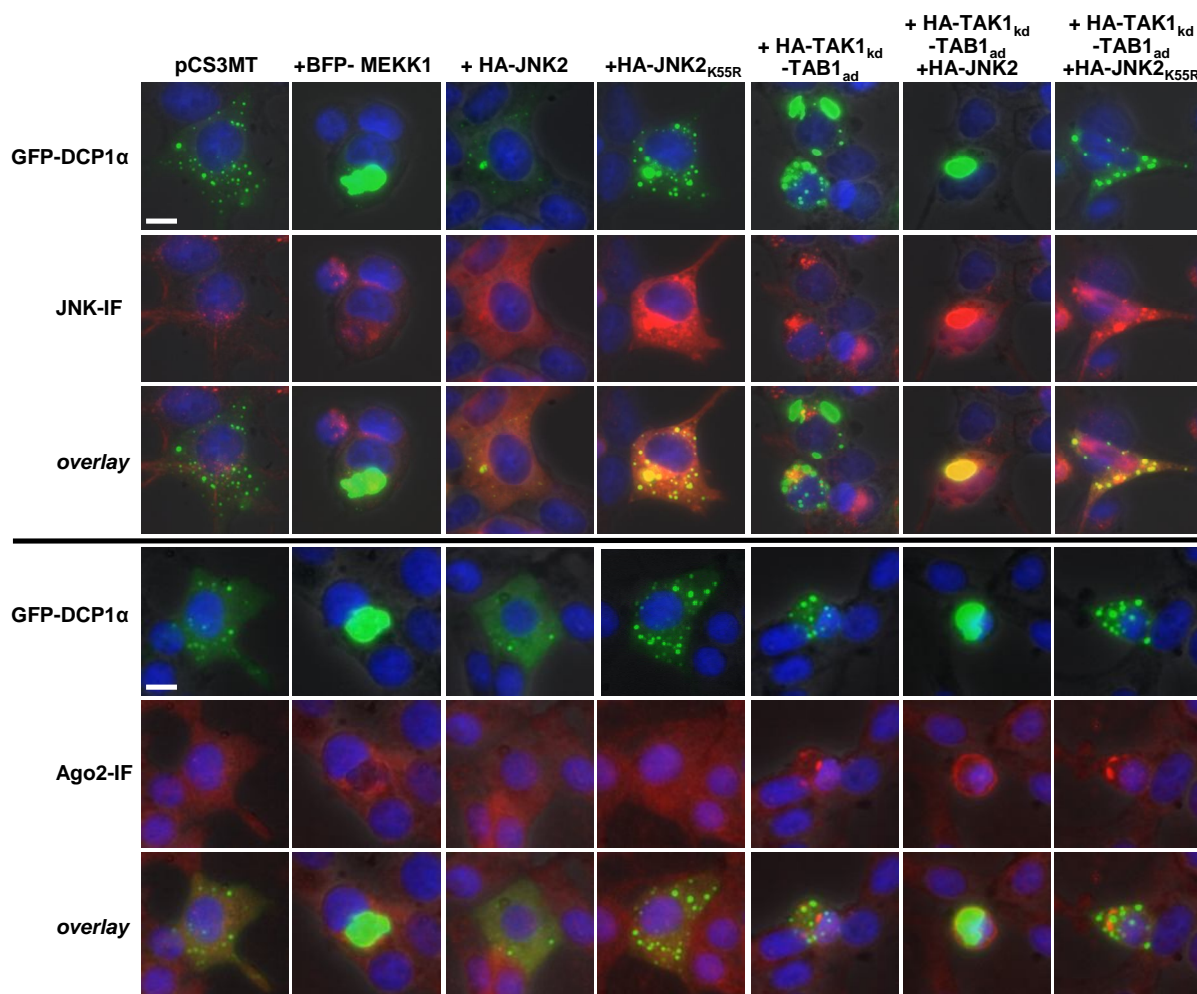
## 3.2 Untersuchungen zur Wechselwirkung von JNK mit DCP1α

### 3.2.1 JNK kolokalisiert mit DCP1α und beeinflusst seine Lokalisation in der Zelle sowie sein Laufverhalten in der SDS-PAGE

Bis zu diesem Zeitpunkt zeigten die Ergebnisse zwar eine eindeutige Bindung von Ago2 an JNK, aber Ago2 war eindeutig kein direktes JNK-Substrat und Ago2-Funktionen, insbesondere die globale RISC-Aktivität, wurden nur schwach durch JNK-Aktivierung reguliert. Daraus ergab sich als alternative Hypothese für die biologische Bedeutung der Bindung von JNK an Ago2, dass Ago2 vielleicht als eine Art Rekrutierungsfaktor fungieren würde, der JNK in bestimmte subzelluläre Multiproteinkomplexe rekrutieren hilft. Die generelle Verteilung von JNK und Ago2 in indirekten Immunfluoreszenzexperimenten zeigte keine eindeutig abgrenzbaren Bereiche der Kolokalisation.

Neben einer Lokalisation im Zytosol und im Kern, ist Ago2 allerdings auch in *P-bodies* zu finden, wo es unter anderem mit DCP1α kolokalisiert. Daher wurde GFP-DCP1α in den

Immunfluoreszenz-Studien zur Lokalisation bzw. Kolo­kalisierung von Ago2 und JNK unter JNK-stimulierenden Bedingungen als *P-body*-Marker verwendet.



**Abbildung 18: Änderung der GFP-DCP1 $\alpha$ -Lokalisation in Abhängigkeit von JNK und seiner Aktivierung**

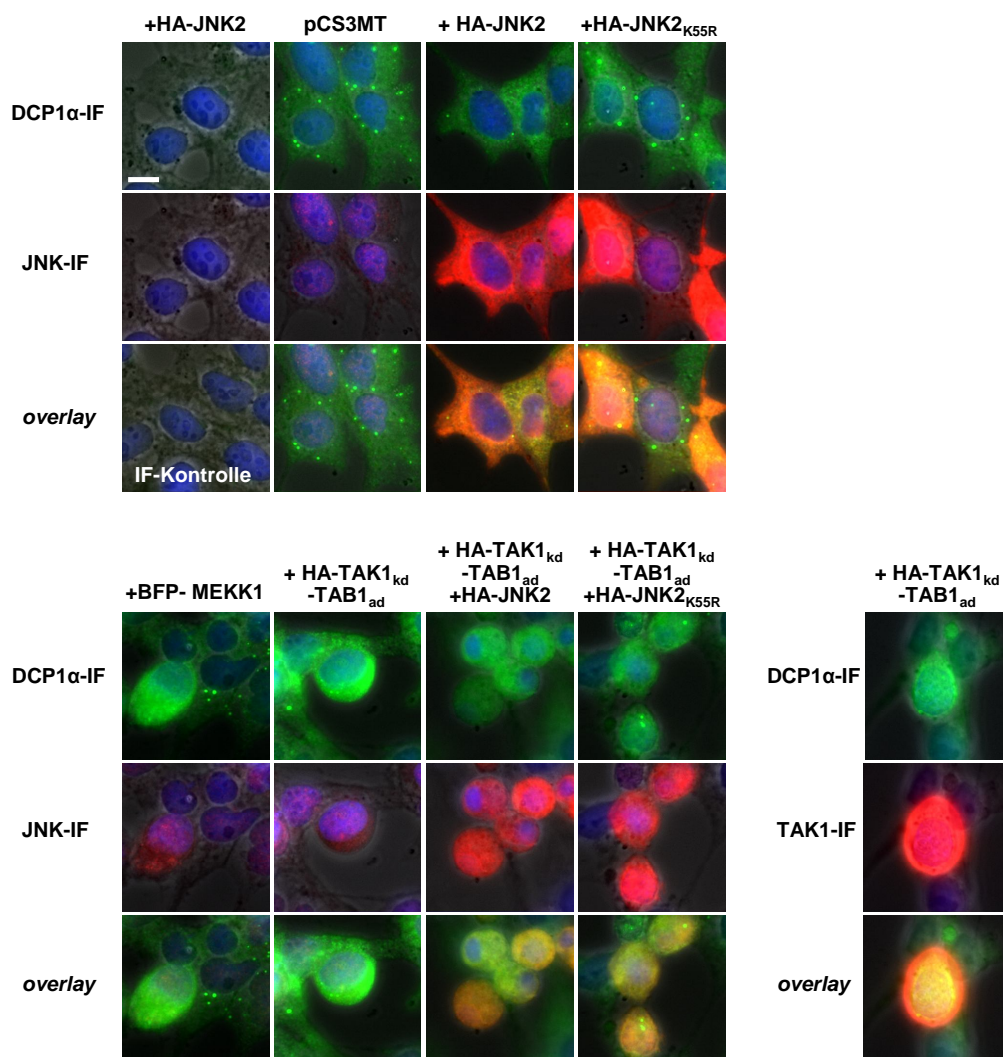
HEK293 IL-1R-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und am Folgetag mit je 2,5 $\mu$ g pEGFP-DCP1 $\alpha$  pro Loch transfiziert. Zusätzlich wurden je nach Ansatz Expressionsplasmide in Kombination oder alleine für folgende Proteine zugefügt: HA-JNK2, HA-JNK2<sub>K55R</sub>, HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub>, und BFP-MEKK1. Von jedem Plasmid wurden 2,5 $\mu$ g pro 6-Loch eingesetzt. Die Gesamt-DNA-Menge wurde für jeden Ansatz mit pCS3MT auf 7,5 $\mu$ g eingestellt. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf  $\mu$ -Slides VI umgesetzt und für einen weiteren Tag in Kultur gelassen. Anschließend wurden die Zellen fixiert und es wurde eine indirekte Immunfluoreszenz für JNK oder Ago2 durchgeführt. Balken: 10 $\mu$ m.

Wie man Abbildung 18 entnehmen kann, befindet sich Ago2 hauptsächlich im Zytosol und dort zum Teil in kreisrunden Strukturen. Es ist ebenfalls schwach im Kern lokalisiert. In den Ansätzen, in denen das Konstrukt für die kinaseinaktive Mutante HA-JNK2<sub>K55R</sub> oder die Konstrukte für HA-TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub> und HA-JNK2 transfiziert wurden, kann eine Kolo­kalisierung zwischen GFP-DCP1 $\alpha$  und endogenem Ago2 beobachtet werden. In den übrigen Ansätzen hingegen ist die Kolo­kalisierung geringer. Die runden, zytoplasmatischen Strukturen in denen sich das endogene Ago2 befindet, liegen zum Teil direkt neben den *P-bodies* oder

überlappen mit diesen. Endogenes und überexprimiertes JNK sowohl der Wildtyp als auch die Mutante sind diffus im Zytosol verteilt und dort ebenfalls zum Teil in runden Strukturen lokalisiert. Man findet sie außerdem schwach im Kern. Endogenes JNK befindet sich in den *P-bodies*, wenn die Zellen HA-TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub> oder BFP-MEKK1 überexprimieren. Wird der Leervektor pCS3MT transfiziert, ist keine Kolokalisation zwischen endogenem JNK und GFP-DCP1 $\alpha$  zu beobachten. In den übrigen Ansätzen ist aufgrund der Überexpression von JNK eine Kolokalisation von endogenem JNK mit GFP-DCP1 $\alpha$  schwer zu beurteilen. Überexprimiertes JNK, unabhängig davon ob es katalytisch aktiv ist, kolokalisiert immer mit GFP-DCP1 $\alpha$ . Eine weitere interessante Beobachtung ist die, dass sich je nach Reaktionsbedingungen die Lokalisation von GFP-DCP1 $\alpha$  ändert. Wird GFP-DCP1 $\alpha$  allein überexprimiert, so findet man neben einigen wenigen größeren *P-bodies* hauptsächlich kleine *P-bodies*. Die Überexpression von HA-JNK2, nicht aber die der katalytisch inaktiven Mutante, führt zu einer Umverteilung von GFP-DCP1 $\alpha$  aus den *P-bodies* ins Zytosol. Die Koexpression von HA-TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub> führt dazu, dass neben den kleinen *P-bodies* vermehrt größere *P-bodies* auftreten. Werden die Zellen mit den Expressionsplasmiden für BFP-MEKK1 oder für HA-JNK2 und HA-TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub> kotransfiziert, so findet man in beiden Fällen nur noch eine einzelne große „*P-body*“-Struktur, welche nahezu das gesamte Zytosol ausfüllt. Dieser Effekt kann aufgehoben werden, wenn anstelle des Wildtyps die Mutante von JNK exprimiert wird.

Unter denselben Reaktionsbedingungen kann man für das endogene DCP1 $\alpha$  eine vergleichbare Lokalisationsänderung beobachten (Abbildung 19).





**Abbildung 19: Änderung der Lokalisation von endogenem DCP1 $\alpha$  nach Überexpression von JNK oder JNK-Aktivatoren**

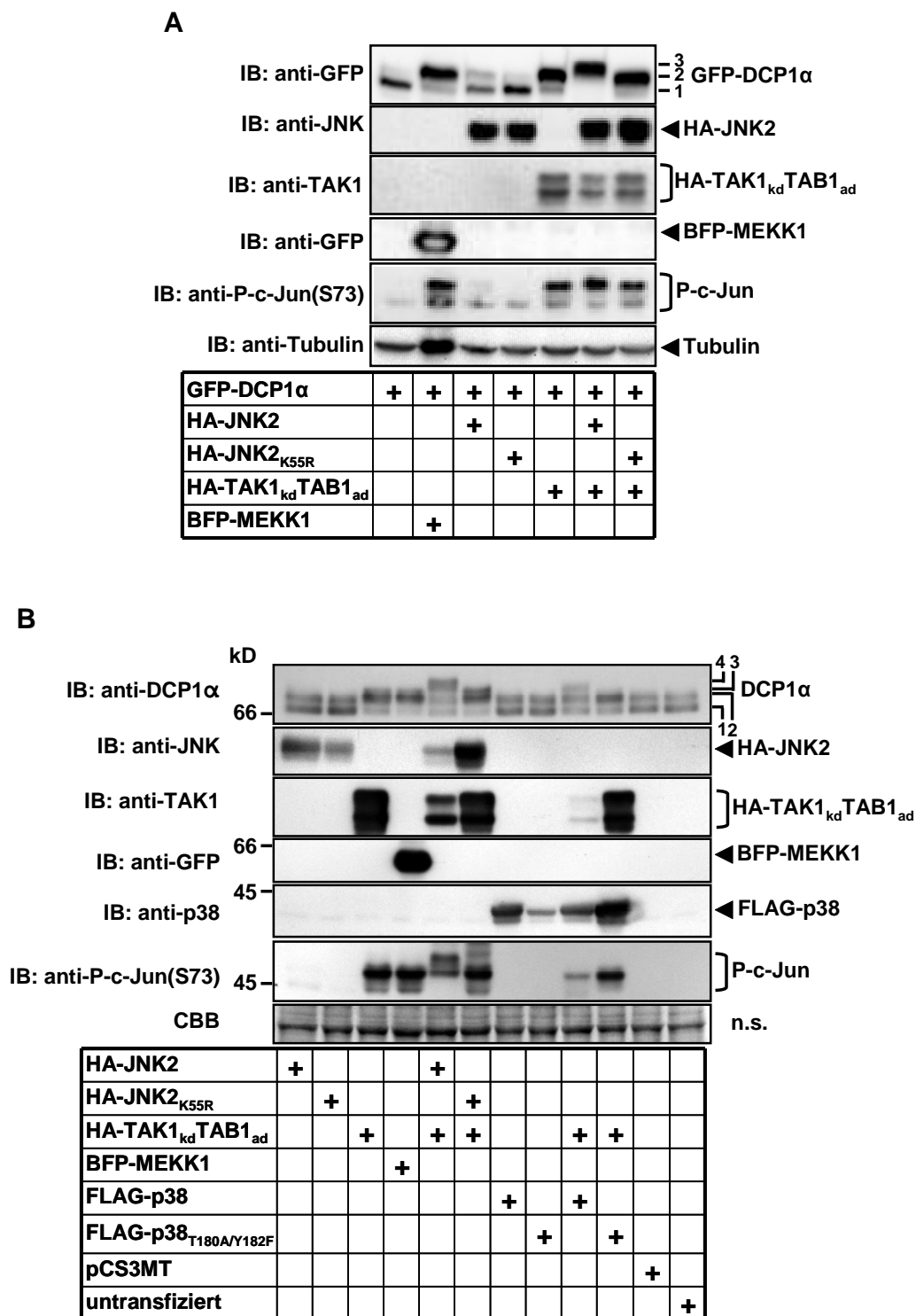
Es wurde verfahren wie unter Abbildung 18 beschrieben, mit der Änderung, dass kein pEGFP-DCP1 $\alpha$  transfiziert wurde und stattdessen eine Doppelimmunfluoreszenz für DCP1 $\alpha$  und JNK bzw. TAK1 durchgeführt wurde. Die Immunfluoreszenz für JNK und TAK1 diente der Unterscheidung zwischen transfizierten und nicht transfizierten Zellen. Balken: 10 $\mu$ m.

Die Überexpression von HA-JNK2 führt zu einer verstärkten Umverteilung des DCP1 $\alpha$  aus den *P-bodies* ins Zytosol und somit zu einer verringerten Lokalisation von DCP1 $\alpha$  in den *P-bodies*. Die katalytisch inaktive JNK-Mutante hingegen hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von DCP1 $\alpha$ . Nach Koexpression von HA-JNK2 und HA-TAK<sub>kd</sub>TAB<sub>ad</sub> als auch nach Überexpression von BFP-MEKK1 kommt es zu einer starken Abrundung der Zellen sowie zu einer vollständigen Umverteilung des DCP1 $\alpha$  aus den *P-bodies* ins Zytosol. Eine ähnliche Beobachtung kann gemacht werden, wenn HA-TAK<sub>kd</sub>TAB<sub>ad</sub> alleine oder mit der katalytisch inaktiven Mutante von JNK überexprimiert wird, mit dem Unterschied, dass DCP1 $\alpha$  in den transfizierten Zellen vereinzelt noch in *P-bodies* vorhanden ist. Die *P-body* Anzahl ist hierbei allerdings deutlich geringer als in den Zellen, welche mit dem Kontrollvektor transfiziert worden sind. Im Vergleich zu den mit dem

Expressionsplasmid für HA-JNK2 transfizierten Zellen, findet man in diesen beiden Ansätzen ebenfalls weniger Zellen, die DCP1 $\alpha$  in den *P-bodies* aufweisen.

Zusammengefasst zeigten diese Untersuchungen, neben der Kolo-kalisation von JNK und Ago2 in *P-bodies*, einen überraschend starken Einfluss der JNK-Aktivierung auf die zelluläre Verteilung von DCP1 $\alpha$ , die ganz eindeutig von der katalytischen Aktivität von JNK abhing. Diese Effekte waren deutlich stärker, als die Effekte von aktiviertem JNK auf die RISC-Aktivität oder Ago2-miRNA-Bindung, so dass dieses Phänomen in dem folgenden Teil der Promotionsarbeit weiter untersucht wurde.

In parallel durchgeführten Analysen aus den gleichen Zellkulturen wiesen überexprimiertes GFP-getaggtetes und endogenes DCP1 $\alpha$  im Westernblot einen massiven Mobilitäts-*shift* auf (Abbildung 20). Wird GFP-DCP1 $\alpha$  alleine überexprimiert, so kann man zwei Mobilitätsformen im Westernblot detektieren, wobei die Form 1 stärker ausgeprägt ist, als die Form 2. Die Koexpression von HA-JNK2, nicht aber von HA-JNK2<sub>K55R</sub>, führt zu einer Verstärkung der Form 2 und einer damit einhergehenden Verminderung der Form 1. Die Überexpression von BFP-MEKK1 oder von HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> resultiert ebenfalls in einer Induktion der Form 2. Diese Induktion scheint stärker zu sein, als die nach der Expression von HA-JNK2 erhaltene. Allerdings muss man berücksichtigen, dass die Expression von HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> oder von BFP-MEKK1 eine starke Geninduktion von GFP-DCP1 $\alpha$  nach sich zieht. Die Koexpression von HA-JNK2 und HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> führt ausschließlich zu einer dritten Mobilitätsform von GFP-DCP1 $\alpha$ . Wird in einem analogen Ansatz anstelle des Wildtyps von HA-JNK2 die Mutante exprimiert, so erhält man die gleichen Mobilitäts-*shifts* wie bei der Überexpression von HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> allein. Das endogene DCP1 $\alpha$  verhält sich ähnlich wie das überexprimierte. Es liegen konstitutiv zwei Mobilitätsformen im gleichen Verhältnis vor. Durch die Überexpression von HA-JNK2 kommt es anders als beim GFP-DCP1 $\alpha$  zu keiner Induktion der Form 2. Allerdings führt die Expression von HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> oder von BFP-MEKK1 zu einer neben der Mobilitätsform 1 verstärkt vorliegenden Mobilitätsform 2. Zusätzlich lässt sich eine schwache Mobilitätsform 3 beobachten, die jedoch nicht der Form 3 des überexprimierten DCP1 $\alpha$  entspricht. Die gleichzeitige Koexpression von HA-JNK2 und HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> resultiert in einer Mobilitätsform 4, die neben den Formen 1 und 2 vorliegt. Die Mobilitätsform 4 des endogenen DCP1 $\alpha$  ist mit der Form 3 des GFP-DCP1 $\alpha$  vergleichbar. Wie beim GFP-DCP1 $\alpha$  lässt sich dieser Effekt aufheben, wenn anstelle des Wildtyps von HA-JNK2 die Mutante koexprimiert wird. In diesem Fall lassen sich die gleichen Mobilitäts-*shifts* beobachten wie beim Ansatz, in dem sich nur HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> befindet. Das Laufverhalten des endogenen DCP1 $\alpha$  wird durch die alleinige Transfektion der Zellen mit den Expressionsplasmiden für FLAG-p38 oder für FLAG-p38<sub>T180A/Y182F</sub> (kinaseinaktive Mutante) nicht beeinflusst. Die Koexpression von FLAG-p38 und HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> hingegen induziert die Mobilitätsform 3, die neben den Formen 1 und 2 vorliegt. Der Austausch des Wildtyps gegen die Mutante von FLAG-p38 führt zu Mobilitäts-*shifts* wie man sie erhält, wenn nur HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> exprimiert wird, mit dem Unterschied, dass die Mobilitätsform 3 nicht induziert wird.



**Abbildung 20: Verändertes Laufverhalten von endogenem und überexprimierten DCP1 $\alpha$  in der SDS-PAGE unter verschiedenen Reaktionsbedingungen**

**A:** Die Durchführung erfolgte wie unter Abbildung 18 beschrieben, mit der Änderung, dass die Zellen am Tag nach der Transfektion lysiert und die erhaltenen Lysate im Westernblot analysiert wurden. **B:** Wie A, mit dem Unterschied, dass kein pEGFP-DCP1 $\alpha$  transfiziert wurde und dass neben den Expressionsplasmiden für die Proteine HA-JNK2, HA-JNK2<sub>K55R</sub>, HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> und BFP-MEKK1 auch Plasmide eingesetzt wurden, die für FLAG-p38 und FLAG-p38<sub>T180A/Y182F</sub> kodieren. n.s.: nicht spezifische Bande.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in Abhängigkeit von JNK und seiner Aktivierung sowohl GFP-DCP1 $\alpha$  als auch endogenes DCP1 $\alpha$  ihre Lokalisation in der Zelle ändern. Zudem weisen unter diesen Reaktionsbedingungen das endogene und das überexprimierte DCP1 $\alpha$  einen massiven Mobilitäts-*shift* in der SDS-PAGE auf. Die Vermutung lag nahe, dass das veränderte Laufverhalten und die Änderung der Lokalisation von DCP1 $\alpha$  in der Zelle auf posttranslationale Modifikationen von DCP1 $\alpha$  zurückzuführen sind. Da diese Veränderungen JNK-abhängig auftraten, war es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei den Modifikationen um Phosphorylierungen handelt.

### 3.2.2 JNK, DCP1 $\alpha$ und Ago2 lassen sich als Komplex aus intakten Zellen isolieren

In den immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte eine Kolo­kalisierung zwischen endogenem sowie überexprimiertem JNK und GFP-DCP1 $\alpha$  detektiert werden. Daher wurde mittels Koimmunopräzipitation überprüft, ob JNK und DCP1 $\alpha$  aneinander binden. In Abbildung 21A ist im Vergleich zum Kontrollimmunglobulin eine spezifische Interaktion zwischen GFP-DCP1 $\alpha$  und GFP-JNK3 zu beobachten. Ebenso kann die bereits mehrfach beschriebene Interaktion zwischen überexprimiertem DCP1 $\alpha$  und überexprimiertem Ago2 mit T7-Ago2-FL und GFP-DCP1 $\alpha$  reproduziert werden. Zudem lassen sich T7-Ago2-FL, GFP-JNK3 und GFP-DCP1 $\alpha$  als trimerer Komplex aus HEK293 IL-1R-Zellen isolieren (Abbildung 21B).

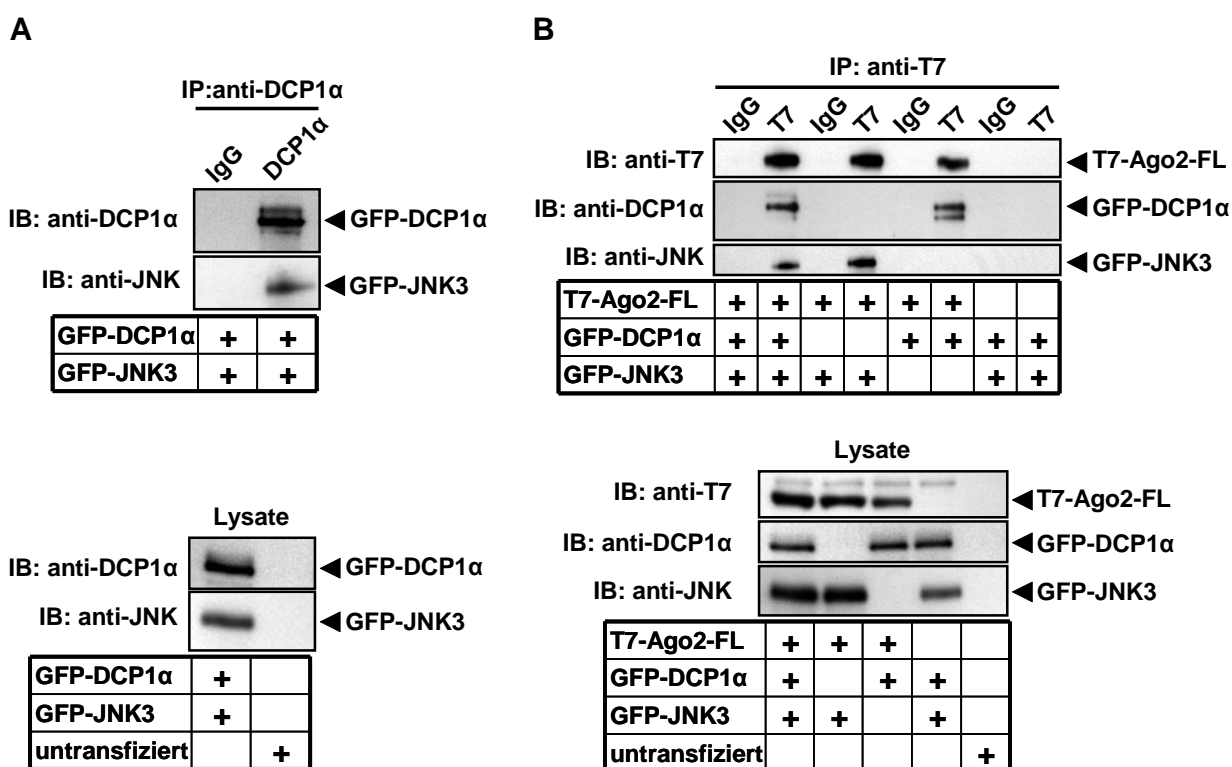


Abbildung 21: Analyse der Interaktion zwischen JNK, DCP1 $\alpha$  und Ago2 mittels Koimmunopräzipitation






**A:** Zwei 75cm<sup>2</sup>-Flaschen mit HEK293 IL-1R-Zellen wurden mit jeweils 26,6µg pEGFP-JNK3, 26,6µg pEGFP-DCP1α und 26,6µg pCS3MT transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen geerntet, lysiert und GFP-DCP1α mit 1µg eines DCP1α-Antikörpers aus dem Lysat immunopräzipitiert. Die Präzipitate wurden anschließend auf die Anwesenheit des immunopräzipitierten GFP-DCP1α und des koimmunopräzipitierten GFP-JNK3 im Westernblot untersucht. Zur Kontrolle der Gleichmäßigkeit der Proteinexpression wurde das Lysat der transfizierten Zellen ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Westernblot untersucht. **B:** Pro Ansatz wurden zwei 75cm<sup>2</sup>-Flaschen mit HEK293 IL-1R-Zellen mit jeweils 13,3µg pCMVT7Ago2-FL transfiziert. Zusätzlich wurden zu einem Ansatz die Expressionsplasmide für GFP-DCP1α und für GFP-JNK3 transfiziert. Zu den beiden übrigen Ansätzen wurde entweder das Expressionsplasmid für GFP-DCP1α oder das für GFP-JNK3 hinzugefügt. Pro 75cm<sup>2</sup>-Flasche wurden von jedem Plasmid 13,3µg eingesetzt. Die Gesamt-DNA-Menge wurde mit pCS3MT auf 40µg eingestellt. Am Folgetag wurden die Zellen geerntet, lysiert und T7-Ago2-FL mit 1µg eines T7-Antikörpers immunopräzipitiert. Die Überprüfung der Immunopräzipitate auf die Anwesenheit des immunopräzipitierten T7-Ago2-FL und des koimmunopräzipitierten GFP-DCP1α und GFP-JNK3 erfolgte im Westernblot. Die Lysate der transfizierten Zellen wurden ebenfalls im Westernblot auf eine gleichmäßige Proteinexpression hin untersucht.

### 3.2.3 Identifizierung von Serin315 als JNK-abhängige Phosphorylierungsstelle in DCP1α

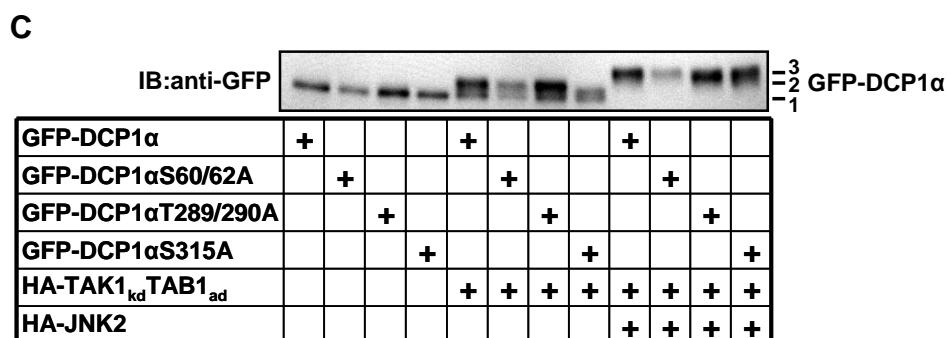
Um die Frage zu beantworten, ob es sich bei DCP1α um ein mehrfach-phosphoryliertes Protein handelt, welches JNK-abhängig phosphoryliert wird, wurden Punktmutanten von GFP-DCP1α generiert, in denen bestimmte Serine oder Threonine zu Alanin mutiert waren. Mit Hilfe des NetPhos 2.0 Servers (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) wurde entschieden, welche der Serine und Threonine mutiert werden. NetPhos trifft auf Grundlage eines neuronalen Netzwerkes Kinase-unspezifische Vorhersagen über die Phosphorylierung von Serinen, Threoninen und Tyrosinen in eukaryotischen Proteinen. Alle Serine und Threonine, für die der Schwellenwert einer potentiellen Phosphorylierung über 0,5 lag und auf die in der Aminosäuresequenz unmittelbar ein Prolin folgt, wurden zu Alanin mutiert. Waren in unmittelbarer Umgebung des Serins/Threonins auf das C-terminal ein Prolin folgt noch weitere Serine oder Threonine vorhanden, so wurden diese zusammen mit dem besagten Serin/Threonin mutiert. Der Grund für die Mutation von Serinen und Threoninen mit einem direkt C-terminal gelegenen Prolin ist der, dass die minimale Konsensussequenz für die Phosphorylierung durch eine MAP-Kinase Serin/Threonin-Prolin lautet. Die optimale Primärstruktur für die Phosphorylierung durch eine MAP-Kinase ist allerdings Prolin-X-Serin/Threonin-Prolin. In Abbildung 22A ist die Aminosäuresequenz von DCP1α mit den mutierten Serinen und Threonin dargestellt. Es sind auch Aminosäuren gekennzeichnet, welche erst zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit mutiert wurden, nachdem in PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org/homeAction.do>), einer sequenzorientierten Proteindatenbank, die Phosphorylierungen und andere Modifikationen aufführt, Serine und Threonine publiziert wurden, welche in DCP1α phosphoryliert werden (siehe 3.2.8). In der gesamten Sequenz befindet sich nur ein Bereich, welcher der optimalen Konsensussequenz für die Phosphorylierung durch eine MAP-Kinase entspricht. Dieser umfasst das Serin315.

## A

1-MEALSRAGQEMSLAALKQHDPYITSIADLTGQVALYTFCKANQWEKTDIEGTL  
FVYRRSASPYHGFTIVNRLNMHNLVEPVNKDLEFQLHEPFLLYRNASLSIYSIWFY  
DKNDCHRIAKLMADVVEEETRRSQQAARDKQSPSQANGCSDHRPIDILEMLSRAKD  
EYERNQMGSNIISSPGLQPSTQLSNLSTETLEEMPSGSQDKSAPSGHKHLTVEEL  
FGTSLPKEQPAVVGLDSEEMERLPGDASQKEPNSFLPFPFEQLGGAPQSETLGVPS  
AAHHSVQPEITTPVLITPASITQSNEKHAPTYTIPLSPVLSPTLPAEAPTAQVPPS  
LPRNSTMMQAVKTPRQRSPLLNQPVPELSHASLIANQSPFRAPLNVTNTAGTSLP  
SVDLLQKLRLTPQHDQIQTQPLGKGAMVASFSPAAGQLATPESFIEPPSKTAAARV  
AASASLSNMVLAPLQSMQONQDPEVQPKVLSSAIQVAGAPLVTATTTAVSSVLL  
APSVFQQTVTRSSDLERKASSPSPLTIGTPESQRKPSIILSKSQLQDTLIHLIKND  
SSFLSTLHEVYLQVLTKNKDNHNL-582

-  vorhergesagte Phosphorylierungsstelle durch NetphosK
-  vorhergesagte Phosphorylierungsstelle durch PhosphoSitePlus
-  vorhergesagte Phosphorylierungsstelle durch NetphosK und PhosphoSitePlus
-  zusätzlich mutierte Aminosäuren
-  Konsensussequenz für Phosphorylierung durch MAPK





**Abbildung 22: Identifizierung von Serin315 als potentielle Phosphorylierungsstelle in DCP1α**

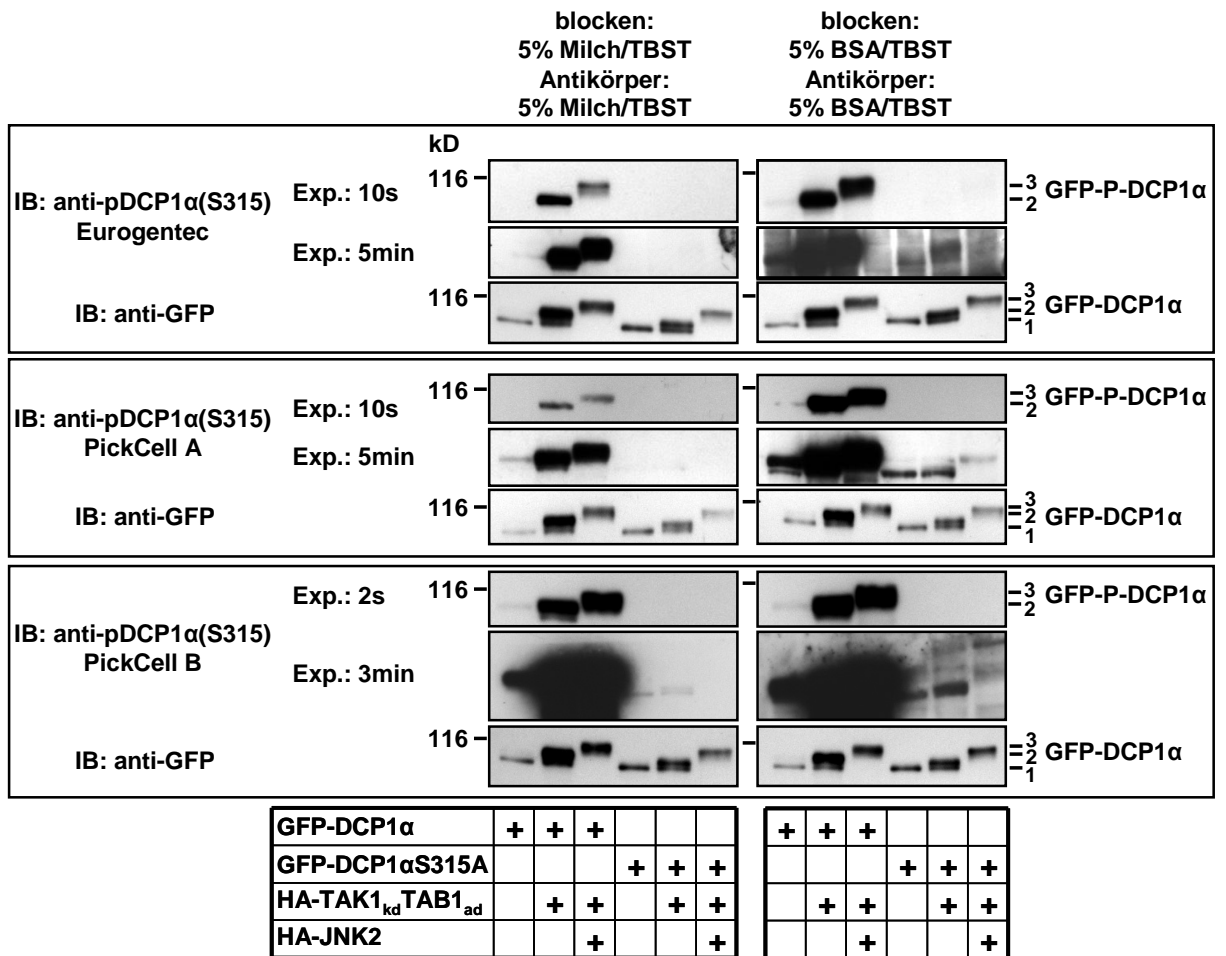
**A:** Aminosäuresequenz des humanen DCP1α (NM\_018403). Die farblich hervorgehobenen Aminosäuren wurden zu Alanin mutiert. Der rot umrandete Bereich entspricht einer optimalen Konsensussequenz für die Phosphorylierung durch eine MAP-Kinase. **B:** Ein 6-Loch mit HEK293 IL-1R-Zellen wurde entweder mit 2,5µg des entsprechenden DCP1α-Konstrukts alleine oder zusammen mit 2,5µg pCDNA3HATAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> oder zusammen mit je 2,5µg pCDNA3HATAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> und peVRFOHAJNK2 transfiziert. Für jedes Loch wurde die Gesamt-DNA-Menge mit pCS3MT auf 7,5µg eingestellt. Nach weiteren 24h in Kultur wurden die Zellen geerntet, lysiert und das Laufverhalten der DCP1α-Mutanten im Westernblot überprüft. **C:** Westernblot eines 6%igen Gels von ausgewählten unter B bereits analysierten Lysaten, um das veränderte Laufverhalten der GFP-DCP1αS315A-Mutante zu demonstrieren.

Das Laufverhalten der unstimulierten sowie der durch Koexpression von HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> oder HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> und HA-JNK2 stimulierten DCP1α-Mutanten wurde im Westernblot untersucht. Durch die Wahl dieser Reaktionsbedingungen erhält man alle drei unterschiedlichen Mobilitätsformen von GFP-DCP1α, welche durch die eingeführten Mutationen verändert werden könnten. Neben dem Laufverhalten der Alanin-Mutanten wurde auch das Laufverhalten einer C-terminalen Deletionsmutante (GFP-DCP1α<sub>Δ513-582</sub>) analysiert. Bis auf die C-terminale Deletionsmutante und die Mutante, in der das Serin315 zu Alanin mutiert ist, weisen alle anderen Mutanten kein verändertes Laufverhalten auf. Von der C-terminalen Deletionsmutante existieren ebenfalls drei Mobilitätsformen. Diese haben aufgrund des um 70 Aminosäuren verkürzten C-Terminus eine schnellere Laufgeschwindigkeit im Gel als der Wildtyp von GFP-DCP1α. Die relative Laufgeschwindigkeit der drei GFP-DCP1α<sub>Δ513-582</sub>-Formen zueinander ist allerdings unverändert. Im deletierten Bereich befinden sich somit keine Aminosäuren, durch deren Modifikation sich das Laufverhalten von GFP-DCP1α in der SDS-PAGE ändert. Damit konsistent ist, dass die Mutation der Aminosäuren Serin 522, 523 und 525 zu Alanin ebenfalls keinen Einfluss auf die Laufgeschwindigkeit der resultierenden GFP-DCP1α-Mutante hat. Durch die Mutation von Serin315 zu Alanin bleiben die Mobilitätsformen 1 und 3 unbeeinflusst. Allerdings kann nach Überexpression von HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> die Mobilitätsform 2 nicht mehr detektiert werden, stattdessen liegt eine schneller laufende Form vor (Abbildung 22B Mitte, Spur 8). Der üblicherweise nach HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub>-Expression vorliegende Mobilitäts-*shift* von der Mobilitätsform 1 auf die Mobilitätsform 2 ist also durch die Mutation von Serin315 vermindert, was deutlich aus den Westernblots in Abbildung 22B/C hervorgeht. Es konnte somit eine Aminosäure identifiziert werden, die JNK-abhängig modifiziert wird und so das Laufverhalten von DCP1α in der SDS-PAGE beeinflusst.



Um zu überprüfen, ob es sich bei der Modifikation an Serin315 um eine Phosphorylierung handelt, wurde bei den Firmen Eurogentec und PickCell die Generierung eines phosphospezifischen Antikörpers gegen das Serin315 in Auftrag gegeben. Von Eurogentec wurde ein Antikörper und von PickCell wurden zwei Antikörper erhalten. Es wurde zunächst unter verschiedenen Reaktionsbedingungen im Westernblot untersucht, ob und wie spezifisch die drei Antikörper eine Phosphorylierung von überexprimierten GFP-DPC1 $\alpha$  an Serin315 detektieren (Abbildung 23).

**A**



**B**

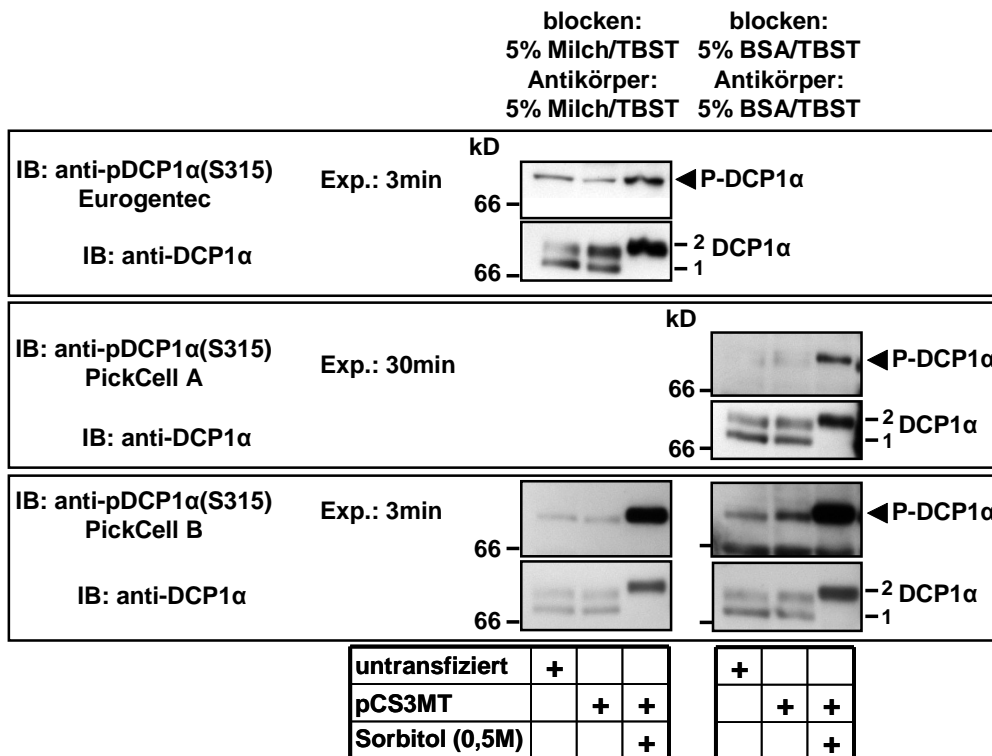


Abbildung 23: Austestung verschiedener pDCP1αS315-Antikörper

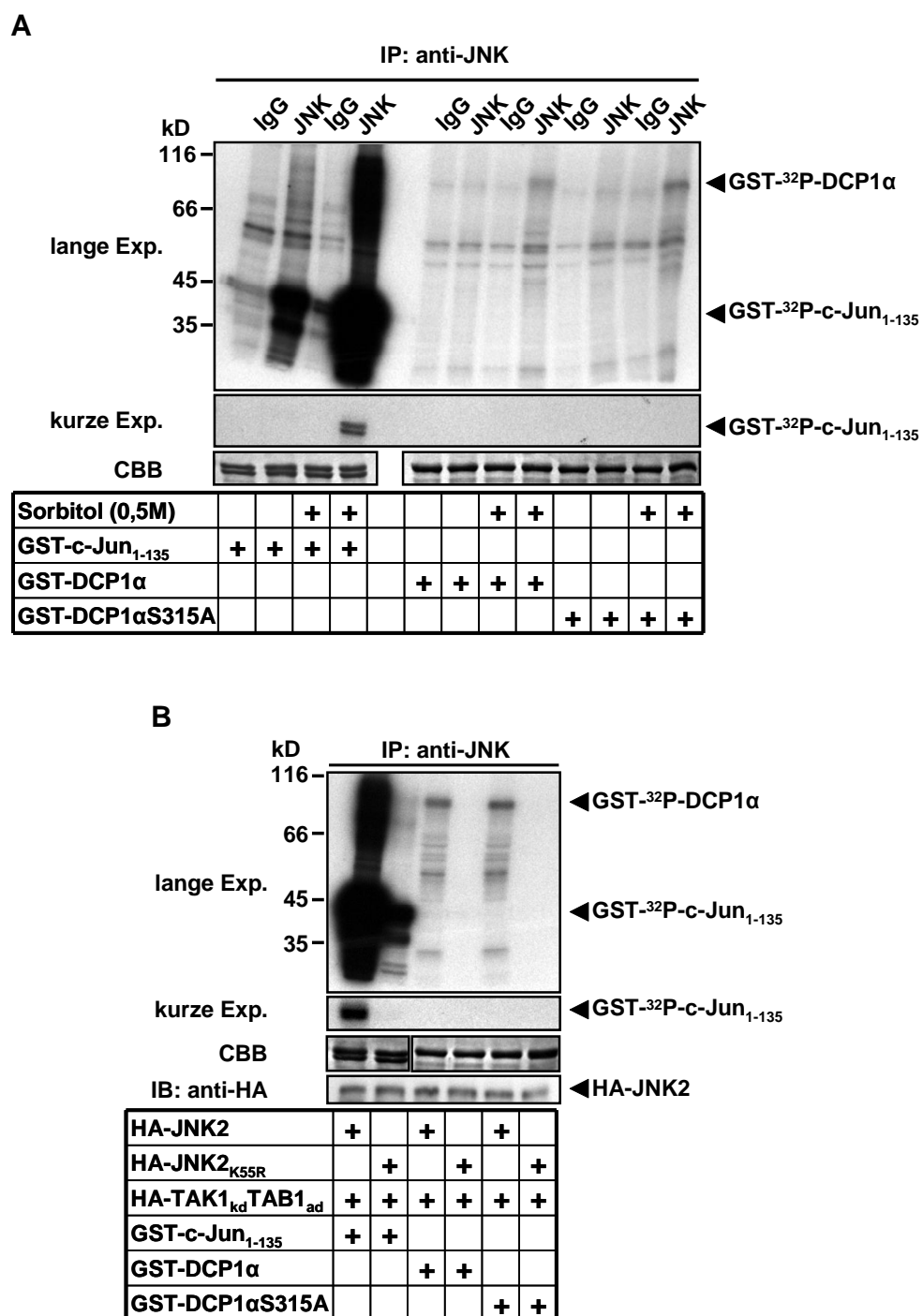
**A:** In 6-Loch-Platten ausgesäte HEK293 IL-1R-Zellen wurden mit pEGFPDCP1 $\alpha$  oder mit pEGFPDCP1 $\alpha$ S315A alleine oder zusammen mit pCDNA3HATAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> oder zusammen mit pCDNA3HATAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> und pEVRFHOAJNK2 transfiziert. Hierbei wurden von jedem Plasmid pro 6-Loch 2,5 $\mu$ g eingesetzt. Die Menge an Gesamt-DNA wurde mit pCS3MT auf 7,5 $\mu$ g eingestellt. Nach der Lyse der Zellen wurden die Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt und GFP-DCP1 $\alpha$  sowie seine Phosphorylierung an Serin315 im Westernblot detektiert. **B:** HEK293 IL-1R-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät, um am nächsten Tag entweder unbehandelt gelassen oder mit 5 $\mu$ g pCS3MT pro 6-Loch transfiziert. Am Folgetag wurden die mit pCS3MT transfizierten Zellen entweder unbehandelt gelassen oder für 1h mit 0,5M Sorbitol stimuliert. Nach anschließender Lyse der Zellen erfolgte die Detektion von endogenem DCP1 $\alpha$  sowie seiner Serin315-Phosphorylierung im Westernblot.

Die drei Antikörper erkennen alle nach Überexpression von HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> oder von HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> und HA-JNK2 eine Serin315-Phosphorylierung von GFP-DCP1 $\alpha$ . Bei der Modifikation an Serin315 handelt es sich somit tatsächlich um eine Phosphorylierung. Der Antikörper B von PickCell ist sensitiver als der Antikörper A und als der Antikörper von Eurogentec, die eine vergleichbare Empfindlichkeit aufweisen. Alle drei Antikörper besitzen eine hohe Spezifität, da sie bei GFP-DCP1 $\alpha$ S315A keine Phosphorylierung an Serin315 detektieren. Erst bei längeren Expositionszeiten erkennen die beiden Antikörper von PickCell unspezifisch GFP-DCP1 $\alpha$ , da man in den Ansätzen mit der Serin-315-Alanin-Mutante ein schwaches Signal erhält. Dieses ist stärker, wenn der Westernblot in 5%-iger BSA-Lösung geblockt und der Antikörper in 5%-iger BSA-Lösung angesetzt wird. Allerdings ist die Bandenintensität immer noch um ein Vielfaches schwächer als die in den Ansätzen, welche den Wildtyp enthalten. Der Antikörper von Eurogentec detektiert nur unter BSA-Reaktionsbedingungen unspezifisch überexprimiertes DCP1 $\alpha$ . Beide PickCell Antikörper erkennen nach längeren Expositionszeiten sehr deutlich unter allen Reaktionsbedingungen auch konstitutiv an Serin315 phosphoryliertes GFP-DCP1 $\alpha$ . Der Antikörper von Eurogentec hingegen detektiert die konstitutive Phosphorylierung nur schwach. Betrachtet man die Detektion der Phosphorylierung von endogenem DCP1 $\alpha$  an Serin315, so findet man große Unterschiede zwischen den einzelnen Antikörpern. Der Antikörper von Eurogentec erkennt eine Bande, die sich auf Höhe der Mobilitätsform 2 des endogenen DCP1 $\alpha$  befindet und die somit dem an Serin315 phosphorylierten endogenen DCP1 $\alpha$  entsprechen könnte. Allerdings ist zwischen der konstitutiven und der durch Sorbitol induzierten Phosphorylierung kaum ein Unterschied zu sehen. Der Antikörper A von PickCell detektiert die stimulusinduzierte Serin315-Phosphorylierung von endogenem DCP1 $\alpha$ . Dagegen erkennt er die konstitutiv vorliegende Phosphorylierung weniger gut. Außerdem sind für die Detektion lange Expositionszeiten erforderlich und der Westernblot muss in 5%-iger BSA-Lösung geblockt und der Antikörper in 5%-iger BSA-Lösung angesetzt werden. Findet die Inkubation des Blots in 5%-iger Milch statt und wird der Antikörper mit 5%-iger Milch verdünnt, so detektierte der Antikörper kein an Serin315 phosphoryliertes DCP1 $\alpha$ . Daher ist der entsprechende Westernblot nicht dargestellt. Der zweite Antikörper (B) von PickCell erkennt innerhalb kurzer Detektionszeiten unter beiden Reaktionsbedingungen sowohl die konstitutive als auch die durch Sorbitol induzierte Phosphorylierung von endogenem DCP1 $\alpha$  an Serin315. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die weiteren Versuche der Antikörper B von PickCell verwendet.

### 3.2.4 Untersuchungen zur Phosphorylierung von DCP1 $\alpha$ *in vitro*

Mit Hilfe von Kinase-Versuchen wurde untersucht, ob DCP1 $\alpha$  ein JNK-Substrat ist und ob es durch JNK an Serin315 phosphoryliert wird.

In Abbildung 24A ist das Ergebnis eines radioaktiven Kinase-Versuchs mit rekombinarem GST-DCP1 $\alpha$  bzw. GST-DCP1 $\alpha$ S315A und immunopräzipitiertem JNK aus unstimulierten sowie aus mit Sorbitol stimulierten HEK293 IL-1R-Zellen dargestellt. Immunopräzipitiertes, aktiviertes, endogenes JNK phosphoryliert sowohl den Wildtyp als auch die Serin-315-Alanin-Mutante von GST-DCP1 $\alpha$ . In den Ansätzen, in denen unstimuliertes JNK immunopräzipitiert wurde, findet keine Phosphorylierung des Wildtyps und der Serin-315-Alanin-Mutante statt. Um auszuschließen, dass die Phosphorylierung auf eine koimmunopräzipitierte Kinase zurückzuführen ist, wurde ein Kinase-Versuch mit immunopräzipitiertem HA-JNK2 und HA-JNK2<sub>K55R</sub> durchgeführt (Abbildung 24B). Zur Stimulation wurde HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> koexprimiert. Sowohl GST-DCP1 $\alpha$  als auch GST-DCP1 $\alpha$ S315A werden nur nach Immunopräzipitation von HA-JNK2 und nicht nach Immunopräzipitation der Kinase-inaktiven Mutante phosphoryliert. Demnach wird DCP1 $\alpha$  durch JNK *in vitro* phosphoryliert.

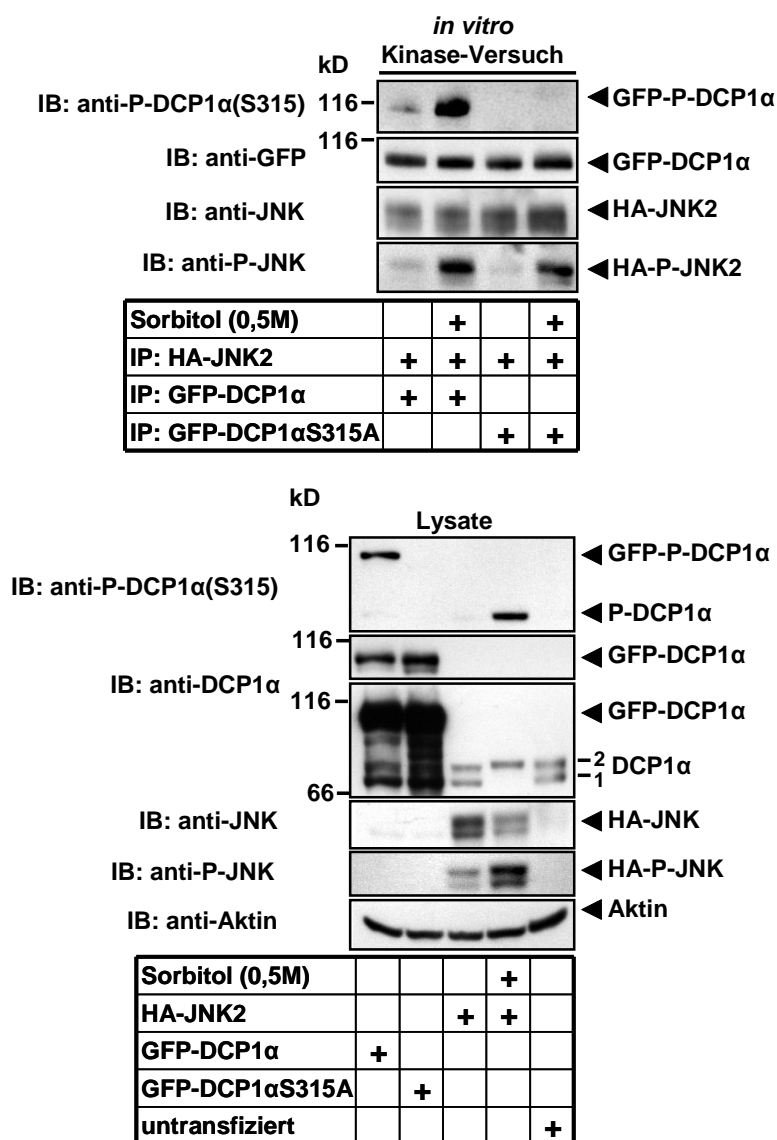


**Abbildung 24:** DCP1α ist ein JNK-Substrat *in vitro*

**A:** Je eine 175cm<sup>2</sup> Flasche mit HEK293 IL-1R-Zellen wurde unstimuliert gelassen oder für 1h mit 0,5M Sorbitol stimuliert. Aus den entsprechenden Zelllysaten wurde JNK immunopräzipitiert und unter Kinase-Versuchs-Reaktionsbedingungen mit <sup>32</sup>P-γ-ATP und GST-c-Jun<sub>1-135</sub>, GST-DCP1α oder GST-DCP1αS315A inkubiert. Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurde deren Phosphorylierungsstatus mittels Autoradiographie des Coomassie-gefärbten, getrockneten Gels detektiert. **B:** Der Kinase-Versuch erfolgte analog zu A, mit dem Unterschied dass immunopräzipitiertes HA-JNK2 und HA-JNK2<sub>K55R</sub> eingesetzt wurden. Zur Stimulation wurde HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> koexprimiert.

Mit dem folgenden Kinase-Versuch wurde der Frage nachgegangen, ob JNK DCP1α an Serin315 phosphorylieren kann. Hierfür wurde aktiviertes und nicht aktiviertes immunopräzipitiertes HA-

JNK2 jeweils mit immunopräzipitiertem GFP-DCP1 $\alpha$  oder mit der entsprechenden immunopräzipitierten Serin-315-Alanin-Mutante unter Kinase-Versuch-Reaktionsbedingungen inkubiert. Die Proteine wurden anschließend in Laemmli-Auftragspuffer eluiert und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion der Phosphorylierung an Serin315 erfolgte im Westernblot mit Hilfe des phosphospezifischen Antikörpers (Abbildung 25).

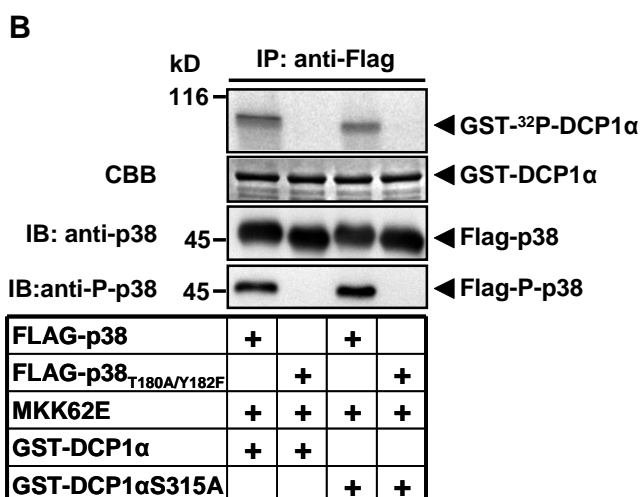
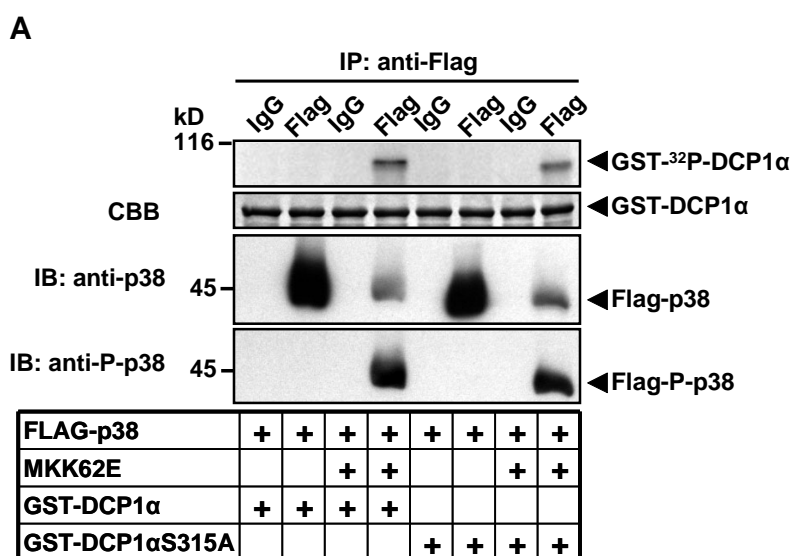


**Abbildung 25: JNK phosphoryliert DCP1 $\alpha$  an Serin315 *in vitro***

Zur Erläuterung siehe Text

Nur in dem Ansatz, der aktiviertes HA-JNK2 und den Wildtyp von GFP-DCP1 $\alpha$  enthält, ist eine induzierte Serin315-Phosphorylierung von GFP-DCP1 $\alpha$  zu beobachten. JNK ist somit in der Lage *in vitro* DCP1 $\alpha$  an Serin315 zu phosphorylieren. Neben Serin315 phosphoryliert JNK *in vitro* noch weitere Aminosäuren in DCP1 $\alpha$ , da nach den Ergebnissen der radioaktiven Kinase-Versuche die Serin-315-Alanin-Mutante noch immer durch JNK phosphoryliert werden kann, auch wenn sie im SDS-Gel etwas schneller läuft (siehe Abbildung 24).

Aus den in Abbildung 26 dargestellten Kinase-Versuchen geht hervor, dass DCP1 $\alpha$  abgesehen von JNK auch durch p38 *in vitro* phosphoryliert wird. Überexprimiertes, durch Koexpression einer konstitutiv aktiven MKK6-Mutante stimuliertes und immunopräzipitiertes p38 phosphoryliert sowohl GST-DCP1 $\alpha$  als auch GST-DCP1 $\alpha$ S315A. Nicht aktiviertes immunopräzipitiertes FLAG-p38 hingegen phosphoryliert weder den Wildtyp noch die Serin-315-Alanin-Mutante von GST-DCP1 $\alpha$  (Abbildung 26A). Der in Abbildung 26B abgebildete Kinase-Versuch zeigt, dass es sich bei der phosphorylierenden Kinase tatsächlich um p38 handelt und nicht um eine mit p38 koimmunopräzipitierte Kinase. Sowohl der Wildtyp als auch die Serin-315-Alanin-Mutante von GST-DCP1 $\alpha$  werden nur durch aktiviertes immunopräzipitiertes FLAG-p38 und nicht durch eine Kinase-inaktive Mutante phosphoryliert.

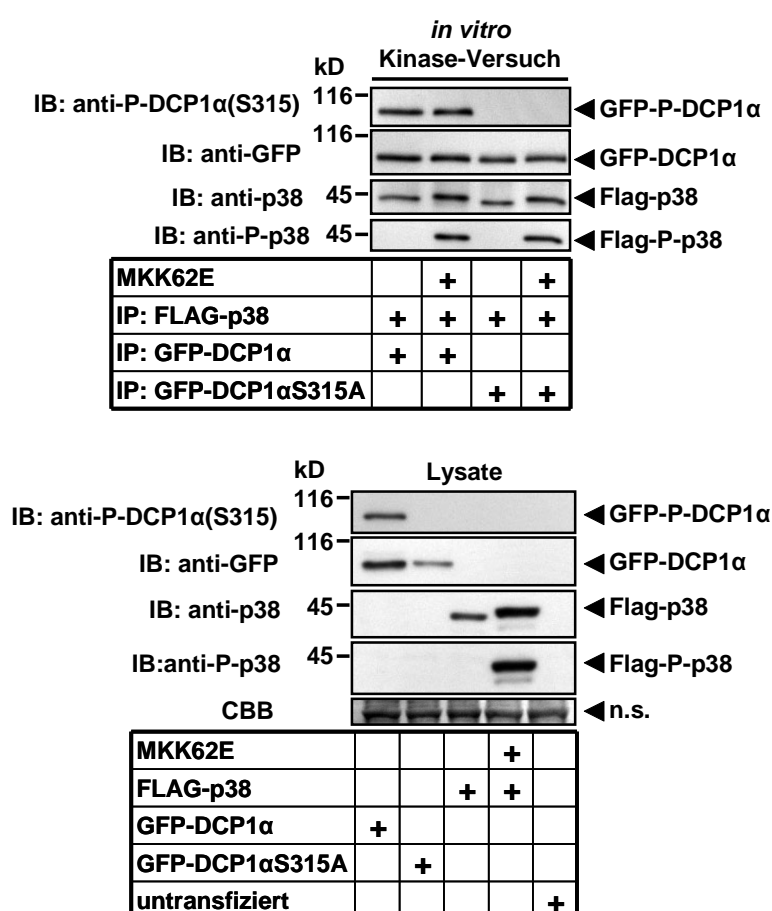


**Abbildung 26:** DCP1 $\alpha$  wird *in vitro* durch p38 phosphoryliert

**A:** Eine 175cm<sup>2</sup> Flasche mit HEK293 IL-1R-Zellen wurde entweder mit dem Expressionsplasmid für FLAG-p38 alleine oder zusammen mit dem Expressionsplasmid für MKK62E transfiziert. Aus den Lysaten wurde FLAG-p38 immunopräzipitiert und unter Kinase-Versuch-Reaktionsbedingungen mit <sup>32</sup>P- $\gamma$ -ATP und GST-DCP1 $\alpha$  oder GST-DCP1 $\alpha$ S315A inkubiert. Die Proteine wurden anschließend in der SDS-PAGE aufgetrennt und ihre

Phosphorylierung mittels Autoradiographie des Coomassie-gefärbten, getrockneten Gels detektiert. **B**: Die Durchführung erfolgte wie unter A beschrieben, jedoch wurde für den Kinase-Versuch immunopräzipitiertes FLAG-p38 sowie FLAG-p38<sup>T180A/Y182F</sup> eingesetzt.

In beiden Kinase-Versuchen kann man beobachten, dass phosphoryliertes GST-DCP1 $\alpha$ S315A ein schnelleres Laufverhalten in der SDS-PAGE aufweist als der entsprechende Wildtyp, was darauf zurückzuführen sein kann, dass p38 DCP1 $\alpha$  ebenfalls an Serin315 phosphoryliert. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die Phosphorylierung von GFP-DCP1 $\alpha$  und von GFP-DCP1 $\alpha$ S315A an Serin315 durch immunopräzipitiertes aktiviertes sowie nicht aktiviertes FLAG-p38 nach erfolgtem Kinase-Versuch mit dem phosphospezifischen Antikörper im Westernblot detektiert (Abbildung 27).



**Abbildung 27:** p38 phosphoryliert DCP1 $\alpha$  nicht an Serin315

Zur Erläuterung siehe Text.

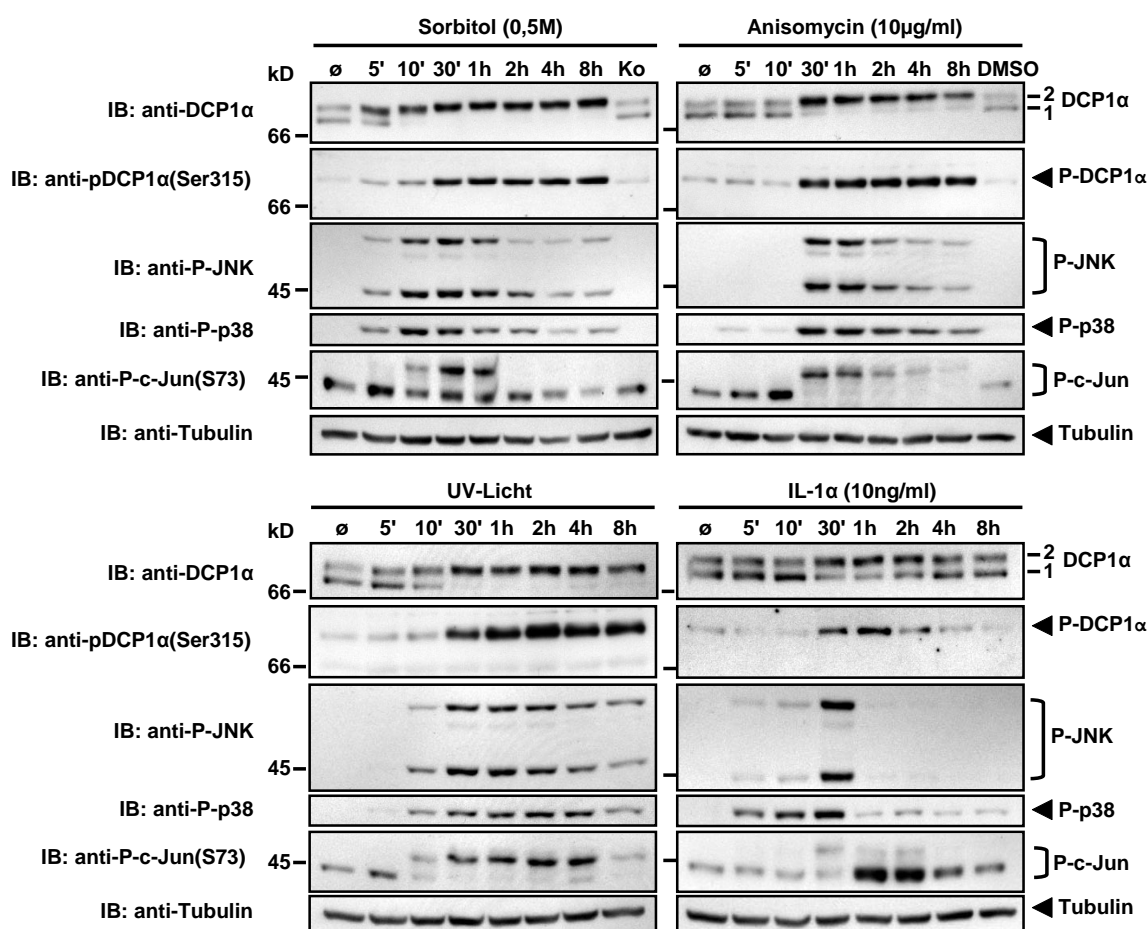
Mit der Serin-315-Alanin-Mutante kann keine Phosphorylierung an Serin315 beobachtet werden, was zu erwarten war. In den Ansätzen, welche den Wildtyp von GFP-DCP1 $\alpha$  enthalten, wird eine konstitutive, aber keine induzierbare Phosphorylierung von Serin315 detektiert. Die konstitutive Phosphorylierung erfolgt jedoch nicht während des Kinase-Versuchs durch FLAG-p38, sondern ist vielmehr schon vorher vorhanden, wie man anhand des Westernblots der Lysate erkennt. Durch die Immunopräzipitation von GFP-DCP1 $\alpha$  wird folglich ebenfalls konstitutiv an



Serin315 phosphoryliertes GFP-DCP1 $\alpha$  koimmunopräzipitiert und daher detektiert. Es kann somit nicht eindeutig gezeigt werden, dass auch p38 DCP1 $\alpha$  an Serin315 phosphoryliert.

### 3.2.5 Einfluss verschiedener Stimuli auf die Serin315-Phosphorylierung und Lokalisation von DCP1 $\alpha$

Im Folgenden wurde die Kinetik der Serin315-Phosphorylierung von endogenem DCP1 $\alpha$  untersucht. Hierfür wurden HEK293 IL-1R-Zellen für unterschiedliche Zeiten mit Sorbitol, Anisomycin, UV-Licht oder IL-1 $\alpha$  stimuliert (Abbildung 28).



**Abbildung 28: Kinetik der Serin315-Phosphorylierung von DCP1 $\alpha$  in Abhängigkeit verschiedener Stimuli**

HEK293 IL-1R-Zellen wurden in Sechs-Loch-Platten ausgesät und am nächsten Tag für die angegebenen Zeiten mit 0,5M Sorbitol, 10 $\mu$ g/ml Anisomycin, 10ng/ml IL-1 $\alpha$  oder UV-Licht stimuliert. Bei der UV-Licht-Stimulation wurden die Zellen für 1min mit UV-Licht bestrahlt und anschließend für die angegebenen Zeiten weiter kultiviert. Die Zellen wurden dann geerntet und lysiert und die Lysate im Westernblot mit den oben aufgeführten Antikörpern untersucht.

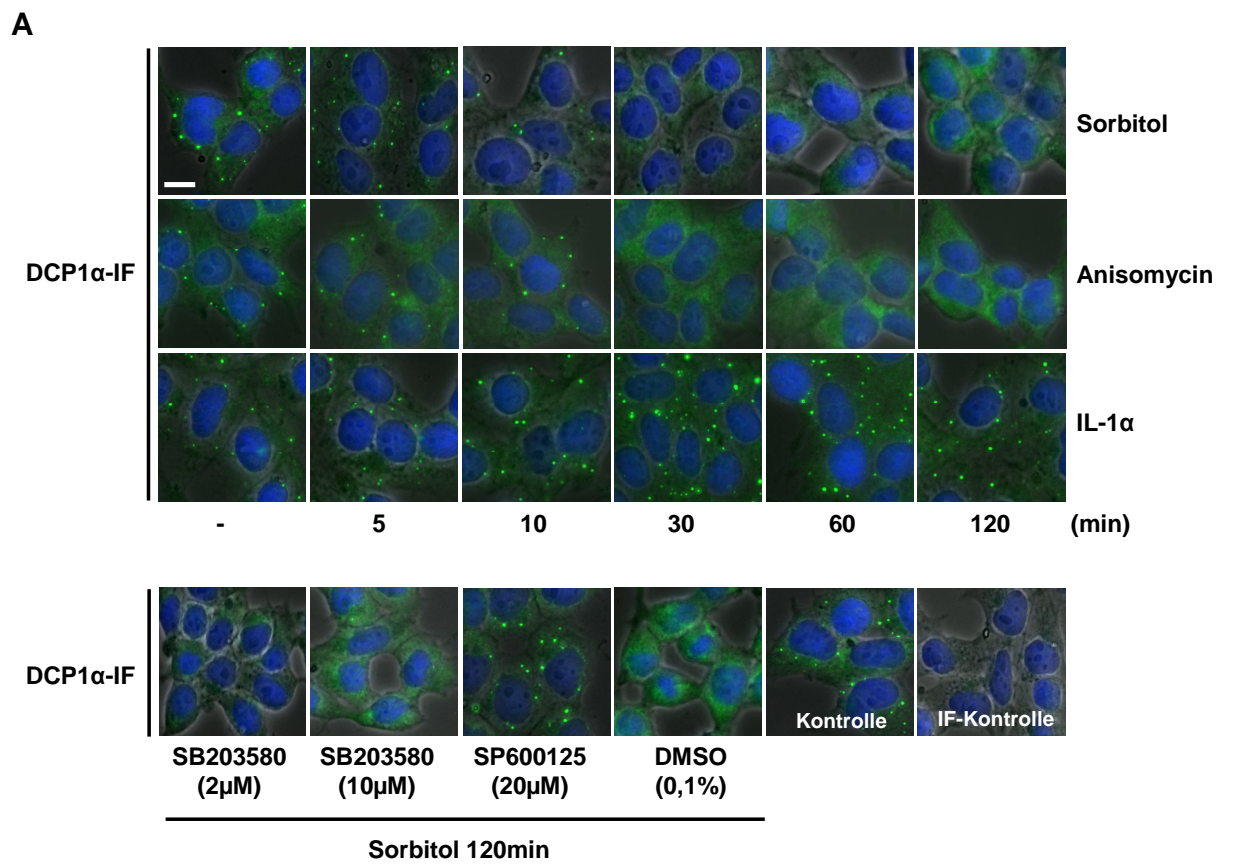
Die Stimuli Sorbitol, UV-Licht und Anisomycin induzieren eine starke Serin315-Phosphorylierung, die mit der Phosphorylierung von JNK und p38 korreliert. Sorbitol bewirkt die stärkste Phosphorylierung an Serin315. Sie ist bereits nach 5min detektierbar und nach 8h immer noch unvermindert vorhanden. Nach Stimulation der Zellen mit Anisomycin oder UV-

Licht ist die induzierte Serin315-Phosphorylierung erst nach 30min detektierbar und wie bei Sorbitol nach 8h immer noch präsent. Im Gegensatz zu den anderen drei Stimuli führt die Behandlung der Zellen mit IL1- $\alpha$  zu einer schwächeren Serin315-Phosphorylierung, erkennbar daran, dass die Mobilitätsform 1 noch deutlich vorhanden ist. Zudem ist die Phosphorylierung transient. Ihre Induktion ist nach 30min messbar und dauert bis zu 2h an. Nach 4h ist keine IL-1 $\alpha$ -induzierte Serin315-Phosphorylierung mehr detektierbar.

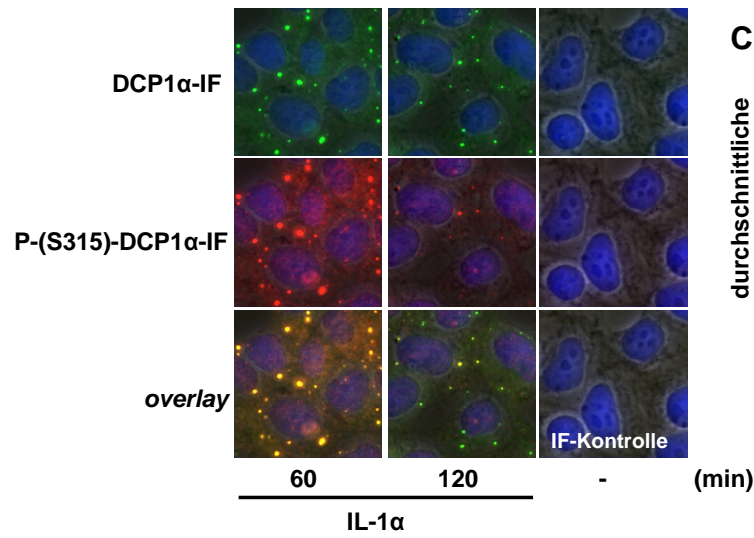
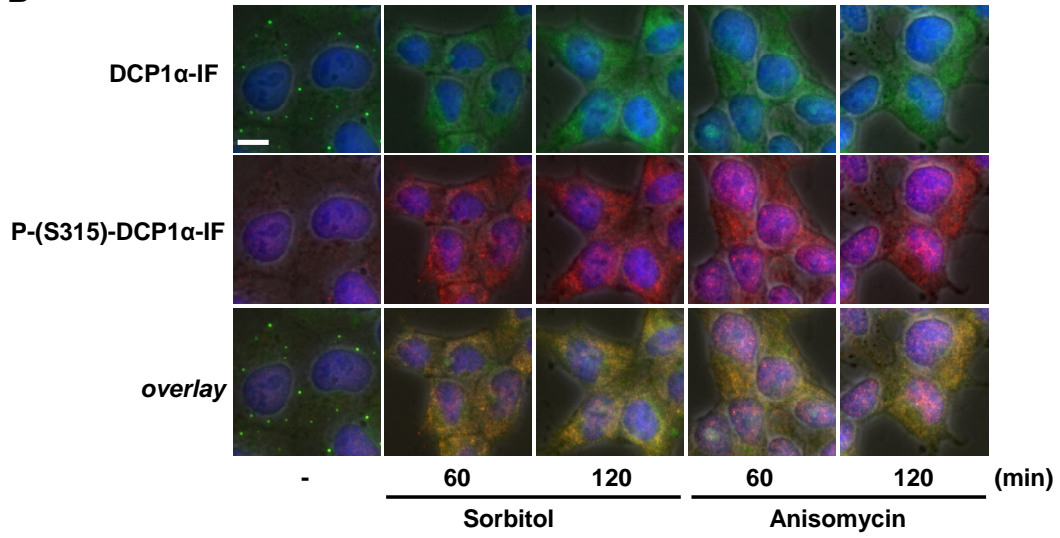
Neben der Analyse im Westernblot wurde zusätzlich mittels indirekter Immunfluoreszenz die Lokalisation von endogenem DCP1 $\alpha$  nach Stimulation von HEK293 IL-1R-Zellen mit Sorbitol, Anisomycin oder IL-1 $\alpha$  untersucht (Abbildung 29).

Die Behandlung der Zellen sowohl mit Sorbitol als auch mit Anisomycin führt zu einer ubiquitären Umverteilung des DCP1 $\alpha$  aus den *P-bodies* ins Zytosol. Die Umverteilung setzt bereits nach fünfminütiger Stimulation ein und ist nach 30min beendet. Sie läuft nach Sorbitol-Stimulation schneller ab als nach Stimulation mit Anisomycin. Dieser Effekt kann durch den JNK-Inhibitor SP600125, jedoch nicht durch den p38-Inhibitor SB203580, nahezu vollständig aufgehoben werden, wie für die Sorbitol-Stimulation dargestellt. Die Behandlung der Zellen mit IL-1 $\alpha$  hat den gegenteiligen Effekt zur Folge. Es kommt zu einer transienten Umverteilung des DCP1 $\alpha$  aus dem Zytosol in die *P-bodies*, deren Anzahl und Größe dadurch zunimmt. Die Zunahme der *P-bodies* ist nach 30min sichtbar und erreicht ihr Maximum bei 1h. Nach 2h nehmen die *P-bodies* bereits wieder ab (Abbildung 29A).

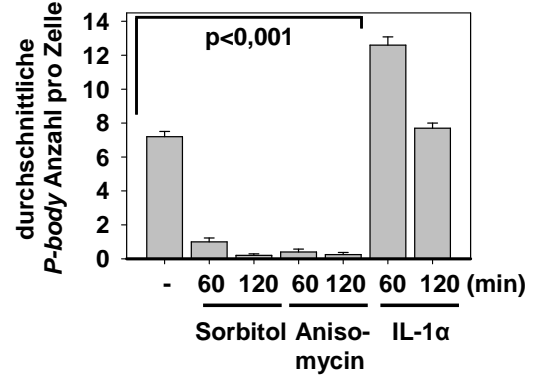
An Serin315 phosphoryliertes DCP1 $\alpha$  ist in unbehandelten Zellen schwach detektierbar und kolokalisiert mit DCP1 $\alpha$  in *P-bodies*. Diese Beobachtung steht mit den Westernblotdaten in Einklang, nach denen endogenes DCP1 $\alpha$  konstitutiv an Serin315 phosphoryliert vorliegt. Nach Stimulation der Zellen mit Anisomycin oder Sorbitol für eine oder zwei Stunden ist P-S315-DCP1 $\alpha$  ebenso wie das DCP1 $\alpha$  diffus im Zytosol verteilt und nicht mehr in *P-bodies* lokalisiert. Im Vergleich zu den unstimulierten Zellen nimmt das P-S315-DCP1 $\alpha$  Signal deutlich zu. Die Zunahme ist nach Sorbitolstimulation etwas stärker als nach Stimulation mit Anisomycin. Die Behandlung der Zellen mit IL-1 $\alpha$  für eine Stunde führt zu einem Anstieg der Phosphorylierung von DCP1 $\alpha$  an Serin315 sowie zu einer Zunahme der phosphorylierten Form im Zytosol, aber vor allem auch in den *P-bodies*. Nach zwei Stunden ist, passend zu den Westernblotergebnissen, eine deutliche Abnahme der Serin-315-Phosphorylierung zu erkennen (Abbildung 29B). Phosphoryliertes DCP1 $\alpha$  kolokalisiert sowohl in unbehandelten als auch in den stimulierten Zellen mit Ago2. Während es keinen mit dem P-DCP1 $\alpha$ -Antikörper markierten *P-body* gibt, der nicht auch Ago2 enthält, gibt es sehr viele andere zelluläre Strukturen, in denen Ago2, aber kein P-DCP1 $\alpha$  lokalisiert ist (Abbildung 29D). Eine Kolokalisation von endogenem DCP1 $\alpha$  mit endogenem Ago2 konnte nicht direkt überprüft werden, da sowohl der DCP1 $\alpha$ - als auch der Ago2-Antikörper aus der Maus stammen und andere in der Immunfluoreszenz zuverlässige Primärantikörper nicht zur Verfügung standen. Da unter den gewählten Reaktionsbedingungen P-DCP1 $\alpha$  immer mit Ago2 und DCP1 $\alpha$  kolokalisiert, ist es jedoch sehr wahrscheinlich, dass auch Ago2 und DCP1 $\alpha$  unter den hier gewählten Bedingungen kolokalisieren.



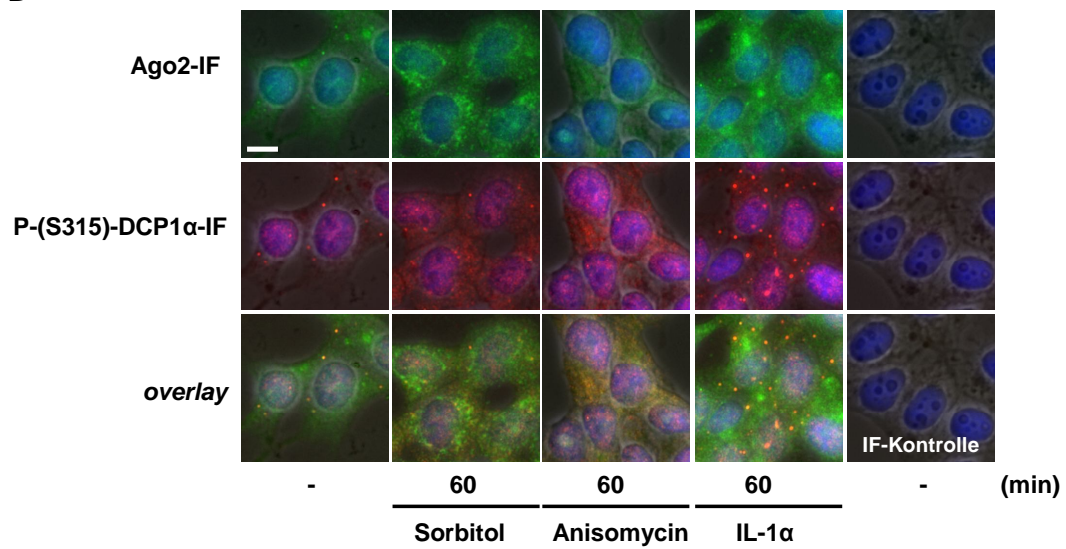
**B**



**C**



**D**



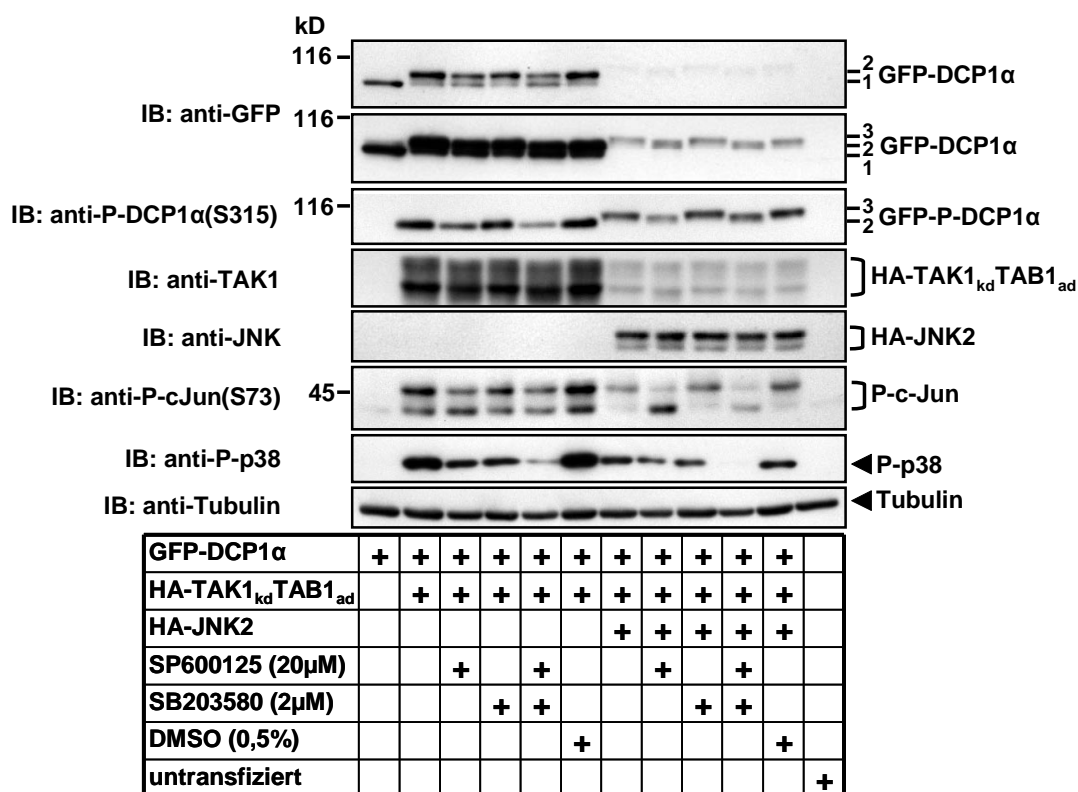
**Abbildung 29: Lokalisation von endogenem DCP1 $\alpha$ , pDCP1 $\alpha$ S315 und Ago2 nach Stimulation mit Sorbitol, Anisomycin oder IL-1 $\alpha$** 

**A:** HEK293 IL-1R-Zellen wurden in  $\mu$ -Slides VI ausgesät und am folgenden Tag für die angegebenen Zeiten mit Sorbitol (0,5M), Anisomycin (10 $\mu$ g/ml) oder IL-1 $\alpha$  (10ng/ml) stimuliert. In den Ansätzen, in denen die Inhibitoren SP600125 (20 $\mu$ M) und SB203580 (2 $\mu$ M und 10 $\mu$ M) eingesetzt wurden, erfolgte vor der 120min Stimulation mit Sorbitol eine Vorinkubation der Zellen mit dem entsprechenden Inhibitor für 30min bei RT. Als Kontrolle wurden die Zellen mit DMSO (0,1%) behandelt. Bei einem weiteren Kontrollansatz wurde wie bei der Sorbitol-Stimulation altes Medium von den Zellen genommen und durch frisches Medium ersetzt, welches allerdings kein Sorbitol enthält. Dadurch sollten Effekte, die auf den bloßen Mediumwechsel zurückzuführen sind, ausgeschlossen werden. Anschließend wurde eine indirekte Immunfluoreszenz für DCP1 $\alpha$  durchgeführt. **B:** HEK293 IL-1R-Zellen wurden analog zu A behandelt. Es wurde eine Doppelimmunfluoreszenz für DCP1 $\alpha$  und pDCP1 $\alpha$ S315 durchgeführt. **C:** Quantifizierung der *P-bodies* aus den Zellen des unter B aufgeführten Versuchs. Dargestellt ist die durchschnittliche *P-body*-Anzahl pro Zelle ( $\pm$ S.E.M.). **D:** wie A und B. Die Doppelimmunfluoreszenz erfolgte für Ago2 und pDCP1 $\alpha$ S315. Balken: 10 $\mu$ m.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung von DCP1 $\alpha$  seine Lokalisation in der Zelle beeinflusst.

Obwohl *in vitro* sowohl JNK als auch p38 rekombinantes GST-DCP1 $\alpha$  phosphorylieren können, führt nur die Inhibierung von JNK, jedoch nicht die von p38 zu einer Inhibierung der Umverteilung von DCP1 $\alpha$  aus den *P-bodies* ins Zytosol nach Sorbitol-Stimulation.

Diese Beobachtung steht im Einklang mit den in Abbildung 30 dargestellten Westernblotergebnissen. Die Phosphorylierung von überexprimiertem DCP1 $\alpha$  wird nach Koexpression von HA-TAK<sub>kd</sub>TAB<sub>ad</sub> oder HA-TAK<sub>kd</sub>TAB<sub>ad</sub> und HA-JNK2 durch den JNK-Inhibitor, aber nicht durch den p38-Inhibitor gehemmt. Dies lässt sich sowohl am veränderten Laufverhalten von GFP-DCP1 $\alpha$  als auch mit Hilfe des phosphospezifischen Antikörpers erkennen.

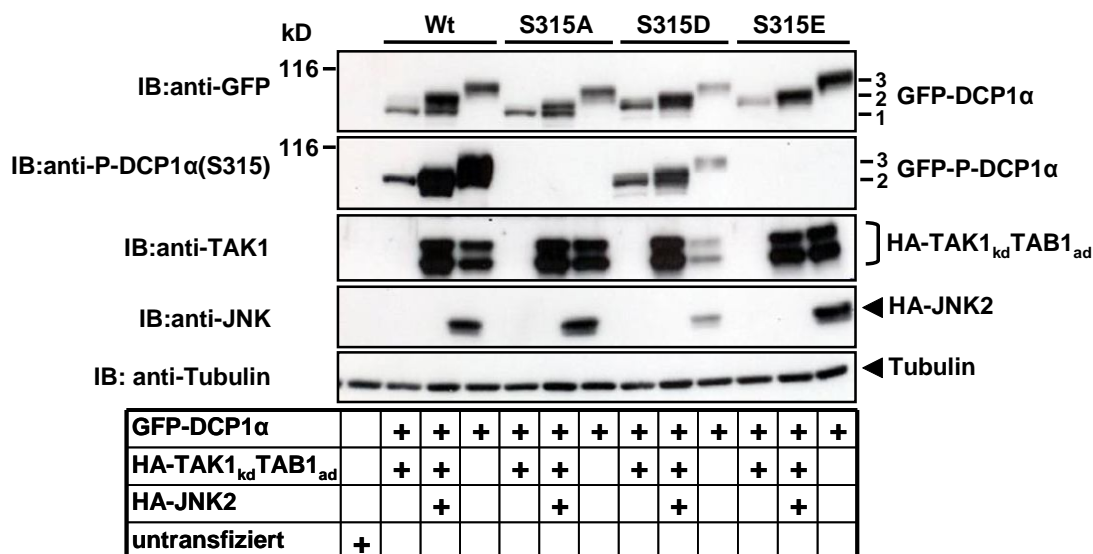


**Abbildung 30: Hemmung der Phosphorylierung von GFP-DCP1 $\alpha$  an Serin315 mit SP600125**

In 6-Loch-Platten ausgesäte HEK293 IL-1R-Zellen wurden mit pEGFPDCP1 $\alpha$  alleine oder zusammen mit pCDNA3HATAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> oder zusammen mit pCDNA3HATAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> und pEVRFHOAJNK2 transfiziert. Hierbei wurden von jedem Plasmid pro 6-Loch 2,5 $\mu$ g eingesetzt. Die Menge an Gesamt-DNA wurde mit pCS3MT auf 7,5 $\mu$ g eingestellt. Die Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren erfolgte in den entsprechenden Ansätzen für 30min. Nach der Lyse der Zellen wurden die Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt und dann im Westernblot mit den aufgeführten Antikörpern untersucht.

### 3.2.6 Untersuchung zum Beitrag der Serin315-Phosphorylierung an der Lokalisation von DCP1 $\alpha$

Es wurde überprüft, inwieweit die Phosphorylierung von DCP1 $\alpha$  an Serin315 die Proteinlokalisierung beeinflusst. Hierfür wurden HEK293 IL-1R-Zellen stabil mit den Expressionsplasmiden für GFP-DCP1 $\alpha$ , für die Serin-315-Alanin-Mutante sowie für die phosphomimetischen Mutanten GFP-DCP1 $\alpha$ S315D und GFPDCP1 $\alpha$ S315E transfiziert. Zusätzlich wurde das Plasmid für die C-terminale Deletionsmutante von GFP-DCP1 $\alpha$  stabil transfiziert. Es wurde *pools* an stabil transfizierten Zellen hergestellt und untersucht. Die Lokalisation der GFP-getaggen Mutanten wurde anschließend mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie detektiert. Zunächst wurden allerdings die phosphomimetischen Mutanten im Westernblot analysiert (Abbildung 31).



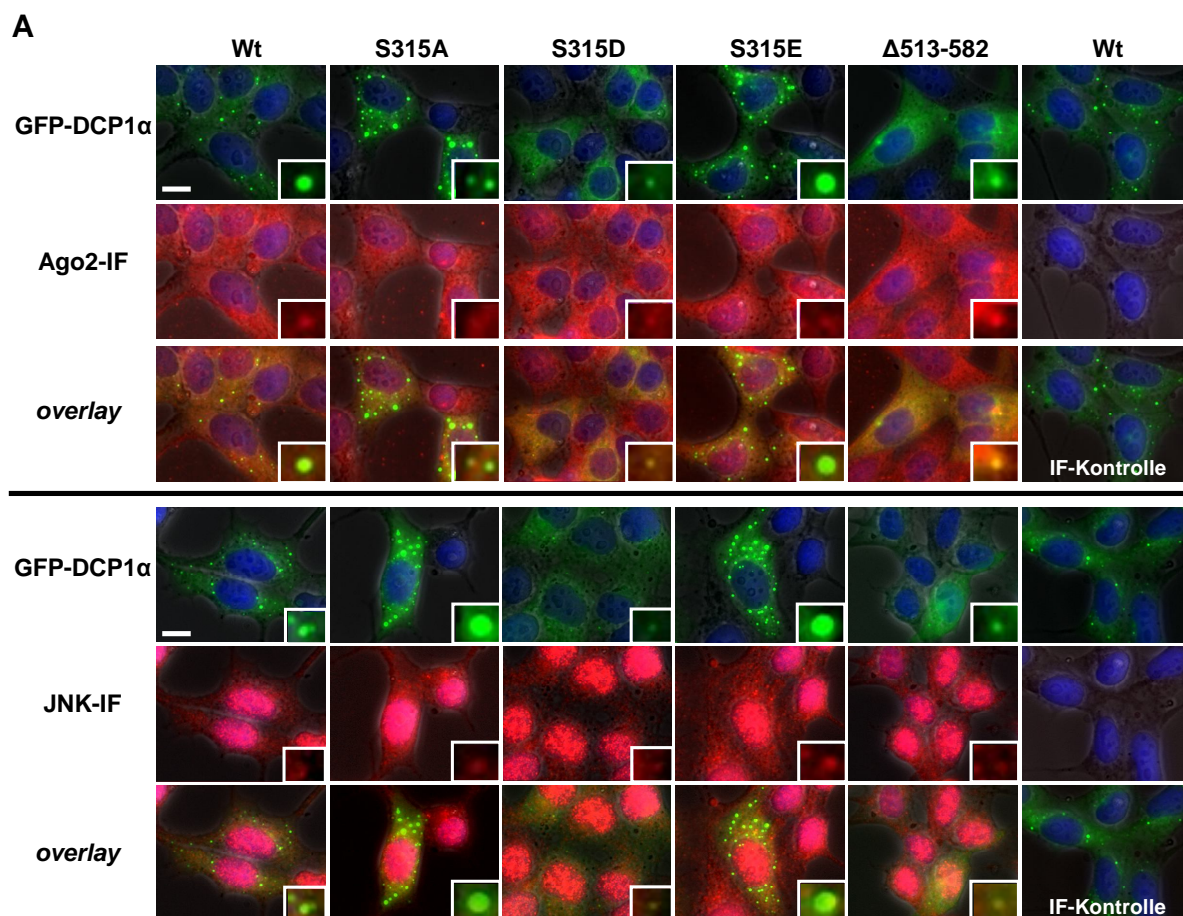
**Abbildung 31: Untersuchung des Laufverhaltens der phosphomimetischen Mutanten GFP-DCP1 $\alpha$ S315D und GFP-DCP1 $\alpha$ S315E in der SDS-PAGE.**

HEK293 IL-1R-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit peGFP-DCP1 $\alpha$ , peGFP-DCP1 $\alpha$ S315A, peGFP-DCP1 $\alpha$ S315D oder peGFP-DCP1 $\alpha$ S315E transfiziert. Je nach Ansatz wurden pCDNA3HATAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> oder pCDNA3HATAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> und pEVRF0HAJNK2 kotransfiziert. In jedes 6-Loch wurden pro Plasmid 2,5 $\mu$ g transfiziert und die Gesamt-DNA-Menge mit pCS3MT auf 7,5 $\mu$ g eingestellt. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Lysate im Westernblot analysiert.

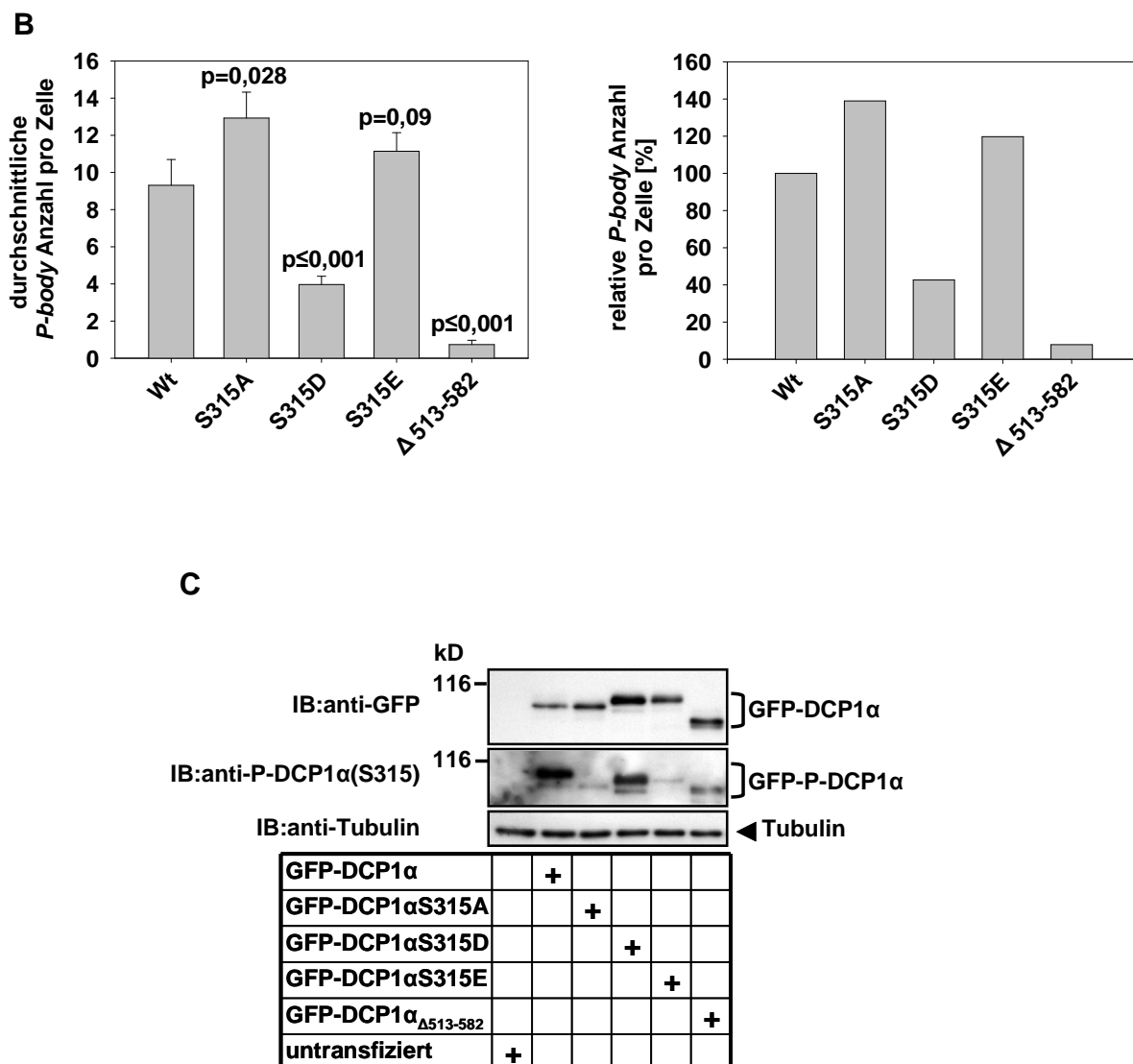
Beide phosphomimetische Mutanten weisen in der SDS-PAGE eine etwas langsamere Laufgeschwindigkeit auf als der Wildtyp von GFP-DCP1 $\alpha$ . Die daraus resultierende Mobilitätsform liegt zwischen den Mobilitätsformen 1 und 2 des Wildtyps. Nach Koexpression von HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> alleine oder zusammen mit HA-JNK2 wird wie beim Wildtyp die Mobilitätsform 2 bzw. 3 induziert. Der phosphospezifische Antikörper gegen S315 erkennt nicht die Serin-315-Glutamat-Mutante, während er die Serin-315-Aspartat-Mutante detektieren kann. Allerdings erkennt er die durch die Aspartat-Substitution vorgetäuschte Phosphorylierung schwächer als die durch Überexpression von HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> oder von HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> und HA-JNK2 induzierte Serin315-Phosphorylierung von GFP-DCP1 $\alpha$ .

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ergaben im Vergleich zum Wildtyp mit der Serin-315-Alanin-Mutante eine Zunahme der *P-body*-Anzahl und -Größe. Die Zunahme der Anzahl der *P-bodies* liegt bei etwa 39%. Die Lokalisation der phosphomimetischen Serin-315-Aspartat-Mutante in den *P-bodies* ist um 57% vermindert. GFP-DCP1 $\alpha$ S315D befindet sich verstärkt im Zytosol, welches dadurch grüner fluoresziert. Die phosphomimetische Serin-315-Glutamat-Mutante hingegen zeigt eine leichte Zunahme der *P-bodies* um 19% und unterscheidet sich nicht signifikant vom Wildtyp. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die Serin-315-Glutamat-Mutante nicht durch den phosphospezifischen Antikörper gegen Serin315 erkannt wird, was darauf hindeutet, dass sie dem an Serin315 phosphorylierten GFP-DCP1 $\alpha$  nicht sehr ähnlich ist. Die C-terminale Deletionsmutante ist wie die Serin-315-

Aspartat-Mutante überwiegend im Zytosol lokalisiert. Allerdings ist die Abnahme der *P-body*-Anzahl mit 92% deutlich höher als bei der Serin-315-Aspartat-Mutante (Abbildung 32A/B). Vor kurzem konnten Tritschler et al. zeigen, dass die Aminosäuren 539-582 von DCP1 $\alpha$  wichtig für die Trimerisierung und *P-body*-Lokalisation von DCP1 $\alpha$  sowie für die Interaktion mit anderen *Decapping*-Faktoren und für seine regulatorische Funktion wichtig sind (Tritschler et al., 2009). Die durchschnittliche *P-body*-Anzahl des stabil überexprimierten Wildtyps, unterscheidet sich nicht wesentlich von der Anzahl der *P-bodies*, welche man mit endogenem DCP1 $\alpha$  beobachten kann (siehe Abbildung 29C). Alle GFP-DCP1 $\alpha$ -Proteine sind gleichmäßig exprimiert (Abbildung 32C), so dass die Änderung der *P-body*-Anzahl auf die jeweilige Mutation zurückzuführen ist. Im Westernblot unter Abbildung 32C ist die konstitutive Phosphorylierung von GFP-DCP1 $\alpha$  sowie von GFP-DCP1 $\alpha_{\Delta 513-582}$  an Serin315 gezeigt, welche mühelos durch den phosphospezifischen Antikörper erkannt wird. Die dazugehörige GFP-DCP1 $\alpha$ - bzw. GFP-DCP1 $\alpha_{\Delta 513-582}$ -Bande kann vom GFP-Antikörper nicht detektiert werden. Unter allen Reaktionsbedingungen ist sowohl eine Kolo-kalisation zwischen den *P-bodies* und endogenem JNK, als auch zwischen den *P-bodies* und endogenem Ago2 zu beobachten. Die *P-bodies* liegen aber auch zum Teil direkt neben den rundlichen zytoplasmatischen Strukturen, in denen sich Ago2 bzw. JNK befinden oder überlappen mit diesen.







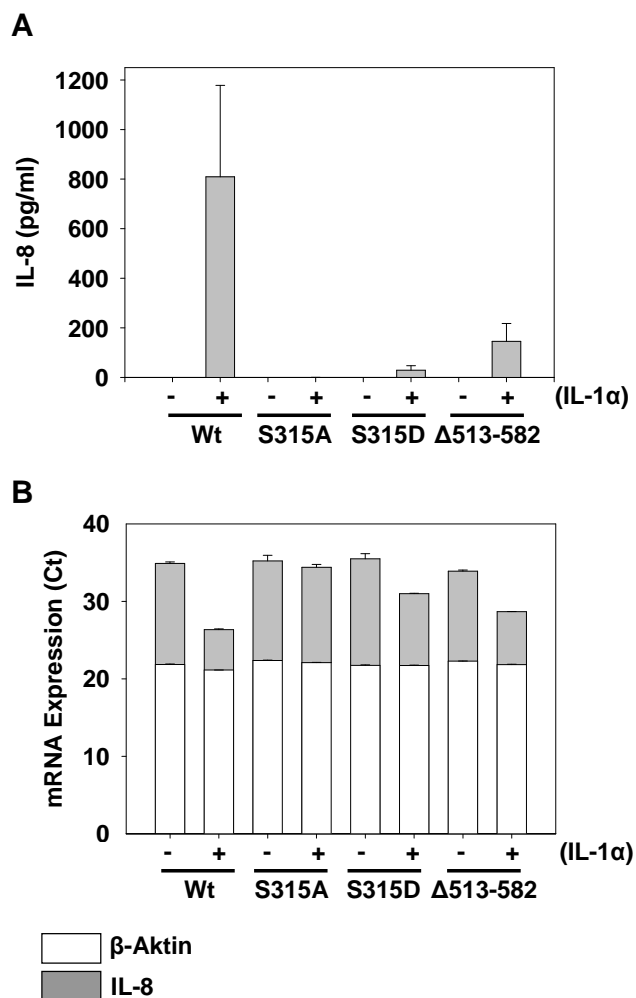
**Abbildung 32: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Lokalisation von GFP-DCP1 $\alpha$ , GFP-DCP1 $\alpha$ S315A, GFP-DCP1 $\alpha$ S315D, GFP-DCP1 $\alpha$ S315E und GFP-DCP1 $\alpha$ <sub>Δ513-582</sub>**

**A:** HEK293 IL-1R-Zellen, die mit dem Expressionsplasmid für die jeweilige GFP-DCP1 $\alpha$ -Mutante stabil transfiziert waren, wurden in  $\mu$ -Slides IV ausgesät und am folgenden Tag wurde eine indirekte Immunfluoreszenz für Ago2 bzw. JNK durchgeführt. Balken: 10 $\mu$ m **B:** Aus zwei unabhängigen stabilen Transfektionen wurden die *P-bodies* aus durchschnittlich 300 Zellen gezählt und daraus die durchschnittliche *P-body*-Anzahl pro Zelle berechnet. Der Fehler ( $\pm$  S.E.M.) ergibt sich aus der durchschnittlichen *P-body* Anzahl/pro Zelle für verschiedene Gesichtsfelder. Im Balkendiagramm rechts ist die relative *P-body*-Anzahl pro Zelle dargestellt. **C:** Die Lysate der stabil transfizierten Zellen wurden auf eine gleichmäßige Expression der GFP-DCP1 $\alpha$ -Proteine hin im Westernblot überprüft.

Geht man davon aus, dass die Serin-315-Glutamat-Mutante keine richtige phosphomimetische Mutante darstellt, so belegen diese Ergebnisse, dass die Phosphorylierung von DCP1 $\alpha$  an Serin315 einen bedeutenden Anteil zur Lokalisation des Proteins in der Zelle beiträgt.

### 3.2.7 Analyse der IL-1 $\alpha$ -induzierten IL-8-Expression und -Sekretion in den stabil mit GFP-DCP1 $\alpha$ -Konstrukten transfizierten Zellen

Um zu untersuchen, ob die Umverteilung von DCP1 $\alpha$  einen Effekt auf die Expression IL-1 $\alpha$ -induzierbarer Gene hat, wurde in den stabil transfizierten HEK293 IL-1R-Zellen, die entweder GFP-DCP1 $\alpha$ , GFP-DCP1 $\alpha$ S315A, GFP-DCP1 $\alpha$ S315D oder GFP-DCP1 $\alpha$  $\Delta$ 513-582 exprimieren, exemplarisch die Transkription und Sekretion des chemotaktischen Zytokins IL-8 nach IL-1 $\alpha$ -Stimulation untersucht (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Untersuchung zur IL-1 $\alpha$ -induzierten IL-8-Expression in den stabil mit den Konstrukten für GFP-DCP1 $\alpha$ , GFP-DCP1 $\alpha$ S315A, GFP-DCP1 $\alpha$ S315D und GFP-DCP1 $\alpha$  $\Delta$ 513-582 transfizierten HEK293 IL-1R-Zellen**

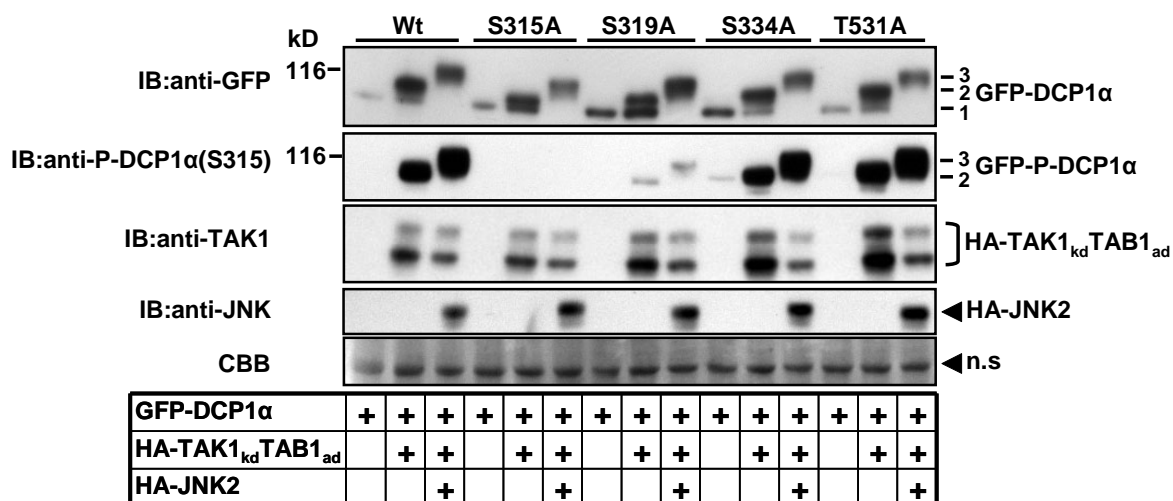
**A:** Die mit den aufgeführten Konstrukten stabil transfizierten HEK293 IL-1R-Zellen wurden für 8h Stunden mit 10ng/ml IL-1 $\alpha$  stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die Messung der IL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand erfolgte im ELISA wie beschrieben. Die dargestellten IL-8-Konzentrationen sind auf 1mg Protein normiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten ( $\pm$  S.E.M.). **B:** Die Zellen wurden wie in A behandelt. Aus den Zellen wurde mRNA isoliert und die IL-8- und  $\beta$ -Aktin-Expression mittels Real Time PCR analysiert. Dargestellt sind die Ct-Werte, welche ein Maß für die mRNA-Expression sind. Der Ct-Wert beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Je niedriger dieser ist, desto

höher ist demnach die mRNA-Menge. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis. Der Fehlerbalken ( $\pm$  S.E.M.) ergibt sich aus zwei technischen Replikaten.

Bei keiner der verwendeten Zellen ist eine basale IL-8-Sekretion messbar, aber eine basale IL-8 mRNA-Expression ist eindeutig nachweisbar, wenn auch in wesentlich geringerer Kopienzahl als der für das *house keeping* Gen  $\beta$ -Aktin. Nach IL-1 $\alpha$ -Stimulation zeigen alle Zellen, welche Mutanten von GFP-DCP1 $\alpha$  exprimieren, unabhängig von der eingeführten Mutation eine zum Wildtyp verminderte IL-8-Sekretion. Dieser Effekt ist nicht nur translational, denn in diesen Zellen ist nach Stimulation mit IL-1 $\alpha$  auch die induzierte IL-8-mRNA-Menge deutlich vermindert.

### 3.2.8 Identifizierung weiterer JNK-abhängig modifizierter Aminosäuren in DCP1 $\alpha$

Wie bereits in Abbildung 22B/C dargestellt, wird der nach Überexpression von HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> erhaltene Mobilitäts-*shift* von GFP-DCP1 $\alpha$  von der Mobilitätsform 1 auf die Mobilitätsform 2 durch die Mutation von Serin315 zu Alanin nicht vollständig aufgehoben, sondern lediglich vermindert. Ebenso weisen die phosphomimetischen Mutanten, wenn sie alleine exprimiert werden (Abbildung 31), nicht die Mobilitätsform 2 auf, sondern eine etwas schneller laufende, die zwischen den Mobilitätsformen 1 und 2 liegt. Es müssen daher noch andere Aminosäuren in DCP1 $\alpha$  vorhanden sein, durch deren Modifikation sich das Laufverhalten von DCP1 $\alpha$  in der SDS-PAGE ändert. Um diese Aminosäuren zu identifizieren, wurden weitere Serine und Threonine in GFP-DCP1 $\alpha$  zu Alanin mutiert und das Laufverhalten der Mutanten im Westernblot analysiert (Abbildung 34). Zu diesem Zeitpunkt der Arbeit waren in PhosphoSitePlus zehn Serine bzw. Threonine publiziert, welche in DCP1 $\alpha$  phosphoryliert werden. Sieben dieser Aminosäuren (S142, S315, S353, T401, S522, S523, S525) wurden bereits beim ersten Versuch eine Aminosäure zu identifizieren, deren JNK-abhängige Modifikation zu einem veränderten Laufverhalten des Proteins im Westernblot führt, zu Alanin mutiert (siehe Abschnitt 3.2.3). Von den Mutanten wies, bis auf die Serin-315-Alanin-Mutante keine eine veränderte Laufgeschwindigkeit in der SDS-PAGE auf. Die restlichen Aminosäuren werden somit unter den hier gewählten Stimulationsbedingungen entweder nicht phosphoryliert oder ihre Phosphorylierung hat keinen Einfluss auf die Mobilität von DCP1 $\alpha$  in der SDS-PAGE. Die nähere Analyse der Phosphorylierung dieser Aminosäuren war daher zunächst von untergeordnetem Interesse. Bei den drei anderen Aminosäuren, die erst im Rahmen dieser zweiten Untersuchung berücksichtigt wurden, handelt es sich um Serin319, Serin334 und Threonin531. Auf Serin319 und auf Threonin531 folgt unmittelbar C-terminal ein Prolin. Die Sequenz entspricht somit der minimalen Konsensussequenz für die Phosphorylierung durch eine MAP-Kinase. Sie wurden allerdings im Zuge der ersten Analyse nicht mutiert, da der durch NetPhos ermittelte Schwellenwert ihrer potentiellen Phosphorylierung unter 0,5 lag.



**Abbildung 34: Identifizierung von Serin319 als weitere potentielle Phosphorylierungsstelle in DCP1α**

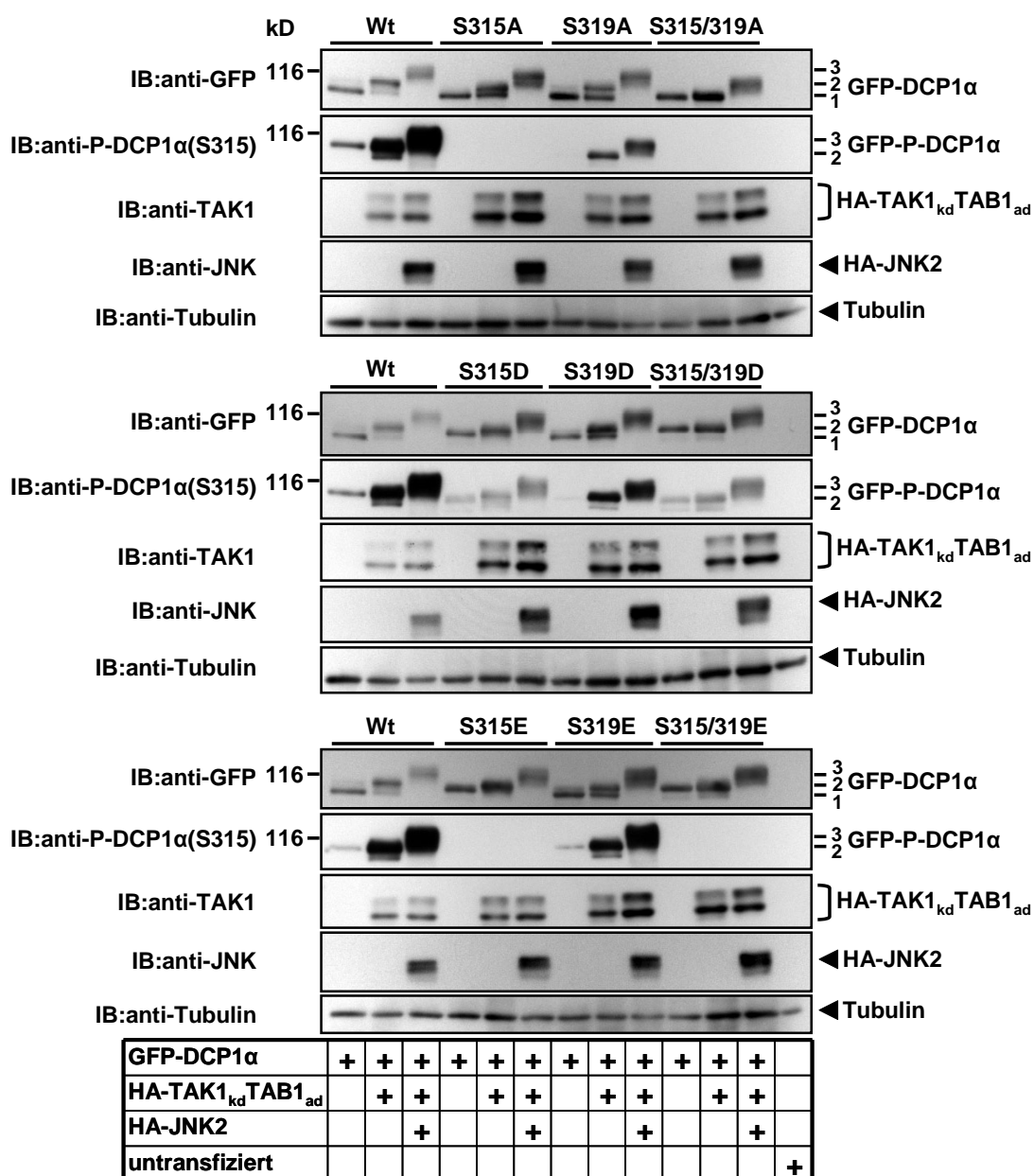
HEK293 IL-1R-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und am Folgetag mit den Expressionsplasmiden für die angegebenen GFP-DCP1α-Proteine alleine oder zusammen mit dem Expressionsplasmid für HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> oder zusammen mit den Expressionsplasmiden für HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> und HA-JNK2 transfiziert. Pro-6-Loch wurden von jedem Plasmid 2,5µg eingesetzt. Die Gesamt-DNA-Menge wurde mit pCS3MT auf 7,5µg eingestellt. Die Lysate der Zellen wurden hinsichtlich des Laufverhaltens der DCP1α-Proteine im Westernblot untersucht.

Sowohl die Serin-334-Alanin-Mutante als auch die Threonin-531-Alanin-Mutante zeigen kein im Vergleich zum Wildtyp verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE. Nach Überexpression von HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> wird bei der Serin-319-Alanin-Mutante wie beim Wildtyp die Mobilitätsform 2 induziert, welche neben der Mobilitätsform 1 vorliegt. Allerdings ist bei der Serin-319-Alanin-Mutante das Verhältnis zwischen Mobilitätsform 1 und 2 verändert. Während beim Wildtyp neben der Mobilitätsform 1 überwiegend die Mobilitätsform 2 vorliegt, sind bei der Serin-319-Alanin-Mutante beide Mobilitätsformen gleich stark vertreten. Die Mobilitätsform 3 bleibt durch die Mutation von Serin319 unbeeinflusst. Mit Serin319 konnte somit eine weitere Aminosäure identifiziert werden, die JNK-abhängig modifiziert wird und so das Laufverhalten von DCP1α in der SDS-PAGE ändert. Interessant ist, dass die induzierte Serin315-Phosphorylierung von GFP-DCP1αS319A wesentlich schwächer durch den phosphospezifischen Antikörper detektiert wird, als die induzierte Serin315-Phosphorylierung vom Wildtyp sowie von GFP-DCP1αS334A und GFP-DCP1αT531A. Dafür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zum einen ist es vorstellbar, dass die Phosphorylierung an Serin315 die Modifikation an Serin319 erfordert. Durch die Alanin-Substitution kann Serin319 nicht mehr modifiziert werden, was dazu führt, dass Serin315 schwächer phosphoryliert wird. Zum anderen ist denkbar, dass die Mutation von Serin319 eine Konformationsänderung des Proteins nach sich zieht, so dass die Serin315-Phosphorylierung trotz gleichem Phosphorylierungsstatus schwächer durch den phosphospezifischen Antikörper detektiert wird.

Um zu überprüfen, wie stark die Modifikation an Serin319 zur Mobilitätsform 2 von GFP-DCP1α in der SDS-PAGE beiträgt, wurden von GFP-DCP1α-Doppelmutanten generiert, in denen Serin315 und Serin319 entweder durch Alanin, durch Aspartat oder durch Glutamat

ersetzt wurden. Zusätzlich wurden Einfachmutanten hergestellt, in denen das Serin319 entweder durch Aspartat oder durch Glutamat substituiert wurde. Das Laufverhalten der Mutanten wurde erneut in der SDS-PAGE analysiert (Abbildung 35). Der Mobilitäts-*shift*, der beim Wildtyp normalerweise nach Koexpression von HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> zu beobachten ist, wird durch die Mutation beider Aminosäuren zu Alanin komplett aufgehoben. Ebenso wird der Mobilitäts-*shift* auf die Mobilitätsform 3 vermindert. Die Modifikation an Serin319 hat somit neben der Serin315-Phosphorylierung einen Anteil an den in der SDS-PAGE auftretenden Mobilitäts-*shifts*. Anders als die phosphomimetischen Serin-315-Mutanten weist weder die Serin-319-Aspartat-Mutante noch die Serin-319-Glutamat-Mutante ein zum Wildtyp verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE auf, wenn sie alleine exprimiert wird. Nach Koexpression von HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> kann bei beiden Mutanten neben der Mobilitätsform 1 auch die Induktion der Mobilitätsform 2 beobachtet werden. Die Mobilitätsform 1 liegt hierbei im Vergleich zum Wildtyp verstärkt vor. Bei beiden phosphomimetischen Serin-319-Mutanten ist die Mobilitätsform 3 nach Überexpression von HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> und HA-JNK2 unverändert. Die Mutation beider Serine zu Aspartat oder zu Glutamat führt zu einer noch schnelleren Laufgeschwindigkeit der Mutanten, als sie bei den entsprechenden Serin-315-Mutanten beobachtet werden kann und resultiert in der Mobilitätsform 2. Die beiden phosphomimetischen Doppelmutanten verhalten sich in der SDS-PAGE demnach so, wie der nach Überexpression von HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> aktivierte Wildtyp. Diese Ergebnisse deuten daher darauf hin, dass es sich bei der Modifikation an Serin319 sehr wahrscheinlich um eine Phosphorylierung handelt. Diese Annahme sollte jedoch mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers bestätigt werden.

Wie bereits in Abbildung 34 gezeigt, wird auch hier die Serin315-Phosphorylierung schwächer vom Antikörper detektiert, wenn Serin319 zu Alanin mutiert ist. Dieser Effekt wird komplett aufgehoben, wenn Serin319 zu Alanin anstatt zu Glutamat mutiert wird und er wird partiell aufgehoben, wenn es zu Aspartat mutiert wird. Die verminderte Detektion der Serin315-Phosphorylierung von GFP-DCP1 $\alpha$ S319A ist somit eher darauf zurückzuführen, dass das Serin315 aufgrund der fehlenden Modifikation an Serin319 schwächer phosphoryliert vorliegt und weniger darauf, dass die Phosphorylierung konformationsbedingt nur schwächer erkannt wird.



**Abbildung 35: Untersuchung des Laufverhaltens von GFP-DCP1 $\alpha$ -Mutanten in der SDS-PAGE**

In 6-Loch-Platten ausgesäte HEK293 IL-1R-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für die verschiedenen GFP-DCP1 $\alpha$ -Proteine transfiziert. Je nach Ansatz wurde das Expressionsplasmid für HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> oder die Expressionsplasmide für HA-TAK1<sub>kd</sub>TAB1<sub>ad</sub> und HA-JNK2 kotransfiziert. Pro 6-Loch wurden von jedem Plasmid 2,5 $\mu$ g eingesetzt. Die mit pCS3MT eingestellte Gesamtmenge an DNA betrug 7,5 $\mu$ g. Nach der Lyse der Zellen wurde das Laufverhalten der GFP-DCP1 $\alpha$ -Mutanten sowie ihre Serin315-Phosphorylierung im Westernblot untersucht.

### 3.2.9 Einfluss der posttranslationalen Modifikation an Serin319 auf die Lokalisation von DCP1 $\alpha$

Die Lokalisation der Serin-319-Alanin- und der Serin-319-Aspartat-Mutante sowie der entsprechenden Serin-315/319-Doppelmutanten wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie

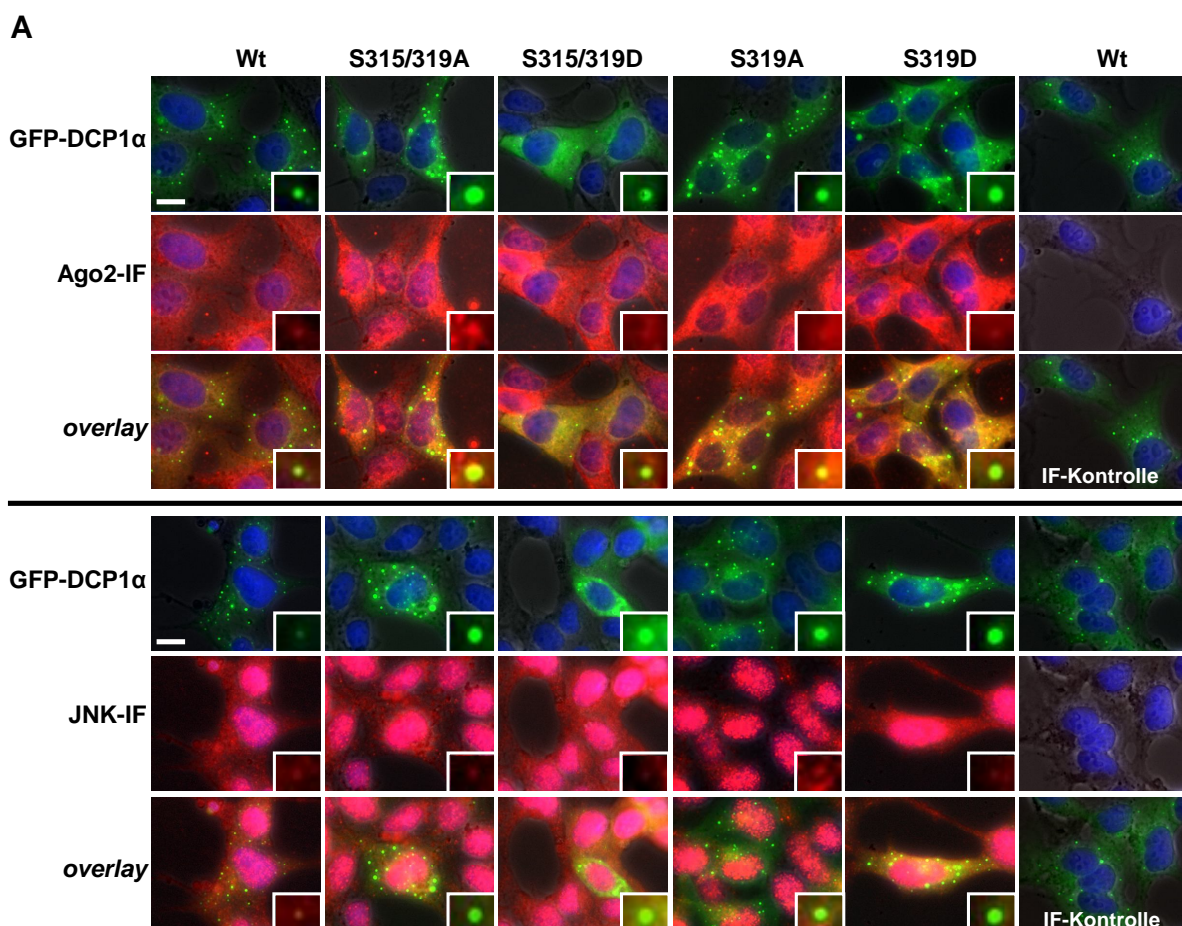
untersucht. Hierfür wurden HEK293 IL-1R-Zellen mit dem für die jeweilige Mutante kodierenden Plasmid stabil transfiziert.

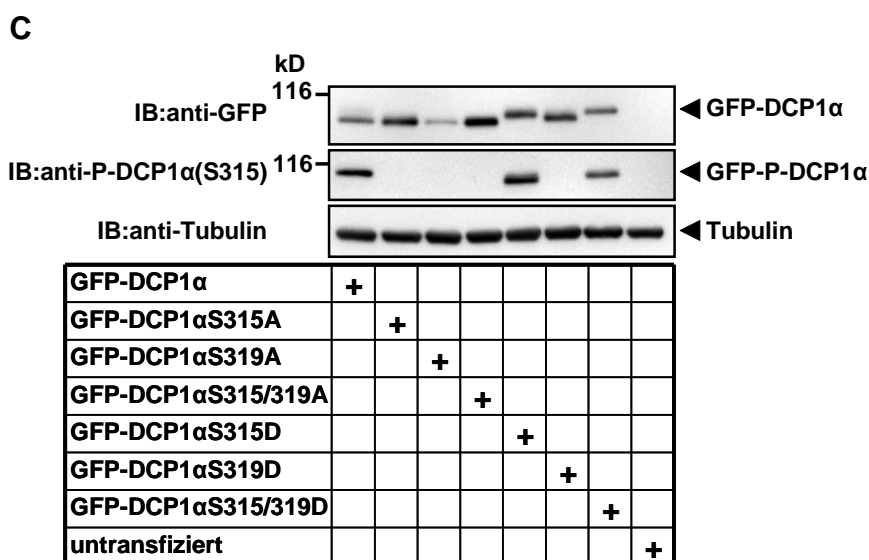
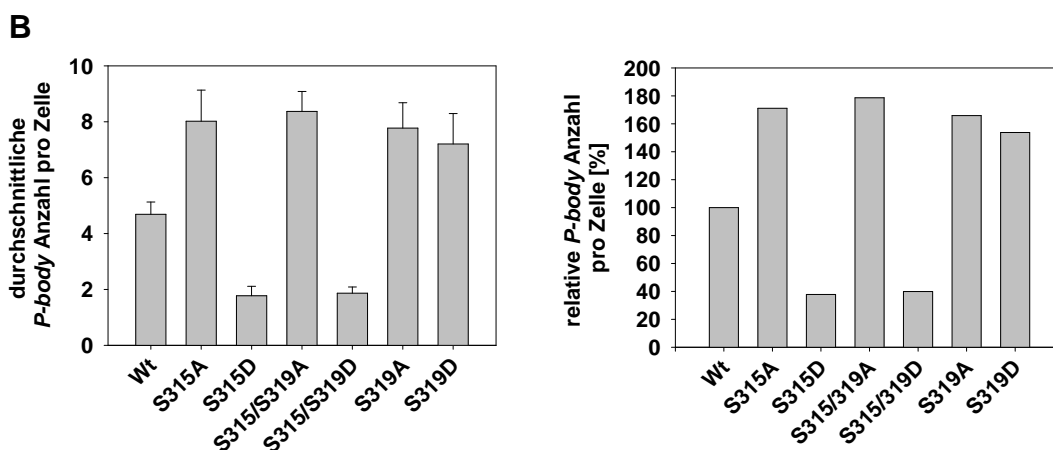
Mit der Serin-315/319-Alanin-Mutante nimmt die *P-body*-Anzahl im Vergleich zum Wildtyp um 78% Prozent zu. Man kann ebenfalls eine Zunahme der *P-body*-Größe beobachten. Die Alanin-Doppelmutante verhält sich somit ähnlich wie die Serin-315-Alanin-Mutante in diesem Experiment (71%ige Zunahme). Die phosphomimetische Doppelmutante ist überwiegend im Zytosol und weniger in den *P-bodies* lokalisiert. Die Abnahme der *P-body*-Anzahl ist mit 60% vergleichbar mit der Abnahme, die man mit der Serin-315-Aspartat-Mutante erhält (62%). Sowohl die Lokalisation der Serin-319-Alanin-Mutante, als auch die der Serin-319-Aspartat-Mutante in den *P-bodies* ist um 65% bzw. 53% erhöht (Abbildung 36A/B).

Zwischen der Lokalisation der Doppelmutanten und der Lokalisation der entsprechenden Serin-315-Einfachmutanten ist kaum ein Unterschied feststellbar. Zudem ist das vermehrte Vorkommen der Serin-319-Einfachmutanten in den *P-bodies* unabhängig von der eingeführten Mutation. Die Modifikation an Serin319 scheint daher keinen Einfluss auf die Lokalisation von DCP1 $\alpha$  zu haben.

Auffällig ist, dass die Zunahme der Serin-315-Alanin-Mutante in diesem Experiment stärker ausfällt als bei den Experimenten, welche unter Abbildung 32 dargestellt sind. Hinzu kommt, dass die durchschnittliche *P-body*-Anzahl pro Zelle insgesamt erniedrigt ist.

Mit allen GFP-DCP1 $\alpha$ -Proteinen kann eine Kolokalisation zwischen den *P-bodies* und endogenem Ago2 sowie zwischen den *P-bodies* und endogenem JNK beobachtet werden. Zum Teil liegen die *P-bodies* neben runden zytoplasmatischen Strukturen, in denen sich Ago2 bzw. JNK befinden oder überlappen mit diesen.





**Abbildung 36: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Lokalisation von GFP-DCP1α, GFP-DCP1αS319A, GFP-DCP1αS319D, GFP-DCP1αS315/319A und GFP-DCP1αS315/319D**

**A:** HEK293 IL-1R-Zellen, die mit den Expressionsplasmiden für die jeweiligen GFP-DCP1α-Mutanten stabil transfiziert waren, wurden in  $\mu$ -Slides IV ausgesät und am folgenden Tag wurde eine indirekte Immunfluoreszenz für Ago2 bzw. JNK durchgeführt. Die repräsentativen Bilder für GFP-DCP1αS315A und GFP-DCP1αS315D sind bereits in Abbildung 32A dargestellt und werden an dieser Stelle nicht aufgeführt. Balken: 10 $\mu$ m. **B:** Die *P-bodies* aus durchschnittlich 160 Zellen wurden gezählt und daraus die durchschnittliche *P-body*-Anzahl pro Zelle berechnet. Der Fehler ( $\pm$  S.E.M.) ergibt sich aus der durchschnittlichen *P-body*-Anzahl pro Zelle für verschiedene Gesichtsfelder. Im Balkendiagramm rechts ist die relative *P-body*-Anzahl pro Zelle dargestellt **C:** Die Lysate der stabil transfizierten Zellen wurden auf eine gleichmäßige Expression der GFP-DCP1α-Proteine hin im Westernblot überprüft.



## 4 Diskussion

### 4.1 Charakterisierung der Ago2/JNK-Wechselwirkung

#### 4.1.1 Untersuchungen zur Identifikation der für die Ago2/JNK-Bindung wichtigen Parameter

In Vorbefunden, die dieser Arbeit vorausgingen, konnte Ago2 als neuer JNK-Interaktionspartner identifiziert werden. Damit bestand die Möglichkeit einer mechanistischen Verbindung zwischen zwei bisher in unabhängige Genregulationsvorgänge involvierten Proteinen. Ein initiales Ziel bestand daher darin, die Ago2/JNK-Interaktion hinsichtlich ihrer Bindung und Funktionalität näher zu charakterisieren.

Da die Koimmunopräzipitation von T7-Ago2 und GFP-JNK3 sich als ein sehr spezifisches und reproduzierbares Nachweissystem erwies, wurden insgesamt 22 verschiedene Ago2-Versionen generiert, die bis auf eine Ausnahme (ein Fragment mit den Aminosäuren 386-516) immer noch eine Interaktion mit JNK zeigten (Abbildung 8). Die mutierten Varianten von Ago2 betrafen sowohl putative JNK *docking sites*, etablierte Strukturen in Ago2 (PAZ- und PIWI-Domäne) als auch weitere C-terminale, N-terminale Fragmente oder einzelne Polypeptide aus Ago2. Eine semiquantitative Auswertung aller vorhandenen Bindungsdaten, inklusive der bereits in der Diplomarbeit erhobenen *GST-pulldown* und Koimmunopräzipitationsexperimente, zeigte deutliche Unterschiede im Ausmaß der JNK-Bindung, so dass geschlussfolgert werden kann, dass Ago2 mit mehreren Anteilen an JNK bindet. Hierbei sind die PAZ-Domäne (As 235-348) und der schon erwähnte Bereich (As 386-516) nicht beteiligt, wohl aber äußerer N-Terminus sowie der C-Terminus und die darin enthaltene PIWI-Domäne. Es ließ sich somit keine bindungsdefiziente Ago2-Mutante generieren, die für funktionelle Untersuchungen in Frage gekommen wäre. Eine Eingrenzung der Interaktionsdomänen von JNK an Ago2 wurde nur mit einer N- bzw. C-terminalen Deletionsmutante von JNK durchgeführt und ergab, dass JNK ebenfalls über N- sowie C-terminale Bereiche an Ago2 bindet (Daten nicht gezeigt).

Durch *in vitro* Degradation der RNA im Zellextrakt konnte demonstriert werden, dass die Ago2/JNK-Interaktion zusätzlich über RNA vermittelt wird (Abbildung 9). Dieses Ergebnis beweist zwar nicht, dass Ago2 und JNK RNA-abhängig in intakten Zellen miteinander interagieren, steht aber im Einklang mit analogen Experimenten, in denen gezeigt werden konnte, dass die RNase A Behandlung nach der Immunopräzipitation die Koimmunopräzipitation von einigen Ago2-bindenden Proteinen wie YB1 oder ZBP1 aufheben kann (Hock et al., 2007). Obwohl Ago2 über eine das gesamte Protein durchziehende positiv geladene Spalte RNA binden kann (Rivas et al., 2005; Song et al., 2004; Yuan et al., 2005), ist es die PAZ-Domäne, welche ein Oligonukleotidbindungsmotiv aufweist (Lingel et al., 2003; Song et al., 2003), über welches spezifisch die zwei 3'-überhängenden Nukleotide der kleinen nicht-kodierenden RNA erkannt

und in einer hydrophoben Tasche verankert werden (Lingel et al., 2004; Ma et al., 2004). Daher wurde zunächst das N-terminale Ago2-Fragment, welches die PAZ-Domäne enthält zur Untersuchung der RNA-Abhängigkeit der Ago2/JNK-Interaktion verwendet. Spätere Versuche mit dem vollständigem Protein (Daten nicht gezeigt) scheiterten daran, dass sich die immunopräzipitierte Ago2-Menge nach RNase A Verdau so stark von der immunopräzipitierten Ago2-Menge in den Kontrollansätzen unterschied, dass eine vernünftige Quantifizierung nicht möglich war.

Da die Bindung zwischen Ago2-N und JNK nach RNase A Verdau zwar deutlich abgeschwächt, jedoch trotz quantitativen RNA-Verdau nicht vollständig aufgehoben war, sind neben Protein/RNA-Kontakten auch Protein/Protein-Kontakte an der Ausbildung des Komplexes beteiligt. Hierbei spielen die vier potentiellen MAP-Kinase *docking sites* in Ago2 keine Rolle, da ihre Mutation oder Deletion zu keiner Verringerung der Ago2/JNK-Bindung führt (Abbildung 7). Ago2 interagiert demnach mit JNK über ein bisher unbekanntes JNK-bindendes Motiv. Die Bindung von JNK-interagierenden Proteinen muss nicht zwangsläufig über eine *docking site* vermittelt werden. So erfolgt die Bindung von c-Jun an JNK in einem Heterotetramer über eine im N-Terminus gelegene klassische JNK *docking site* (As 31-59) und zum anderen über eine auxiliäre PQ-Domäne (As 182-256), die keine JNK *docking site* besitzt (May et al., 1998). An dieser Bindung sind möglicherweise auch Nukleinsäuren, in diesem Fall DNA, beteiligt (May et al., 1998).

Untersuchungen des Überstandes nach Ago2/JNK-Koimmunopräzipitation zeigten, dass trotz quantitativer Präzipitation von Ago2 der größte Anteil an JNK im Überstand verblieb (Abbildung 16). Demnach interagiert nur ein kleiner Anteil des gesamten zellulären JNK stabil mit Ago2. Dementsprechend gelang es nicht, auch unter Verwendung von zwei verschiedenen Ago2- und JNK-Antikörpern, die endogenen Proteine zu koimmunopräzipitieren (Daten nicht gezeigt). Zudem steht diese Beobachtung im Einklang mit der Tatsache, dass in den bisherigen Studien zur Isolation Ago2-interagierender Proteine kein JNK gefunden wurde (Hock et al., 2007; Meister et al., 2005; Peters and Meister, 2007; Qi et al., 2008).

Die Determinanten, welche die Stöchiometrie von Ago2/JNK-Komplexen in intakten Zellen bestimmen, sind unklar. Weiterführende Experimente könnten Koimmunopräzipitationen unter Verwendung von zell-permeablen *Crosslinkern* sein, so dass ausgeschlossen wird, dass die Interaktion von Ago2 mit JNK im Zellextrakt stattfindet oder verändert wird. Solche Methoden ermöglichen auch eine Isolation von endogenen Bindungspartnern und Nukleinsäuren unter hoch stringenten, denaturierenden Bedingungen (Tagwerker et al., 2006).

#### **4.1.2 Untersuchungen zur Phosphorylierung von Ago2**

Aufgrund der multiplen Funktionen von Ago2 (Hutvagner and Simard, 2008) war es sehr wahrscheinlich, dass seine Aktivität durch Integration in spezifische Proteinkomplexe, zelluläre Kompartimente und durch posttranslationale Modifikationen reguliert wird. Eine offensichtliche Frage war, ob Ago2 durch JNK phosphoryliert wird.

Zu Beginn dieser Arbeit waren keine Signaltransduktionswege bekannt, deren Aktivierung die Ago2-Funktion beeinflusst. Erst während der hier vorgestellten Arbeiten am Ago2/JNK-Komplex erschienen einige wenige Veröffentlichungen, die eine posttranslationale Modifikation dieses Proteins beschrieben. So wird Ago2 an Prolin700 hydroxyliert (Qi et al., 2008) und ubiquitinyliert (Rybak et al., 2009). Beide Modifikationen regulieren die Ago2-Stabilität und somit indirekt seine RISC-Aktivität (Qi et al., 2008; Rybak et al., 2009). Die Hydroxylierung sowie die Phosphorylierung an Serin387 durch das p38-Substrat MK2 beeinflussen positiv die Lokalisation von Ago2 in *P-bodies* (Qi et al., 2008; Zeng et al., 2008). Der ERK-Signaltransduktionsweg hingegen trägt als Antwort auf einen EGF-Stimulus hin zur erhöhten Ago2-Proteinexpression bei (Adams et al., 2009).

Im Zuge dieser Arbeit konnte der Befund von Zeng et al., dass es sich bei Ago2 um ein phosphoryliertes Protein handelt, mit Hilfe von *in vitro* Kinase-Versuchen unter Verwendung von rekombinantem GST-Ago2 bestätigt werden (Abbildung 11). Im Gegensatz zu dem JNK-Substrat GST-c-Jun, war diese *in vitro* Phosphorylierung (i) nicht durch starke JNK-Stimuli wie UV-Licht induzierbar (Abbildung 12), trat (ii) nur in Zellextrakten, aber nicht nach JNK-Immunopräzipitation auf und war (iii) auch mit Zellextrakten aus JNK1/2-doppeldefizienten Fibroblasten detektierbar (Abbildung 15). Diese Experimente zeigen relativ eindeutig, dass Ago2 kein direktes JNK Substrat ist. Die *in vitro* nachweisbare Ago2-Phosphorylierung wird jedoch durch den Einsatz des JNK-Inhibitors SP600125 deutlich gehemmt (Abbildung 12-Abbildung 14). Obwohl der SP600125 Inhibitor effektiv JNK und die davon abhängige c-Jun-Phosphorylierung hemmt und in dieser Funktion von vielen Arbeitsgruppen eingesetzt wird (Holzberg et al., 2003; Wolter et al., 2008), ist er unspezifisch und hemmt eine ganze Reihe weiterer Kinasen wie SGK (*serum- and glucocorticoid-induced kinase*), S6K1 (p70 *ribosomal protein S6 kinase 1*), AMPK (*activated protein kinase*), CDK2 (*cyclin dependent kinase 2*), CK1d (*casein kinase 1d*) und DYRK1A (*tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A*) (Bain et al., 2003; Cohen, 2010), die deshalb am ehesten für die beobachtete JNK-unabhängige *in vitro* Phosphorylierung von Ago2 in Frage kommen.

Dem Autoradiogramm in Abbildung 13 kann entnommen werden, dass I $\kappa$ B-Kinasen eventuell auch einen Beitrag zur Phosphorylierung von Ago2 leisten, während die ERK1/2/5 Signalwege sowie der PI3K-Signalweg keinen Einfluss auf die Phosphorylierung haben. Die Abnahme der Phosphorylierung von Ago2 unter Einsatz des p38 Inhibitors SB203580 lässt sich unter anderem mit der schon publizierten Reduktion der Phosphorylierung von Serin387 durch MK2 erklären (Zeng et al., 2008). Allerdings ist auffällig, dass die totale Phosphorylierung von Ago2 durch den p38-Inhibitor nur schwach inhibiert wird, obwohl Zeng et al. mit Hilfe von *in vivo* Markierung mit <sup>32</sup>P-Orthophosphat und anschließender zweidimensionaler Phosphopeptidkartierung zeigen konnten, dass es sich bei Serin387 um die in Ago2 hauptsächlich phosphorylierte Aminosäure handelt. Die Diskrepanz mit den hier gezeigten Ergebnissen ist am ehesten darin zu suchen, dass hier in einem *in vitro* System mit zudem noch rekombinant in Bakterien hergestelltem GST-Ago2 gearbeitet wurde.

Weder mit den gewählten extrazellulären Stimuli (IL-1 $\alpha$ , FKS, TPA, UV-Licht) (Abbildung 12 und Abbildung 13) noch mit dem Phosphataseinhibitor Calyculin A (Abbildung 14) konnte eine induzierbare Ago2-Phosphorylierung erzielt werden, obgleich IL-1 $\alpha$  und UV-Licht eine p38-Aktivierung bewirken (Freshney et al., 1994; Stein et al., 1997; Wang et al., 1997) (Abbildung 28) und Zeng et al. eine durch Arsenit und Anisomycin induzierbare Phosphorylierung von Ago2 an Serin387 demonstrieren konnten. Ein Grund für die fehlende Induzierbarkeit der Ago2-Phosphorylierung könnte sein, dass *in vitro* die regulierten Phosphorylierungen von Ago2, wie die an Serin387, durch konstitutive, wenig bis gar nicht regulierte Phosphorylierungen überlagert werden. Solche Erfahrungen konnten in der Arbeitsgruppe mit rekombinantem GST-I $\kappa$ B $\alpha$  und GST-c-Jun gemacht werden. Nur C-terminal trunkierte Versionen dieser Proteine zeigen in *in vitro* Kinase-Versuchen Phosphorylierungen an Ser32/36 (I $\kappa$ B $\alpha$ 1-54) bzw. Ser63/73/Thr91/93 (GST-c-Jun<sub>1-135</sub>), die durch multiple C-terminale Phosphorylierungen überlagert werden, wenn die kompletten Proteine in Kinase-Versuchen eingesetzt werden. Trotz dieses Einwandes wurde aufgrund der klaren negativen Ergebnisse zur JNK-abhängigen *in vitro* Phosphorylierung des kompletten GST-Ago2-Fusionsproteins auf eine weitere systematische Austestung von verkürzten Ago2-Fragmenten mittels *in vitro* Kinase-Versuchen verzichtet.

Es wurde auch darauf verzichtet komplexere Analyseverfahren zum Nachweis einer möglichen Phosphorylierung von endogenem Ago2 zu verwenden. Ein solches System wäre z.B. die Isolierung von endogenem Ago2 aus Wildtyp und JNK1/2 defizienten Zellen nach vorhergehendem SILAC (*stable isotope labeling with amino acids in cell culture*) oder Anreicherung von Phospho-Proteinen mittels Affinitätschromatographie gewesen (Macek et al., 2009). Es ist prinzipiell denkbar, dass unter solchen Bedingungen doch noch Aminosäuren identifiziert werden könnten, die JNK-abhängig phosphoryliert werden. Zusammengefasst ließen es die Untersuchungen zur direkten Phosphorylierung von GST-Ago2 durch JNK aber als sehr unwahrscheinlich erscheinen, dass endogenes Ago2 ein JNK Substrat ist.

#### **4.1.3 Analyse der miRNA-Assoziation an Ago2-Komplexe in Abhängigkeit von JNK und seiner Aktivierung**

Als nächstes wurde daher überprüft, ob JNK und seine Aktivierung einen Einfluss auf die Beladung von Ago2-Komplexen mit miRNAs haben. Aufgrund der unter 3.1.3.1 erläuterten Ergebnisse aus *screening*-Experimenten wurde die Assoziation von acht miRNAs an Ago2 unter Bedingungen der JNK-Überexpression und/oder -Aktivierung getestet. Vier der acht miRNAs konnten mit Hilfe der Real Time PCR zufriedenstellend detektiert werden, während die andere Hälfte aufgrund von schwacher bis fehlender Expression in HEK293 IL-1R-Zellen nicht oder nur unzureichend messbar war. In zwei durchgeführten Experimenten wurde beobachtet, dass zwei (mir-210 und mir-186) der vier miRNAs bereits durch die bloße Überexpression von JNK eine tendenzielle Abnahme im Komplex zeigten, welche durch die Aktivierung von JNK nach Überexpression von MEKK1 noch verstärkt wurde. Für die beiden anderen miRNAs (mir-23b und mir-214) wurden in den beiden durchgeführten Experimenten unterschiedliche Ergebnisse erhalten. Eine mögliche Erklärung für diese Inkonsistenz sind vermutlich die geringen Effekte

verbunden mit der Tatsache, dass die Ct-Werte für mir-23b (29-32) und vor allem für mir-214 (32-34) deutlich höher waren als die für mir-210 (25-30) und mir-186 (23-26). Die ermittelten Unterschiede sind klein und die Ct-Werte relativ hoch, was schnell zu Abweichungen führen kann. Hinzu kommt, dass nur ein kleiner Anteil an Ago2 und JNK miteinander assoziiert ist, wie man dem Westernblot in Abbildung 16 entnehmen kann. Unter den hier gewählten Koimmunopräzipitationsbedingungen werden daher nicht ausschließlich JNK-enhaltene Ago2-Komplexe immunopräzipitiert, sondern ebenfalls Ago2-Komplexe ohne koimmunopräzipitiertes JNK. Je nachdem wie viel von den Ago2-Komplexen ohne JNK bzw. aktiviertes JNK im Vergleich zu JNK-enhaltenen Ago2-Komplexen immunopräzipitiert werden, können sich die Ergebnisse vor allem bei schwach exprimierten miRNAs schnell unterscheiden. Außerdem kann das mit ein Grund für die allgemein relativ geringen Unterschiede sein.

Um zu entscheiden wie sich die Bindung von mir-23b und mir-214 an Ago2-Komplexe unter den hier gewählten Reaktionsbedingungen tatsächlich ändert und um die Bindung weiterer miRNAs an Ago2-Komplexe unter JNK-stimulierenden Bedingungen zu untersuchen, fand eine Wiederholung der Experimente statt. Wie bereits erwähnt, wurden diese aufgrund von unzureichend gleichmäßiger Immunopräzipitation von Ago2 vorzeitig abgebrochen.

Eine Reihe an Daten deutet darauf hin, dass die Beladung von Ago2 mit miRNAs und mRNAs in Abhängigkeit vom zellulären Kontext variieren kann. So bindet Ago2 an verschiedene mRNAs, miRNAs sowie pre-miRNAs (Beitzinger et al., 2007; Hendrickson et al., 2008; Nonne et al., 2010; Tan et al., 2009) und ist in HEK293-Zellen an drei unterschiedliche Ribonukleoproteinkomplexe assoziiert, die sich in ihrer RNA und Proteinzusammensetzung unterscheiden (Hock et al., 2007). Zudem ist es unter anderem in *P-bodies* lokalisiert (Liu et al., 2005b; Sen and Blau, 2005) und unter Stressbedingungen auch in Stress Granula (Leung et al., 2006) zu finden. Es kooperiert mit Dicer und Drosha und spielt eine Rolle bei der Prozessierung von pre-miRNAs (Diederichs and Haber, 2007). Die Interaktion mit JNK und besonders mit aktiviertem JNK könnte ein weiterer Faktor sein, welcher die Beladung von Ago2 mit RNAs reguliert und so auf die Ago2-Funktion einen Einfluss nimmt. Ähnlich wie Importin, welches die Bindung von mRNAs an Ago2 kontrolliert und so die miRNA-vermittelte RISC-Aktivität beeinflusst (Weinmann et al., 2009). Allerdings müssen weitere Untersuchungen folgen, um zu beurteilen in wie fern die Bindung anderer miRNAs durch JNK und seine Aktivierung in dieser Art und Weise beeinflusst wird. Zudem muss berücksichtigt werden, dass es nach Überexpression der MAP3-Kinase MEKK1 neben einer starken JNK-Aktivierung (Abbildung 16) ebenfalls zu einer Aktivierung von p38 sowie NF $\kappa$ B kommt (Lee et al., 1997; Stein et al., 1997). Um zu überprüfen inwieweit der p38- und NF $\kappa$ B-Signalweg zu den hier gemachten Beobachtungen beitragen, müsste der Versuch unter Reaktionsbedingungen durchgeführt werden, unter denen ausschließlich der JNK-Signalweg aktiviert wird, was sich als schwierig gestaltet. Alternativ könnte der JNK-abhängige Anteil an den Effekten durch die Verwendung von SP600125 oder eines JNK *knock down* ermittelt oder analog der p38- bzw. NF $\kappa$ B-Signalweg mit Inhibitoren blockiert werden.

In Bakterien exprimiertes, rekombinantes GST-JNK2, welches eine geringe basale Aktivität besitzt, hat keinen Einfluss auf die *in vitro* RISC-Aktivität von GST-Ago2 (Daten Dr. Daniela Kettner-Buhrow). Mit Hilfe eines Luziferase-Reporters konnte jedoch demonstriert werden, dass die Überexpression von MEKK1 einen schwachen, aber reproduzierbaren und statistisch signifikanten, inhibitorischen Effekt auf die siRNA-vermittelte globale RISC-Aktivität in intakten Zellen aufweist (Abbildung 17). Da dieser Effekt mit SP600125 aufgehoben werden kann, ist er sehr wahrscheinlich auf eine MEKK1-abhängige Aktivierung von endogenem JNK zurückzuführen. Nachdem die Überexpression von MEKK1 und die damit verbundene Aktivierung von JNK eine Abnahme bestimmter miRNAs an Ago2-Komplexe nach sich zieht, wäre es vorstellbar, dass die Bindung von siRNAs in derselben Weise betroffen ist und dass darauf die abgeschwächte RISC-Aktivität zurückzuführen ist. Dies könnte wiederum erklären, weshalb die hier gemessenen Effekte ebenfalls gering sind.

## 4.2 Charakterisierung der Interaktion zwischen DCP1 $\alpha$ und JNK

### 4.2.1 Interaktion und Kolokalisation von Ago2 und JNK mit DCP1 $\alpha$

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Ago2/JNK-Komplex mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht, um zu überprüfen ob eine mögliche Funktion der Ago2/JNK-Bindung darin besteht, JNK in bestimmte subzelluläre Strukturen zu rekrutieren. Dabei stellte sich in initialen Experimenten heraus, dass Ago2 und JNK eine komplexe Verteilung mit keinen eindeutig abgrenzbaren Bereichen der Kolokalisation aufweisen, so dass es schwierig war, durch Doppelimmunfluoreszenz gegen Ago2 und JNK eine Kolokalisation nachzuweisen.

Die beschriebene Lokalisation von Ago2 in *P-bodies* betrifft nur einen kleinen Teil von Ago2 (Leung et al., 2006; Vasudevan and Steitz, 2007), ist aber biologische hochinteressant, was zu der Entscheidung führte in einer ausgedehnten Studie zu analysieren ob Ago2 und JNK zusammen in *P-bodies* lokalisiert sind. Da bekannt ist, dass Ago2 mit DCP1 $\alpha$  interagiert und mit diesem Protein in *P-bodies* kolokalisiert (Liu et al., 2005b; Sen and Blau, 2005), wurde GFP-DCP1 $\alpha$  zu diesem Zweck als *P-body*-Marker eingesetzt.

Unter Verwendung einer Reihe von Ansätzen konnte der bereits publizierte Befund, dass ein Teil von Ago2 in *P-bodies* lokalisiert ist, bestätigt werden. So kolokalisiert endogenes Ago2 sowohl mit transient (Abbildung 18) und stabil überexprimiertem DCP1 $\alpha$  (Abbildung 32) als auch mit an Serin315 phosphoryliertem endogenem DCP1 $\alpha$  (Abbildung 29D). Die Kolokalisation mit transient überexprimiertem DCP1 $\alpha$  wird durch die Koexpression einer katalytisch inaktiven JNK2-Mutante sowie durch Koexpression von HA-JNK2 und HA-TAK<sub>kd</sub>-TAB<sub>ad</sub> deutlich verstärkt.

Die *P-bodies* und die runden Strukturen in denen Ago2 lokalisiert ist, lagen teilweise auch dicht nebeneinander oder überlappten. Dabei könnte es sich um andere, von *P-bodies* verschiedene Ribonukleoproteinpartikel oder ebenfalls um *P-bodies* handeln, die kein DCP1 $\alpha$  aufweisen. Bei den hochdynamischen Strukturen, welche *P-bodies* darstellen, besitzen diese nicht immer den gleichen Satz an Proteinen sowie RNAs (Cougot et al., 2004; Kedersha et al., 2005). Dass es sich

bei den nicht mit GFP-DCP1 $\alpha$  kolocalisierenden Ago2-Strukturen um Stress Granula handelt, welche unter den hier gewählten Bedingungen induziert werden, ist eher unwahrscheinlich, da diese größer sind und eine irreguläre Form besitzen. Eine mögliche Erklärung für die überlappenden Strukturen könnten die in der Literatur beschriebenen Fusions- und Andockprozesse zwischen Ribonukleoproteinpartikeln sein (Kedersha et al., 2005; Wilczynska et al., 2005).

Unter allen Bedingungen, unter denen Ago2 eine Lokalisation in *P-bodies* aufwies, konnte ebenfalls sowohl endogenes als auch überexprimiertes JNK, unabhängig von seiner Kinaseaktivität, in *P-bodies* gefunden werden (Abbildung 18, Abbildung 32). Das spricht dafür, dass ein Teil von Ago2 und JNK gemeinsam in diesen Strukturen lokalisiert ist. Weiterführende Experimente mit einer Tripelimmunfluoreszenz gegen Ago2, DCP1 $\alpha$  und JNK könnten diesen Befund stärken. Hierbei wäre es unter anderem wichtig, eine Kombination von geeigneten Fluorophoren und dazu passenden Anregungs- und vor allem Emissionsfiltern zu wählen, um zu vermeiden, dass das emittierte Licht eines Fluorophors zur Anregung eines anderen Fluorophors führt.

Während der Fertigstellung dieser Arbeit konnten Wasserman et al. ebenfalls eine Verbindung zwischen *P-bodies* und JNK demonstrieren (Wasserman et al., 2010). Wasserman et al. haben unter Verwendung des *Ras recruitment systems* versucht neue JNK-interagierende Proteine zu detektieren und konnten das Protein WDR62 als JNK-*Scaffold* identifizieren und charakterisieren. Im Zuge dieser Charakterisierung wurde beobachtet, dass unter stark artifizieller Induktion von Stress Granula, nämlich nach Überexpression von YFP-TTP und YFP-TAI, jedoch nicht nach Stimulation mit Arsenit oder Hitzeschock, phosphoryliertes JNK in Stress Granula vorhanden ist und in diesen Strukturen mit WDR62 kolocalisiert. Nach Stimulation mit Arsenit allein oder in Kombination mit Puromycin kolocalisiert phosphoryliertes JNK mit DCP1 $\alpha$  in *P-bodies*. Wasserman et al. konnten ebenfalls einen stimulierenden Einfluss der Aktivierung von JNK auf die Arsenit induzierte *P-body*- und Stress Granula-Bildung zeigen. Da diese Untersuchungen der Charakterisierung der JNK/WDR62-Interaktion dienen sollten, wurde die gefundene Kolokalisation zwischen phosphoryliertem JNK und DCP1 $\alpha$  in *P-bodies* sowie der Einfluss von JNK auf *P-body*- und Stress Granula-Bildung nicht weiter auf ihre Bedeutung hin analysiert.

In Koimmunopräzipitationsexperimenten konnte demonstriert werden, dass die Kolokalisation von DCP1 $\alpha$  und JNK auf eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen zurückzuführen ist (Abbildung 21). Der Frage, ob es sich hierbei um eine direkte oder indirekte Interaktion handelt, wurde nicht weiter nachgegangen. Allerdings wäre es interessant zu untersuchen, ob Ago2 die DCP1 $\alpha$ /JNK-Interaktion fördert oder vermittelt, da sich die drei Proteine als trimerer Komplex aus HEK293 IL-1R-Zellen isolieren lassen. Dies könnte mit *GST-pulldown*- oder Koimmunopräzipitationsversuchen aus Zellen mit herunterreguliertem Ago2 überprüft werden. In Zellen mit herunterreguliertem Ago2 oder in Ago2<sup>-/-</sup> MEFs (Liu et al., 2004) ließe sich ebenfalls untersuchen, ob Ago2 einen Einfluss auf die Lokalisation von JNK in *P-bodies* hat.

#### 4.2.2 Charakterisierung von DCP1 $\alpha$ als JNK-Substrat

Die gefundene Kollokalisierung und Interaktion zwischen DCP1 $\alpha$  und JNK führte zu der Frage, ob es sich bei DCP1 $\alpha$  um ein JNK-Substrat handelt, zumal sowohl überexprimiertes als auch endogenes DCP1 $\alpha$  nach Überexpression von JNK und/oder MAP3-Kinasen, welche unter anderem den JNK-Signalweg aktivieren, ein massiv verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE aufwiesen (Abbildung 20), so wie man es häufig bei mehrfach phosphorylierten Proteinen wie TAB1 (Shin et al., 2009; Thiefes et al., 2006) oder c-Jun (Abbildung 28) beobachten kann. Beim GFP-DCP1 $\alpha$  können drei und beim endogenen DCP1 $\alpha$  vier Mobilitätsformen beobachtet werden. Hierbei scheinen die Mobilitätsformen 1, 2 und 3 des überexprimierten DCP1 $\alpha$  den Mobilitätsformen 1, 2 und 4 des endogenen Proteins zu entsprechen. Möglicherweise werden durch das GFP-tag normalerweise modifizierte Aminosäuren abgeschirmt und so der Modifikation nicht zugänglich gemacht. Ebenso ist vorstellbar, dass aufgrund des größeren Molekulargewichts von GFP-DCP1 $\alpha$  unter den gewählten SDS-PAGE-Bedingungen bestimmte Mobilitätsformen nicht mehr ausreichend getrennt werden können und als eine Bande wahrgenommen werden.

Um die Aminosäuren zu identifizieren, welche für die JNK-abhängigen Veränderung des Laufverhaltens von DCP1 $\alpha$  in der SDS-Page verantwortlich sind, wurden in GFP-DCP1 $\alpha$  20 Serine bzw. Threonine alleine oder in Kombination zu Alanin mutiert und das Laufverhalten der daraus resultierenden 13 Mutanten unter JNK-aktivierenden Bedingungen in der SDS-Page analysiert (Abbildung 22, Abbildung 34). Es konnten somit zwei Aminosäuren identifiziert werden, nämlich Serin315 und Serin319, deren Modifikation unter JNK-stimulierenden Bedingungen zum veränderten Laufverhalten von DCP1 $\alpha$  beiträgt. Mit Hilfe von drei unterschiedlichen phosphospezifischen Antikörpern gegen Serin315, konnte zudem sowohl für überexprimiertes als auch für endogenes DCP1 $\alpha$  demonstriert werden, dass es konstitutiv an Serin315 phosphoryliert vorliegt und die Phosphorylierung an dieser Aminosäure unter JNK-stimulierenden Bedingungen induziert werden kann (Abbildung 23, Abbildung 28). Da die Identifizierung von Serin319 als posttranslational modifizierte Aminosäure erst zu einem späten Zeitpunkt in dieser Arbeit stattfand, konnte mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers noch nicht eindeutig demonstriert werden, dass es sich bei der JNK-abhängigen Modifikation ebenfalls um eine Phosphorylierung handelt. Aufgrund der Tatsache, dass sich die beiden phosphomimetischen Serin-315/319-Doppelmutanten im unstimulierten Zustand in der SDS-PAGE so verhalten wie der Wildtyp nach Überexpression von HA-TAK<sub>kd</sub>TAB<sub>ad</sub>, ist es sehr wahrscheinlich, dass auch im Fall von Serin319 eine Phosphorylierung vorliegt (Abbildung 35). Diese Daten stehen zum größten Teil im Einklang mit den während der Anfertigung der Promotion publizierten Ergebnissen von Blumenthal et al., welche die Expression von DCP1 $\alpha$  in Gehirnhomogenaten von Mäusen unterschiedlichen Alters sowie in pluripotenten P19 embryonalen Karzinom Zellen während der Entwicklung zu Neuronen unter Retinsäurebehandlung untersuchten (Blumenthal et al., 2009). Sie konnten zeigen, dass DCP1 $\alpha$  in der SDS-PAGE zwei Mobilitätsformen aufweist, deren relative Intensität sich während der



Entwicklung des Gehirns und der Differenzierung von Neuronen ändert und schlossen aus der Aufhebung der langsamer laufenden Form nach CIAP(*calf intestinal alkaline phosphatase*)-Behandlung darauf, dass DCP1 $\alpha$  während der neuronalen Entwicklung phosphoryliert wird. In HEK293-Zellen wurden ebenfalls zwei Mobilitätsformen von DCP1 $\alpha$  beobachtet, von denen die potentiell phosphorylierte, langsamer laufende durch Arsenat-Behandlung (oxidativer Stress) induziert wurde (Blumenthal et al., 2009). Um auf die potentiellen Phosphorylierungsstellen in humanem DCP1 $\alpha$  zu schließen, bedienten sich Blumenthal et al. der Phosida-Datenbank (<http://www.phosida.com/>), welche unter anderem Phosphorylierungsstellen veröffentlicht, die durch groß angelegte massenspektrometrische Untersuchungen identifiziert wurden (Gnad et al., 2007). Anhand von Alanin-Mutationen der in der Datenbank publizierten Phosphorylierungsstellen für DCP1 $\alpha$ , gefolgt von der Analyse der resultierenden Mutanten in der SDS-PAGE, konnten Blumenthal et al. eine Beteiligung der Aminosäuren Serin315, Serin319 sowie Threonin321 an der Arsenat-induzierten Phosphorylierung von humanem DCP1 $\alpha$  nachweisen. Es fand jedoch keine Überprüfung mittels phosphospezifischer Antikörper statt. Auch wurde in diesem Zusammenhang weder eine Kinase präsentiert, welche die Phosphorylierung von DCP1 $\alpha$  katalysiert, noch wurde eine funktionelle Bedeutung der Phosphorylierung demonstriert.

Dieses Problem besteht ebenfalls bei den heutzutage im großen Maßstab durchgeführten massenspektrometrischen Analysen zum Phosphorylierungsstatus von Proteinen aus unterschiedlichen Zellen, Zellkompartimenten oder Geweben (Beausoleil et al., 2004; Dephore et al., 2008; Olsen et al., 2006; Van Hoof et al., 2009; Villen et al., 2007). Die in Phosida und PhosphoSitePlus veröffentlichten Phosphorylierungsstellen von DCP1 $\alpha$  basieren auch auf solchen Untersuchungen (Olsen et al., 2006; Olsen et al., 2010), welche zwar Auskunft darüber geben, ob ein Protein unter bestimmten Reaktionsbedingungen an einer bestimmten Aminosäure phosphoryliert vorliegt, aber nicht welche Funktion die Phosphorylierung in dieser Situation ausübt.

Im Zuge dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass DCP1 $\alpha$  durch JNK phosphoryliert wird. Der *in vitro* Kinase-Versuch unter Verwendung des phosphospezifischen Antikörpers gegen Serin315 zeigt eindeutig, dass JNK die induzierbare Phosphorylierung von DCP1 $\alpha$  an Serin315 katalysiert (Abbildung 25). Dieser Befund wird durch das geringfügig schnellere Laufverhalten der Serin-315-Alanin-Mutante in der SDS-PAGE nach einem *in vitro* Kinase-Versuch unter Einsatz von  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP (Abbildung 24) sowie durch die verminderte Serin315-Phosphorylierung von GFP-DCP1 $\alpha$  unter JNK-stimulierenden Bedingungen nach Verwendung des Inhibitors SP600125 in intakten Zellen gestützt (Abbildung 30). Die Ergebnisse der radioaktiven Kinase-Versuche zeigen auch, dass die Serin-315-Alanin-Mutante weiterhin stimulusabhängig durch JNK phosphoryliert wird und dass die Serin-315-Alanin-Mutation keinen Einfluss auf die Gesamtposphorylierung des rekombinanten DCP1 $\alpha$  hat. Dies spricht dafür, dass JNK neben Serin315 noch weitere Aminosäuren in DCP1 $\alpha$  phosphorylieren kann, wie eventuell Serin319 oder noch andere bislang durch die beiden Mutationsanalysen nicht identifizierte Aminosäuren. Denn obwohl die Mutation von Serin315 und Serin319 in GFP-DCP1 $\alpha$  nach Überexpression

von HA-TAK<sub>kd</sub>TAB<sub>ad</sub> zu einem vollständigen Verlust der Laufform 2 in der SDS-Page führt, weisen die Serin-315/319-Alanin-Mutante als auch die beiden phosphomimetischen Doppelmutanten nach Koexpression von HA-TAK<sub>kd</sub>TAB<sub>ad</sub> und HA-JNK2 immer noch eine in der SDS-PAGE langsamere Mobilitätsform auf. Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um andere Modifikationen als Phosphorylierungen handelt. An dieser Stelle muss ebenfalls erwähnt werden, dass bei der Suche nach JNK-abhängigen Phosphorylierungsstellen einige der zu Alanin mutierten Serine oder Threonine ebenfalls durch JNK phosphoryliert werden könnten, allerdings ihre Phosphorylierung generell oder aufgrund der hier gewählten Reaktionsbedingungen mit keinem veränderten Laufverhalten des Proteins in der SDS-PAGE einhergeht. Auch könnte ihr Beitrag zur veränderten Mobilität von DCP1 $\alpha$  in der SDS-PAGE so klein sein, dass erst die Kombination an Mutationen solcher Aminosäuren Laufunterschiede sichtbar werden lassen.

MAP-Kinasen weisen überlappende Substrate auf, welche von verschiedenen MAP-Kinasen an derselben Aminosäure phosphoryliert werden können. So sind sowohl JNK als auch p38 in der Lage ATF2 in der N-terminalen transaktivierenden Domäne an Threonin69 und Serin71 zu phosphorylieren (Gupta et al., 1995; Raingeaud et al., 1995). Rekombinantes DCP1 $\alpha$  wird *in vitro* ebenfalls durch p38 phosphoryliert. In den Kinase-Versuchen, welche zur Markierung der Phosphorylierung von GST-DCP1 $\alpha$  mit <sup>32</sup>P- $\gamma$ -ATP durchgeführt wurden, weist die Alanin-Mutante erneut eine leicht schneller laufende Mobilitätsform in der SDS-PAGE auf und scheint zudem etwas schwächer als der Wildtyp phosphoryliert zu werden, was zunächst darauf hindeutet, dass Serin315 ebenfalls durch p38 phosphoryliert wird (Abbildung 26). Allerdings kann nach dem *in vitro* Kinase-Versuch unter Verwendung des phosphospezifischen Antikörpers keine an Serin315 induzierbare Phosphorylierung von DCP1 $\alpha$  detektiert werden (Abbildung 27). Außerdem ist in intakten Zellen nach Überexpression von HA-TAK<sub>kd</sub>TAB<sub>ad</sub> oder HA-TAK<sub>kd</sub>TAB<sub>ad</sub> und HA-JNK2 unter Einsatz des p38 Inhibitors SB203580, anders als mit dem JNK Inhibitor SP600125, keine Hemmung der Serin315 Phosphorylierung von GFP-DCP1 $\alpha$  zu verzeichnen (Abbildung 30). Eine mögliche Erklärung für die schnellere Laufgeschwindigkeit der Alanin-Mutante im radioaktiven Kinase-Versuch könnte sein, dass die Phosphorylierung an Serin315 nötig ist, um weitere Aminosäuren durch p38 zu phosphorylieren. Dasselbe kann natürlich auch für die Phosphorylierung durch JNK gelten. Aus den Westernblotdaten wird ebenfalls ersichtlich, dass die Hemmung von p38 keinen Effekt auf die induzierten GFP-DCP1 $\alpha$ -Mobilitätsformen hat. Demzufolge ist DCP1 $\alpha$  *in vivo* entweder tatsächlich kein p38 Substrat oder es wird durch p38 an Aminosäuren phosphoryliert, deren Phosphorylierung kein verändertes Laufverhalten von DCP1 $\alpha$  nach sich zieht. Es ist auch denkbar, dass p38 unter anderem dieselben Aminosäuren wie JNK phosphoryliert, jedoch dass JNK unter den gewählten Reaktionsbedingungen die dominante Kinase darstellt, welche nach Inhibierung von p38 kompensierend eingreifen kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch diese Befunde zum ersten Mal gezeigt werden konnte, dass JNK ein am mRNA-Abbau beteiligtes Protein direkt phosphoryliert.

### 4.2.3 Untersuchungen zur JNK-abhängigen Lokalisationsänderung von DCP1 $\alpha$

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die *P-body*-Bildung direkt proportional zur Konzentration translational gehemmter, zytoplasmatischer mRNPs. Ereignisse in der Zelle, welche die globale Menge an nicht translatierten mRNPs erhöhen, führen in der Regel zur *P-body*-Zunahme, während solche, die die Menge erniedrigen, eine Abnahme an *P-bodies* nach sich ziehen. Die Mechanismen, welche die Bildung von *P-bodies* beeinflussen und kontrollieren sind unbekannt. Ebenso ist nicht gut untersucht, welche Faktoren für die Akkumulation von *P-body*-Proteinen in diesen Strukturen eine Rolle spielen. Erste Untersuchungen in der Hefe haben ergeben, dass Q/N-reiche Domänen, ähnlich wie sie in Prionen gefunden werden und Prolin-reiche Sequenzen, einen Beitrag zur *P-body*-Lokalisation leisten, indem sie die Aggregation der Proteine fördern (Decker et al., 2007; Reijns et al., 2008). In Metazoen können in einigen *P-body*-Proteinen wie Hedls ähnliche Domänen gefunden werden, welche zur *P-body*-Lokalisation beitragen (Decker et al., 2007; Yu et al., 2005).

Viele *P-body*-Proteine wie DCP1 $\alpha$  sind neben ihrer *P-body*-Lokalisation ebenso im Zytosol zu finden. Es ist schwer vorstellbar, dass diese Verteilung von *P-body*-Proteinen nicht reguliert ist, vor allem, da die meisten dieser Proteine an der translationalen Hemmung und am mRNA-Abbau beteiligt sind und somit eine wichtige Funktion innerhalb der Zelle einnehmen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die bloße Überexpression von JNK und noch mehr seine Aktivierung durch Überexpression von MEKK1 oder HA-TAK<sub>kd</sub>TAB<sub>ad</sub> die Lokalisation sowohl von überexprimiertem als auch von endogenem DCP1 $\alpha$  in der Zelle beeinflusst (Abbildung 18, Abbildung 19). Wie bereits erwähnt, wird durch die Überexpression von MEKK1 oder HA-TAK<sub>kd</sub>TAB<sub>ad</sub> nicht ausschließlich der JNK-Signalweg aktiviert. Es ist allerdings sehr wahrscheinlich, dass die beobachteten Effekte auf die Lokalisation von überexprimiertem und endogenem DCP1 $\alpha$  der Aktivierung von JNK zuzuschreiben sind, da die alleinige Überexpression von JNK bereits eine Wirkung auf die DCP1 $\alpha$ -Lokalisation hat, die Überexpression der katalytisch inaktiven JNK-Mutante hingegen nicht. Auch ist der nach Koexpression von JNK und HA-TAK<sub>kd</sub>TAB<sub>ad</sub> erhaltene Effekt durch den Austausch des JNK-Wildtyps gegen die Mutante reversibel. Ebenfalls kann ausgeschlossen werden, dass die hier beobachtete Lokalisationsänderung auf die Änderung der globalen nicht translatierten mRNP-Menge zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse hinsichtlich der stimulationsbedingten Lokalisationsänderung des endogenen DCP1 $\alpha$  sind auf den ersten Blick widersprüchlich zu den Ergebnissen, die für die Lokalisationsänderung des überexprimierten GFP-getaggten DCP1 $\alpha$  erhalten wurden. Während es beim überexprimierten Protein, außer in dem Ansatz mit koexprimierten HA-JNK2, den Anschein hat, als ob es sich aus dem Zytosol in die *P-bodies* begibt, was zu deren Größenzunahme führt, kann man beim endogenen DCP1 $\alpha$  eine Umverteilung aus den *P-bodies* ins Zytosol beobachten. Eine mögliche Erklärung für die angeblichen Unterschiede ist, dass sich GFP-DCP1 $\alpha$  eigentlich wie das endogene DCP1 $\alpha$  verhält und sich aus den *P-bodies* ins Zytosol

umverteilt. Diese Umverteilung ist allerdings lokal begrenzt und findet nur in den Teilen der Zelle statt, wo auch koexprimiertes JNK oder eine koexprimierte MAP3-Kinase vermehrt vorliegen. Die Intensität des GFP-Signals ist aber so stark, dass diese lokale Umverteilung des GFP-DCP1 $\alpha$  aus den *P-bodies* ins Zytosol wie das Verschmelzen zu einem bzw. mehreren großen *P-bodies* wirkt. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass BFP-MEKK1 mit GFP-DCP1 $\alpha$  in dieser einen großen rundlichen Struktur, welche es induziert, kolokalisiert (Daten nicht gezeigt). Diese Struktur füllt nahezu das gesamte Zytosol aus, was auch dafür spricht, dass es sich hierbei um keinen klassischen *P-body* handelt.

Der Einfluss des JNK-Signalwegs auf die Lokalisation von DCP1 $\alpha$  konnte durch Verwendung JNK-aktivierender extrazellulärer Stimuli (Anisomycin, Sorbitol, IL-1 $\alpha$ ) validiert werden (Abbildung 29). Anisomycin und Sorbitol führen zu einer raschen Umverteilung von DCP1 $\alpha$  aus den *P-bodies* ins Zytosol, vergleichbar mit der nach Überexpression von HA-JNK2, HA-TAK<sub>kd</sub>TAB<sub>ad</sub> oder BFP-MEKK1, während die Stimulation mit IL-1 $\alpha$  eine transiente Zunahme von DCP1 $\alpha$  in den *P-bodies* nach sich zieht. Dabei geht die Lokalisationsänderung mit einer Serin315-Phosphorylierung von DCP1 $\alpha$  einher.

Anisomycin wirkt ähnlich wie Cycloheximid, welches die Proteinbiosynthese auf der Stufe der Elongation inhibiert. Dadurch verbleibt die zu translatierende mRNA an den Polysomen, was zur Abnahme des Anteils an nicht translatierter der Degradation zugänglicher zytoplasmatischer mRNA sowie zum Verschwinden von *P-body*-Strukturen führt (Cougot et al., 2004; Grollman, 1967; Ross, 1995; Tscherne and Pestka, 1975). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass im Fall von Anisomycin die Umverteilung von DCP1 $\alpha$  aus den *P-bodies* ins Zytosol nicht allein auf die Aktivierung von JNK zurückzuführen ist, sondern auch auf die veränderte Menge an nicht translatierter mRNA. Dafür spricht auch, dass eine deutliche JNK-Aktivierung und Phosphorylierung von DCP1 $\alpha$  erst nach 30min erkennbar ist (Abbildung 28), während man bereits nach 5min eine leichte Umverteilung beobachten kann (Abbildung 29).

Osmotischer Stress, wie er z.B. durch Sorbitol verursacht wird, führt zur Inhibierung der Translationsinitiation und der Transkription (Burg et al., 2007; Wengler and Wengler, 1972) und beeinflusst darüber ebenfalls die Menge an nicht translatierter zytoplasmatischer RNA. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass diese Effekte bei der beobachteten Lokalisationsänderung von DCP1 $\alpha$  nach Stimulation mit Sorbitol eine Rolle spielen. Nichtsdestotrotz hat der JNK-Signalweg einen großen Einfluss auf die Sorbitol-induzierte Lokalisationsänderung von DCP1 $\alpha$ , da diese durch SP600125, aber nicht durch SB203580 nahezu vollständig inhibiert werden kann. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass in Hefen, welche über keine zu JNK homologe Kinase verfügen, osmotischer Stress nicht zu einer Abnahme, sondern zu einer Zunahme der *P-bodies* führt, welche von Hog1, einer zu p38 homologen Kinase, abhängig ist (Teixeira et al., 2005). Um den Beitrag an der JNK-vermittelten Lokalisationsänderung von DCP1 $\alpha$  zu bestimmen, könnten weitere *P-body*-Proteine unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen untersucht werden. Hierbei ist natürlich nicht auszuschließen, dass sich darunter welche befinden, die ebenfalls JNK-abhängig reguliert werden.

Mit Hilfe der stabil mit Konstrukten für GFP-DCP1 $\alpha$ -Mutanten transfizierten Zellen konnte eine direkte Verbindung zwischen der Lokalisationsänderung von DCP1 $\alpha$  und der Phosphorylierung an Serin315 geschaffen werden (Abbildung 32). Im Vergleich zum Wildtyp lokalisiert die Serin-315-Alanin-Mutante bevorzugt in *P-bodies*, während die phosphomimetische Serin-315-Aspartat Mutante, ähnlich wie die C-terminal trunkierte Version von GFP-DCP1 $\alpha$ , überwiegend eine zytosolische Verteilung aufweist. Wie bereits erwähnt, fehlt der C-terminalen Deletionsmutante die Trimerisierungsdomäne, ohne die DCP1 $\alpha$  nicht in *P-bodies* lokalisieren kann (Tritschler et al., 2009). Die Mutation von Serin315 zu Glutamat hingegen resultiert in keiner veränderten Lokalisation der entsprechenden Mutante. Das Glutamat scheint allerdings die Phosphorylierung an Serin315 nicht sehr gut zu imitieren, da die Serin-315-Glutamat-Mutante in Westernblotuntersuchungen auch bei langen Expositionszeiten nicht vom phosphospezifischen Antikörper gegen Serin315 erkannt wird, während die Detektion der Serin-315-Aspartat-Mutante problemlos erfolgt (Abbildung 31). Im Gegensatz zur Phosphorylierung an Serin315 hat die Phosphorylierung an Serin319 keinen bedeutsamen Einfluss auf die Lokalisation von DCP1 $\alpha$ , da es unabhängig von der eingeführten Mutation an Serin319 zur Zunahme der jeweiligen Einzelmutanten in den *P-bodies* kommt, was auf einen unspezifischen Effekt hindeutet. Ebenfalls unterscheiden sich die Serin-315/319-Alanin-Mutante und die Serin-315/319-Aspartat-Mutante hinsichtlich der Lokalisation nicht von den entsprechenden Serin-315-Einfachmutanten (Abbildung 36). Nach den Ergebnissen der in Abbildung 34 und Abbildung 35 dargestellten Westernblots ist es denkbar, dass die Phosphorylierung an Serin319 unter anderem für eine effiziente Phosphorylierung an Serin315 wichtig ist.

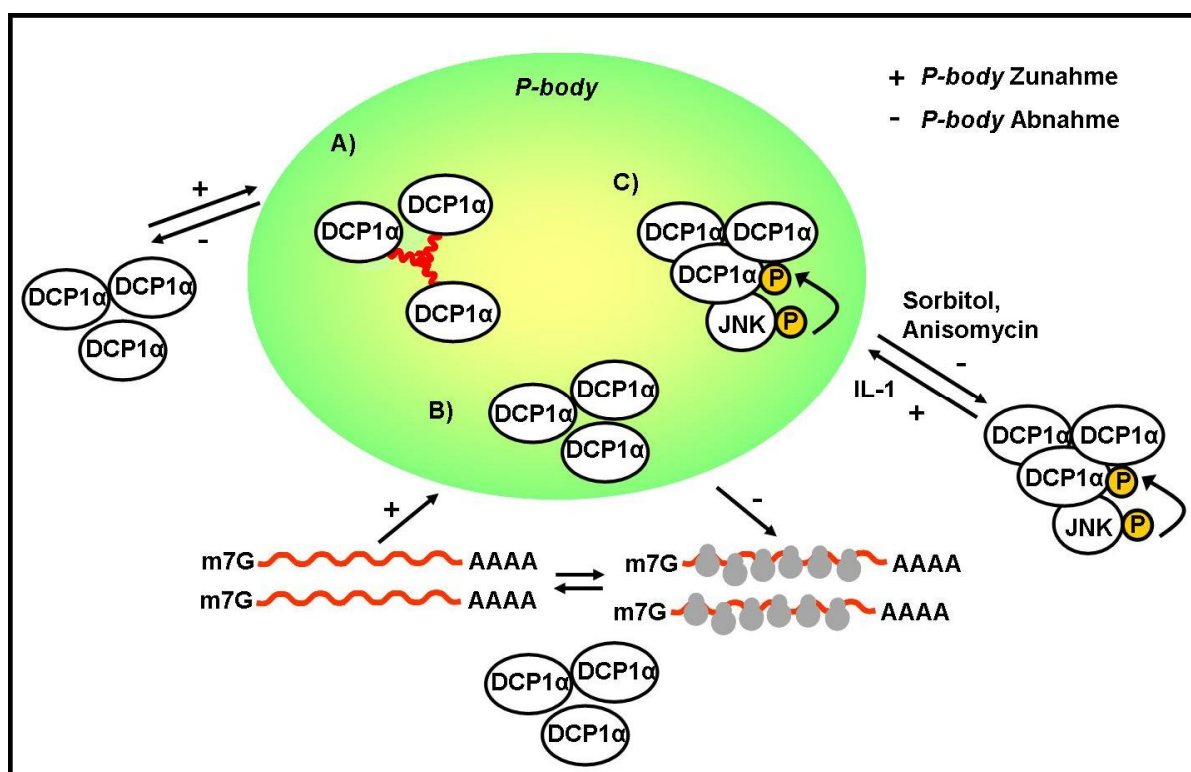
Die Generierung der stabilen Linien mit den Serin-315-Einfachmutanten wurde in zwei unabhängigen Ansetzten durchgeführt. Ebenso wurden die stabilen Zelllinien, welche die Doppelmutanten exprimieren, in einer unabhängigen Transfektion hergestellt. In jedem Fall konnte beobachtet werden, dass die Mutation von Serin315 zu Alanin oder zu Aspartat, mit einer Zunahme bzw. Abnahme der entsprechenden Einzel- als auch Doppelmutanten in den *P-bodies* einherging. Bei der Lokalisationsänderung der Serin-315-Mutanten handelt es sich also um einen absolut reproduzierbaren und somit spezifischen Effekt und nicht um mögliche Selektionsartefakte.

Die hier gemachten Beobachtungen bezüglich der Phosphorylierung von DCP1 $\alpha$  an Serin315 und der damit einhergehenden, in Abhängigkeit von den Stimuli, unterschiedlichen Lokalisationsänderung können eventuell mit der unterschiedlichen Kinetik der JNK-Aktivierung und DCP1 $\alpha$ -Phosphorylierung interpretiert werden. Eine lang anhaltende JNK-Aktivierung, welche eine starke und lang anhaltende Phosphorylierung von DCP1 $\alpha$  an Serin315 nach sich zieht (Überexpression von HA-TAK<sub>kd</sub>TAB<sub>ad</sub> etc., Sorbitol, Anisomycin, S315D-Mutante), scheint die Lokalisation von DCP1 $\alpha$  im Zytosol zu begünstigen. Eine transiente Aktivierung von JNK hingegen, wie es nach Stimulation mit IL-1 $\alpha$  der Fall ist, führt zu einer schwachen und transienten Phosphorylierung von DCP1 $\alpha$  an Serin315 und zu einer verstärkten Lokalisation dieses Proteins in *P-bodies*. Durch weitere Stimuli, die den JNK Signalweg einmal transient und

einmal lang anhaltend aktivieren und dabei die globale mRNA Menge nicht verändern, könnte dieser Befund weiter gefestigt werden.

Es ist durchaus bekannt, dass die Stärke und Dauer der Aktivierung von JNK verschiedene biologische Effekte zur Folge hat. So fördert eine frühe transiente Aktivierung von JNK das Überleben von Zellen, während eine späte, lang anhaltende Aktivierung die gegenteilige Wirkung zeigt (Ventura et al., 2006). Eine ähnliche Beobachtung konnte für den ERK-Signalweg gemacht werden. Hier konnte gezeigt werden, dass eine kurze Aktivierung von ERK mit einer schwachen Phosphorylierung von c-Fos und seiner Degradation einhergeht, während eine lang anhaltende Aktivierung zu einer c-Fos-Hyperphosphorylierung und -Stabilisierung führt, resultierend in unterschiedlichen biologischen Effekten (Murphy et al., 2002).

Die Lokalisation von DCP1 $\alpha$  in *P-bodies* ist abhängig von der zytoplasmatischen Konzentration an nicht translatierter mRNA sowie von der Fähigkeit über eine C-terminale Domäne (As 539-582) Trimere zu bilden. Die hier präsentierten Daten verdeutlichen, dass die Phosphorylierung von DCP1 $\alpha$  an Serin315 durch JNK einen weiteren, zudem physiologischen Mechanismus darstellt, welcher zur Regulation der Lokalisation des Proteins beiträgt. Die Abhängigkeit der *P-body*-Integrität von der nicht translatierten mRNA-Menge und die damit verbundene Lokalisation von DCP1 $\alpha$  konnte bislang nur durch deren stark artifizielle Manipulation, wie der Behandlung von Zellen mit Translationsinhibitoren (Puromycin, Cycloheximid) oder Transkriptionsinhibitoren (Aktinomycin D) demonstriert werden. Unter physiologischen Bedingungen dürften solche extremen Änderungen der globalen Menge an nicht translatierter mRNA eher die Ausnahme darstellen.



**Abbildung 37: Schematische Darstellung der Mechanismen, welche die Lokalisation von DCP1 $\alpha$  beeinflussen**

Die Lokalisation von DCP1 $\alpha$  in *P-bodies* wird über eine im C-Terminus des Proteins gelegene Domäne (As 539-582) (A), über die Konzentration an zytoplasmatischer nicht translaterter mRNA (B) sowie über die durch JNK katalysierte Phosphorylierung von DCP1 $\alpha$  an Serin315 beeinflusst (C).

Die Relevanz der phosphorylierungsbedingten Lokalisationsänderung von DCP1 $\alpha$  muss noch geklärt werden. Es ist vorstellbar, dass über die Phosphorylierung und vor allem über ihre Kinetik das Gleichgewicht der Degradation bestimmter mRNAs beeinflusst wird und JNK so die Genexpression posttranskriptionell verschieden regulieren kann. So könnte die Entfernung von DCP1 $\alpha$  aus dem Zytosol nach einer transienten Phosphorylierung die zytoplasmatischen nicht translateren mRNAs vor Degradation schützen und ihnen ermöglichen für eine weitere Translation an die Polysomen zu translozieren. Auch könnte solch ein Mechanismus die nach einem Stimulus wie IL-1 $\alpha$  neu synthetisierten mRNAs vor einem schnellen Abbau bewahren und so eine effiziente Translation ermöglichen. Eine lang anhaltende Phosphorylierung hingegen würde DCP1 $\alpha$  aus den *P-bodies* ausschließen und so die mRNAs vor *Decapping* und Abbau schützen, welche dort gelagert werden. Diese könnten dann ebenfalls der Translation zugeführt werden. Andere, unter den Bedingungen im Zytosol lokalisierten mRNAs, würden dann eher der Degradation zugänglich.

Letzteres würde bedeuten, dass *P-bodies* erhalten bleiben, auch wenn DCP1 $\alpha$  ins Zytosol umverteilt wird, eine Hypothese, die im Rahmen dieser Promotion nicht mehr überprüft werden konnte. Zudem gibt es Hinweise, dass *P-body*-Proteine immer koordiniert umverteilt werden, wenn die *P-body*-Bildung durch Herunterregulieren einer Proteinkomponente oder durch RNA-Depletion manipuliert wird (Teixeira et al., 2005).

Um diese Überlegungen zu vertiefen, wurde in den HEK293 IL-1R-Zellen, welche stabil mit dem Konstrukt für die unterschiedlichen GFP-DCP1 $\alpha$ -Mutanten transfiziert waren, die Transkription und Sekretion von IL-8 nach IL-1 $\alpha$ -Stimulation bestimmt (Abbildung 33). Das IL-8-Gen wird nach einer Stimulation mit IL-1 $\alpha$  schnell transkribiert und das Protein schnell gebildet und sekretiert. In allen Zellen, welche stabil mit den Konstrukten für mutierte Versionen von DCP1 $\alpha$  transfiziert sind, ist sowohl die mRNA-Induktion nach IL-1 $\alpha$ -Stimulation als auch die damit vermutlich verbundene Sekretion dieses Proteins unterschiedlich stark beeinträchtigt.

Bei der Serin-315-Alanin-Mutante konnte in weiteren Versuchen gezeigt werden, dass dafür sehr wahrscheinlich eine stark verminderte IL-1 $\alpha$ -Responsivität verantwortlich ist (Daten nicht gezeigt). Die Serin-315-Aspartat-Mutante sowie die C-terminal-trunkierte Version von DCP1 $\alpha$  hingegen, weisen eine zum Wildtyp vergleichbare IL-1 $\alpha$ -Responsivität auf, wie anhand von IL-1 $\alpha$ -abhängigen Phosphorylierungen im Westernblot überprüft wurde (Daten nicht gezeigt).

Demnach scheint eine vermehrte zytosolische Verteilung von DCP1 $\alpha$  mit einer verminderten Induzierbarkeit der IL-8 Expression einherzugehen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die IL-8-Transkription nach IL-1 $\alpha$ -Stimulation ungehindert stattfindet, die IL-8-mRNA jedoch schneller abgebaut wird. Tritschler et al. konnten allerdings zeigen, dass eine vergleichbare C-terminale Deletionsmutante mit einer verminderten *Decapping*-Aktivität *in vivo* assoziiert ist. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass in dieser Studie ein Luziferasereporter eingesetzt und nicht die Expression eines physiologischen Zielgens betrachtet wurde (Tritschler et al., 2009).

Auch wenn der JNK-Signalweg die meisten seiner Funktionen auf der Ebene der Transkription ausübt, so existieren doch einige Berichte, dass JNK einen Einfluss auf die ARE-vermittelte mRNA-Stabilität hat (Chen et al., 2000; Korhonen et al., 2007; Ming et al., 1998; Sze et al., 2008). Die dahinterstehenden Mechanismen sind weniger gut verstanden, involvieren allerdings unter anderem das ARE-bindende Protein TTP (Korhonen et al., 2007; Sze et al., 2008). In A549/8 humanen alveolaren Epithelzellen führt die Inhibierung von JNK durch SP600125 oder das Herunterregulieren des Proteins mittels spezifischer siRNAs zu einer auf posttranskriptionellen Effekten basierenden Abnahme der TTP Proteinmenge und in Folge dessen zu einer Reduktion der iNOS(*inducible nitric oxide synthase*)-mRNA und -Proteinmenge (Korhonen et al., 2007). In murinen TM4-Zellen geht die durch TNF $\alpha$  induzierte Aktivierung des JNK-Signalwegs mit einer erhöhten TTP Expression und Destabilisierung der CLMP(*cox sackie- and adenovirus-receptor-like membrane protein*)-mRNA einher (Sze et al., 2008). TTP kann in *P-bodies* lokalisiert sein und ist wichtig für die Akkumulation von ARE-enthaltenden mRNAs in diesen Strukturen (Franks and Lykke-Andersen, 2007; Kedersha et al., 2005). Es interagiert auch mit den Komponenten des *Decapping*-Komplexes, unter anderen mit DCP1 $\alpha$  und ist essentiell für effizientes *Decapping* von ARE-mRNAs *in vitro* (Fenger-Gron et al., 2005; Lykke-Andersen and Wagner, 2005).

Es ist daher vorstellbar, dass JNK auf die Stabilität von ARE-mRNAs Einfluss nimmt, indem es über die Phosphorylierung von DCP1 $\alpha$  an Serin315 die Interaktion zwischen DCP1 $\alpha$  und TTP beeinflusst. Eventuell sind auch die in den stabilen Zelllinien beobachteten Effekt auf eine gestörte Interaktion zwischen TTP und dem *Decapping*-Komplex zurückzuführen, zumal TTP an



der Stabilität von IL-8-mRNA, welche über AU-reiche Sequenzen in der 3'-UTR verfügt, beteiligt zu sein scheint (Balakathiresan et al., 2009; Suswam et al., 2008).

Da die Ergebnisse zur DCP1 $\alpha$ -abhängigen IL-8-Expression zum Ende der Doktorarbeit erhoben wurden, konnte zu diesem Zeitpunkt nicht mehr geklärt werden, ob die gemachten Beobachtungen nicht nur auf posttranskriptionelle, sondern möglicherweise auch auf transkriptionelle Effekte zurückzuführen sind. Die meisten Studien zu DCP1 $\alpha$  beschäftigen sich mit der Untersuchung seiner Funktion beim *Decapping*. Allerdings existiert ein Bericht darüber, dass DCP1 $\alpha$  als SMAD4-interagierender, transkriptioneller Co-Aktivator fungiert (Bai et al., 2002). In zukünftigen Experimenten muss auch geklärt werden inwieweit die gemessenen IL-8-Proteinmengen nur durch die verschiedenen mRNA-Level verursacht sind oder ob zusätzlich ein Einfluss auf die Translation besteht. Zudem ist es erforderlich den Einfluss der DCP1 $\alpha$ -Mutanten auf weitere Gene mittels Transkriptomanalysen zu erfassen.

### 4.3 Zusammenfassung

Die im Rahmen dieser Arbeit präsentierten Befunde lassen sich mit den aus der Literatur vorliegenden Daten in folgender Abbildung zusammenfassen:

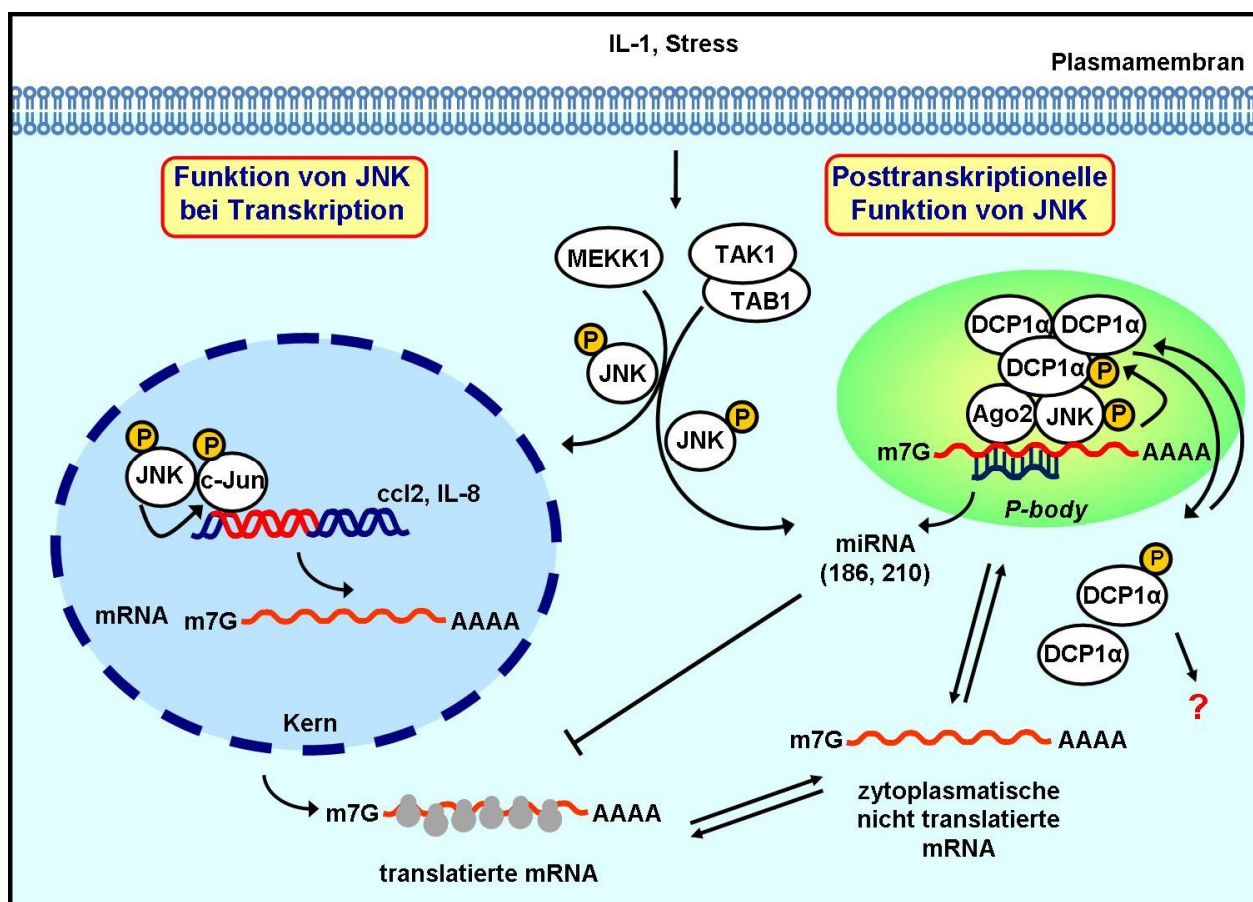


Abbildung 38: Schematische, zusammenfassende Darstellung der transkriptionellen und posttranskriptionellen Funktion von JNK

JNK wird durch eine Reihe von Stimuli wie proinflammatorischen Zytokinen oder jeder Form von zellulärem Stress unter der Beteiligung von MAP3-Kinasen wie TAK1 oder MEKK1 aktiviert und übt daraufhin die meisten seiner Funktionen über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie c-Jun aus. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein kleiner Anteil an JNK RNA-abhängig mit Ago2 interagiert und dass aktiviertes JNK die Menge einiger miRNAs (186, 210) in solchen Komplexen herabsetzt. Komplexe aus Ago2 und JNK interagieren zudem mit DCP1 $\alpha$ , welches durch JNK an Serin315 phosphoryliert und an Serin319 JNK-abhängig modifiziert wird. Über die Phosphorylierung an Serin315 wird die Lokalisation von DCP1 $\alpha$  reguliert. Hierbei führt eine schwache transiente Phosphorylierung zur Zunahme von DCP1 $\alpha$  in den *P-bodies*, während eine starke, lang anhaltende Phosphorylierung den gegenteiligen Effekt hat. Ob und inwieweit JNK durch die Lokalisationsänderung von DCP1 $\alpha$  und die herabgesetzte Menge an miRNAs in Ago2-Komplexen die Expression bestimmter Gene posttranskriptionell reguliert, muss durch weiterführende Experimente geklärt werden.

#### 4.4 Ausblick

Aus den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen ergibt sich eine Vielzahl an weiteren Vorgehensweisen.

Im Zusammenhang mit der Abnahme der Menge der miRNAs mir-186 und mir-210 an Ago2-Komplexen, welche aktiviertes JNK enthalten, ist es wichtig zu untersuchen inwiefern die Bindung weiterer miRNAs von der JNK-Aktivierung betroffen ist. Um möglichst viele miRNAs abzudecken, sollte dabei von der Durchführung einzelner miRNA *TaqMan assays* abgesehen und direkt miRNA-*Microarrays* eingesetzt werden. Hierbei könnten verschiedene JNK-stimulierende Bedingungen gewählt werden. Ebenso wäre es von Interesse unter diesen Reaktionsbedingungen die mRNA-Beladung zu messen und zu untersuchen, ob und welcher Zusammenhang zwischen der JNK-regulierten miRNA-Assoziation und der mRNA-Beladung besteht, vor allem da die Zusammensetzung an Ago2-assoziierten mRNAs von den miRNAs abzuhängen scheint, die an Ago2-Komplexe gebunden vorliegen (Hendrickson et al., 2008). Auch existieren bislang keine Aufreinigungen von miRNAs und mRNAs aus Ago2-Komplexen unter Bedingungen der Stimulation (Azuma-Mukai et al., 2008; Beitzinger et al., 2007; Hendrickson et al., 2008; Landthaler et al., 2008). Je nach Ausgang dieser Untersuchungen könnte dann für ausgewählte mRNAs die Translation unter JNK-aktivierenden Bedingungen untersucht werden.

Nach den initialen ELISA-Ergebnissen zu urteilen, scheinen die HEK293 IL-1R-Zellen, welche DCP1 $\alpha$  und die jeweiligen Mutanten stabil exprimieren, ein interessantes Werkzeug darzustellen. Auf der Grundlage der hier erhaltenen Daten sollten daher eine Reihe von weiteren Zielgenen auf ihrer Transkription sowie Translation unter Verwendung von DNA- und Protein-*Microarrays* untersucht werden. Dabei empfiehlt es sich zunächst zu klären mit welcher Ebene der Proteinbildung (Transkription, posttranskriptionell (Degradation), Translation) die Mutanten interferieren.

In den bislang veröffentlichten Studien, welche sich mit mRNA-Abbau in Abhängigkeit von *P-body*-Integrität und somit auch indirekt in Abhängigkeit von der DCP1 $\alpha$ -Lokalisation beschäftigen, werden überexprimierte Reporter eingesetzt. Es existieren bisher keine Berichte über die Auswirkungen auf endogene Transkripte und die daraus resultierende Proteinbildung.

Um die biologische Relevanz der Phosphorylierung von DCP1 $\alpha$  an Serin315 weiter zu untersuchen, könnten *knock in* Mäuse generiert werden, die entweder die Serin-315-Alanin- oder die phosphomimetische Serin-315-Aspartat-Mutante von DCP1 $\alpha$  exprimieren. Die *knock in* Strategie wurde z.B. erfolgreich für die Untersuchung der N-terminalen Phosphorylierungsstellen von p53 (Sluss et al., 2004; Wu et al., 2002) und c-Jun (Behrens et al., 1999) eingesetzt.

Es existieren wenige Berichte darüber, welche Bereiche von DCP1 $\alpha$  aus höheren Eukaryoten an Proteininteraktionen oder am *Decapping* beteiligt sind. Untersuchungen, die dazu existieren, zeigen bislang, dass Serin315 in einem Bereich des Proteins liegt, welcher nicht am *Decapping* oder an der Bindung zu anderen Proteinen beteiligt ist (Lykke-Andersen, 2002; Tritschler et al., 2009). Daher wäre es interessant zu überprüfen, ob die Phosphorylierung an Serin315 nicht nur die Lokalisation von DCP1 $\alpha$  beeinflusst, sondern ebenfalls mit einer veränderten *Decapping*-Aktivität oder einer veränderten Bindung von DCP1 $\alpha$ -interagierenden Proteinen einhergeht. Um die *Decapping*-Aktivität zu untersuchen, könnten *in vitro* *Decapping*-Versuche mit dem Wildtyp von DCP1 $\alpha$  im Vergleich zur Serin-315-Alanin- und zur Serin-315-Aspartat-Mutante durchgeführt werden. Für die Untersuchung der Proteininteraktion würde es sich empfehlen, aus den stabilen Zelllinien GFP-DCP1 $\alpha$  sowie die jeweiligen Mutanten im präparativen Maßstab zu immunopräzipitieren und die koimmunopräzipitierten Proteine massenspektrometrisch zu identifizieren.

Ebenfalls ist es wichtig die an Serin319 JNK-abhängig auftretende Modifikation näher zu charakterisieren. Bei DCP1 $\alpha$  handelt es sich offensichtlich um ein posttranskriptionell stark modifiziertes und somit in seiner Funktion sehr wahrscheinlich hoch reguliertes Protein. Daher ist es von Bedeutung DCP1 $\alpha$  auf weitere JNK-abhängige Modifikationen hin zu überprüfen. Dabei sollte nicht ausschließlich die Phosphorylierung im Vordergrund stehen, sondern ebenfalls Modifikationen wie Ubiquitylierung, Sumoylierung, Acetylierung und Methylierung in Betracht gezogen werden.

## 5 Literatur

- Adam-Stitah,S., Penna,L., Chambon,P., and Rochette-Egly,C. (1999). Hyperphosphorylation of the retinoid X receptor alpha by activated c-Jun NH2-terminal kinases. *J. Biol. Chem.* 274, 18932-18941.
- Adams,B.D., Claffey,K.P., and White,B.A. (2009). Argonaute-2 expression is regulated by epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase signaling and correlates with a transformed phenotype in breast cancer cells. *Endocrinology* 150, 14-23.
- Adler,V., Pincus,M.R., Minamoto,T., Fuchs,S.Y., Bluth,M.J., Brandt-Rauf,P.W., Friedman,F.K., Robinson,R.C., Chen,J.M., Wang,X.W., Harris,C.C., and Ronai,Z. (1997). Conformation-dependent phosphorylation of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 1686-1691.
- Adler,V., Polotskaya,A., Wagner,F., and Kraft,A.S. (1992). Affinity-purified c-Jun amino-terminal protein kinase requires serine/threonine phosphorylation for activity. *J. Biol. Chem.* 267, 17001-17005.
- Aguirre,V., Uchida,T., Yenush,L., Davis,R., and White,M.F. (2000). The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J. Biol. Chem.* 275, 9047-9054.
- Aizer,A., Brody,Y., Ler,L.W., Sonenberg,N., Singer,R.H., and Shav-Tal,Y. (2008). The dynamics of mammalian P body transport, assembly, and disassembly in vivo. *Mol. Biol. Cell* 19, 4154-4166.
- Alvarez,E., Northwood,I.C., Gonzalez,F.A., Latour,D.A., Seth,A., Abate,C., Curran,T., and Davis,R.J. (1991). Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation. Characterization of the phosphorylation of c-myc and c-jun proteins by an epidermal growth factor receptor threonine 669 protein kinase. *J. Biol. Chem.* 266, 15277-15285.
- Anderson,P. and Kedersha,N. (2008). Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem. Sci.* 33, 141-150.
- Anderson,P. and Kedersha,N. (2009). RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 430-436.
- Andrei,M.A., Ingelfinger,D., Heintzmann,R., Achsel,T., Rivera-Pomar,R., and Luhrmann,R. (2005). A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA*. 11, 717-727.
- Arbour,N., Nanche,D., Homann,D., Davis,R.J., Flavell,R.A., and Oldstone,M.B. (2002). c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 signaling pathways have divergent roles in CD8(+) T cell-mediated antiviral immunity. *J. Exp. Med.* 195, 801-810.
- Avruch,J. (2007). MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 1150-1160.
- Awano,K., Amano,K., Nagaura,Y., Kanno,S., Echigo,S., Tamura,S., and Kobayashi,T. (2008). Phosphorylation of protein phosphatase 2Czeta by c-Jun NH2-terminal kinase at Ser92 attenuates its phosphatase activity. *Biochemistry* 47, 7248-7255.
- Azuma-Mukai,A., Oguri,H., Mituyama,T., Qian,Z.R., Asai,K., Siomi,H., and Siomi,M.C. (2008). Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 7964-7969.
- Baek,D., Villen,J., Shin,C., Camargo,F.D., Gygi,S.P., and Bartel,D.P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455, 64-71.
- Bagga,S., Bracht,J., Hunter,S., Massirer,K., Holtz,J., Eachus,R., and Pasquinelli,A.E. (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122, 553-563.
- Bai,R.Y., Koester,C., Ouyang,T., Hahn,S.A., Hammerschmidt,M., Peschel,C., and Duyster,J. (2002). SMIF, a Smad4-interacting protein that functions as a co-activator in TGFbeta signalling. *Nat. Cell Biol.* 4, 181-190.

- Bain,J., McLauchlan,H., Elliott,M., and Cohen,P. (2003). The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem. J.* *371*, 199-204.
- Balakathiresan,N.S., Bhattacharyya,S., Gutti,U., Long,R.P., Jozwik,C., Huang,W., Srivastava,M., Pollard,H.B., and Biswas,R. (2009). Tristetraprolin regulates IL-8 mRNA stability in cystic fibrosis lung epithelial cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* *296*, L1012-L1018.
- Barreau,C., Paillard,L., and Osborne,H.B. (2005). AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res.* *33*, 7138-7150.
- Bartel,D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* *116*, 281-297.
- Bashkirov,V.I., Scherthan,H., Solinger,J.A., Buerstedde,J.M., and Heyer,W.D. (1997). A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *J. Cell Biol.* *136*, 761-773.
- Baumberger,N. and Baulcombe,D.C. (2005). Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 11928-11933.
- 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.
- Beelman,C.A., Stevens,A., Caponigro,G., LaGrandeur,T.E., Hatfield,L., Fortner,D.M., and Parker,R. (1996). An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. *Nature* *382*, 642-646.
- Behm-Ansmant,I., Rehwinkel,J., Doerks,T., Stark,A., Bork,P., and Izaurralde,E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* *20*, 1885-1898.
- Behrens,A., Sibilio,M., and Wagner,E.F. (1999). Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat. Genet.* *21*, 326-329.
- Beitzinger,M., Peters,L., Zhu,J.Y., Kremmer,E., and Meister,G. (2007). Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes. *RNA. Biol.* *4*, 76-84.
- Berezikov,E., Chung,W.J., Willis,J., Cuppen,E., and Lai,E.C. (2007). Mammalian mirtron genes. *Mol. Cell* *28*, 328-336.
- Bernstein,E., Caudy,A.A., Hammond,S.M., and Hannon,G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* *409*, 363-366.
- Bhattacharyya,S.N. and Filipowicz,W. (2007). Argonautes and company: sailing against the wind. *Cell* *128*, 1027-1028.
- Bhattacharyya,S.N., Habermacher,R., Martine,U., Closs,E.I., and Filipowicz,W. (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* *125*, 1111-1124.
- Blumenthal,J., Behar,L., Elliott,E., and Ginzburg,I. (2009). Dcp1a phosphorylation along neuronal development and stress. *FEBS Lett.* *583*, 197-201.
- 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.
- Bohmert,K., Camus,I., Bellini,C., Bouchez,D., Caboche,M., and Benning,C. (1998). AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO J.* *17*, 170-180.
- Bonny,C., Borsello,T., and Zine,A. (2005). Targeting the JNK pathway as a therapeutic protective strategy for nervous system diseases. *Rev. Neurosci.* *16*, 57-67.
- Borchert,G.M., Lanier,W., and Davidson,B.L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 1097-1101.

- Bregues, M., Teixeira, D., and Parker, R. (2005). Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* *310*, 486-489.
- Burg, M.B., Ferraris, J.D., and Dmitrieva, N.I. (2007). Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev.* *87*, 1441-1474.
- Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* *10*, 1957-1966.
- Calin, G.A. and Croce, C.M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 857-866.
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., and Croce, C.M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 15524-15529.
- Camp, H.S., Tafuri, S.R., and Leff, T. (1999). c-Jun N-terminal kinase phosphorylates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and negatively regulates its transcriptional activity. *Endocrinology* *140*, 392-397.
- Care, A., Catalucci, D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., Bang, M.L., Segnalini, P., Gu, Y., Dalton, N.D., Elia, L., Latronico, M.V., Hoydal, M., Autore, C., Russo, M.A., Dorn, G.W., Ellingsen, O., Ruiz-Lozano, P., Peterson, K.L., Croce, C.M., Peschle, C., and Condorelli, G. (2007). MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* *13*, 613-618.
- Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q., and Hannon, G.J. (2002). The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev.* *16*, 2733-2742.
- Cerutti, L., Mian, N., and Bateman, A. (2000). Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 481-482.
- Chang, L., Jones, Y., Ellisman, M.H., Goldstein, L.S., and Karin, M. (2003). JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Dev. Cell* *4*, 521-533.
- Chang, Y.F., Imam, J.S., and Wilkinson, M.F. (2007). The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 51-74.
- Chapados, B.R., Chai, Q., Hosfield, D.J., Qiu, J., Shen, B., and Tainer, J.A. (2001). Structural biochemistry of a type 2 RNase H: RNA primer recognition and removal during DNA replication. *J. Mol. Biol.* *307*, 541-556.
- Chen, C.Y., Gherzi, R., Andersen, J.S., Gaietta, G., Jurchott, K., Royer, H.D., Mann, M., and Karin, M. (2000). Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes Dev.* *14*, 1236-1248.
- Chen, C.Y., Zheng, D., Xia, Z., and Shyu, A.B. (2009). Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 1160-1166.
- Chinenov, Y. and Kerppola, T.K. (2001). Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* *20*, 2438-2452.
- Chow, C.W., Dong, C., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2000). c-Jun NH(2)-terminal kinase inhibits targeting of the protein phosphatase calcineurin to NFATc1. *Mol. Cell Biol.* *20*, 5227-5234.
- Chow, C.W., Rincon, M., Cavanagh, J., Dickens, M., and Davis, R.J. (1997). Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* *278*, 1638-1641.
- Chu, C.Y. and Rana, T.M. (2006). Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS. Biol.* *4*, e210.
- Cohen, P. (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 596-601.

- Cohen,P. (2010). Guidelines for the effective use of chemical inhibitors of protein function to understand their roles in cell regulation. *Biochem. J.* 425, 53-54.
- Coller,J. and Parker,R. (2005). General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* 122, 875-886.
- Conze,D., Krahl,T., Kennedy,N., Weiss,L., Lumsden,J., Hess,P., Flavell,R.A., Le Gros,G., Davis,R.J., and Rincon,M. (2002). c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 have distinct roles in CD8(+) T cell activation. *J. Exp. Med.* 195, 811-823.
- Cougot,N., Babajko,S., and Seraphin,B. (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J. Cell Biol.* 165, 31-40.
- Davis,R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.
- Decker,C.J., Teixeira,D., and Parker,R. (2007). Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 179, 437-449.
- Deng,X., Xiao,L., Lang,W., Gao,F., Ruvolo,P., and May,W.S., Jr. (2001). Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 23681-23688.
- Denli,A.M., Tops,B.B., Plasterk,R.H., Ketting,R.F., and Hannon,G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-235.
- Dephoure,N., Zhou,C., Villen,J., Beausoleil,S.A., Bakalarski,C.E., Elledge,S.J., and Gygi,S.P. (2008). A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 10762-10767.
- Derijard,B., Hibi,M., Wu,I.H., Barrett,T., Su,B., Deng,T., Karin,M., and Davis,R.J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76, 1025-1037.
- Derijard,B., Ringeaud,J., Barrett,T., Wu,I.H., Han,J., Ulevitch,R.J., and Davis,R.J. (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267, 682-685.
- Diederichs,S. and Haber,D.A. (2007). Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 131, 1097-1108.
- Ding,L., Spencer,A., Morita,K., and Han,M. (2005). The developmental timing regulator AIN-1 interacts with miRISCs and may target the argonaute protein ALG-1 to cytoplasmic P bodies in *C. elegans*. *Mol. Cell* 19, 437-447.
- Dong,C., Yang,D.D., Wysk,M., Whitmarsh,A.J., Davis,R.J., and Flavell,R.A. (1998). Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* 282, 2092-2095.
- Ducret,C., Maira,S.M., Dierich,A., and Wasylyk,B. (1999). The net repressor is regulated by nuclear export in response to anisomycin, UV, and heat shock. *Mol. Cell Biol.* 19, 7076-7087.
- Ducret,C., Maira,S.M., Lutz,Y., and Wasylyk,B. (2000). The ternary complex factor Net contains two distinct elements that mediate different responses to MAP kinase signalling cascades. *Oncogene* 19, 5063-5072.
- Dunckley,T. and Parker,R. (1999). The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. *EMBO J.* 18, 5411-5422.
- Eferl,R. and Wagner,E.F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 3, 859-868.
- Eulalio,A., Behm-Ansmant,I., and Izaurralde,E. (2007a). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 9-22.
- Eulalio,A., Behm-Ansmant,I., Schweizer,D., and Izaurralde,E. (2007b). P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol. Cell Biol.* 27, 3970-3981.
- Eystathiou,T., Chan,E.K., Tenenbaum,S.A., Keene,J.D., Griffith,K., and Fritzler,M.J. (2002). A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol. Biol. Cell* 13, 1338-1351.

- Eystathiou,T., Jakymiw,A., Chan,E.K., Seraphin,B., Cougot,N., and Fritzler,M.J. (2003). The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA*. *9*, 1171-1173.
- Fenger-Gron,M., Fillman,C., Norrild,B., and Lykke-Andersen,J. (2005). Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. *Mol. Cell* *20*, 905-915.
- Ferraiuolo,M.A., Basak,S., Dostie,J., Murray,E.L., Schoenberg,D.R., and Sonenberg,N. (2005). A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *J. Cell Biol.* *170*, 913-924.
- Filipowicz,W. (2005). RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell* *122*, 17-20.
- Finch,A., Davis,W., Carter,W.G., and Saklatvala,J. (2001). Analysis of mitogen-activated protein kinase pathways used by interleukin 1 in tissues in vivo: activation of hepatic c-Jun N-terminal kinases 1 and 2, and mitogen-activated protein kinase kinases 4 and 7. *Biochem. J.* *353*, 275-281.
- Forstemann,K., Horwich,M.D., Wee,L., Tomari,Y., and Zamore,P.D. (2007). Drosophila microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by dicer-1. *Cell* *130*, 287-297.
- Franks,T.M. and Lykke-Andersen,J. (2007). TTP and BRF proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements. *Genes Dev.* *21*, 719-735.
- Franks,T.M. and Lykke-Andersen,J. (2008). The control of mRNA decapping and P-body formation. *Mol. Cell* *32*, 605-615.
- Freshney,N.W., Rawlinson,L., Guesdon,F., Jones,E., Cowley,S., Hsuan,J., and Saklatvala,J. (1994). Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* *78*, 1039-1049.
- Fuchs,S.Y., Dolan,L., Davis,R.J., and Ronai,Z. (1996). Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N-kinase. *Oncogene* *13*, 1531-1535.
- Fuchs,S.Y., Tappin,I., and Ronai,Z. (2000). Stability of the ATF2 transcription factor is regulated by phosphorylation and dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* *275*, 12560-12564.
- Fukuhara,N., Ebert,J., Unterholzner,L., Lindner,D., Izaurralde,E., and Conti,E. (2005). SMG7 is a 14-3-3-like adaptor in the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Mol. Cell* *17*, 537-547.
- Gaestel,M. and Kracht,M. (2009). Peptides as Signaling Inhibitors for Mammalian MAP Kinase Cascades. *Curr Pharm Des* *15*, 2471-2480.
- Gille,H., Strahl,T., and Shaw,P.E. (1995). Activation of ternary complex factor Elk-1 by stress-activated protein kinases. *Curr. Biol.* *5*, 1191-1200.
- Giraldez,A.J., Mishima,Y., Rihel,J., Grocock,R.J., Van Dongen,S., Inoue,K., Enright,A.J., and Schier,A.F. (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* *312*, 75-79.
- 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.
- Gregory,R.I., Yan,K.P., Amuthan,G., Chendrimada,T., Doratotaj,B., Cooch,N., and Shiekhattar,R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* *432*, 235-240.
- Grollman,A.P. (1967). Inhibitors of protein biosynthesis. II. Mode of action of anisomycin. *J. Biol. Chem.* *242*, 3226-3233.
- 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.
- Gupta,S., Campbell,D., Derijard,B., and Davis,R.J. (1995). Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* *267*, 389-393.



- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H., and Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* *18*, 3016-3027.
- Hebert, S.S., Horre, K., Nicolai, L., Papadopoulou, A.S., Mandemakers, W., Silahtaroglu, A.N., Kauppinen, S., Delacourte, A., and De Strooper, B. (2008). Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 6415-6420.
- Hendrickson, D.G., Hogan, D.J., Herschlag, D., Ferrell, J.E., and Brown, P.O. (2008). Systematic identification of mRNAs recruited to argonaute 2 by specific microRNAs and corresponding changes in transcript abundance. *PLoS. One.* *3*, e2126.
- Heo, I. and Kim, V.N. (2009). Regulating the regulators: posttranslational modifications of RNA silencing factors. *Cell* *139*, 28-31.
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., and Karin, M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* *7*, 2135-2148.
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K., Karin, M., and Hotamisligil, G.S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* *420*, 333-336.
- Ho, D.T., Bardwell, A.J., Abdollahi, M., and Bardwell, L. (2003). A docking site in MKK4 mediates high affinity binding to JNK MAPKs and competes with similar docking sites in JNK substrates. *J. Biol. Chem.* *278*, 32662-32672.
- Ho, D.T., Bardwell, A.J., Grewal, S., Iverson, C., and Bardwell, L. (2006). Interacting JNK-docking sites in MKK7 promote binding and activation of JNK mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* *281*, 13169-13179.
- Hock, J. and Meister, G. (2008). The Argonaute protein family. *Genome Biol.* *9*, 210.
- Hock, J., Weinmann, L., Ender, C., Rudel, S., Kremmer, E., Raabe, M., Urlaub, H., and Meister, G. (2007). Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep.* *8*, 1052-1060.
- Holland, P.M., Suzanne, M., Campbell, J.S., Noselli, S., and Cooper, J.A. (1997). MKK7 is a stress-activated mitogen-activated protein kinase functionally related to hemipterous. *J. Biol. Chem.* *272*, 24994-24998.
- Holzberg, D., Knight, C.G., Dittrich-Breiholz, O., Schneider, H., Dorrie, A., Hoffmann, E., Resch, K., and Kracht, M. (2003). Disruption of the c-JUN-JNK complex by a cell-permeable peptide containing the c-JUN delta domain induces apoptosis and affects a distinct set of interleukin-1-induced inflammatory genes. *J. Biol. Chem.* *278*, 40213-40223.
- Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 16961-16966.
- Hutvagner, G. and Simard, M.J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 22-32.
- Ingelfinger, D., Arndt-Jovin, D.J., Luhrmann, R., and Achsel, T. (2002). The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci. *RNA.* *8*, 1489-1501.
- Inoshita, S., Takeda, K., Hatai, T., Terada, Y., Sano, M., Hata, J., Umezawa, A., and Ichijo, H. (2002). Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* *277*, 43730-43734.
- Irvine, D.V., Zariatigui, M., Tolia, N.H., Goto, D.B., Chitwood, D.H., Vaughn, M.W., Joshua-Tor, L., and Martienssen, R.A. (2006). Argonaute slicing is required for heterochromatic silencing and spreading. *Science* *313*, 1134-1137.
- Ito, T., Deng, X., Carr, B., and May, W.S. (1997). Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J. Biol. Chem.* *272*, 11671-11673.
- Iwasaki, S., Kawamata, T., and Tomari, Y. (2009). Drosophila argonaute1 and argonaute2 employ distinct mechanisms for translational repression. *Mol. Cell* *34*, 58-67.

- Jagannath,A. and Wood,M.J. (2009). Localization of double-stranded small interfering RNA to cytoplasmic processing bodies is Ago2 dependent and results in up-regulation of GW182 and Argonaute-2. *Mol. Biol. Cell* *20*, 521-529.
- Jakymiw,A., Lian,S., Eystathioy,T., Li,S., Satoh,M., Hamel,J.C., Fritzler,M.J., and Chan,E.K. (2005). Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat. Cell Biol.* *7*, 1267-1274.
- Janowski,B.A., Huffman,K.E., Schwartz,J.C., Ram,R., Nordsell,R., Shames,D.S., Minna,J.D., and Corey,D.R. (2006). Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 787-792.
- Jing,Q., Huang,S., Guth,S., Zarubin,T., Motoyama,A., Chen,J., Di Padova,F., Lin,S.C., Gram,H., and Han,J. (2005). Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* *120*, 623-634.
- Johnson,G.L. and Nakamura,K. (2007). The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1773*, 1341-1348.
- 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.
- Kallunki,T., Su,B., Tsigelny,I., Sluss,H.K., Derijard,B., Moore,G., Davis,R., and Karin,M. (1994). JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev.* *8*, 2996-3007.
- Katz,S. and Aronheim,A. (2002). Differential targeting of the stress mitogen-activated protein kinases to the c-Jun dimerization protein 2. *Biochem. J.* *368*, 939-945.
- Katz,S., Heinrich,R., and Aronheim,A. (2001). The AP-1 repressor, JDP2, is a bona fide substrate for the c-Jun N-terminal kinase. *FEBS Lett.* *506*, 196-200.
- Kawasaki,H. and Taira,K. (2004). Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature* *431*, 211-217.
- Kawasaki,H., Taira,K., and Morris,K.V. (2005). siRNA induced transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Cell Cycle* *4*, 442-448.
- Kawauchi,T., Chihama,K., Nishimura,Y.V., Nabeshima,Y., and Hoshino,M. (2005). MAP1B phosphorylation is differentially regulated by Cdk5/p35, Cdk5/p25, and JNK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *337*, 50-55.
- Kedersha,N., Stoecklin,G., Ayodele,M., Yacono,P., Lykke-Andersen,J., Fritzler,M.J., Scheuner,D., Kaufman,R.J., Golan,D.E., and Anderson,P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* *169*, 871-884.
- Kedersha,N.L., Gupta,M., Li,W., Miller,I., and Anderson,P. (1999). RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* *147*, 1431-1442.
- Kharbanda,S., Saxena,S., Yoshida,K., Pandey,P., Kaneki,M., Wang,Q., Cheng,K., Chen,Y.N., Campbell,A., Sudha,T., Yuan,Z.M., Narula,J., Weichselbaum,R., Nalin,C., and Kufe,D. (2000). Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* *275*, 322-327.
- Kim,B.J., Ryu,S.W., and Song,B.J. (2006a). JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 21256-21265.
- Kim,D.H., Villeneuve,L.M., Morris,K.V., and Rossi,J.J. (2006b). Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 793-797.
- Kim,J., Inoue,K., Ishii,J., Vanti,W.B., Voronov,S.V., Murchison,E., Hannon,G., and Abeliovich,A. (2007). A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* *317*, 1220-1224.
- Kim,V.N., Han,J., and Siomi,M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 126-139.
- Kim,Y.K. and Kim,V.N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *EMBO J.* *26*, 775-783.

- Kiriakidou, M., Tan, G.S., Lamprinaki, S., Planell-Sagner, M., Nelson, P.T., and Mourelatos, Z. (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* 129, 1141-1151.
- Korhonen, R., Linker, K., Pautz, A., Forstermann, U., Moilanen, E., and Kleinert, H. (2007). Post-transcriptional regulation of human inducible nitric-oxide synthase expression by the Jun N-terminal kinase. *Mol. Pharmacol.* 71, 1427-1434.
- Kracht, M., Shiroo, M., Marshall, C.J., Hsuan, J.J., and Saklatvala, J. (1994a). Interleukin-1 activates a novel protein kinase that phosphorylates the epidermal-growth-factor receptor peptide T669. *Biochem. J.* 302 ( Pt 3), 897-905.
- Kracht, M., Truong, O., Totty, N.F., Shiroo, M., and Saklatvala, J. (1994b). Interleukin 1 alpha activates two forms of p54 alpha mitogen-activated protein kinase in rabbit liver. *J. Exp. Med.* 180, 2017-2025.
- Kshirsagar, M. and Parker, R. (2004). Identification of Edc3p as an enhancer of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 166, 729-739.
- Kuan, C.Y., Yang, D.D., Samanta Roy, D.R., Davis, R.J., Rakic, P., and Flavell, R.A. (1999). The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22, 667-676.
- Kyriakis, J.M. and Avruch, J. (1990). pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J. Biol. Chem.* 265, 17355-17363.
- Kyriakis, J.M. and Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 81, 807-869.
- Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J., and Woodgett, J.R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369, 156-160.
- Kyriakis, J.M., Brautigan, D.L., Ingebritsen, T.S., and Avruch, J. (1991). pp54 microtubule-associated protein-2 kinase requires both tyrosine and serine/threonine phosphorylation for activity. *J. Biol. Chem.* 266, 10043-10046.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853-858.
- LaGrandeur, T.E. and Parker, R. (1998). Isolation and characterization of Dcp1p, the yeast mRNA decapping enzyme. *EMBO J.* 17, 1487-1496.
- Landthaler, M., Gaidatzis, D., Rothballer, A., Chen, P.Y., Soll, S.J., Dinic, L., Ojo, T., Hafner, M., Zavolan, M., and Tuschl, T. (2008). Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs. *RNA* 14, 2580-2596.
- Landthaler, M., Yalcin, A., and Tuschl, T. (2004). The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr. Biol.* 14, 2162-2167.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., and Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858-862.
- Lawler, S., Fleming, Y., Goedert, M., and Cohen, P. (1998). Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Curr. Biol.* 8, 1387-1390.
- Lee, F.S., Hagler, J., Chen, Z.J., and Maniatis, T. (1997). Activation of the I $\kappa$ B $\alpha$  kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell* 88, 213-222.
- Lee, H.Y., Suh, Y.A., Robinson, M.J., Clifford, J.L., Hong, W.K., Woodgett, J.R., Cobb, M.H., Mangelsdorf, D.J., and Kurie, J.M. (2000). Stress pathway activation induces phosphorylation of retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 32193-32199.
- Lee, R.C. and Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862-864.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.

- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V.N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* *425*, 415-419.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S., and Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* *21*, 4663-4670.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* *23*, 4051-4060.
- Lei, K. and Davis, R.J. (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 2432-2437.
- Leung, A.K., Calabrese, J.M., and Sharp, P.A. (2006). Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 18125-18130.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* *120*, 15-20.
- Li, B., Tournier, C., Davis, R.J., and Flavell, R.A. (1999). Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *EMBO J.* *18*, 420-432.
- Lian, S., Fritzier, M.J., Katz, J., Hamazaki, T., Terada, N., Satoh, M., and Chan, E.K. (2007). Small interfering RNA-mediated silencing induces target-dependent assembly of GW/P bodies. *Mol. Biol. Cell* *18*, 3375-3387.
- Lin, A., Minden, A., Martinetto, H., Claret, F.X., Lange-Carter, C., Mercurio, F., Johnson, G.L., and Karin, M. (1995). Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* *268*, 286-290.
- Lin, H. and Spradling, A.C. (1997). A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* *124*, 2463-2476.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., and Sattler, M. (2003). Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* *426*, 465-469.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., and Sattler, M. (2004). Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 576-577.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* *305*, 1437-1441.
- Liu, J., Rivas, F.V., Wohlschlegel, J., Yates, J.R., III, Parker, R., and Hannon, G.J. (2005a). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat. Cell Biol.* *7*, 1261-1266.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. (2005b). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* *7*, 719-723.
- Livingstone, C., Patel, G., and Jones, N. (1995). ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J.* *14*, 1785-1797.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* *303*, 95-98.
- Lykke-Andersen, J. (2002). Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. *Mol. Cell Biol.* *22*, 8114-8121.
- Lykke-Andersen, J. and Wagner, E. (2005). Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes Dev.* *19*, 351-361.
- Ma, J.B., Ye, K., and Patel, D.J. (2004). Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* *429*, 318-322.
- Ma, J.B., Yuan, Y.R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2005). Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* *434*, 666-670.

- Macek,B., Mann,M., and Olsen,J.V. (2009). Global and site-specific quantitative phosphoproteomics: principles and applications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *49*, 199-221.
- Maroney,P.A., Yu,Y., Fisher,J., and Nilsen,T.W. (2006). Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 1102-1107.
- May,G.H., Allen,K.E., Clark,W., Funk,M., and Gillespie,D.A. (1998). Analysis of the interaction between c-Jun and c-Jun N-terminal kinase in vivo. *J. Biol. Chem.* *273*, 33429-33435.
- Meister,G., Landthaler,M., Patkaniowska,A., Dorsett,Y., Teng,G., and Tuschl,T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* *15*, 185-197.
- Meister,G., Landthaler,M., Peters,L., Chen,P.Y., Urlaub,H., Luhrmann,R., and Tuschl,T. (2005). Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr. Biol.* *15*, 2149-2155.
- Meister,G. and Tuschl,T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* *431*, 343-349.
- Ming,X.F., Kaiser,M., and Moroni,C. (1998). c-jun N-terminal kinase is involved in AUUUA-mediated interleukin-3 mRNA turnover in mast cells. *EMBO J.* *17*, 6039-6048.
- Moriguchi,T., Toyoshima,F., Masuyama,N., Hanafusa,H., Gotoh,Y., and Nishida,E. (1997). A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNFalpha and cellular stresses. *EMBO J.* *16*, 7045-7053.
- Morton,S., Davis,R.J., McLaren,A., and Cohen,P. (2003). A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *EMBO J.* *22*, 3876-3886.
- Moussian,B., Schoof,H., Haecker,A., Jurgens,G., and Laux,T. (1998). Role of the ZWILLE gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during Arabidopsis embryogenesis. *EMBO J.* *17*, 1799-1809.
- Murphy,L.O., Smith,S., Chen,R.H., Fingar,D.C., and Blenis,J. (2002). Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat. Cell Biol.* *4*, 556-564.
- Musti,A.M., Treier,M., and Bohmann,D. (1997). Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science* *275*, 400-402.
- Nakasa,T., Miyaki,S., Okubo,A., Hashimoto,M., Nishida,K., Ochi,M., and Asahara,H. (2008). Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum.* *58*, 1284-1292.
- Neidhart,S., Antonsson,B., Gillieron,C., Vilbois,F., Grenningloh,G., and Arkinstall,S. (2001). c-Jun N-terminal kinase-3 (JNK3)/stress-activated protein kinase-beta (SAPKbeta) binds and phosphorylates the neuronal microtubule regulator SCG10. *FEBS Lett.* *508*, 259-264.
- Noguchi,K., Kitanaka,C., Yamana,H., Kokubu,A., Mochizuki,T., and Kuchino,Y. (1999). Regulation of c-Myc through phosphorylation at Ser-62 and Ser-71 by c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* *274*, 32580-32587.
- Nonne,N., Ameyar-Zazoua,M., Souidi,M., and Harel-Bellan,A. (2010). Tandem affinity purification of miRNA target mRNAs (TAP-Tar). *Nucleic Acids Res.* *38*, e20.
- Nottrott,S., Simard,M.J., and Richter,J.D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 1108-1114.
- Nowotny,M., Gaidamakov,S.A., Crouch,R.J., and Yang,W. (2005). Crystal structures of RNase H bound to an RNA/DNA hybrid: substrate specificity and metal-dependent catalysis. *Cell* *121*, 1005-1016.
- O'Connell,R.M., Taganov,K.D., Boldin,M.P., Cheng,G., and Baltimore,D. (2007). MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 1604-1609.
- Okamura,K., Hagen,J.W., Duan,H., Tyler,D.M., and Lai,E.C. (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila. *Cell* *130*, 89-100.
- Olsen,J.V., Blagoev,B., Gnadt,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.

- Olsen, J.V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M.L., Jensen, L.J., Gnad, F., Cox, J., Jensen, T.S., Nigg, E.A., Brunak, S., and Mann, M. (2010). Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci. Signal.* 3, ra3.
- Olsen, P.H. and Ambros, V. (1999). The *lin-4* regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev. Biol.* 216, 671-680.
- Ortega-Perez, I., Cano, E., Were, F., Villar, M., Vazquez, J., and Redondo, J.M. (2005). c-Jun N-terminal kinase (JNK) positively regulates NFATc2 transactivation through phosphorylation within the N-terminal regulatory domain. *J. Biol. Chem.* 280, 20867-20878.
- Pare, J.M., Tahbaz, N., Lopez-Orozco, J., LaPointe, P., Lasko, P., and Hobman, T.C. (2009). Hsp90 regulates the function of argonaute 2 and its recruitment to stress granules and P-bodies. *Mol. Biol. Cell* 20, 3273-3284.
- Parker, J.S., Roe, S.M., and Barford, D. (2004). Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J.* 23, 4727-4737.
- Pauley, K.M., Eystathiou, T., Jakymiw, A., Hamel, J.C., Fritzler, M.J., and Chan, E.K. (2006). Formation of GW bodies is a consequence of microRNA genesis. *EMBO Rep.* 7, 904-910.
- Payne, D.M., Rossomando, A.J., Martino, P., Erickson, A.K., Her, J.H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Weber, M.J., and Sturgill, T.W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.* 10, 885-892.
- Peters, L. and Meister, G. (2007). Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol. Cell* 26, 611-623.
- Petersen, C.P., Bordeleau, M.E., Pelletier, J., and Sharp, P.A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol. Cell* 21, 533-542.
- Pillai, R.S., Artus, C.G., and Filipowicz, W. (2004). Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA*. 10, 1518-1525.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 309, 1573-1576.
- Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Nikolakaki, E., and Woodgett, J.R. (1991). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353, 670-674.
- Qi, H.H., Ongusaha, P.P., Myllyharju, J., Cheng, D., Pakkanen, O., Shi, Y., Lee, S.W., Peng, J., and Shi, Y. (2008). Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability. *Nature* 455, 421-424.
- Qi, Y., Denli, A.M., and Hannon, G.J. (2005). Biochemical specialization within Arabidopsis RNA silencing pathways. *Mol. Cell* 19, 421-428.
- Qi, Y., He, X., Wang, X.J., Kohany, O., Jurka, J., and Hannon, G.J. (2006). Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* 443, 1008-1012.
- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J., and Davis, R.J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.* 270, 7420-7426.
- Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., and Izaurralde, E. (2005). A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA*. 11, 1640-1647.
- Reijns, M.A., Alexander, R.D., Spiller, M.P., and Beggs, J.D. (2008). A role for Q/N-rich aggregation-prone regions in P-body localization. *J. Cell Sci.* 121, 2463-2472.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.
- Rivas, F.V., Tolia, N.H., Song, J.J., Aragon, J.P., Liu, J., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2005). Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 340-349.

- Rogatsky, I., Logan, S.K., and Garabedian, M.J. (1998). Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 2050-2055.
- Ross, J. (1995). mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol. Rev.* *59*, 423-450.
- Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* *448*, 83-86.
- Rybak, A., Fuchs, H., Hadian, K., Smirnova, L., Wulczyn, E.A., Michel, G., Nitsch, R., Krappmann, D., and Wulczyn, F.G. (2009). The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1411-1420.
- Sabapathy, K., Jochum, W., Hochedlinger, K., Chang, L., Karin, M., and Wagner, E.F. (1999). Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mech. Dev.* *89*, 115-124.
- Sakurai, H., Nishi, A., Sato, N., Mizukami, J., Miyoshi, H., and Sugita, T. (2002). TAK1-TAB1 fusion protein: a novel constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase kinase that stimulates AP-1 and NF-kappaB signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *297*, 1277-1281.
- Sasaki, T., Shiohama, A., Minoshima, S., and Shimizu, N. (2003). Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled. *Genomics* *82*, 323-330.
- Seggerson, K., Tang, L., and Moss, E.G. (2002). Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev. Biol.* *243*, 215-225.
- Selbach, M., Schwanhauser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., and Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* *455*, 58-63.
- Sen, G.L. and Blau, H.M. (2005). Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat. Cell Biol.* *7*, 633-636.
- Serman, A., Le Roy, F., Aigueperse, C., Kress, M., Dautry, F., and Weil, D. (2007). GW body disassembly triggered by siRNAs independently of their silencing activity. *Nucleic Acids Res.* *35*, 4715-4727.
- Seyfried, J., Wang, X., Kharebava, G., and Tournier, C. (2005). A novel mitogen-activated protein kinase docking site in the N terminus of MEK5alpha organizes the components of the extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* *25*, 9820-9828.
- 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.
- Shaulian, E. and Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* *4*, E131-E136.
- She, M., Decker, C.J., Chen, N., Tumati, S., Parker, R., and Song, H. (2006). Crystal structure and functional analysis of Dcp2p from *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 63-70.
- She, M., Decker, C.J., Sundramurthy, K., Liu, Y., Chen, N., Parker, R., and Song, H. (2004). Crystal structure of Dcp1p and its functional implications in mRNA decapping. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 249-256.
- She, M., Decker, C.J., Svergun, D.I., Round, A., Chen, N., Muhrad, D., Parker, R., and Song, H. (2008). Structural basis of dcp2 recognition and activation by dcp1. *Mol. Cell* *29*, 337-349.
- Sheth, U. and Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* *300*, 805-808.
- Sheth, U. and Parker, R. (2006). Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. *Cell* *125*, 1095-1109.
- Shin, M.S., Shinghirunusorn, P., Sugishima, Y., Nishimura, M., Suzuki, S., Koizumi, K., Saiki, I., and Sakurai, H. (2009). Cross interference with TNF-alpha-induced TAK1 activation via EGFR-mediated p38 phosphorylation of TAK1-binding protein 1. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 1156-1164.

- Sluss,H.K., Armata,H., Gallant,J., and Jones,S.N. (2004). Phosphorylation of serine 18 regulates distinct p53 functions in mice. *Mol. Cell Biol.* *24*, 976-984.
- Sluss,H.K., Barrett,T., Derijard,B., and Davis,R.J. (1994). Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol. Cell Biol.* *14*, 8376-8384.
- Sluss,H.K., Han,Z., Barrett,T., Goberdhan,D.C., Wilson,C., Davis,R.J., and Ip,Y.T. (1996). A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes Dev.* *10*, 2745-2758.
- Song,J.J., Liu,J., Tolia,N.H., Schneiderman,J., Smith,S.K., Martienssen,R.A., Hannon,G.J., and Joshua-Tor,L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat. Struct. Biol.* *10*, 1026-1032.
- Song,J.J., Smith,S.K., Hannon,G.J., and Joshua-Tor,L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* *305*, 1434-1437.
- Squirrell,J.M., Eggers,Z.T., Luedke,N., Saari,B., Grimson,A., Lyons,G.E., Anderson,P., and White,J.G. (2006). CAR-1, a protein that localizes with the mRNA decapping component DCAP-1, is required for cytokinesis and ER organization in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Mol. Biol. Cell* *17*, 336-344.
- Srinivas,H., Juroske,D.M., Kalyankrishna,S., Cody,D.D., Price,R.E., Xu,X.C., Narayanan,R., Weigel,N.L., and Kurie,J.M. (2005). c-Jun N-terminal kinase contributes to aberrant retinoid signaling in lung cancer cells by phosphorylating and inducing proteasomal degradation of retinoic acid receptor alpha. *Mol. Cell Biol.* *25*, 1054-1069.
- Stanczyk,J., Pedrioli,D.M., Brentano,F., Sanchez-Pernaute,O., Kolling,C., Gay,R.E., Detmar,M., Gay,S., and Kyburz,D. (2008). Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *58*, 1001-1009.
- Stefani,G. and Slack,F.J. (2008). Small non-coding RNAs in animal development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 219-230.
- Steiger,M., Carr-Schmid,A., Schwartz,D.C., Kiledjian,M., and Parker,R. (2003). Analysis of recombinant yeast decapping enzyme. *RNA.* *9*, 231-238.
- Stein,B., Yang,M.X., Young,D.B., Janknecht,R., Hunter,T., Murray,B.W., and Barbosa,M.S. (1997). p38-2, a novel mitogen-activated protein kinase with distinct properties. *J. Biol. Chem.* *272*, 19509-19517.
- Stoecklin,G. and Anderson,P. (2007). In a tight spot: ARE-mRNAs at processing bodies. *Genes Dev.* *21*, 627-631.
- Stoecklin,G., Mayo,T., and Anderson,P. (2006). ARE-mRNA degradation requires the 5'-3' decay pathway. *EMBO Rep.* *7*, 72-77.
- Stoecklin,G., Stubbs,T., Kedersha,N., Wax,S., Rigby,W.F., Blackwell,T.K., and Anderson,P. (2004). MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *EMBO J.* *23*, 1313-1324.
- Suswam,E., Li,Y., Zhang,X., Gillespie,G.Y., Li,X., Shacka,J.J., Lu,L., Zheng,L., and King,P.H. (2008). Tristetraprolin down-regulates interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in malignant glioma cells. *Cancer Res.* *68*, 674-682.
- Sze,K.L., Lui,W.Y., and Lee,W.M. (2008). Post-transcriptional regulation of CLMP mRNA is controlled by tristetraprolin in response to TNFalpha via c-Jun N-terminal kinase signalling. *Biochem. J.* *410*, 575-583.
- Taganov,K.D., Boldin,M.P., Chang,K.J., and Baltimore,D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 12481-12486.
- Tagwerker,C., Flick,K., Cui,M., Guerrero,C., Dou,Y., Auer,B., Baldi,P., Huang,L., and Kaiser,P. (2006). A tandem affinity tag for two-step purification under fully denaturing conditions: application in ubiquitin profiling and protein complex identification combined with in vivocross-linking. *Mol. Cell Proteomics.* *5*, 737-748.



- Tan, G.S., Garchow, B.G., Liu, X., Yeung, J., Morris, J.P., Cuellar, T.L., McManus, M.T., and Kiriakidou, M. (2009). Expanded RNA-binding activities of mammalian Argonaute 2. *Nucleic Acids Res.* *37*, 7533-7545.
- Tanoue, T., Yamamoto, T., Maeda, R., and Nishida, E. (2001). A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs. *J. Biol. Chem.* *276*, 26629-26639.
- Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A., Brengues, M., and Parker, R. (2005). Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA.* *11*, 371-382.
- Thiefes, A., Wolf, A., Doerrie, A., Grassl, G.A., Matsumoto, K., Autenrieth, I., Bohn, E., Sakurai, H., Niedenthal, R., Resch, K., and Kracht, M. (2006). The *Yersinia enterocolitica* effector YopP inhibits host cell signalling by inactivating the protein kinase TAK1 in the IL-1 signalling pathway. *EMBO Rep.* *7*, 838-844.
- Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., Bussen, M., Galuppo, P., Just, S., Rottbauer, W., Frantz, S., Castoldi, M., Soutschek, J., Koteliansky, V., Rosenwald, A., Basson, M.A., Licht, J.D., Pena, J.T., Rouhanifard, S.H., Muckenthaler, M.U., Tuschl, T., Martin, G.R., Bauersachs, J., and Engelhardt, S. (2008). MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* *456*, 980-984.
- Tournier, C., Dong, C., Turner, T.K., Jones, S.N., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2001). MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev.* *15*, 1419-1426.
- Tournier, C., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Barrett, T., and Davis, R.J. (1997). Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 7337-7342.
- Tritschler, F., Braun, J.E., Motz, C., Igreja, C., Haas, G., Truffault, V., Izaurralde, E., and Weichenrieder, O. (2009). DCP1 forms asymmetric trimers to assemble into active mRNA decapping complexes in metazoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 21591-21596.
- Tscherne, J.S. and Pestka, S. (1975). Inhibition of protein synthesis in intact HeLa cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* *8*, 479-487.
- Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori, S., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N., and Gotoh, Y. (2004). JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J.* *23*, 1889-1899.
- Unterholzner, L. and Izaurralde, E. (2004). SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol. Cell* *16*, 587-596.
- van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P., and Angel, P. (1995). ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J.* *14*, 1798-1811.
- van Dijk, E., Cougot, N., Meyer, S., Babajko, S., Wahle, E., and Seraphin, B. (2002). Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J.* *21*, 6915-6924.
- Van Hoof, D., Munoz, J., Braam, S.R., Pinkse, M.W., Linding, R., Heck, A.J., Mummery, C.L., and Krijgsveld, J. (2009). Phosphorylation dynamics during early differentiation of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* *5*, 214-226.
- Vasudevan, S. and Steitz, J.A. (2007). AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* *128*, 1105-1118.
- Ventura, J.J., Hubner, A., Zhang, C., Flavell, R.A., Shokat, K.M., and Davis, R.J. (2006). Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol. Cell* *21*, 701-710.
- Villen, J., Beausoleil, S.A., Gerber, S.A., and Gygi, S.P. (2007). Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 1488-1493.
- Wakiyama, M., Takimoto, K., Ohara, O., and Yokoyama, S. (2007). Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev.* *21*, 1857-1862.
- Wang, B., Love, T.M., Call, M.E., Doench, J.G., and Novina, C.D. (2006). Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro. *Mol. Cell* *22*, 553-560.

- Wang, X.S., Diener, K., Manthey, C.L., Wang, S., Rosenzweig, B., Bray, J., Delaney, J., Cole, C.N., Chan-Hui, P.Y., Mantlo, N., Lichenstein, H.S., Zukowski, M., and Yao, Z. (1997). Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* *272*, 23668-23674.
- Wang, Z., Jiao, X., Carr-Schmid, A., and Kiledjian, M. (2002). The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 12663-12668.
- Wasserman, T., Katsenelson, K., Daniliuc, S., Hasin, T., Choder, M., and Aronheim, A. (2010). A novel c-Jun N-terminal kinase (JNK)-binding protein WDR62 is recruited to stress granules and mediates a nonclassical JNK activation. *Mol. Biol. Cell* *21*, 117-130.
- Weinmann, L., Hock, J., Ivacevic, T., Ohrt, T., Mutze, J., Schwille, P., Kremmer, E., Benes, V., Urlaub, H., and Meister, G. (2009). Importin 8 is a gene silencing factor that targets argonaute proteins to distinct mRNAs. *Cell* *136*, 496-507.
- Wengler, G. and Wengler, G. (1972). Medium hypertonicity and polyribosome structure in Hela cells. The influence of hypertonicity of the growth medium on polyribosomes in Hela cells. *Eur. J. Biochem.* *27*, 162-173.
- Whitmarsh, A.J. (2007). Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Biochim. Biophys. Acta* *1773*, 1285-1298.
- Whitmarsh, A.J., Shore, P., Sharrocks, A.D., and Davis, R.J. (1995). Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* *269*, 403-407.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., and Johnson, G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* *79*, 143-180.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* *75*, 855-862.
- Wilczynska, A., Aigueperse, C., Kress, M., Dautry, F., and Weil, D. (2005). The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J. Cell Sci.* *118*, 981-992.
- Wolter, S., Doerrie, A., Weber, A., Schneider, H., Hoffmann, E., von der, O.J., Bakiri, L., Wagner, E.F., Resch, K., and Kracht, M. (2008). c-Jun controls histone modifications, NF-kappaB recruitment, and RNA polymerase II function to activate the *ccl2* gene. *Mol. Cell Biol.* *28*, 4407-4423.
- Wu, L., Fan, J., and Belasco, J.G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 4034-4039.
- Wu, Z., Earle, J., Saito, S., Anderson, C.W., Appella, E., and Xu, Y. (2002). Mutation of mouse p53 Ser23 and the response to DNA damage. *Mol. Cell Biol.* *22*, 2441-2449.
- Xia, Y. and Karin, M. (2004). The control of cell motility and epithelial morphogenesis by Jun kinases. *Trends Cell Biol.* *14*, 94-101.
- Yamamoto, K., Ichijo, H., and Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol. Cell Biol.* *19*, 8469-8478.
- Yamashita, A., Chang, T.C., Yamashita, Y., Zhu, W., Zhong, Z., Chen, C.Y., and Shyu, A.B. (2005). Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 1054-1063.
- Yang, D.D., Conze, D., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Davis, R.J., Rincon, M., and Flavell, R.A. (1998). Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity* *9*, 575-585.
- Yang, D.D., Kuan, C.Y., Whitmarsh, A.J., Rincon, M., Zheng, T.S., Davis, R.J., Rakic, P., and Flavell, R.A. (1997). Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the *Jnk3* gene. *Nature* *389*, 865-870.
- Yang, Z., Jakymiw, A., Wood, M.R., Eystathiou, T., Rubin, R.L., Fritzler, M.J., and Chan, E.K. (2004). GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *J. Cell Sci.* *117*, 5567-5578.

- Yazgan,O. and Pfarr,C.M. (2002). Regulation of two JunD isoforms by Jun N-terminal kinases. *J. Biol. Chem.* *277*, 29710-29718.
- Yekta,S., Shih,I.H., and Bartel,D.P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* *304*, 594-596.
- Yigit,E., Batista,P.J., Bei,Y., Pang,K.M., Chen,C.C., Tolia,N.H., Joshua-Tor,L., Mitani,S., Simard,M.J., and Mello,C.C. (2006). Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell* *127*, 747-757.
- Yoshida,H., Hastie,C.J., McLauchlan,H., Cohen,P., and Goedert,M. (2004). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by isoforms of c-Jun N-terminal kinase (JNK). *J. Neurochem.* *90*, 352-358.
- Yu,J.H., Yang,W.H., Gulick,T., Bloch,K.D., and Bloch,D.B. (2005). Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. *RNA*. *11*, 1795-1802.
- Yuan,Y.R., Pei,Y., Ma,J.B., Kuryavyi,V., Zhadina,M., Meister,G., Chen,H.Y., Dauter,Z., Tuschl,T., and Patel,D.J. (2005). Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol. Cell* *19*, 405-419.
- Zeng,Y., Sankala,H., Zhang,X., and Graves,P.R. (2008). Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. *Biochem. J.* *413*, 429-436.
- Zhang,T., Kruys,V., Huez,G., and Gueydan,C. (2002). AU-rich element-mediated translational control: complexity and multiple activities of trans-activating factors. *Biochem. Soc. Trans.* *30*, 952-958.
- Zheng,D., Ezzeddine,N., Chen,C.Y., Zhu,W., He,X., and Shyu,A.B. (2008). Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *J. Cell Biol.* *182*, 89-101.
- Zhou,H., Yang,L., Li,H., Li,L., and Chen,J. (2009). Residues that affect human Argonaute2 concentration in cytoplasmic processing bodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *378*, 620-624.

## 6 Lebenslauf

Katharina Rzeczowski, verheiratet, keine Kinder

Dipl.-Biochemikerin

\*19.08.1980 Breslau

### Schulausbildung

08.1987 – 07.2000

- Grundschule Wasserkampfschule
- Orientierungsstufe Ludwig-Windthorst-Schule, Hannover
- St. Ursula Gymnasium in Hannover, Abschluss der Hochschulreife mit der Note 1,8

### Studium und Promotionsstudium

11.2000 – 09.2002

- Grundstudium Biochemie an der Universität Hannover mit der Vordiplomsnote „gut“ abgeschlossen

09.2002 – 01.2006

- Hauptstudium Biochemie an der Universität Hannover mit den Wahlpflichtfächern Biophysikalische Chemie und Pharmakologie  
Mündliche Diplomprüfung: Juni 2005 mit der Note „sehr gut“ bestanden  
Diplomarbeit: von Juli 2005 bis Januar 2006 an der Medizinischen Hochschule Hannover am Institut für allgemeine Pharmakologie mit dem Titel „Charakterisierung der Wechselwirkung der Proteinkinase JNK mit dem neuen JNK Interaktionspartner p100 (Ago2) *in vitro* und *in vivo*“. Mit der Note „sehr gut“ bewertet; unter Anleitung von Prof. Dr. Kracht

seit 03.2006-dato

- Anfertigung der Promotion an der Medizinischen Hochschule Hannover am Institut für Pharmakologie, seit Ende August 2007 an der Justus-Liebig-Universität Gießen am Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kracht, Betreuer: Prof. Dr. Müller (Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover) und Prof. Dr. Kracht

## 7 Publikationen

### Artikel:

- **Rzeczkowski K**, Beuerlein K, Holzberg D, Kettner-Buhrow D, Müller H, Wolter S, Wait R, Saklatvala J, Holtmann H, Kracht M  
Jun-N-terminal kinase controls formation of processing bodies, submitted

### Vorträge:

- **Rzeczkowski K**, Holzberg D, Kettner-Buhrow D, Beuerlein K, Müller H, Wolter S, Thiefes A, Dörrie A, Wait R, Saklatvala J, Kracht M  
A novel JNK-regulated ribonucleoprotein complex that responds to cytokines and participates in inflammatory gene expression  
Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie  
50. Jahrestagung, Mainz, 10.03-12.03.2009, Naunyn-Schmiedeberg's Arch.  
Pharmacol Supplement 1 to Volume 379, March 2009, Page R39, 176
- **Rzeczkowski K**, Beuerlein K, Holzberg D, Kettner-Buhrow D, Müller H, Wolter S, Thiefes A, Wait R, Saklatvala J, Kracht M  
JNK regulates the dynamics and composition of cytoplasmic ribonucleoprotein (RNP) complexes by interacting with Ago2 and by phosphorylating DCP1 $\alpha$   
13<sup>th</sup> Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS), Weimar, 28.10-30.10.2010, Page 42
- **Beuerlein K**, Müller H, **Rzeczkowski K**, Kracht M  
Localisation studies of subcellular structures using genetically altered fluorescent markers  
14<sup>th</sup> International Conference, Kazan, 05.06.-07.06.2009,  
Microbial Enzymes in Biotechnology and Medicine, Page 106

### Poster:

- **Rzeczkowski K**, Beuerlein K, Maertens I, Kracht M  
JNK colocalizes to RNA-processing(P)-bodies and regulates the P-body localization of the decapping enzyme subunit DCP1 $\alpha$  by phosphorylation at Serine 315  
Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie  
51. Jahrestagung, Mainz, 23.03-25.03.2010, Naunyn-Schmiedeberg's Arch.  
Pharmacol Supplement 1 to Volume 381, March 2010, Page R40, 172

Der präsentierende Autor ist durch Unterstreichung gekennzeichnet.