

**Klonierung, Charakterisierung und Funktion  
der beiden SAPK-Mitglieder  
JNK und p38 MAPK  
des marinen Schwamms *S. domuncula***

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

Markus Böhm  
geb. in Wiesbaden

Mainz 2001

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2002

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Schwämme.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Phylogenie.....</b>	<b>2</b>
1.2.1	Allgemeines.....	2
1.2.2	Die Monophylie der Metazoen.....	3
1.2.3	Die Beziehung der Organismenreiche.....	3
<b>1.3</b>	<b>Die Superfamilie der eukaryotischen Protein Kinasen.....</b>	<b>4</b>
1.3.1	Verbreitung, Struktur und Klassifizierung.....	4
1.3.2	Zelluläre Funktionen .....	6
<b>1.4</b>	<b>Die Familie der MAPKs .....</b>	<b>7</b>
1.4.1	Allgemeines, Struktur und Klassifizierung .....	7
1.4.2	MAPK-Module und deren Substrate.....	11
1.4.3	Organisation der MAPK-Module durch Gerüstproteine.....	13
<b>1.5</b>	<b>Die SAPK-Untergruppe der MAPKs.....</b>	<b>16</b>
1.5.1	Die Subfamilie der SAPK1/JNK.....	16
1.5.1.1	<i>Charakterisierung der SAPK1/JNK-Mitglieder.....</i>	<i>16</i>
1.5.1.2	<i>Aktivierung und Substrate der JNKs.....</i>	<i>17</i>
1.5.1.3	<i>Komponenten der JNK-Signalwege.....</i>	<i>18</i>
1.5.1.4	<i>TNFRs und JNK-Aktivierung.....</i>	<i>22</i>
1.5.2	Die Subfamilie der SAPK2/p38 MAPK.....	24
1.5.2.1	<i>Entdeckung und Charakterisierung der SAPK2/p38 MAPK-Mitglieder .....</i>	<i>24</i>
1.5.2.2	<i>Aktivierung und Substrate der p38 MAPKs.....</i>	<i>25</i>
1.5.2.3	<i>Komponenten der p38 MAPK-Signalwege .....</i>	<i>29</i>
1.5.3	Biologische Funktionen der SAPKs.....	32
1.5.3.1	<i>Beteiligung an apoptotischen Prozessen .....</i>	<i>32</i>
1.5.3.2	<i>Kontrolle des Zellzyklusses.....</i>	<i>33</i>
1.5.3.3	<i>Steuerung der Morphogenese .....</i>	<i>33</i>
1.5.3.4	<i>Induktion von Immunreaktionen.....</i>	<i>34</i>
1.5.3.5	<i>Initiation von Entzündungsprozessen .....</i>	<i>35</i>
1.5.4	Die YSAPK HOG1 und osmotischer Stress .....	35
1.5.4.1	<i>Bedeutung der Osmoregulation für die Zelle .....</i>	<i>35</i>

1.5.4.2	Reaktion auf Hyperosmose durch <i>HOG1</i> in <i>S. cerevisiae</i> .....	36
1.5.4.3	Komponenten des <i>HOG</i> -Signalwegs .....	37
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>41</b>
3.1	<b>Chemikalien .....</b>	<b>41</b>
3.2	<b>Geräte .....</b>	<b>41</b>
3.3	<b>Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>42</b>
3.4	<b>Enzyme .....</b>	<b>43</b>
3.5	<b>Kits .....</b>	<b>43</b>
3.6	<b>Antikörper .....</b>	<b>43</b>
3.6.1	Primärantikörper .....	43
3.6.2	Sekundärantikörper .....	44
3.7	<b>Molekulargewichtsmarker .....</b>	<b>44</b>
3.8	<b>Vektoren .....</b>	<b>44</b>
3.9	<b>Bakterienstamm .....</b>	<b>45</b>
3.10	<b>Hefestämme .....</b>	<b>45</b>
3.11	<b>Nährmedien für Bakterienkulturen .....</b>	<b>45</b>
3.12	<b>Nährmedien für Hefekulturen .....</b>	<b>45</b>
3.13	<b>Primer .....</b>	<b>46</b>
3.13.1	Primer zur Isolierung von <i>S. domuncula JNK (SDJNK)</i> und <i>p38 MAPK (SDp38)</i> aus der cDNA-Bibliothek .....	46
3.13.2	Primer zur Isolierung von <i>SDJNKge</i> und <i>SDp38ge</i> .....	46
3.13.3	Primer zur Synthese der DNA-Sonden von <i>SDJNK</i> und <i>SDp38</i> .....	47
3.13.4	Primer zur Konstruktion der rekombinanten <i>pVT103-U</i> Hefe-Expressionsvektoren mit <i>HOG1</i> , <i>SDJNK</i> und <i>SDp38</i> .....	47
3.13.5	Vektorprimer .....	47
3.13.6	Sequenzierprimer (IRD800 gelabelt) .....	48
3.14	<b>Computerprogramme und Internet-Dienste zur Auswertung von DNA-Sequenzen .....</b>	<b>48</b>
3.14.1	Computerprogramme .....	48
3.14.2	Internet-Dienste .....	49

<b>3.15 DNA-Techniken .....</b>	<b>50</b>
3.15.1 Die Polymerasekettenreaktion.....	50
3.15.1.1 PCR-Zusammensetzung und Temperaturzyklen .....	50
3.15.1.2 Primerdesign.....	51
3.15.1.3 Berechnung der Schmelztemperatur der Primer .....	52
3.15.2 DNA-Gelelektrophorese.....	52
3.15.2.1 Analytische und präparative DNA-Agarosegele.....	52
3.15.2.2 Detektion der DNA im Agarosegel und Dokumentation der Gele.....	53
3.15.3 Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen.....	53
3.15.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegele.....	54
3.15.5 Ligation .....	55
3.15.5.1 Ligation von PCR-Produkten mittels T-A-Cloning.....	55
3.15.5.2 Ligation von Restriktionsfragmenten.....	55
3.15.6 Manipulation von DNA mit Restriktionsenzymen .....	56
3.15.6.1 Restriktion rekombinanter pGEM-®T-Klone .....	56
3.15.6.2 Restriktion der zur weiteren Subklonierung vorgesehen Vektoren.....	56
3.15.7 Transformation von Bakterien .....	57
3.15.7.1 Herstellung kompetenter Bakterien .....	57
3.15.7.2 Überprüfung der Kompetenz .....	58
3.15.7.3 Transformation kompetenter Bakterien.....	58
3.15.8 Blau-Weiß-Selektion transformierter Bakterien .....	59
3.15.9 Checking-PCR.....	59
3.15.10 Kultivierung von Bakterien für die Plasmid-Präparation.....	60
3.15.10.1 Die Suspensionskultur .....	60
3.15.10.2 Herstellung eines Glycerinstocks.....	60
3.15.11 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	60
3.15.11.1 Mini (Spin)-Plasmidpräparation .....	61
3.15.11.2 Midi-Plasmidpräparation.....	61
3.15.12 Präparation und Weiterbehandlung genomischer DNA.....	62
3.15.12.1 Präparation genomischer DNA aus <i>S. domuncula</i> .....	62
3.15.12.2 Analytisches Gel .....	63
3.15.12.3 Sonifizierung genomischer DNA für eine nachfolgende PCR-Amplifikation .....	63
3.15.13 Messung der Konzentration und Reinheit einer Nukleinsäurelösung.....	63
3.15.14 DNA-Sequenzierung nach Sanger .....	63
3.15.14.1 Gießen der Sequenziergele .....	64

3.15.14.2	Die Sequenzierreaktion.....	64
3.15.14.3	Auftragung der Proben und Gellauf.....	66
3.15.14.4	Auswertung der Sequenziergele.....	66
<b>3.16</b>	<b>RNA-Techniken .....</b>	<b>66</b>
3.16.1	DMPC-Behandlung von Lösungen und Verbrauchsmaterialien.....	66
3.16.2	RNA-Präparation aus <i>S. domuncula</i> mittels TRIzol <sup>®</sup> -Reagenz .....	67
3.16.3	RNA-Gelelektrophorese.....	67
3.16.3.1	Analytische RNA-Agarosegele.....	68
3.16.3.2	Detektion aufgetrennter RNA mit Toluidinblau.....	68
3.16.4	Northern Blot.....	69
3.16.4.1	Kapillartransfer und Immobilisierung der RNA.....	69
3.16.4.2	Detektion immobilisierter RNA mit Methylenblau.....	69
3.16.4.3	DIG-Markierung der DNA-Sonden .....	70
3.16.4.4	Hybridisierung und Detektion mit CDP-Star <sup>TM</sup> .....	70
3.16.5	Reverse Transkription von mRNA mit nachfolgender PCR.....	71
<b>3.17</b>	<b>Hefekulturen .....</b>	<b>72</b>
3.17.1	Kultivierung der Hefe.....	72
3.17.1.1	Zellausstrich auf Agar-Platten („working stock Platten“ ).....	72
3.17.1.2	Die Suspensionskultur .....	72
3.17.1.3	Messung der optischen Dichte einer Hefekultur.....	72
3.17.1.4	Herstellung der Glycerinstocks .....	73
3.17.2	Konstruktion der rekombinanten <i>pVT103-U</i> Vektoren.....	73
3.17.3	Transformation von Hefe .....	75
3.17.3.1	One-Step-Transformation von Hefe.....	75
3.17.3.2	Selektion und Kultivierung der Transformanten auf “drop out Platten” .....	76
3.17.4	Detektion der rekombinanten SAPKs .....	77
3.17.5	Komplementierungsstudien.....	77
3.17.6	Nachweis der Aktivierung der rekombinanten SAPKs.....	78
3.17.7	Immunfluoreszenzmikroskopie und Kernfärbung von Zellen .....	78
<b>3.18</b>	<b>Schwammzucht .....</b>	<b>80</b>
3.18.1	Haltung der Schwämme .....	80
3.18.2	Stressinduktionen .....	81
<b>3.19</b>	<b>Protein-Techniken .....</b>	<b>82</b>
3.19.1	Proteinpräparation aus <i>S. domuncula</i> .....	82

3.19.2	Proteinpräparation aus <i>S. cerevisiae</i> .....	82
3.19.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	83
3.19.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	83
3.19.5	Western Blot.....	85
3.19.6	Inhibitorstudie mit SB203580 .....	86
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>87</b>
<b>4.1</b>	<b>Isolierung und Charakterisierung der cDNA-Klone .....</b>	<b>87</b>
4.1.1	Isolierung der cDNA-Klone aus <i>S. domuncula</i> .....	87
4.1.2	Identifizierung und Charakterisierung der cDNA-Klone.....	88
4.1.3	Vergleich der beiden SAPK-Sequenzen mit Sequenzen aus Datenbanken .....	91
<b>4.2</b>	<b>Inhibitorstudie mit SB203580.....</b>	<b>100</b>
<b>4.3</b>	<b>Northern Blot-Analysen.....</b>	<b>101</b>
<b>4.4</b>	<b>Genomische Sequenz von <i>SDJNK</i> und <i>SDp38</i> .....</b>	<b>102</b>
4.4.1	Isolierung und Charakterisierung der genomischen Klone .....	102
4.4.2	Vergleich der Exon/Intron-Struktur von <i>SDJNKge</i> mit <i>SDp38ge</i> sowie mit <i>SAPK</i> -Genen anderer Metazoen .....	106
<b>4.5</b>	<b>Western Blot-Analysen .....</b>	<b>109</b>
<b>4.6</b>	<b>Funktionsstudien mit <i>HOG1</i>-defizienter Hefe.....</b>	<b>114</b>
4.6.1	Konstruktion der SAPK-Expressionsklone.....	114
4.6.2	Nachweis der rekombinanten SAPKs durch Western Blot-Analyse .....	114
4.6.3	Funktionale Komplementierung des HOG1-Proteins durch die JNK und p38 MAPK des Schwamms .....	116
4.6.4	Phosphorylierung der rekombinanten SAPKs in Folge von hyperosmo- tischem Stress.....	117
4.6.5	Intrazelluläre Lokalisation der aktivierten SAPKs in Hefe.....	119
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>122</b>
<b>5.1</b>	<b>Analyse der cDNA-Sequenzen.....</b>	<b>122</b>
<b>5.2</b>	<b>Analyse der genomischen Sequenzen.....</b>	<b>128</b>
<b>5.3</b>	<b>Vergleich der Exon/Intron-Struktur von <i>SAPK</i>-Genen.....</b>	<b>128</b>
<b>5.4</b>	<b>Aktivierung der SAPKs durch Zellstress-auslösende Stimuli.....</b>	<b>133</b>
5.4.1	Osmotischer Stress .....	133

5.4.2	Endotoxin (LPS)-induzierter Stress .....	135
5.4.3	OA-induzierter Stress.....	137
5.4.4	Stress durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Hitzeschock oder UVB-Bestrahlung.....	139
<b>5.5</b>	<b>Funktionale Komplementierung eines <i>HOG1</i>-defizienten Hefestamms mit den SAPKs aus <i>S. domuncula</i> .....</b>	<b>141</b>
5.5.1	Funktionale Komplementierung und Aktivierung durch Hyperosmose .....	141
5.5.2	Intrazelluläre Lokalisation der aktivierten SAPKs.....	143
5.5.3	Osmoregulation in Metazoen durch SAPKs .....	144
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>146</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>148</b>
7.1	Abkürzungen und Summenformeln des Textes .....	148
7.2	Abkürzungskodes für Aminosäuren und Basen.....	153
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>154</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die Schwämme

Die Schwämme (Porifera) gehören zu den ältesten mehrzelligen Organismen (Metazoa). Paläontologischen Daten zufolge sind sie ungefähr 600 Mio. Jahre alt (MEHL *et al.*, 1998), werden hingegen molekularbiologische Analysen berücksichtigt, kann ein Alter von ca. 800 Mio. Jahre angenommen werden (MÜLLER, 1995). Der Stamm Porifera umfasst 5000-8000 Arten, die in 3 Klassen aufgeteilt werden: [1] Calcarea (Kalkschwämme), [2] Hexactinellida (Glasschwämme) und [3] Demospongiae (Hornschwämme), die mit 80-90 % aller Schwammspezies die größte und wichtigste rezente Gruppe der Porifera darstellt (WESTHEIDE und RIEGER, 1996). Umstritten jedoch ist die im System der Schwämme aufeinander bezogene phylogenetische Stellung dieser drei Klassen. Einige Autoren stellen den Hexactinellida und Demospongiae, die aufgrund ihrer Siliziumdioxid-Nadeln (Spicula) als Silicea (Kieselchwämme) zusammengefasst werden können, die Calcarea gegenüber (BÖGER, 1988). Andere betrachten die Calcarea und Demospongiae wegen ihrer diskreten Zellen als Schwestergruppen (Cellularia) und stellen ihnen die Symplasma mit den Hexactinellida als einzige Vertreter entgegen (MEHL und REISWEG, 1991; KRUSE *et al.*, 1998).

Der evolutionäre Ursprung der Schwämme wird aufgrund der großen morphologischen Ähnlichkeit zu ihren Kragengeißelzellen (Choanocyten) vielfach bei den Choanoflagellaten gesucht. Ultrastrukturanalysen des Geißelapparates beider Zelltypen ergaben jedoch keine Anhaltspunkte für eine direkte Verwandtschaft zwischen Choanoflagellaten und den Choanocyten der Schwämme (KÄSTNER, 1993). Vergleichende 18S rRNA-Analysen deuten dagegen auf eine Verwandtschaft zwischen ihnen hin (CAVALIERE-SMITH *et al.*, 1996; KUMAR und RZHETSKY, 1996).

Schwämme besiedeln außer 120 im Süßwasser lebenden Arten (Spongillidae) das Meer in allen geographischen Breiten. Sie kommen überwiegend in Küstennähe in geringen Tiefen vor. Unter den Schwämmen gibt es aber auch typische Tiefseebewohner, wie die Hexactinellida. Diese können noch in 6000 m Tiefe leben (KÄSTNER; 1993).

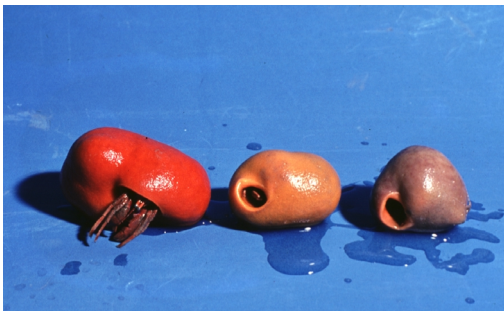
Als sessile Strudler erzeugen Porifera mit Hilfe synchronisierter Geißelschläge der Choanocyten, die den Innenraum eines Schwamms (Choanoderm) epithelartig auskleiden, einen Wasserstrom. Dadurch gelangen Nahrungspartikel, wie Detritus, Algen und Bakterien, sowie gelöste organische Verbindungen über die Dermalporen in das innere Kanalsystem der Schwämme und werden über Endocytose resorbiert. Das gefilterte Wasser und die Exkretionsprodukte werden anschließend mit Hilfe des Stroms über eine oder mehrere Öffnungen (Oscula) wieder hinaus befördert. Zur Ernährung des Schwamms tragen auch Mikro-

symbionten, wie Bakterien, Cyanobakterien und Grünalgen, bei. Darüber hinaus ist auch ein karnivorer Schwamm beschrieben worden (VACELET und BOURY-ESNAULT, 1995).

Schwämme sind über eine aus Pinacocyten bestehende, epithelartige Schicht nach außen abgegrenzt. Zwischen diesem Pinacoderm und dem inneren Choanoderm befindet sich das Mesohyl, welches aus verschiedenen Zelltypen, extrazellulärer Matrix und Skelettelementen aufgebaut ist. In diesem Gewebe befinden sich u. a. die omnipotenten Archeocyten, die phagocytierenden Amoebocyten und die das Mesenchymgerüst aufbauenden Collencyten. Zur Stabilisierung ihres Habitus bilden Schwämme meist ein mineralisches Skelett, das aus einzelnen Nadeln (Spicula) besteht. Bei den Demospongiae und Hexactinellida bestehen diese aus Siliziumdioxid, bei den Calcarea dagegen aus Calciumcarbonat. Die Bildung der Spicula erfolgt durch spezialisierte Zellen (Skleroblasten). Das mineralische Skelett kann bei manchen Demospongiae mit kollagenartigen Sponginfasern verstärkt sein.

Im Gegensatz zu den übrigen Metazoen besitzen Schwämme weder echte Organe noch Epithelien. Ferner fehlen ihnen auch ein Nervensystem sowie Blutgefäße (KÄSTNER, 1993; WESTHEIDE und RIEGER, 1996).

Die Fortpflanzung der oft hermaphroditischen Schwämme erfolgt sowohl sexuell durch Gametenbildung als auch vegetativ über Knospung oder Fragmentierung. Die am meisten verbreitete asexuelle Fortpflanzungsform (vor allem bei Süßwasserschwämmen) stellt die Bildung von kapselförmigen Gemmulae dar.



**Abb. 1.1:**

*Verschiedene Exemplare von Suberites domuncula aus der nördlichen Adria in der Nähe von Rovinj stammend. Diese Schwammspezies ordnet sich wie folgt in das System der Porifera ein: Familie Suberitidae, Ordnung Hadromerida, Unterklasse Tetractinomorpha, Klasse Demospongiae in Symbiose mit Paguristes oculatus. Foto von Prof. Dr. W.E.G. Müller.*

## 1.2 Phylogenie

### 1.2.1 Allgemeines

Die Ähnlichkeit von Genen oder Proteinen zueinander lässt sich anhand multipler cDNA- oder Gen-Sequenzanalysen sowie durch Vergleiche der daraus abgeleiteten AS-Abfolgen ermitteln. Diese Gegenüberstellungen können demzufolge auch zur Berechnung des Verwandtschaftsgrades von Organismen herangezogen werden. Ferner dienen diese verglei-

chenden Untersuchungen auch zur Klärung von Fragestellungen in der Evolutionsforschung. Ein zentrales Problem ist dabei die Suche nach dem Ursprung der Metazoen und die Klärung, ob sie eine monophyletische Gruppe bilden, die auch die Schwämme umfasst. Von weiterem Interesse ist auch die Frage, wie nahe die verschiedenen Organismenreiche Metazoen, Pilze, Pflanzen und Einzeller zueinander stehen. Im Hinblick auf diese Problemstellungen kommt der Betrachtung der Schwämme eine besondere Bedeutung zu, da sie die einfachsten multi-zellulären Organismen sind.

### 1.2.2 Die Monophylie der Metazoen

Durch die Vielzahl vergleichender Analysen von aus marinen Schwämmen (hauptsächlich *Geodia cydonium* und *S. domuncula*) stammenden cDNA-Sequenzen und den daraus abgeleiteten AS-Abfolgen ist sicher, dass Porifera typische Metazoen darstellen und dass alle Metazoen (inklusive die Schwämme) monophyletischen Ursprungs sind (REITNER und MEHL, 1995; CAVALIER-SMITH *et al.*, 1996). Diese Tatsache lässt sich z. B. mit den aus Schwämmen isolierten und charakterisierten Signaltransduktionskomponenten, wie die Ser/Thr-Kinase (SCHÜTZE *et al.*, 1999), die PKC (KRUSE *et al.*, 1996) oder die p38 MAPK (BÖHM *et al.*, 2000), Zelladhäsionsmolekülen, wie das Galektin (WAGNER-HÜLSMANN *et al.*, 1996) und Fibronectin (PAHLER; *et al.*, 1998), Rezeptorproteinen, wie das Integrin (PANCER *et al.*, 1997a), die Rezeptor Tyrosin Kinase (MÜLLER und SCHÄCKE, 1996), und anhand von Elementen des G-Protein gekoppelten Rezeptors (SEACK *et al.*, 1998) sowie ferner durch Bestandteile des Immunsystems, wie der AIF-1 und die GPX (KRUSE *et al.*, 1999), die (2'-5')Oligoadenylat-Synthetase (WIENS *et al.*, 1999), die SRCR- und SCR-repeats (PANCER *et al.*, 1997b) oder anhand der V-Domäne der Immunglobuline (BLUMBACH *et al.*, 1999), im Einzelnen belegen (MÜLLER, 1998; MÜLLER *et al.*, 1999). Gestützt werden diese Ergebnisse auch durch Vergleiche zwischen den aus Schwämmen und anderen Metazoen stammenden 18S rRNA-Sequenzen (CAVALIER-SMITH *et al.*, 1996).

### 1.2.3 Die Beziehung der Organismenreiche

Die exakte phylogenetische Beziehung der eukaryotischen Organismenreiche Metazoen, Pilze, Pflanzen und Einzeller ist noch unklar. Morphologische, biochemische, cytologische und physiologische Gegenüberstellungen konnten dieses Problem nicht lösen. Der Vergleich von 18S rRNA-Sequenzen deutet jedoch daraufhin, dass Pilze den Metazoen evolutionär näher stehen als den Pflanzen. Dieses Resultat wird auch durch biochemische Gemeinsamkeiten zwischen beiden Gruppen bestätigt. Das Bindeglied zwischen Pilzen und Metazoen

sind wahrscheinlich die Choanoflagellaten. Weiterhin lässt sich mit Hilfe der erwähnten rRNA-Analysen belegen, dass die Choanoflagellaten, Pilze und Metazoen einen gemeinsamen Vorfahren haben. Als nächste Verwandte erscheinen die grünen Pflanzen. Allerdings lassen sich auf der Basis dieser rRNA-Daten nicht alle Fragestellungen vollständig lösen (WAINWRIGHT *et al.*, 1993; CAVALIER-SMITH *et al.*, 1996; KUMAR und RZHETSKY, 1996). So ist z. B. noch unklar aus welchem Vorläufer die Metazoen evolutionär hervorgegangen sind.

## 1.3 Die Superfamilie der eukaryotischen Protein Kinasen

### 1.3.1 Verbreitung, Struktur und Klassifizierung

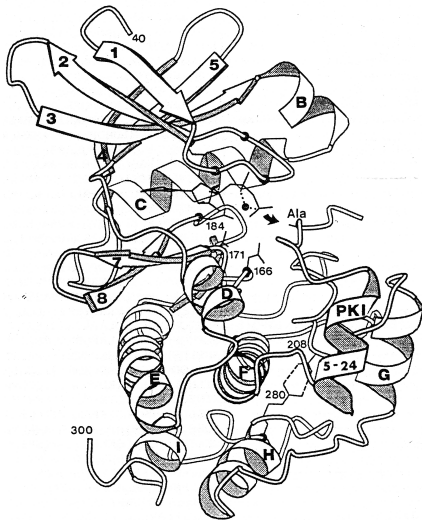
Die Superfamilie der eukaryotischen Protein Kinasen (PKs) repräsentiert die größte aller bekannten Proteingruppierungen. Bereits 1995 waren allein aus Säugern 175 Familienmitglieder identifiziert (HANKS und HUNTER, 1995). Es gibt realistische Schätzungen, wonach fast 1 % der Säugergene für PKs kodieren (HUNTER, 1987). Wie anhand multipler AS-Sequenzvergleiche herausgefunden werden konnte, ist allen eukaryotischen PKs eine aus 250-300 AS-Resten bestehende Kinase Domäne (katalytische Domäne) gemeinsam. Aufgrund jener können diese Enzyme die gammaständige Phosphatgruppe von ATP oder GTP entweder auf alkoholische Proteingruppen von Serin oder Threonin (Ser/Thr-PKs) oder auf die Phenolgruppe von Tyrosin (Tyr-PKs) übertragen (HANKS *et al.*, 1988; HANKS und HUNTER, 1995). Mittlerweile sind PKs aus nahezu allen Tierstämmen sowie aus einer Vielzahl von Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen isoliert und charakterisiert worden. Aufgrund dessen wird angenommen, dass das Vorläufergen der PKs schon vor der evolutionären Auftrennung der eukaryotischen Hauptreiche existiert haben muss. Die hohe Anzahl von zueinander analogen PKs aus *Saccharomyces cerevisiae* und aus höher entwickelten Tieren demonstriert, dass Signaltransduktionsprozesse in der Zelle, die über Proteinphosphorylierungen gesteuert werden und einfache Aspekte der Zellphysiologie betreffen, über den gesamten Verlauf der Evolution konserviert wurden.

Eine kleine aber wachsende Zahl von PKs eukaryotischen Ursprungs kann jedoch nicht in diese Superfamilie eingeordnet werden. Sie ähneln vielmehr den prokaryotischen His-PKs (ALEX und SIMON, 1994). In Prokaryoten erfüllen Proteinphosphorylierungen zentrale regulatorische Funktionen in einer Vielzahl von Prozessen, wie Chemotaxis, Bakteriophageninfektion, Nährstoffaufnahme oder Gentranskription (STOCK *et al.*, 1989; COZZONE, 1993). Bakterielle PKs können in 3 Klassen unterteilt werden (SAIER, 1993): [1] His-PKs, [2] Phosphotransferasen und [3] Ser/Thr-PKs. Vergleichende Analysen ihrer AS-Sequenzen

zeigen, dass sie nicht mit den eukaryotischen PKs verwandt sind, sondern eine eigenständige Gruppe bilden.

Erstaunlicherweise wurden in den Bakterienspezies *Yersinia pseudotuberculosis* (GALYOV *et al.*, 1993) und *Myxococcus xanthus* (MUNOZ-DORADO *et al.*, 1991 und 1993) jedoch Homologe der eukaryotischen PKs gefunden. Das YpkA-kodierende Gen des pathogenen Bakteriums *Y. pseudotuberculosis* ist dabei auf dem für die Virulenz des Einzellers verantwortlichen Plasmid lokalisiert. Daher scheint die Hypothese denkbar, dass dieses Gen durch horizontalen Gentransfer von einem eukaryotischen Wirt auf das Plasmid übertragen wurde. *M. xanthus* besitzt hingegen in seinem Genom mindestens 8 Gene, die als Mitglieder der Superfamilie der eukaryotischen PKs identifiziert wurden (MUNOZ-DORADO *et al.*, 1993). Diese bakterielle Spezies unterscheidet sich von allen anderen Prokaryoten außerdem durch einen komplexen Entwicklungszyklus, den sie bei Nährstoffmangel durchläuft (analog zu dem des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum*). Demzufolge kann angenommen werden, dass solche Homologe der eukaryotischen PKs nur in den Bakterien vorkommen, die einen Entwicklungszyklus ausführen können. Diese Gene könnten potentiell die Vorläufer der Superfamilie der eukaryotischen PKs darstellen (HANKS und HUNTER, 1995).

Die für alle Familienmitglieder charakteristische homologe Kinase Domäne kann in 12 Subdomänen unterteilt werden. Sie ist verantwortlich für die katalytische Aktivität der Enzyme. Drei separate Prozesse werden ihr zugeschrieben: [1] Bindung und Orientierung des Phosphatdonators ATP (GTP) in Form eines  $Mg^{2+}$ - oder  $Mn^{2+}$ -Komplexes, [2] Bindung und Orientierung des Proteinsubstrats und [3] Transfer der gammaständigen Phosphatgruppe von ATP (GTP) auf die Akzeptor-Hydroxylgruppe des Proteins. Eine Analyse multipler AS-Sequenzvergleiche zwischen PKs von Pflanzen, Pilzen, Invertebraten und Vertebraten zeigt, dass 12 nahezu invariable AS-Reste in dieser Domäne existieren (s. Abb. 1.2) und dass die Subdomänen VIIb, VIII und IX am stärksten konserviert sind (HANKS und HUNTER, 1995). Die Kinase Domäne faltet sich dabei im Sinne einer „Zwei-Falten-Struktur“, wie anhand der als Basismodell einer eukaryotischen PK fungierenden PKA-C $\alpha$  demonstriert werden kann (s. Abb. 1.2). Die kleine N-terminale Falte (umfasst die Subdomänen I-IV) ist in die Bindung und Orientierung des Nukleotids involviert. Sie ist aus überwiegend antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen aufgebaut. Diese Anordnung ist einzigartig für Nukleotid-bindende Proteine. Die größere C-terminale Falte (umfasst die Subdomänen VIa-XI) ist hauptsächlich für die Bindung des Proteinsubstrats sowie die Initiierung des Phosphattransfers verantwortlich und besteht mehrheitlich aus  $\alpha$ -Helices. Die Subdomäne V verbindet beide Falten und beinhaltet in einer tiefen Tasche das katalytische Zentrum (TAYLOR *et al.*, 1993).

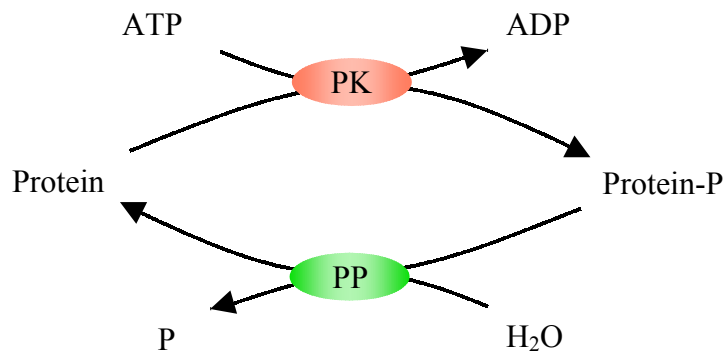


**Abb. 1.2:**  
 Ribbon Diagram der Kinase Domäne von PKA-Ca (AS-Reste 40-300), die sich in einem ternären Komplex mit MgATP und dem Pseudosubstrat PKI1524 befindet (nach HANKS und HUNTER, 1995). Die invariablen AS-Reste (G50, G52, G55, K72, E91, D166, N171, D184, E208, D220 und R280) sind durch Punkte entlang des Ribbon Diagramms gekennzeichnet. Die Seitenketten der Reste K72, D166, N171, D184, E208 und R280 sind abgebildet.  $\beta$ -Faltblätter und  $\alpha$ -Helices sind als flache Pfeile und Helices durchnummeriert dargestellt. Der kleine Pfeil symbolisiert den Phosphattransfer auf den Alanin-Rest, der in PKI1524 den eigentlichen Phosphatakzeptor Serin ersetzt.

Eukaryotische PKs können aufgrund ihrer phylogenetischen Stammbäume in die folgenden Hauptgruppen unterteilt werden (HANKS und HUNTER, 1995): [1] AGC-Gruppe, [2] CaMK-Gruppe, [3] CMGC-Gruppe und [4] die konventionelle Tyr-PK-Gruppe. Des weiteren gibt es eine Vielzahl untereinander sehr heterologer PKs. Diese lassen sich nicht in eine der ersten 4 Gruppen eingliedern.

### 1.3.2 Zelluläre Funktionen

Durch Phosphorylierungen können enzymatische oder andere funktionale Aktivitäten der Substratproteine schnell und effektiv moduliert werden (HARDIE, 1995). Der Phosphorylierungsstatus eines Substratproteins wird durch die Variation der Aktivität der phosphorylierend wirkenden PK und/oder der dephosphorylierend wirkenden Protein Phosphatase (PP) reguliert (s. Abb. 1.3).



**Abb. 1.3:**  
 Der Phosphorylierungszyklus eines von einer PK sowie PP modulierten Substratproteins.

Durch diese Proteinphosphorylierungszyklen werden Signale in der Zelle amplifiziert. Weiterhin ermöglichen diese eine hohe Sensitivität in der Signalbeantwortung (HARDIE, 1995). Aufgrund der übergeordneten Verschaltung dieser Zyklen entstehen die sog. PK-Kaskaden. Aus dem Beispiel des MAPK-Systems ist bekannt, dass die Verkettung der Zyklen nicht eindimensional sondern wesentlich komplexer ist. Eine Kaskade kann sich dabei sowohl konvergent als auch divergent zu einem komplizierten Signalnetzwerk verzweigen (s. Abb. 1.9 und 1.12). Dies gestattet der Zelle unterschiedliche initiiierende Signale selektiv in zahlreiche verschiedene Antworten aufzuteilen.

## 1.4 Die Familie der MAPKs

### 1.4.1 Allgemeines, Struktur und Klassifizierung

Die große Familie der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPKs) gehört phylogenetisch zur CMGC-Gruppe der Superfamilie der eukaryotischen PKs (HANKS und HUNTER, 1995) (s. Kap. 1.3.1), zu der auch die Cyclin-abhängigen Kinasen, Glykogen-Synthase Kinasen der Klasse 3 und Cdc-ähnliche Kinasen gehören (KÜLTZ; 1998; KÜLTZ und BURG, 1998). Die erste MAPK wurde 1987 entdeckt (RAY und STURGILL, 1987). Bis heute wurden über 100 Familienmitglieder identifiziert, darunter mehr als ein Dutzend allein aus *Homo sapiens* (COBB, 1999). MAPKs repräsentieren zentrale Elemente in hoch konservierten Phosphorylierungskaskaden, die Signaltransduktionsprozesse von der Zelloberfläche bis in den Zellkern vermitteln (PELECH und SANGHERA, 1992; DAVIS, 1993; NISHIDA und GOTOH, 1993; TREISMANN, 1996). Dabei sind sie in die Regulation zahlreicher physiologischer Prozesse in einer Vielzahl von Organismen, wie Pflanzen, Pilze, Metazoen, einschließlich der Säuger, involviert. In *S. cerevisiae* kontrollieren sie diverse zelluläre Vorgänge, die Reifeprozesse, Filamentation, Osmoregulation, Zellwandmodulation und Sporulation zur Folge haben. In *Drosophila melanogaster* sind die MAPK-Signalwege an der embryonalen Entwicklung und Immunantwort beteiligt, während sie in Säugerzellen Zellwachstum, Transformationsprozesse, Zelldifferenzierung, Immunreaktionen und Apoptose regulieren (s. Kap. 1.5.3) (LEWIS *et al.*, 1998; WHITMARSH und DAVIS, 1998). Die Aktivitäten der MAPKs werden unter diesen Umständen durch eine Reihe extrazellulärer Signale und Substanzen, wie Wachstumsfaktoren, Cytokine, T-Zell-Antigene, Pheromone, Phorbolster, UV- und ionisierende Strahlung, osmotischer oder oxidativer Stress, Hitzeschock und Translationsinhibitoren (Anisomycin), Ceramide und Lipopolysaccharide (LPS), stimuliert (KÜLTZ, 1998). Dabei werden mit Ausnahme der Mitglieder der MAPK3-Subfamilie alle MAPKs durch eine simultane Phosphorylierung von Threonin und Tyrosin im regulatorisch wirkenden TXY-Motiv aktiviert, das wiederum kurz vor dem hoch konservierten APE-Motiv in der

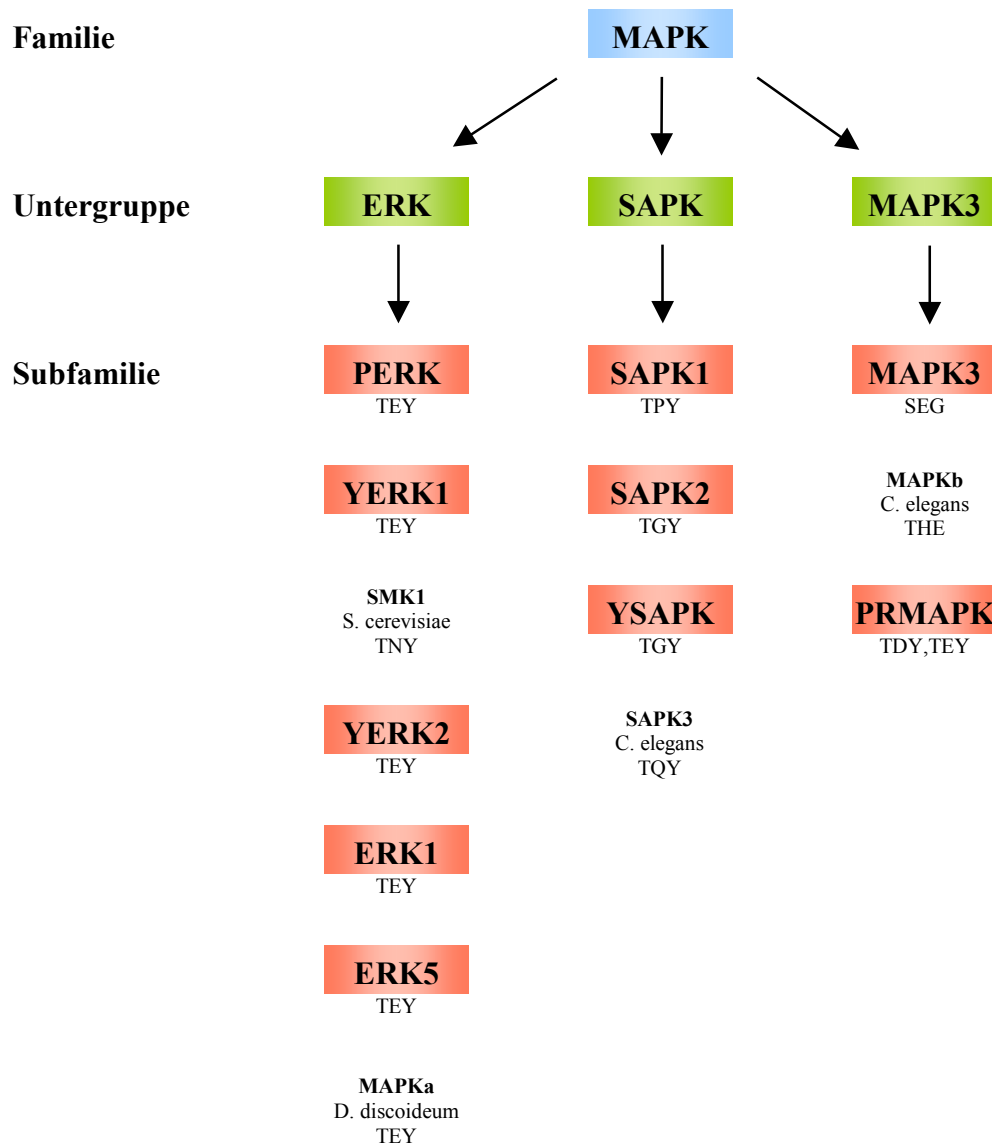
Subdomäne VIII der eukaryotischen PKs lokalisiert ist. Diese Dualphosphorylierung wird katalysiert von sog. MAPK Kinasen (MAPKKs), wie MEKs und MKKs, oder SAPK Kinasen (SAPKKs), zu denen die MKKs, SEKs oder SKKs gehören, die ihrerseits von MAPKK Kinasen (MAPKKKs), darunter die ASKs, MEKKs, MKKKs, MLKs oder Raf, phosphoryliert und aktiviert werden (s. Kap. 1.4.2) (PELECH und SANGHERA, 1992; DAVIS, 1993; NISHIDA und GOTOH, 1993; KÜLTZ, 1998, KÜLTZ und BURG, 1998; LEWIS *et al.*, 1998; WHITMARSH und DAVIS, 1998). Durch die erfolgreiche Aufklärung dreidimensionaler Strukturen der inaktiven (ZHANG *et al.*, 1993) und aktiven (CANAGARAJAH *et al.*, 1997) ERK2, die unter diesem Aspekt stellvertretend für nahezu alle übrigen MAPKs zu betrachten ist, konnte belegt werden, dass nach der Dualphosphorylierung eine Konformationsänderung eintritt, infolgedessen eine Bindungstasche für das ATP im katalytischen Zentrum gebildet und das Substratpeptid C-terminal davon gebunden wird. Dadurch gelangt die als Phosphatakzeptor dienende AS des Substrats in die Nähe des aktiven Zentrums, woraufhin der Phosphattransfer stattfinden kann (SCHAEFFER und WEBER, 1999).

MAPKs sind Prolin-gerichtete Ser/Thr-PKs, die nur solche Substratproteine spezifisch phosphorylieren können, welche ein Prolin in der Phospho+1 Position im für alle MAPKs gültigen Substrat-Erkennungsmotiv  $\Psi\text{X}[\text{ST}]\text{P}$  besitzen, wobei  $\Psi$  ein Prolin oder eine aliphatische AS repräsentiert (CLARK-LEWIS *et al.*, 1991). Zu diesen von den MAPKs selektiv erkannten Substratproteinen zählen u. a. im Zellkern befindliche Transkriptionsfaktoren oder im Nukleus oder Cytoplasma lokalisierte PKs, z. B. aus der Familie der MAPK-aktivierten Protein Kinasen (MAPKAPKs), die auch als Ribosomale S6 Kinasen (RSKs) bezeichnet werden (s. Kap. 1.4.2).

Die meisten MAPKs besitzen kleine N- sowie C-Termini und bestehen dadurch vorwiegend aus der ca. 300 AS-Reste langen eukaryotischen PK-Domäne (s. Kap. 1.3.1). Nur wenige haben relativ ausgedehnte Insertionen zwischen den Subdomänen X und XI (HANKS und HUNTER; 1995). Als typische eukaryotische PKs falten sie sich in einer „Zwei-Falten-Struktur“ (s. Kap. 1.3.1 und Abb. 1.2), wobei beide „Proteinfalten“ von der Tasche des katalytischen Zentrums getrennt werden (TAYLOR und RADZIO-ANDZELM, 1994; COBB und GOLDSMITH, 1995; JOHNSON *et al.*, 1996).

Phylogenetische Analysen zufolge können MAPKs in die 3 folgenden Untergruppen eingeteilt werden (KÜLTZ, 1998; KÜLTZ und BURG, 1998): [1] Extrazellulär-Signal regulierte Kinasen (ERKs), [2] Stress-aktivierte Protein Kinasen (SAPKs) und [3] MAPK3-Mitglieder (s. Abb. 1.4). Auf der Basis phylogenetischer Verwandtschaften und funktionaler Charakteristika können diese weiterführend in mehr als 9 Subfamilien untergliedert werden (s. Abb. 1.4). Die SAPK-Untergruppe wird dabei in mindestens 3 Subfamilien eingeteilt: [1] SAPK1/JNK, [2] SAPK2/p38 MAPK und [3] SAPK-Mitglieder der Hefe (YSAPK). Die SAPK3 von *Caenorhabditis elegans* passt hingegen in keine der 3 Subfamilien (s. Abb. 1.4).

Sie repräsentiert wahrscheinlich das Gründungsmitglied einer 4. Subfamilie, deren Mitglieder das ungewöhnliche TQY-Dualphosphorylierungsmotiv besitzen.



**Abb. 1.4:**

Einteilung der MAPK-Familie in die 3 Untergruppen der ERKs, SAPKs und MAPK3 (nach KÜLTZ und BURG, 1998). Jede von ihnen wird des weiteren in diverse Subfamilien untergliedert. Das für jede Subfamilie charakteristische Phosphorylierungsmotiv ist ebenfalls aufgeführt. Mitglieder, die sich nicht in eine der Subfamilien einordnen lassen, sind separat dargestellt.

Die ERK-Untergruppe setzt sich aus mindestens 5 Subfamilien zusammen: [1] Pflanzen ERK (PERK), [2] Hefe ERK1 (YERK1), [3] Hefe ERK2 (YERK2), [4] Tier ERK1 (ERK1) und [5] Tier ERK5 (ERK5). Die MAPKa von *D. discoideum* und die SMK1 von *S. cerevisiae* können keiner der 5 Subfamilien zugeordnet werden. Bis auf die SMK1 (TNY) besitzen alle ERK-Untergruppenmitglieder übereinstimmend das TEY-Motiv (s. Abb. 1.4). Die MAPK3-

Untergruppe besteht aus einer einzigen Subfamilie: der Tier MAPK3 (MAPK3), und aus zahlreichen anderen MAPKs, die hauptsächlich aus Protozoen stammen (PRMAPK) (s. Abb. 1.4).

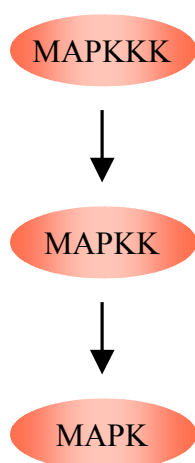
Wie anhand der Abb. 1.4 erkennbar, ist das Dualphosphorylierungsmotiv TXY für eine Klassifizierung der MAPKs bezüglich der Untergruppe nur bedingt geeignet, da (wie z. B. bei der SAPK-Untergruppe ersichtlich) die Subfamilien unterschiedliche Motive besitzen können oder aber das gleiche Motiv in verschiedenen Untergruppen vorkommen kann. Auffällig ist jedoch, dass in der ERK-Untergruppe, bis auf eine Ausnahme, sämtliche Mitglieder das TEY-Motiv besitzen. Die MAPK3-Subfamilie hat kein TXY-Motiv sondern an vergleichbarer Position eine Monophosphorylierungsstelle im Sinne eines SEG-Motivs (bzw. THE bei der MAPKb von *C. elegans*).

Die gemeinsame Bezeichnung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) (KYRIAKIS und AVRUCH, 1996; WOODGETT *et al.*, 1996) und der p38 MAPK (COHEN, 1997; CUENDA *et al.*, 1997; KUMAR *et al.*, 1997) als SAPK basiert übereinstimmend sowohl auf phylogenetischen Analysen als auch auf dem Aktivierungsprofil beider Mitglieder der SAPK-Untergruppe der MAPKs. Beide SAPKs werden bevorzugt durch Stress-vermittelnde Signale stimuliert (ähnlich wie einige PERKs und manche ERK5-Mitglieder) und weniger stark durch Mitogene, wie die meisten anderen ERKs. Da Pflanzen über keine SAPKs verfügen, werden deren ERKs ungewöhnlicherweise auch durch zellulären Stress aktiviert (KÜLTZ, 1998). Die SAPKs der Tiere werden in 2 Subfamilien unterteilt (SAPK1/JNK und SAPK2/p38 MAPK). Ihre Mitglieder stellen in Vertebraten den größten Anteil der MAPKs dar. Allein aus *H. sapiens* wurden mittlerweile mindestens 7 *SAPK*-Gene nachgewiesen. Nebenbei existieren aufgrund alternativen Spleißens weitere mRNA-Transkripte dieser Gene (s. Kap. 1.5.1/2).

Da fast alle Mitglieder der ERK- und viele der MAPK3-Untergruppe das TEY-Motiv aufweisen, kann angenommen werden, dass beide Gruppen phylogenetisch aus einem gemeinsamen *MAPK*-Urgen hervorgegangen sind. Die MAPK-Familie hat sich womöglich relativ früh nach Abspaltung der Eukaryoten aus dem Stamm der Organismen entwickelt und müsste demnach 1-1,5 Mrd. Jahre alt sein. SAPKs erscheinen dagegen nur in Pilzen und Tieren, woraus gefolgert wird, dass diese Untergruppe der MAPKs die phylogenetisch Jüngste ist. Sie hat sich wahrscheinlich aus der ERK-Linie entwickelt, nachdem sich Protozoa und Pflanzen von dem gemeinsamen Stamm der Pilze und Metazoen abgetrennt haben (KÜLTZ, 1998).

## 1.4.2 MAPK-Module und deren Substrate

MAPKs nehmen aufgrund der von ihnen vermittelten Aktivierung induzierbarer Transkriptionsfaktoren im Zellkern oder anderer Substrate der Zelle in der Beantwortung zahlreicher extrazellulärer Signale eine Schlüsselposition ein. Diese regulatorischen Aktivitäten führen u. a. zu verstärkten Genexpressionen, Veränderungen im Metabolismus der betroffenen Zellen sowie Umbildungen in deren Cytoskelett. Das zentrale Element von MAPK-Signalwegen ist ein Modul aus 3 aufeinanderfolgenden PKs, das bezüglich der Anordnung seiner Komponenten von der Hefe bis zum Mensch konserviert ist (s. Abb. 1.5) (BLENIS, 1993; DAVIS, 1993; NISHIDA und GOTOH, 1993; ELION, 1998; KÜLTZ, 1998; LEWIS *et al.*, 1998; COBB, 1999; WIDMANN *et al.*, 1999).



**Abb. 1.5:**  
*Aufbau des MAPK-Moduls aus  
3 aufeinanderfolgenden PKs.*

Die MAPKKKs werden in ihren Aktivitäten durch Interaktionen mit kleinen GTP-bindenden Proteinen aus der Ras- oder Rho-Familie sowie über Phosphorylierungen durch vorangeschaltete MAPKKKKs reguliert (s. Abb. 1.9 und Abb. 1.12). Nach ihrer Aktivierung phosphorylieren sie MAPKKs oder SAPKKs an Serin- oder Threonin-Resten, die daraufhin das TXY-Motiv der nachgeschalteten MAPKs erkennen können und als dualspezifische Kinasen in diesem Motiv Threonin und Tyrosin phosphorylieren (GARRINGTON und JOHNSON, 1999; THOMSON *et al.*, 1999; WIDMANN *et al.*, 1999). Die somit aktivierten MAPKs können dann im Zellkern lokalisierte, induzierbare Transkriptionsfaktoren, wie ATF-2, CHOP, c-Jun, c-Myc, DPC4, Elk-1, Els-1, Ets-1 und Ets-2, Fos, Fra-1 und Fra-2, Max, MEF-2C, NF-AT4, SAP-1, STATs, Tal oder p53, sowie nachfolgende PKs phosphorylieren und aktivieren (LEWIS *et al.*, 1998; GARRINGTON und JOHNSON, 1999; THOMSON *et al.*, 1999). Zu Letzteren gehören die MAPK-Signal-Integrations Kinase 1 (MNK1) und MNK2 (FUKUNAGA und HUNTER, 1997; WASKIEWICZ *et al.*, 1997), die Mitogen- und Stress-aktivierte Protein Kinase 1 (MSK-1) und MSK-2 (DEAK *et al.*, 1998), RSK-B (PIERRAT *et*

*al.*, 1998), MAPKAPK1 (ERIKSON und MALLER, 1986), MAPKAPK2 (STOKOE *et al.*, 1992a), MAPKAPK3 (MCLAUGHLIN *et al.*, 1996) und die p38-regulierte aktivierte Kinase (PRAK/MAPKAPK5) (NEW *et al.*, 1998; NI *et al.*, 1998). Zu den Substraten der MAPKs zählen aber auch regulatorische Enzyme, wie die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), cytoskelettale Proteine, darunter Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1 (MAP1), MAP2 oder Tau, ferner der GDP-GTP Austauschfaktor Son of sevenless 1 (Sos1) sowie MAPKKs und MAPKKKs (KÜLTZ, 1998; LEWIS *et al.*, 1998; GARRINGTON und JOHNSON, 1999; SCHAEFFER und WEBER, 1999; THOMSON *et al.*, 1999).

Die Phosphorylierung der im Signaltransduktionsweg vorangeschalteten MAPKKs und MAPKKKs im Sinne von positiven oder negativen Rückkopplungen, scheint die Aktivität der MAPKs ebenso zu beeinflussen, wie die Stimulierung dualspezifischer PPs, die hohe Substratspezifitäten gegenüber MAPKs besitzen und diese in Folge der von ihnen katalysierten Dephosphorylierung des TXY-Motivs effizient inhibieren können (ALESSI *et al.*, 1993; GUAN und DIXON, 1993; SUN *et al.*, 1993; ZHENG und GUAN, 1993; WARD *et al.*, 1994; MARTELL *et al.*, 1995; CHU *et al.*, 1996; LEWIS *et al.*, 1998; COBB, 1999; SCHAEFFER und WEBER, 1999). Auch Ser/Thr-PPs, wie die PP1 oder PP2, können MAPK-Module regulieren, vorzugsweise über Dephosphorylierung von MEKs und MAPKKKs, wie Raf (ALESSI *et al.*, 1995; LEWIS *et al.*, 1998; COBB, 1999).

Bis heute sind 14 MAPKKKs, 7 MAPKKs und mehr als 12 MAPKs in Säugerzellen identifiziert und charakterisiert worden (GARRINGTON und JOHNSON, 1999; WIDMANN *et al.*, 1999). Daran wird deutlich, dass von allen Modulkomponenten die MAPKKs am stärksten unterrepräsentiert sind. Außerdem besitzen sie eine ausgesprochen hohe Spezifität zu ihren jeweiligen nachgeschalteten MAPKs und erlauben deswegen nur minimale Variationen im distalen Modulteil (GARRINGTON und JOHNSON, 1999; WIDMANN *et al.*, 1999). Demnach nehmen die MAPKKs in dem kompliziert verzweigten Signalnetzwerk der Zelle den zentralen Konvergenzpunkt ein, an dem zahlreiche Signaltransduktionswege zusammen treffen (s. Abb. 1.9 und 1.12). Dagegen stellen die MAPKs aufgrund ihrer Eigenschaft, eine Vielzahl von diversen Substraten zu phosphorylieren, den zentralen Divergenzpunkt dar (s. Abb. 1.9 und 1.12) (KÜLTZ, 1998). Während die Mitglieder dieser beiden PK-Familien innerhalb ihrer Gruppe relativ homolog zueinander sind, weisen die 14 MAPKKKs doch recht unterschiedliche Strukturmerkmale untereinander auf. So verfügen sie über diverse regulatorische Motive, die in den anderen Komponenten der MAPKs-Module nicht existieren. Dazu gehören die Plechstrin-homologe (PH) Domäne, Prolin-reiche Sequenzen zur Bindung von Src-homologen 3 (SH3)-Domänen, Bindestellen für kleine GTP-bindende Proteine, Leucin-Zipper und Phosphorylierungspositionen für Tyr- und Ser/Thr-PKs. Anhand dieser Motive können sie sehr unterschiedlich von einer Vielzahl an übergeordneten Signalelementen reguliert werden und auch aufgrund ihrer hohen Anzahl in der Zelle diese zahlreichen Stimuli

effizient in die MAPK-Signalwege integrieren (s. Abb. 1.9 und 1.12) (GARRINGTON und JOHNSON, 1999; WIDMANN *et al.*, 1999).

### 1.4.3 Organisation der MAPK-Module durch Gerüstproteine

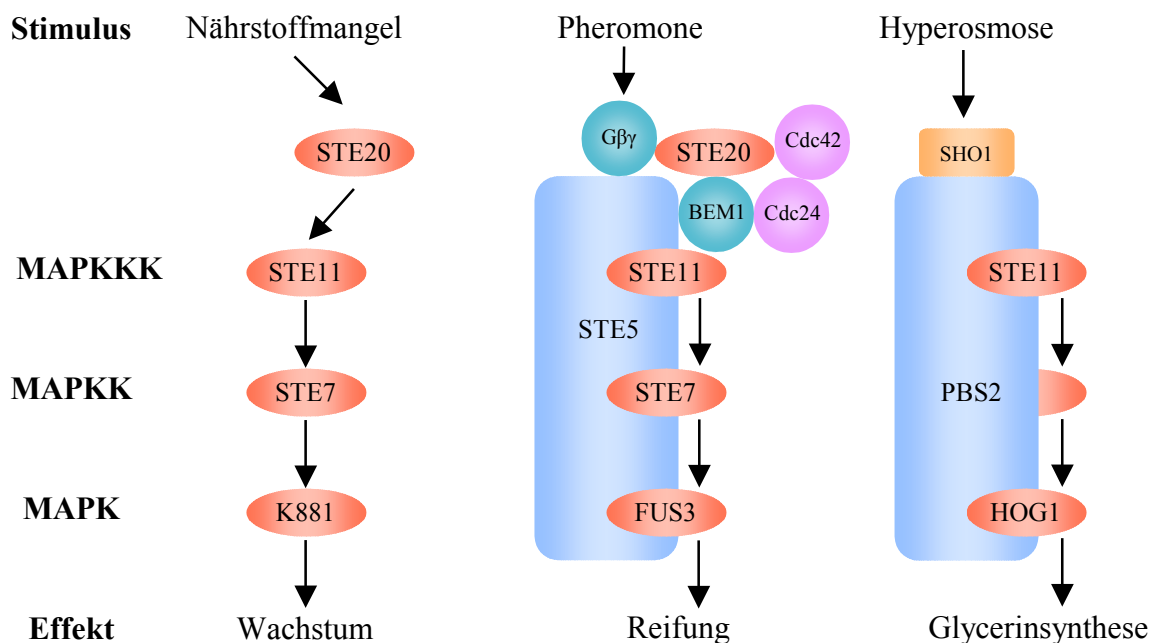
Zellen besitzen, wie schon angedeutet, mehrere unterschiedliche MAPK-Signalwege. Im Fall der Hefe *S. cerevisiae* wurden 5 verschiedene MAPK-Module beschrieben. Dort regulieren sie Prozesse, wie Reifung, Filamentation, Osmoregulation, Zellwandmodulation und Sporulation (HERSKOVITZ, 1995; MADHANI und FINK, 1998). In Säugerzellen existieren nach dem heutigen Kenntnisstand ebenfalls 5 MAPK-Module. Dazu zählen u. a. das Modul der ERK1/2-Kaskade, die vorzugsweise Zellwachstum oder Differenzierung kontrolliert, sowie die Module der JNK- und p38 MAPK-Pfade, die beide hauptsächlich in Folge von Zellstress-auslösenden Stimuli aktiviert werden (s. Kap. 1.5.1/2) und eine Reihe biologischer Prozesse regulieren (s. Kap. 1.5.3) (ROBINSON und COBB, 1997; IP und DAVIS, 1998; LEWIS *et al.*, 1998).

Bei Signalweiterleitungen über MAPK-Signalwege werden häufig Modulkomponenten von unterschiedlichen MAPK-Kaskaden gemeinsam genutzt. Diese Problematik wird deutlich bei der Betrachtung von 3 in Hefe existierenden Signalkaskaden, die durch verschiedene Faktoren, wie Nährstoffmangel, Pheromone oder Hyperosmolarität, aktiviert werden und unterschiedliche Reaktionen der Zelle vermitteln, jedoch in allen Fällen die MAPKKK STE11 verwenden (s. Abb. 1.6). Solche Systeme mit austauschbaren Modulkomponenten ermöglichen der Zelle eine hohe Diversifizierung in der Signalbeantwortung bei einer vergleichbar geringen Anzahl an Komponenten. Als Konsequenz daraus müssen jedoch regulatorische Mechanismen existieren, die unspezifische Aktivierungen dieser Komponenten und somit ein unkontrolliertes Überschneiden der Signalkaskaden verhindern.

Eine Möglichkeit, die Spezifität eines Signals aufrecht zu erhalten, stellt die selektive Bindung von Modulkomponenten an Gerüstproteine (scaffolding Proteine) dar. Dadurch wird verhindert, dass diese Komponenten frei in der Zelle diffundieren und unspezifisch reguliert werden (ELION, 1998; WHITMARSH und DAVIS, 1998; SCHAEFFER und WEBER, 1999; THOMSON *et al.*, 1999; WIDMANN *et al.*, 1999).

Solche Gerüstproteine mit einer verankernden Funktion für MAPK-Modulkomponenten konnten zunächst in den Pheromon- und Hyperosmolarität-Pfaden von *S. cerevisiae* nachgewiesen werden (s. Abb. 1.6) (ELION, 1995). STE5 bindet dabei sämtliche Komponenten des Pheromon-Signalwegs (die MAPKKK STE11, die MAPKK STE7 sowie die MAPKs FUS3 oder KSS1) an distinkte Domänen (ELION, 1995). Durch weiterführende Studien konnte gezeigt werden, dass dieses Gerüstprotein auch noch mit anderen Signalelementen assoziiert sein kann. Dazu gehört die G $\beta$ -Untereinheit (G $\beta$ -UE) eines heterotrimeren G-

Proteins und BEM1, ein Regulator der Zellpolarität. Die Bindung von Pheromonen an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor bewirkt die Dissoziation der G $\beta\gamma$ -UE von der inhibitorischen G $\alpha$ -UE. Anschließend kann die G $\beta\gamma$ -UE des G $\beta\gamma$ -Dimers an STE5 und somit auch an die MAPKKK STE20 binden, woraufhin diese STE11 phosphoryliert (WHITEAWAY *et al.*, 1995; FENG *et al.*, 1998; LEEUW *et al.*, 1998). BEM1 ist hingegen ein Protein, das eine SH3-Domäne enthält und den für die GTPase Cdc42 essentiellen GDP-GTP Austauschfaktor Cdc24 binden kann. BEM1 assoziiert des weiteren auch mit STE5 und STE20 und vermittelt womöglich dadurch die Pheromon-induzierte Aktivierung der Hefezelle, die zu einem Verbleib in der G1-Phase des Zellzyklusses führt (LEEUW *et al.*, 1995; LYONS *et al.*, 1996). Ähnlich wie STE5, fungiert in Hefezellen PBS2 als Gerüstprotein, ist aber im Gegensatz zu diesem selbst eine Komponente eines MAPK-Moduls, das bei Hyperosmose die Synthese des organischen Osmolyten Glycerin stimuliert (s. Kap. 1.5.4) (POSAS und SAITO, 1997). Dabei formiert die MAPKK PBS2 einen Multienzymkomplex aus dem Osmosensor SHO1, der MAPKKK STE11 und der MAPK HOG1 (s. Abb. 1.6).

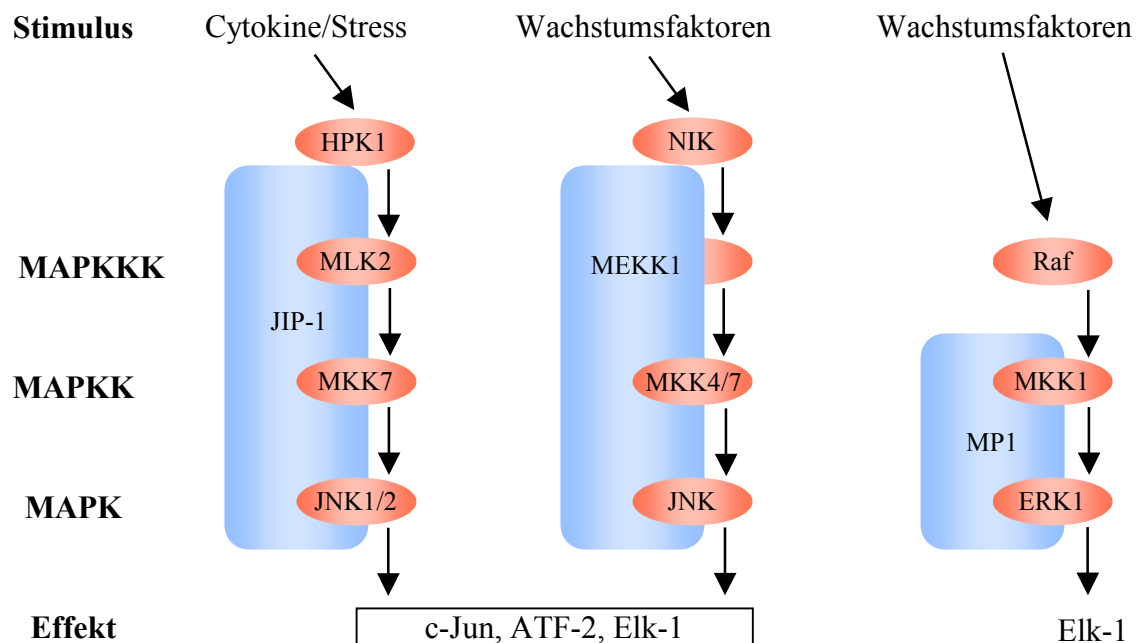


**Abb. 1.6:**

Beschreibung der 3 Signalwege in *S. cerevisiae*, die gemeinsam die MAPKKK STE11 als Signalkomponente verwenden. Dargestellt ist ebenfalls die Organisation der MAPK-Modulkomponenten und ihrer vorangeschalteten Signalelemente durch die Gerüstproteine STE5 und PBS2.

Mittlerweile sind solche Proteine auch in Säugerzellen nachgewiesen worden (s. Abb. 1.7). In diesem Zusammenhang, scheint das im JNK-Signalweg involvierte JNK-Interaktionsprotein 1 (JIP-1) eine homologe Funktion zu dem STE5 der Hefe zu haben. Ursprünglich wurde JIP-1 als Inhibitor der JNK-Kaskade charakterisiert, das über die selektive Bindung von JNK im

Cytoplasma dessen Translokation in den Nukleus verhindern kann (DICKENS *et al.*, 1997). Durch Koimmunpräzipitierungsstudien wurde demonstriert, dass JIP-1 mit der MAPKKK MLK2, der MAPKK MKK7 und den MAPKs JNK1 und JNK2 assoziiert ist. Des weiteren konnte eine Bindung mit der STE20-homologen MAPKKKK HPK1 nachgewiesen werden (WHITMARSH *et al.*, 1998).



**Abb. 1.7:**

Organisation von MAPK-Modulkomponenten und ihrer vorangeschalteten MAPKKKKs durch die Gerüstproteine JIP-1, MEKK1 und MP1 in Säugerzellen.

Ein PBS2-ähnliches Protein, scheint ebenfalls in Säugerzellen zu existieren. Die MAPKKK MEKK1 ist nämlich in der Lage, mit der STE20-homologen MAPKKKK NIK, den MAPKKs MKK4 sowie MKK7 und der JNK zu interagieren. Auf diese Weise verbindet es die Wachstumsfaktor-Rezeptoren mit dem JNK-Signalweg (FANGER *et al.*, 1997a; SU *et al.*, 1997; XU und COBB, 1997).

Eine dritte Klasse von Gerüstproteinen in Säugern repräsentiert das Protein MP1. Dieses ist in der Lage, die MAPKK MKK1 und die MAPK ERK1 (nicht aber MKK2 und ERK2) zu binden und auf diese Weise die MKK1-kontrollierte Aktivierung der ERK1 zu vermitteln (SCHAEFFER *et al.*, 1998). Ob der Komplex noch mit anderen Mitgliedern des ERK1-Moduls assoziiert ist, verblieb bislang unklar.

## 1.5 Die SAPK-Untergruppe der MAPKs

### 1.5.1 Die Subfamilie der SAPK1/JNK

#### 1.5.1.1 Charakterisierung der SAPK1/JNK-Mitglieder

Das erste Mitglied der SAPK1/JNK-Subfamilie wurde 1991 aus Cycloheximid-behandelten Rattenleberzellen biochemisch charakterisiert. Im Unterschied zu den bis *dato* bekannten MAPKs konnte diese 54 kD große PK durch Zellstress stimuliert werden und den aktivierenden N-Terminus des Transkriptionsfaktors c-Jun phosphorylieren. Daraufhin wurde dieses Enzym als „c-Jun N-terminale Kinase“ (JNK) bezeichnet (PULVERER *et al.*, 1991). 1994 gelangen durch zwei unterschiedliche Arbeitsgruppen die ersten Klonierungen von *JNK*-Genen, wobei das menschliche Homolog *JNK* genannt wurde (DÉRIJARD *et al.*, 1994), während das der Ratte die Bezeichnung *SAPK* für „Stress-aktivierte Protein Kinase“ erhielt (DAVIS, 1994).

Mittlerweile sind im Genom des Menschen sowie in dem der Ratte die 3 Gene *JNK1*, *JNK2* und *JNK3* identifiziert worden (GUPTA *et al.*, 1996; WIDMANN *et al.*, 1999). Infolge alternativen Spleißens sowie unterschiedlicher Exonbenutzungen existieren insgesamt 10 JNK-Isoformen (s. Abb. 1.8), wobei alle übereinstimmend das TPY-Motiv in der Subdomäne VIII besitzen (GUPTA *et al.*, 1996; KYRIAKIS und AVRUCH; 1996).

Die JNK1-Proteinklasse umfasst 4 Isoformen (JNK1 $\alpha$ 1, JNK1 $\alpha$ 2, JNK1 $\beta$ 1 und JNK1 $\beta$ 2). Ihre Mitglieder unterscheiden sich zum einen aufgrund der alternativen Expression einer aus 17 AS-Resten bestehenden Kasette zwischen den PK-Subdomänen IX und X, die auf einer unterschiedlichen Benutzung zweier Exone beruht (JNK1 $\alpha$ - und JNK1 $\beta$ -Isoformen). Zum anderen verfügen diese  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoformen über unterschiedlich lange C-Termini, so dass jeweils eine kurze (46 kD: JNK1 $\alpha$ 1, JNK1 $\beta$ 1) und eine lange (54 kD: JNK1 $\alpha$ 2, JNK1 $\beta$ 2) Isoform des JNK1 $\alpha$ - oder JNK1 $\beta$ -Proteins gebildet wird. Dies ist zurückzuführen auf ein alternatives Spleißens des für den C-Terminus der Kinase kodierenden Bereichs der mRNA (GUPTA *et al.*, 1996).

Die JNK2-Klasse besteht aufgrund analoger Modifikationen ebenfalls aus 4 Isoformen (46 kD: JNK2 $\alpha$ 1, JNK2 $\beta$ 1; 54 kD: JNK2 $\alpha$ 2, JNK2 $\beta$ 2) und ist somit der von JNK1 relativ ähnlich (GUPTA *et al.*, 1996).

Die beiden JNK3-Proteine unterscheiden sich von den Mitgliedern der anderen JNK-Klassen hauptsächlich durch die Präsenz eines verlängerten N-Terminus. Außerdem scheint die Expression der JNK3, im Gegensatz zu den ubiquitär exprimierten JNK1 und JNK2, nur auf das Gehirn lokalisiert zu sein (KYRIAKIS und AVRUCH; 1996; WIDMANN *et al.*, 1999). Eine alternierende Sequenz zwischen den PK-Subdomänen IX und X konnte nicht gefunden

werden, so dass nur 2  $\alpha$ -Isoformen (48 kD: JNK3 $\alpha$ 1; 57 kD: JNK3 $\alpha$ 2) des JNK3-Proteins mit unterschiedlich langen C-Termini existieren (GUPTA *et al.*, 1996).

### 1.5.1.2 Aktivierung und Substrate der JNKs

JNKs werden bevorzugt in Folge von Zellstress-auslösenden Stimuli (UV- und ionisierende Strahlung, Hitzeschock, oxidativer Stress und Hyperosmolarität) sowie durch Bindung proinflammatorischer Cytokine an Mitglieder der TNF $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Rezeptor Superfamilie aktiviert (s. Kap. 1.5.1.4). Im Unterschied zu den ERKs der Tiere werden sie in den meisten Fällen weniger stark durch mitogene Signale (Wachstumsfaktoren oder Phorbol ester), die über Wachstumsfaktor Rezeptoren, Grb2/Sos1-Kopplung und Ras vermittelt werden, stimuliert (s. Abb. 1.9) (DAVIS, 1994; GUPTA *et al.*, 1996; KYRIAKIS und AVRUCH; 1996; ICHIJO, 1999; KYRIAKIS; 1999; LEPPÄ und BOHRMANN, 1999; TIBBLES und WOODGETT; 1999; WIDMANN *et al.*, 1999). Nach ihrer Aktivierung und Homodimerisierung erfolgt die Translokation der JNKs aus dem Cytoplasma in den Zellkern, wo sie induzierbare Transkriptionsfaktoren, wie ATF-2, c-Jun, DPC4, Elk-1, NF-AT4 und p53, phosphorylieren können (s. Abb. 1.8 und 1.9) (PULVERER *et al.*, 1991; GUPTA *et al.*, 1995; MILNE *et al.*, 1995; ZINCK *et al.*, 1995; AFTI *et al.*, 1997; CHOW *et al.*, 1997; HU *et al.*, 1997). Andere Substrate außerhalb der Gruppe der Transkriptionsfaktoren konnten für JNKs noch nicht identifiziert werden.

Die verschiedenen Isoformen der JNKs unterscheiden sich gegenüber den erwähnten Substraten in ihrer Bindungsaffinität und dadurch auch in ihrem Aktivierungspotential. Aufgrund dessen müssen neben der erwähnten Phospho+1 Position (s. Kap. 1.4) noch weitere regulatorische Domänen in diesen Substraten existieren, die eine selektive Bindung ihrer aktivierenden JNKs kontrollieren (GUPTA *et al.*, 1996; KYRIAKIS und AVRUCH, 1996; DAVIS; 1999; TIBBLES und WOODGETT, 1999; WIDMANN *et al.*, 1999). So konnte z. B. in den JNK-Substraten c-Jun sowie ATF-2 eine für die Bindung und Phosphorylierung essentielle N-terminale Region identifiziert werden, die separat von der Phospho+1 Position lokalisiert ist (ADLER *et al.*, 1992; HIBI *et al.*, 1993; DÉRIJARD *et al.*, 1994; GUPTA *et al.*, 1995; LIVINGSTONE *et al.*, 1995). In Übereinstimmung mit der Tatsache, dass die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoformen der JNK1- und JNK2-Proteine unterschiedliche Substratspezifitäten besitzen, konnte nachgewiesen werden, dass insbesondere die PK-Subdomänen IX und X für die Wechselwirkung mit diesen regulatorischen Bindedomänen der Transkriptionsfaktoren verantwortlich sind (KALLUNKI *et al.*, 1994; SLUSS *et al.*, 1994; GUPTA *et al.*, 1996; DAVIS, 1999).

Die durch JNKs aktivierten Transkriptionsfaktoren c-Jun und ATF-2 gehören zur Klasse der „Basic Leucine Zipper Region Proteine“ (bZIPs), die sich in die übergeordnete Aktivator

Protein 1 (AP-1)-Familie einordnet (ANGEL und KARIN, 1991). Die Mitglieder dieser bZIP-Klasse, zu der auch c-Fos zählt, können in Folge ihrer Aktivierung homo- als auch heterodimerisieren und sind dann in der Lage, an AP-1 oder AP-1-ähnlichen Stellen in Promotoren zahlreicher Gene zu binden, um deren Transkription zu stimulieren (DAVIS, 1999; LEPPÄ und BOHMANN, 1999). Der Transkriptionsfaktor c-Jun wird nach Bindung mit JNK an Ser63 und Ser73 phosphoryliert. Dies führt zu einer Bildung von Jun/Jun- oder Jun/ATF-2-Dimeren, die u. a. mit der AP-1 Stelle des *c-Jun*-Gens assoziieren können, woraufhin c-Jun in einem erhöhten Ausmaß exprimiert wird. Die Expression dieses Proteins wird allerdings noch über einen zweiten JNK-vermittelten Mechanismus begünstigt. In Folge der Phosphorylierung von c-Jun durch JNK wird die Degradierung dieses Transkriptionsfaktors durch Ubiquitin weitgehend verhindert, so dass dieser eine längere Halbwertszeit in der Zelle aufweist. Der erhöhte Gehalt an c-Jun führt dann zu einer verstärkten Transkription und folglich zur Expression AP-1-kontrollierter Gene (FUCHS *et al.*, 1996; WHITMARSH und DAVIS, 1996; MUSTI *et al.*, 1997; DAVIS, 1999; WIDMANN *et al.*, 1999). Der aktivierende Transkriptionsfaktor 2 (ATF-2) wird durch JNK in dem aktivierenden N-Terminus an Thr69 und Thr71 phosphoryliert, woraufhin dieser nach Dimerisierung ebenfalls an AP-1 Stellen von Promotoren binden kann (GUPTA *et al.*, 1995; LIVINGSTONE *et al.*, 1995).

Ein weiteres Substrat der JNKs ist Elk-1, das ein Konvergenzpunkt der JNK-, p38- und ERK-Signalwege darstellt und ein transkriptionaler Regulator der Ets-Familie ist (ZINCK *et al.*, 1995). Nach der Aktivierung dimerisiert Elk-1 mit dem Serum Response Factor (SRF) zu einem ternären Komplex, der daraufhin imstande ist, mit dem Serum Response Element (SRE) von Promotoren zu assoziieren (WHITMARSH *et al.*, 1995). Als Konsequenz dessen wird u. a. c-Fos verstärkt exprimiert (CAVIGELLI *et al.*, 1995; GILLE *et al.*, 1995; MUSTI *et al.*, 1997).

Die Phosphorylierung des nuklearen Faktors aktivierter T-Zellen 4 (NF-AT4) durch JNK verhindert seine Translokation in den Nukleus und hat somit einen inhibitorischen Effekt auf seine Funktion (CHOW *et al.*, 1997).

### 1.5.1.3 Komponenten der JNK-Signalwege

Die Aktivierung der JNKs (detaillierte Darstellung der Signalkomponenten s. Abb. 1.8 und 1.9) über eine Dualphosphorylierung ihres TPY-Motivs in der Subdomäne VIII erfolgt durch die JNK-spezifischen MAPKKs: MKK4, die auch als SAPK und ERK Kinase 1 (SEK1) bekannt ist (SANCHEZ *et al.*, 1994; DÉRIJARD *et al.*, 1995), sowie MKK7 (MORIGUCHI *et al.*, 1997; WU *et al.*, 1997).

Die Inaktivierung der JNKs erfolgt hingegen durch dualspezifische PPs, wie die MAPK Phosphatase 1 (MKP-1), MKP-2, MKP-4 oder M3/6-Phosphatase, die vorwiegend eine

Hydrolyse des Tyrosin-Phosphatesters im regulatorischen TPY-Motiv der JNKs katalysieren (CHU *et al.*, 1996; MUDA *et al.*, 1996 und 1997; HIRSCH und STORCK, 1997). Auch das schon erwähnte JIP-1 (s. Kap. 1.4.3) kann die JNK-Aktivität negativ beeinflussen, in dem es die Translokation der JNKs in den Zellkern verhindert (WHITMARSH und DAVIS, 1998).

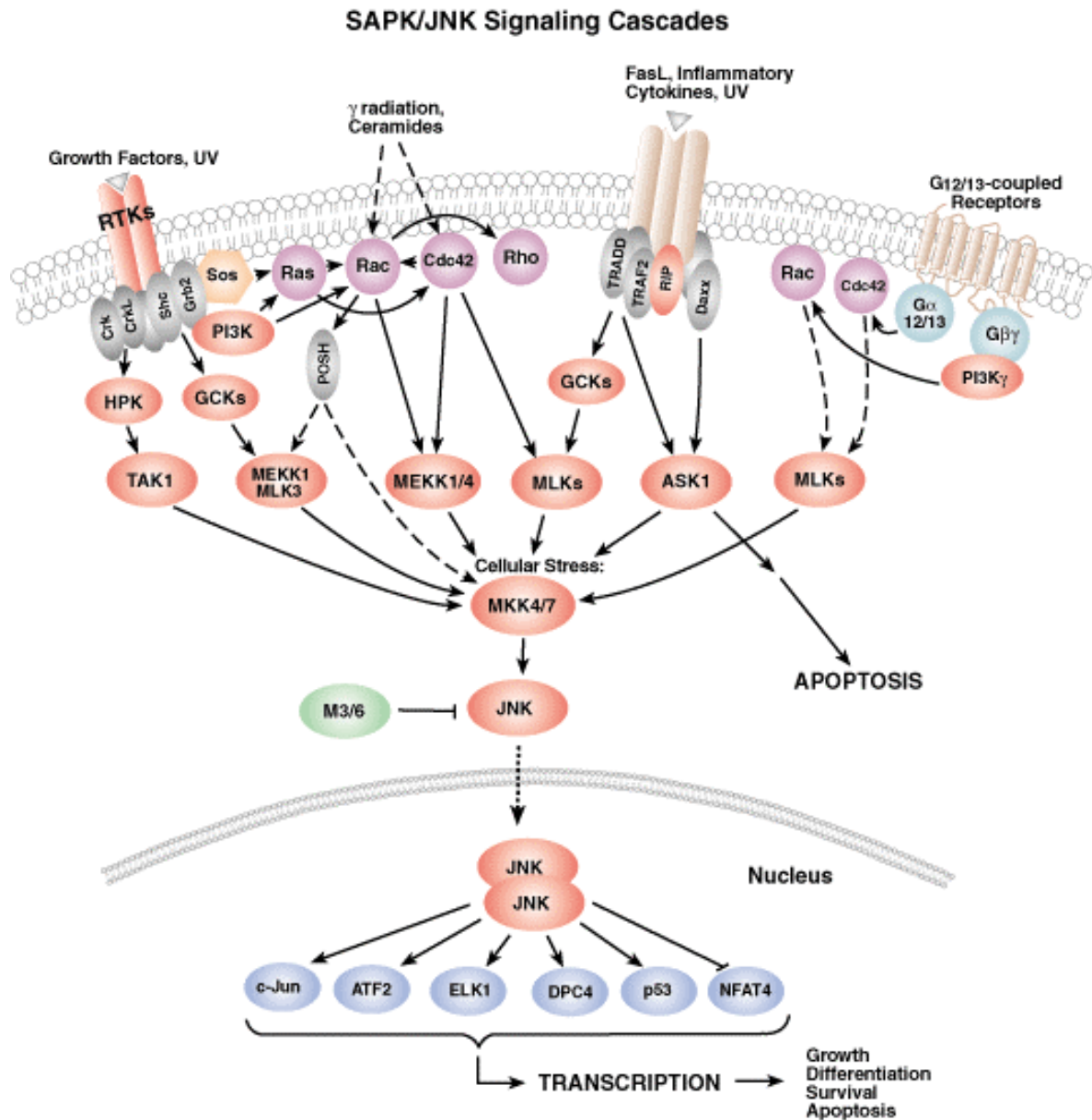
JNKs	MAPKKs	MAPKKKs	MAPKKKKs	Substrate
JNK1 $\alpha$ 1	MKK4/SEK1	ASK1/MAPKKK5	GCK	ATF-2
JNK1 $\alpha$ 2	MKK7	ASK2/MAPKKK6	GCKR	c-Jun
JNK1 $\beta$ 1		DLK/MUK/ZPK	GLK	DPC4
JNK1 $\beta$ 2		MEKK1	HPK1	Elk-1
		MEKK2	MST1/Krs-2	NF-AT4
JNK2 $\alpha$ 1		MEKK3	NIK	p53
JNK2 $\alpha$ 2		MLK2/MST	PAK1	
JNK2 $\beta$ 1		MLK3/SPRK1	PAK2	
JNK2 $\beta$ 2		MTK1/MEKK4	PAK3	
		TAK1	PAK4	
JNK3 $\alpha$ 1		Tpl-2/Cot		
JNK3 $\alpha$ 2				

**Abb. 1.8:**

Tabellarische Übersicht der verschiedenen JNK-Isoformen und ihrer vorangeschalteten Signalkomponenten, gegliedert in MAPKKs, MAPKKKs und MAPKKKKs. Die PKs sind farblich unterschiedlich dargestellt, je nachdem ob sie ein CRIB-Motiv besitzen oder zu den SPS1-Familienmitgliedern gehören. Des Weiteren sind die Substrate der JNKs aufgeführt.

Bis heute sind 11 verschiedene MAPKKKs des JNK-Moduls identifiziert worden (s. Abb. 1.8 und 1.9). Dies sind im einzelnen ASK1/MAPKKK5, ASK2/MAPKKK6, DLK/MUK/ZPK, MEKK1, 2 und 3, MLK2/MST, MLK3/SPRK1, MTK1/MEKK4, TAK1 und Tpl-2/Cot (ICHIJO, 1999; KYRIAKIS, 1999; TIBBLES und WOODGETT, 1999; WIDMANN *et al.*, 1999). MLK2, MLK3, MTK1 und DLK werden der Gruppe der „Mixed Lineages Kinasen“ (MLKs) zugeordnet, die sich durch den Besitz zahlreicher regulatorischer Domänen, wie SH3-Bindestellen, Leucin Zipper oder Anlagerungspositionen für kleine GTP-bindende Proteine, auszeichnen (TIBBLES und WOODGETT, 1999).

Von den 14 mittlerweile bekannten Mitgliedern der MAPKKKKs (GCK, GCKR, GLK, HPK1, Krs-1, LOK, MST1/Krs-2, MST3, NIK, PAK1-4 und SOK1), scheinen alle bis auf Krs-1, LOK, MST3 und SOK1 JNK-Module stimulieren zu können (s. Abb. 1.8 und 1.9) (ICHIJO, 1999).



**Abb. 1.9:**

Die JNK-Signaltransduktionskaskaden. Dargestellt sind die aktivierenden Stimuli der JNK-Kaskaden und die Komponenten, die diese Signale innerhalb der Zelle bis in den Zellkern weiterleiten. Die Pfeile repräsentieren die Aktivierung der entsprechenden Signalkomponenten; unterbrochene Pfeile stehen für eine Aktivierung über einen noch unbekanntem Mechanismus/Weg; der gepunktete Pfeil dokumentiert die Translokation der aktivierten JNK in den Nukleus; stumpf endende Pfeile repräsentieren eine Inhibition der Signalelemente.

Quelle: [www.CELLSIGNAL.com](http://www.CELLSIGNAL.com)

Auch kleine GTP-bindende Proteine aus der Rho-Familie, wie Rac1 und Cdc42, können JNK-Signaltransduktionswege aktivieren. Diese GTPasen scheinen an der Steuerung der cytoskelettalen Reorganisation nach Stress-auslösenden Stimuli, wie  $\gamma$ -Bestrahlung, osmotischer Schock, Behandlung mit Anisomycin oder Ceramidfreisetzung, beteiligt zu sein (s. Abb. 1.9) (LEWIS *et al.*, 1998). Rac1 und Cdc42 können ferner durch Rezeptor-gekoppelte heterotrimere G-Proteine aktiviert werden und dadurch ebenfalls die JNK-Kaskade stimulieren (LEWIS *et al.*, 1998). In seltenen Fällen vermag außerdem die GTPase Ras über

eine Kopplung mit Rac1, Signale von Wachstumsfaktor-Rezeptoren in den JNK-Signalweg zu integrieren und nicht, wie sonst üblich, durch Bindung mit Raf die Raf-MEK-ERK-Kaskade zu stimulieren (s. Abb. 1.9) (COSO *et al.*, 1995; MINDEN *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 1995; KYRIAKIS, 1999).

Die Integration der GTPasen-Signale in die JNK-Pfade wird durch eine Reihe von JNK-aktivierenden MAPKKKKs und MAPKKs ermöglicht, die ein Cdc42/Rac-Interaction-Binding (CRIB)-Motiv besitzen (s. Abb. 1.8). Dieses CRIB-Motiv gestattet ihnen, mit GTP-tragenden  $\beta\gamma$ -UE der GTPasen zu assoziieren. Dadurch werden sie aktiviert und sind daraufhin in der Lage, nachgeschaltete PKs des JNK-Moduls zu phosphorylieren (KYRIAKIS und AVRUCH, 1996; KYRIAKIS, 1999). Als Vertreter der MAPKKKKs sei in diesem Zusammenhang die p21-aktivierte Kinase 1 (PAK1) und deren Homologe erwähnt. Diese PAKs werden aufgrund ihrer Position im Signaltransduktionsweg und wegen der hohen Homologie zwischen ihrer PK-Domäne und der von STE20 aus *S. cerevisiae* (s. Kap. 1.4.3) als STE20-homologe PKs bezeichnet. MAPKKs, die über ein solches CRIB-Motiv verfügen sowie MKK4 und/oder MKK7 aktivieren können sind MEKK1, MLK2, MLK3 und MTK1 (FANGER *et al.*, 1997b; GERWINS *et al.*, 1997; NAGATA *et al.*, 1998; TAKEKAWA und SAITO, 1998; ICHIJO, 1999; KYRIAKIS, 1999).

Der JNK-Signalweg kann aber auch unabhängig von Rac1 und Cdc42 stimuliert werden. Dabei spielen die Mitglieder der SPS1-Familie, die als MAPKKKKs fungieren, eine herausragende Rolle (s. Abb. 1.8). SPS1 aus *S. cerevisiae* ist eine Ser/Thr-PK, die für eine Einkapselung von haploiden Nuklei während der Sporulation verantwortlich ist (FRIESEN *et al.*, 1994). Sie verfügt über eine N-terminale PK-Domäne und eine lange C-terminale Domäne, die keine nachweisbare katalytische Aktivität besitzt (FRIESEN *et al.*, 1994). Mittlerweile sind 6 SPS1-homologe MAPKKKKs aus Säugern identifiziert worden. Sie aktivieren mit Ausnahme von MST1 ausschließlich den JNK-Pfad. Ursprünglich wurden sie wie die PAKs in die Klasse der STE20-homologen PKs eingeordnet. Die PK-Domänen der SPS1-Mitglieder sind jedoch im Vergleich zu denen der PAKs (70 % Homologie) nur zu 40-50 % homolog zu der von STE20, weisen dafür aber eine wesentlich höhere Homologie zu der Domäne von SPS1 aus *S. cerevisiae* auf. Da SPS1-Familienmitglieder in ihrer C-terminalen Domäne gegenüber den STE20-homologen PKs zusätzliche regulatorische und funktionale Motive aufweisen, aber kein CRIB-Motiv besitzen (und demzufolge nicht durch GTPasen aktiviert werden können), werden sie mittlerweile als eigenständige Proteinfamilie angesehen (KYRIAKIS und AVRUCH, 1996; KYRIAKIS, 1999). Das erste SPS1-Protein, das aus Säugerzellen isoliert werden konnte, war die Germinal Center Kinase (GCK). Die weiteren Mitglieder dieser Familie sind Haematopoietic Progenitor Kinase-1 (HPK1), Nck-interacting Kinase (NIK), Kinase responsive to stress 1 (Krs-1), Mammalian Sterile Twenty-like-1 (MST1) und Ste20-like Oxidant-stress-activated Kinase-1 (SOK1) (CREASY und CHERNOFF, 1995; HU *et al.*, 1996; KIEFER *et al.*, 1996; POMBO *et al.*, 1996; TAYLOR *et*

*al.*, 1996; SU *et al.*, 1997). SPS1-Mitglieder können nachgeschaltete MAPKKs binden und durch Phosphorylierung aktivieren. HPK1 assoziiert in diesem Zusammenhang sowohl mit MEKK1 als auch mit MLK3 über ihre C-terminale Domäne. Dort befindet sich u. a. eine Prolin-reiche Region, die eine Bindung mit der SH3-Domäne von MLK3 ermöglicht (HU *et al.*, 1996; KIEFER *et al.*, 1996). NIK besitzt in ihrer C-terminalen Domäne ebenfalls eine SH3-bindende Prolin-reiche Region, die eine Interaktion mit dem SH2/SH3-Adapterprotein Nck erlaubt. Vielleicht wird auf diese Weise (ähnlich wie Sos1 durch Grb2) NIK mit Tyr-PK-Domänen gekoppelt. Eine weitere C-terminale Region von NIK ist für die Bindung mit MEKK1 verantwortlich (SU *et al.*, 1997). Diese C-terminale MEKK1-Binderegion von NIK formt eine hydrophobe Tasche und ist damit analog zu der Leucin-reichen GCK-Domäne und zu einem Teil der C-terminalen Verlängerung von HPK1. Daher wird angenommen, dass es sich hierbei um eine allgemeine MEKK-Binderegion handelt (SU *et al.*, 1997).

Die Aktivierung von SPS1-Familienmitgliedern durch vorangeschaltete Signalelemente ist ebenso wie die der GTPasen noch nicht genau geklärt. Im Kontext der SPS1-homologen MAPKKKKs wird eine Beteiligung von Mitgliedern der Rab-Familie angenommen (KYRIAKIS, 1999).

#### 1.5.1.4 TNFRs und JNK-Aktivierung

Die am besten charakterisierten Signaltransduktionsprozesse, die zu einer Stimulierung von JNK-Modulen (und p38 MAPK-Modulen) führen, sind jene, die durch Bindung von Liganden an Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptoren (TNFRs) ausgelöst werden (s. Abb. 1.9 und 1.12). Die Familie der TNFRs umfasst u. a. TNFR1, TNRF2, den Fas- und IL-1 $\beta$ -Rezeptor, CD40, CD30, CD28 sowie CD27 (VANDENABEELE *et al.*, 1995). Die Bindung proinflammatorischer Cytokine, wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , oder anderer Liganden bewirkt eine Oligomerisierung der TNFRs, woraufhin cytoplasmatische Proteine an die intrazelluläre Domäne der Rezeptoren binden können. Die intrazelluläre Domäne des TNFR1 und des Fas-Rezeptors besitzt eine Death Domain, die für die Induktion von Apoptose essentiell ist. Die TNFR1 Death Domain bindet das TNFR-assoziierte Death Domain (TRADD) Protein, welches sich wiederum an das Fas-assoziierte Death Domain (FADD) Protein anlagern kann. FADD kann auch direkt an den Fas-Rezeptor binden. TRADD bindet über seine TRAF-Interaktionsdomäne des weiteren den TNFR-assoziierten Faktor 2 (TRAF2) und koppelt diesen mit TNFR1. TNFR2 bindet dagegen TRAF2 direkt (ICHIJO, 1999; KYRIAKIS, 1999).

Bislang sind 6 Mitglieder der TRAF-Familie bekannt, die alle übereinstimmend eine konservierte C-terminale TRAF-Domäne besitzen, welche für eine Interaktion mit der intrazellulären Domäne der TNFRs benötigt wird (HU *et al.*, 1994). TRAFs verfügen über keine feststellbare katalytische Aktivität und fungieren demnach als Adapterproteine. TRAF2,

TRAF5 und TRAF6 können JNK-Signalwege (und p38 MAPK-Signalwege) aktivieren. Vermutlich überbrücken die MAPKKKs ASK1 und MEKK1 die Lücke in der Kaskade zwischen TRAFs und den SAPK-Modulen. Von TRAF2 ist außerdem bekannt, dass es auch mit den beiden MAPKKKKs GCK und GCKR interagieren kann, die daraufhin MEKK1 stimulieren (ICHIJO, 1999).

Ergänzend konnte eine weitere JNK- und p38 MAPK-aktivierende Signalkomponente identifiziert werden, die über ihre Death Domain TRADD binden kann und über eine Bindung von TRADD mit TRAF2 an TNFR1 gekoppelt wird. Dabei handelt es sich um das Rezeptor-Interaktionsprotein RIP, das eine N-terminale Ser/Thr-PK-Domäne aufweist (KYRIAKIS; 1999). Der genaue Mechanismus, der nach der Assoziation von TNFR1 mit TRAF2, TRADD und RIP zu einer Stimulierung von SAPK-Modulen führt, ist noch unklar. In diesem Zusammenhang wird über eine von TNF-induzierte Ceramidproduktion (die zur Aktivierung der SAPKs führen kann) diskutiert oder eine Kopplung von TRAF2 und RIP mit der erst vor kurzem identifizierten JNK-stimulierenden MAPKKK NF- $\kappa$ B-inducing Kinase angenommen (KYRIAKIS, 1999).

Ein weiteres Adapterprotein, das nach Aktivierung von TNFRs eine Stimulierung der JNK-Signalwege (und der p38 MAPK-Signalwege) vermitteln kann, ist das Fas-Adapterprotein Daxx (YANG *et al.*, 1997). Daxx kann in Folge der Oligomerisierung der Fas-Rezeptoren und einer Assoziation seinerseits mit diesen an die N-terminale Domäne von ASK1 binden und über die Stimulierung dieser SAPK-aktivierenden MAPKKK einen Signaltransduktionsprozess auslösen, der letztendlich zur Apoptose der Zelle führt (ICHIJO *et al.*, 1999). Eine Aktivierung der SAPK-Module im Verlauf der durch Fas induzierten apoptotischen Signalkaskade kann alternativ auch über eine durch FADD stimulierte Aktivierung der Caspase-8 verlaufen. Diese Caspase spaltet daraufhin eine Reihe von Signalkomponenten, u. a. auch die den JNK- sowie p38 MAPK-Modulen vorangeschalteten MAPKKKKs PAK2C und MST1, die dadurch aktiviert werden (ICHIJO *et al.*, 1999).

## 1.5.2 Die Subfamilie der SAPK2/p38 MAPK

### 1.5.2.1 Entdeckung und Charakterisierung der SAPK2/p38 MAPK-Mitglieder

Eine Isolierung von Säugerhomologen des High Osmolarity Glycerol 1 (HOG1)-Proteins, eine YSAPK aus *S. cerevisiae*, die durch Hyperosmose aktiviert wird (s. Kap. 1.5.4), erfolgte unabhängig voneinander durch unterschiedliche Strategien.

HAN *et al.* (1994) entdeckte in Makrophagen von Mäusen ein 38 kD großes Polypeptid, das in Folge einer Exposition der Zellen mit LPS an Tyrosin-Resten phosphoryliert wird. Das zugehörige Gen zeigte bezüglich der daraus abgeleiteten AS-Sequenz eine hohe Homologie zu HOG1. Analog zu dieser YSAPK wies die als p38 MAPK bezeichnete PK ein TGY-Motiv in der Subdomäne VIII auf. In weiterer Übereinstimmung mit HOG1 wird diese SAPK durch Hyperosmose in Makrophagen phosphoryliert.

LPS, ein Endotoxin aus der Zellwand gramnegativer Bakterien, induziert in Makrophagen sowie in anderen Zelltypen die Synthese proinflammatorischer Cytokine, wie z. B. TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  (s. Kap. 1.5.3.4/5). Cytokin-suppressive antiinflammatorische Wirkstoffe (CSAIDs) aus der Klasse der Pyridinylimidazole wie SB203580 agieren als Inhibitoren der LPS-stimulierten Cytokinfreisetzung (LEE *et al.*, 1994). In diesem Zusammenhang konnten die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoformen der p38 MAPKs als CSAID-bindende Proteine (CSBPs) identifiziert werden. Durch die Bindung der Pyridinylimidazole wird die Kinaseaktivität dieser Isoformen spontan inhibiert. Aufgrund der Korrelation zwischen CSAID-vermittelter Hemmung der TNF $\alpha$ -Synthese und der p38 MAPK-Aktivität repräsentieren die beiden SAPKs essentielle Vermittler der LPS-induzierten Cytokinsynthese. Diese Tatsache macht sie zu bedeutenden Zielen in der Entwicklung neuartiger antiinflammatorischer Wirkstoffe (LEE *et al.*, 1994).

Eine weitere Studie, die zur Entdeckung der p38 MAPKs beitrug, beschäftigte sich mit der Regulation der kleinen Hitzeschockproteine HSP25/HSP27, deren *in vivo* Phosphorylierung eine wichtige und charakteristische Konsequenz in der zellulären Reaktion auf proinflammatorische Cytokine, Wachstumsfaktoren oder physiologischen Stress ist. Als erste Kinase, die HSP25/HSP27 *in vitro* an regulatorischen Stellen phosphorylieren kann, wurde MAPKAPK2 aus Skelettmuskeln von Kaninchen isoliert (STOKOE *et al.*, 1992b). Diese Kinase kann durch Ser/Thr-Phosphorylierung aktiviert und durch die Phosphatase PP2A inhibiert werden. Anhand von Immunpräzipitierungen mit einem p38 MAPK-Mitglied aus *Xenopus laevis* konnte diese SAPK als die aktivierende Kinase von HSP25/HSP27 nach Stress- und IL-1 $\beta$ -Stimulierung identifiziert werden (FRESHNEY *et al.*, 1994; ROUSE *et al.*, 1994).

Allen Mitgliedern der SAPK2/p38 MAPK-Subfamilie ist ein TGY-Motiv in der Subdomäne VIII gemeinsam (LEWIS *et al.*, 1998; WIDMANN *et al.*, 1999). Mittlerweile sind 4 Gene der p38 MAPKs bekannt. Sie kodieren für folgende Proteine: [1] p38 $\alpha$ /SAPK2a/CSBP2/p38/RK,

[2] p38 $\beta$ /SAPK2b/CSBP1, [3] p38 $\gamma$ /SAPK3/ERK6 und [4] p38 $\delta$ /SAPK4 (s. Abb. 1.10) (FRESHNEY *et al.*, 1994; HAN *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 1994; ROUSE *et al.*, 1994; JIANG *et al.*, 1996; LECHNER *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1996; CUENDA *et al.*, 1997; GOEDERT *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 1997). Eine 5. Isoform (p38 $\beta$ 2/p38-2) konnte durch STEIN *et al.* (1997) isoliert werden (s. Abb. 1.10). Diese p38 MAPK wird vorwiegend in Herz- und Skelettmuskeln sowie im Gehirn exprimiert und unterscheidet sich von der ihr am ähnlichsten p38 $\beta$ -Isoform hauptsächlich durch den Verlust der für die  $\beta$ -Isoform typischen Insertion aus 8 AS-Resten im Anfang der Subdomäne VIa. Von der p38 $\alpha$ -Isoform existiert noch eine weitere Spleißvariante (Mxi2) mit einem verkürzten C-Terminus (ZERVOS *et al.*, 1995). Die p38 $\gamma$ -Isoform zeichnet sich durch eine vorwiegend auf Skelettmuskeln beschränkte Expression aus. Die restlichen Mitglieder dieser Subfamilie der MAPKs werden mehr oder weniger ubiquitär exprimiert (HERLAAR und BROWN, 1999).

Die SAPK2/p38 MAPK-Subfamilie wird aufgrund der unterschiedlichen Sensitivität ihrer Mitglieder gegenüber CSAIDs aus der Klasse der Pyridinylimidazole und der Fähigkeit, durch bestimmte Stimuli aktiviert zu werden (s. Abb. 1.10), in 2 Klassen eingeteilt. Dabei erfolgt die Gegenüberstellung der p38-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$  sowie  $\beta$ 2 zu denen von  $\gamma$  und  $\delta$  (HERLAAR und BROWN, 1999; TIBBLES und WOODGETT, 1999).

CSAIDs wie SB203580 können selektiv die p38 $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\beta$ 2-Isoformen inhibieren. Ihre hemmende Wirkung beruht auf der kompetitiven Bindung der ATP-Tasche der p38 MAPKs. Strukturelle Veränderungen in dieser ATP-bindenden Tasche können die inhibitorische Effizienz von SB203580 deutlich beeinflussen. Lediglich AS mit kleinen Seitenketten in der Position 106 (wie Threonin bei p38 $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\beta$ 2) lassen eine Bindetasche entstehen, in die der Fluorophenylring der Pyridinylimidazolverbindung hineinpasst. Sperrige AS-Reste in dieser Position (wie Methionin bei p38 $\gamma$  und p38 $\delta$ ) reduzieren dagegen drastisch die inhibitorische Wirkung (EYERS *et al.*, 1998; GUM *et al.*, 1998).

### 1.5.2.2 Aktivierung und Substrate der p38 MAPKs

Ähnlich wie JNKs werden p38 MAPKs durch Zellstress-auslösende Stimuli (UV- und ionisierende Strahlung, oxidativer Stress, Hitzeschock, Hyperosmose), Translationsinhibitoren (Anisomycin), Ceramide, LPS sowie durch Bindung proinflammatorischer Cytokine an ihre Rezeptoren (s. Kap. 1.5.1.4) aktiviert. Sie lassen sich in weiterer Übereinstimmung mit den JNKs weniger effektiv durch mitogene Signale stimulieren. Diese werden über Ras auf einem Raf-MEK-ERK-unabhängigen Signalweg vermittelt (s. Kap. 1.5.1.2/3) (KYRIAKIS und AVRUCH, 1996; LEWIS *et al.*, 1998; HERLAAR und BROWN, 1999; ICHIJO, 1999; KYRIAKIS, 1999; TIBBLES und WOODGETT, 1999; WIDMANN *et al.*, 1999; ONO und HAN, 2000). Die verschiedenen p38-Isoformen unterscheiden sich dabei in der Präferenz

ihrer aktivierenden Signale. So werden die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\beta$ 2-Isoformen vorwiegend durch die gleichen Stimuli wie die JNKs aktiviert, während p38 $\gamma$  und p38 $\delta$  bevorzugt durch Hyperosmose, Phorbolster, TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  stimuliert werden (s. Abb. 1.10) (HERLAAR und BROWN, 1999).

p38	Synonyme	MAPKKs	Stimuli	Substrate
p38 $\alpha$	SAPK2a, CSBP2, p38, RK	MEK6, MKK3, MKK4, MKK6, MKK6b	Stress, Anisomycin, LPS, IL-1 $\beta$ , IL-3, TNF $\alpha$ , CD40L	MAPKAPK2 und 3, PRAK, MNKs, MSKs, ATF-2, CHOP, Elk-1, MEF-2C, SAP-1a
p38 $\beta$	SAPK2b, CSBP1	MKK6b	Stress, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$	MAPKAPK2 und 3, ATF-2, Elk-1
p38 $\beta$ 2	p38-2	MEK6	Stress, Anisomycin, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ,	MAPKAPK2 und 3, PRAK, ATF-2, SAP-1a
p38 $\gamma$	SAPK3, ERK6	MKK3, MKK6	Hyperosmose, IL-1 $\beta$ , Phorbolster, TNF $\alpha$	ATF-2, Elk-1, SAP-1a
p38 $\delta$	SAPK4	MKK3, MKK6	Hyperosmose, IL-1 $\beta$ Phorbolster, TNF $\alpha$	ATF-2, Elk-1, SAP-1a

**Abb. 1.10:**

Tabellarische Übersicht der diversen p38-Isoformen. Angegeben sind auch ihre alternativen Bezeichnungen. Für jede Isoform sind außerdem die spezifisch bevorzugten MAPKKs, Stimuli und Substrate aufgeführt.

Nach der Aktivierung der p38 MAPKs durch eine Dualphosphorylierung im TGY-Motiv wird eine Homodimerisierung ihrerseits begünstigt (KHOKLATCHEV *et al.*, 1998), woraufhin eine Translokation in den Zellkern erfolgt, in dem die meisten ihrer Substrate lokalisiert sind (COBB, 1999).

Zu den direkten Substraten der p38 MAPKs zählen im Unterschied zu den JNKs nicht nur Transkriptionsfaktoren sondern auch einige PKs (detaillierte Übersicht s. Abb. 1.10 und 1.12), die aber lediglich durch die p38-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\beta$ 2 an regulatorischen Positionen phosphoryliert und demzufolge aktiviert werden (HERLAAR und BROWN, 1999; KYRIAKIS, 1999). Nach ihrer Aktivierung können sie im Chromatin enthaltende Proteine, wie das Histonprotein H3 oder HMG-14, die kleinen Hitzeschockproteine HSP25/HSP27 und den Transkriptionsfaktor CREB phosphorylieren und stimulieren (THOMSON *et al.*, 1999).

Zu den ausschließlich durch p38 MAPKs aktivierten PKs gehören MAPKAPK2, MAPKAPK3 und PRAK/MAPKAPK5, während MNK, MSK sowie RSK-B auch von ERKs stimuliert werden können (s. Abb. 1.10 und 1.12) und dadurch in der Lage sind sowohl mitogene als auch durch Stress induzierte Signale konvergent auf gemeinsame Substrate der Zelle zu übertragen (STOKOE *et al.*, 1992a und 1992b; ROUSE *et al.*, 1994; LUDWIG *et al.*, 1996; MCLAUGHLIN *et al.*, 1996; FUKUNAGA und HUNTER, 1997; WASKIEWICZ *et al.*, 1997; DEAK *et al.*, 1998; LEWIS *et al.*, 1998; NI *et al.*, 1998; PIERRAT *et al.*, 1998; THOMSON, 1999).

MAPKAPK2 (ROUSE *et al.*, 1994) und MAPKAPK3 (MCLAUGHLIN *et al.*, 1996), die bezüglich ihrer AS-Sequenz zu 75 % identisch sind und ähnliche Substratspezifitäten besitzen (CLIFTON *et al.*, 1996), können durch die gleichen Agonisten wie p38 MAPKs aktiviert und mit SB203580 (s. Kap. 1.5.2.1) inhibiert werden. Aufgrund dieser Zusammenhänge konnten beide MAPKAPKs als p38-spezifisch regulierte PKs identifiziert werden (CUENDA *et al.*, 1997). Nach der Stimulierung durch p38 MAPKs können sie ihrerseits HSP25/HSP27 an regulatorischen Stellen phosphorylieren und aktivieren (s. Abb. 1.12) (ENGEL *et al.*, 1995a und 1995b; CLIFTON *et al.*, 1996; MCLAUGHLIN *et al.*, 1996; CUENDA *et al.*, 1997; LEWIS *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung von HSP27, scheint die Polymerisation von Aktin zu steigern und ermöglicht auf diese Weise vermutlich, das durch den Zellstress zerstörte Mikrofilamentnetzwerk der Zelle zu reparieren und neu zu organisieren (LAVOIE *et al.*, 1995; GUAY *et al.*, 1997). Aufgrund dessen können MAPKAPK2 und MAPKAPK3 als potentielle Regulatoren der cytoskelettalen Organisation angesehen werden. Beide MAPKAPs stimulieren außerdem noch das cAMP Responsive Element (CRE) Binding Protein (CREB) und das CREB-bindende Protein (CBP) auf einem direkten und/oder indirekten Weg (s. Abb. 1.12) (NAKAJIMA *et al.*, 1996; TAN *et al.*, 1996; XING *et al.*, 1996 und 1998). Das an Ser133 phosphorylierte CREB ist dann in der Lage, an CREs in Promotoren CRE-kontrollierter Gene (z. B. *c-Fos*) zu binden und deren Transkription zu induzieren (CUENDA *et al.*, 1997). Eine weitere wichtige physiologische Funktion der im Zellkern lokalisierten und nach Stimulierung durch p38 MAPKs in das Cytoplasma diffundierenden MAPKAPK2 könnte der Koexport ihrer Aktivator kinase sein (s. Abb. 1.12). Die ebenfalls nur durch p38 MAPKs aktivierbare PRAK konnte durch NEW *et al.* (1998) aus humanen Zellen isoliert werden. Das Homolog der Maus wird als MAPKAPK5 (NI *et al.*, 1998) bezeichnet. Diese MAPKAPK-homologe Kinase ist imstande, HSP27 *in vitro* und *in vivo* an funktionalen Stellen zu phosphorylieren (s. Abb. 1.12) (NEW *et al.*, 1998). Weitere Substrate von ihr wurden noch nicht identifiziert.

Von den sowohl über ERK- als auch durch p38 MAPK-Signalwege stimulierten PKs MNK (FUKUNAGA und HUNTER, 1997; WASKIEWICZ *et al.*, 1997) und MSK (DEAK *et al.*, 1998) existieren jeweils 2 Isoformen (MNK1,2 und MSK-1,-2). MNKs können nach ihrer Stimulierung den eukaryotischen Initiationsfaktor 4e (eIF4e) phosphorylieren und sind

demnach an der Regulation der Translation beteiligt (s. Abb. **1.12**) (WASKIEWICZ *et al.*, 1997).

Die MSKs besitzen analog zu der MAPKAPK1 zwei Kinase Domänen und sind im Zellkern lokalisiert (VIK und RYDER, 1997; DALBY *et al.*, 1998). Im Gegensatz zur MAPKAPK2, scheinen sie dort auch nach ihrer Aktivierung zu verbleiben. Daher sind diese PKs für die Phosphorylierung einiger im Nukleus lokalisierter Substrate verantwortlich. So stellen sie bei einer Reihe von Zelltypen nach verschiedenen Stimuli die vermutlich wichtigste CREB-Kinase dar (s. Abb. **1.12**). MSKs sind ferner effiziente Kinasen von H3 und HMG-14 (THOMSON *et al.*, 1999). In Folge ihrer Phosphorylierung können diese Chromatin-assoziierten Proteine Modifizierungen in der Chromatinstruktur bewirken, die bei sog. „immediate-early“ Geninduktionen eine wichtige Rolle spielen (THOMSON *et al.*, 1999).

Die von den p38 MAPKs aktivierten Transkriptionsfaktoren sind ATF-2, CHOP/GADD153, Elk-1, Max-Myc, MEF-2C, SAP-1a und STAT (s. Abb. **1.10** und **1.12**) (CUENDA *et al.*, 1997; LEWIS *et al.*, 1998; KYRIAKIS, 1999; THOMSON *et al.*, 1999; TIBBLES und WOODGETT, 1999; WIDMANN *et al.*, 1999; ONO und HAN, 2000). Die einzelnen p38-Isoformen unterscheiden sich durchaus in der Präferenz der Aktivierung ihrer diversen Transkriptionsfaktoren (s. Abb. **1.10**) (HERLAAR und BROWN, 1999). Außerdem können die verschiedenen Isoformen die gemeinsam aktivierten Transkriptionsfaktoren an unterschiedlichen Stellen phosphorylieren (HERLAAR und BROWN, 1999).

ATF-2 wird durch p38 MAPKs (wie durch JNKs) an Threonin-Resten der N-terminalen aktivierenden Domäne phosphoryliert und auf diese Weise in seiner transkriptionalen Aktivität stimuliert. Dadurch ist dieses Protein, das wie c-Fos und c-Jun zur bZIP-Klasse der Transkriptionsfaktoren (s. Kap. **1.5.1.2**) gehört, in der Lage, nach Dimerisierung AP-1 kontrollierte Gene zu aktivieren (WIDMANN *et al.*, 1999). Als Konsequenz dessen wird z. B. c-Jun verstärkt exprimiert. Der Promotor des *c-Jun*-Gens besitzt jedoch nicht nur AP-1 sondern auch MEF-2 Bindestellen und kann somit auch über die von p38 MAPKs vermittelte Phosphorylierung des myocytes enhancer factor-2C (MEF-2C) Proteins aktiviert werden (THOMSON *et al.*, 1999).

Weitere Transkriptionsfaktoren, die von p38 MAPKs über eine Phosphorylierung stimuliert werden, sind Elk-1 und SAP-1a. Diese Mitglieder der Ternary Complex Factor (TCF)-Familie können daraufhin mit SRF dimerisieren und sind dadurch in der Lage, an SREs von Promotoren SRE-kontrollierter Gene zu binden (THOMSON *et al.*, 1999). Da der c-Fos-Promotor neben dem CRE und dem SIS-inducible Element (SIE) auch ein SRE aufweist (BUCKLE *et al.*, 1995), kann eine Expression von c-Fos durch p38 MAPK-Signalwege über eine Aktivierung von Elk-1 und SAP-1a induziert werden.

Der Transkriptionsfaktor CHOP, auch Growth Arrest and DNA Damage Transcription Factor 153 (GADD153) genannt, ist ein Mitglied der C/EBP-Familie der Transkriptionsfaktoren, die

von p38 MAPKs an Ser78 und Ser81 phosphoryliert und in ihrer Transkriptionsaktivität gesteigert werden (WANG und RON, 1996).

Max bindet an Mxi2, wodurch dieser Transkriptionsfaktor phosphoryliert und nachfolgend mit dem ERK-Substrat c-Myc heterodimerisieren kann (ZERVOS *et al.*, 1995). Dadurch stellt diese Dimerisierung einen weiteren Konvergenzpunkt zwischen den p38 MAPK- und ERK-Signalkaskaden dar.

Neben den Transkriptionsfaktoren und PKs können p38 MAPKs auch noch das Schrittmacherenzym des Arachidonsäure-freisetzenden Synthesewegs, die PLA<sub>2</sub> (s. Abb. 1.12), phosphorylieren und somit regulatorisch in die Prostaglandinsynthese eingreifen (KRAMER *et al.*, 1996).

### 1.5.2.3 Komponenten der p38 MAPK-Signalwege

Die Aktivierung der p38 MAPKs (detaillierte Darstellung der Signalkomponenten s. Abb. 1.10, 1.11 und 1.12) über eine Dualphosphorylierung ihres TGY-Motivs in der Subdomäne VIII wird katalysiert durch die folgenden 5 MAPKKs: MEK6, MKK3/SAPKK2, MKK4, MKK6/SAPKK3 und MKK6b (HERLAAR und BROWN, 1999). Bis auf die JNK-aktivierende MKK4, die zumindest *in vitro* auch die p38 $\alpha$ -Isoform phosphorylieren kann (SANCHEZ *et al.*, 1994; DÉRIJARD *et al.*, 1995; LIN *et al.*, 1995; TOURNIER *et al.*, 1997), sind die restlichen MAPKKs p38-spezifisch, wobei sie unterschiedliche p38-Isoformen bevorzugt stimulieren (s. Abb. 1.10) (HERLAAR und BROWN, 1999). MKK6 scheint unter diesem Aspekt jedoch die dominierende MAPKK zu sein, da sie bis auf p38 $\beta$ 2 jede p38-Isoform unter allen bekannten p38-aktivierenden Stimuli phosphorylieren kann (CUENDA *et al.*, 1996; HAN *et al.*, 1996; MORIGUCHI *et al.*, 1996a; RAINGEAUD *et al.*, 1996; STEIN *et al.*, 1996) und im Vergleich zur verwandten MKK3 eine wesentlich höhere Basalaktivität aufweist (DÉRIJARD *et al.*, 1995; RAINGEAUD *et al.*, 1996). MKK3 kann die p38-Isoformen  $\alpha$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  phosphorylieren, während p38 $\beta$  vorwiegend durch MKK6b (JIANG *et al.*, 1996) und p38 $\beta$ 2 hauptsächlich über MEK6 (STEIN *et al.*, 1997) stimuliert wird.

Die Aktivität der p38 MAPKs wird über eine Dephosphorylierung ihres TGY-Motivs inhibiert, die durch dualspezifische PPs, wie MKP-1, MKP-2 und M3/6-Phosphatase, oder durch die p38-spezifische PAC1 katalysiert wird (CHU *et al.*, 1996; MUDA *et al.*, 1996 und 1997).

Bis heute wurden 7 verschiedene p38-aktivierende MAPKKs identifiziert (s. Abb. 1.11 und 1.12), wobei sich ASK1, MTK1 und TAK1 als die stärksten Aktivatoren erwiesen. ASK2, MLK2, MLK3 sowie DLK können jedoch auch MKK3 und MKK6 phosphorylieren (LEWIS *et al.*, 1998; ICHIJO, 1999; KYRIAKIS, 1999; TIBBLES und WOODGETT, 1999; WIDMANN *et al.*, 1999; ONO und HAN, 2000). Da diese MAPKKs auch MKK4 und

MKK7 phosphorylieren (s. Kap. 1.5.1.3), sind sie zudem in der Lage, JNKs zu aktivieren. MAPKKKs, die ausschließlich JNK- oder p38 MAPK-Signaltransduktionswege stimulieren können, sind noch nicht bekannt (ICHIJO, 1999).

MAPKKKs	MAPKKKKs
ASK1/MAPKKK5, ASK2/MAPKKK6, DLK/MUK/ZPK, MLK2/MST, MLK3/SPRK1, MTK1/MEKK4, TAK1	MST1/Krs-2, PAK1, PAK2, PAK3

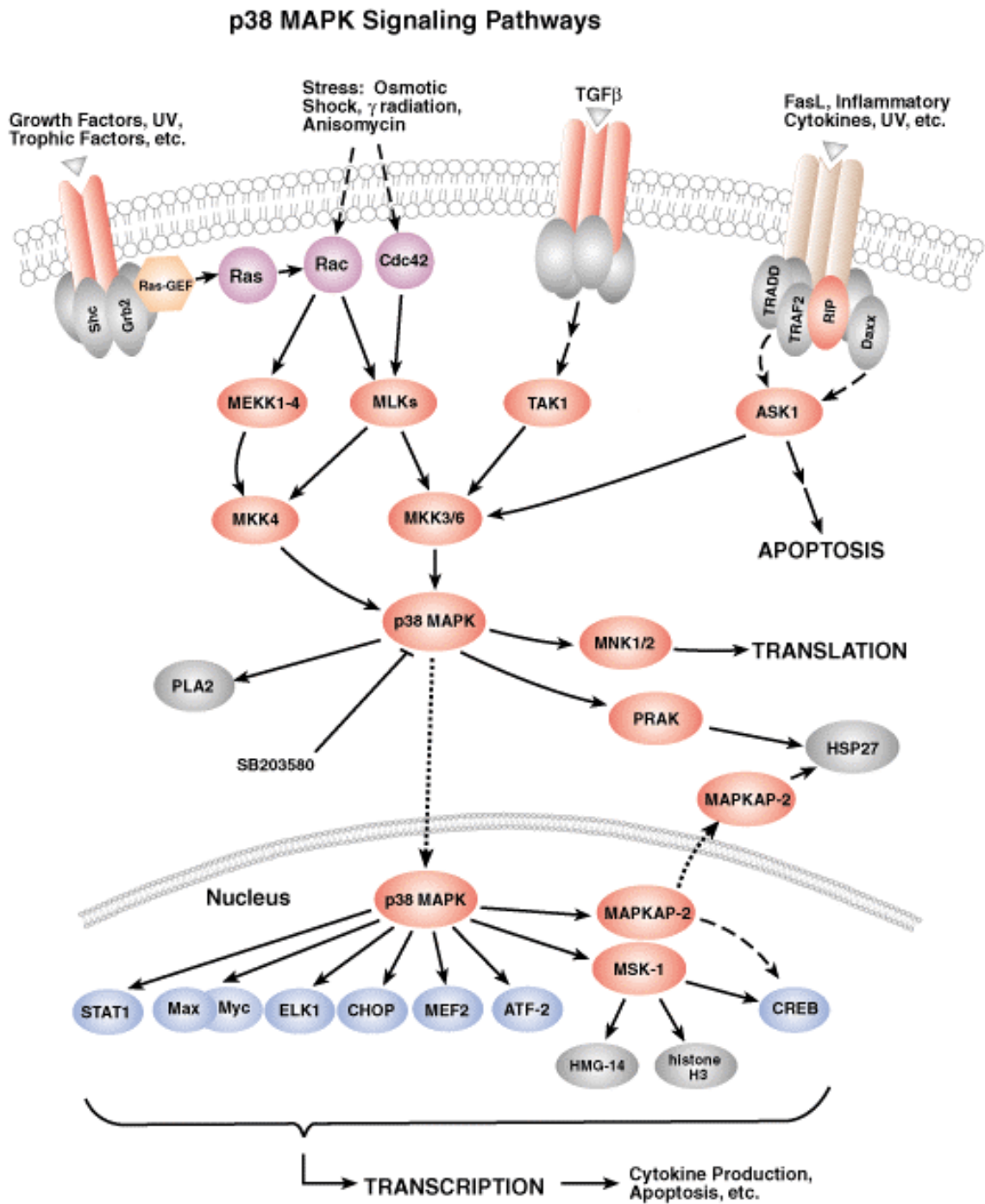
**Abb. 1.11:**

*Tabellarische Übersicht der p38-aktivierenden MAPKKKs und MAPKKKKs. Die PKs sind farblich unterschiedlich dargestellt, je nachdem ob sie ein CRIB-Motiv besitzen oder zu den SPS1-Familienmitgliedern gehören.*

Die zu den STE20-homologen PKs zählenden MAPKKKKs PAK1, PAK2 und PAK3 (s. Kap. 1.5.1.3) vermögen ebenfalls, nicht nur JNK- sondern auch p38 MAPK-Signalwege zu aktivieren (s. Abb. 1.11 und 1.12) (MANSER *et al.*, 1994; KNAUS *et al.*, 1995; ABO, 1998). Viele der p38-aktivierenden MAPKKKs und die PAKs besitzen neben anderen regulatorischen Domänen auch ein CRIB-Motiv (s. Kap. 1.5.1.3 und Abb. 1.11) und können daher durch die von Cdc42 und Rac1 vermittelten Signale (Stress, osmotischer Schock,  $\gamma$ -Bestrahlung oder Anisomycin) stimuliert werden (s. Kap. 1.5.1.3). Ebenso wie die JNKs werden die p38 MAPKs in seltenen Fällen auch durch Ras auf einer Raf-MEK-ERK-unabhängigen Kaskade über Rac1 aktiviert (s. Kap. 1.5.1.3) (KYRIAKIS und AVRUCH, 1996; KYRIAKIS, 1999).

Die p38 MAPK-Module können auch unabhängig von den GTPasen durch die SPS1-homologe MAPKKKK MST1 stimuliert werden (s. Abb. 1.11) (CREASY und CHERNOFF, 1995; KYRIAKIS und AVRUCH, 1996; TAYLOR *et al.*, 1996, KYRIAKIS, 1999, ICHIJO, 1999).

Wie schon im Kap. 1.5.1.3 aufgeführt, sind über die genauen GTPasen-aktivierenden Mechanismen nach Stress-vermittelnden Stimuli noch relativ wenige Details bekannt. Lediglich die mechanistischen Abläufe, die nach Bindung von Liganden an Rezeptoren der TNF $\alpha$ - oder IL-1 $\beta$ -Familie zu einer Stimulierung von p38 MAPK-Modulen führen, sind detailliert charakterisiert (s. Kap. 1.5.1.4). Auch die Apoptose-vermittelnden Signaltransduktionsprozesse, die durch eine Assoziation zwischen TNFR1 oder Fas-Rezeptor und ihren Liganden ausgelöst werden und zu einer Aktivierung von p38 MAPKs führen, sind exakt beschrieben worden (s. Kap. 1.5.1.4).



**Abb. 1.12:**

Die p38 MAPK-Signaltransduktionskaskaden. Dargestellt sind die aktivierenden Stimuli der p38 MAPK-Kaskaden und die Komponenten, die diese Signale innerhalb der Zelle bis in den Zellkern weiterleiten. Die Pfeile repräsentieren die Aktivierung der entsprechenden Signalkomponenten; unterbrochene Pfeile stehen für eine Aktivierung über einen noch unbekanntem Mechanismus/Weg; gepunktete Pfeile dokumentieren eine Translokation der Signalelemente in den Nukleus oder in das Cytoplasma; stumpf endende Pfeile repräsentieren eine Inhibition der Signalelemente.

Quelle: [www.CELLSIGNAL.com](http://www.CELLSIGNAL.com)

### 1.5.3 Biologische Funktionen der SAPKs

#### 1.5.3.1 Beteiligung an apoptotischen Prozessen

Die genauen Funktionen der SAPK-Mitglieder in der Regulation der Apoptose, wie auch in der Steuerung der übrigen biologischen Prozesse (s. Kap. 1.5.3.2-5), werden erst beginnend aufgeklärt.

Die SAPKs werden durch viele Apoptose-auslösende Stimuli, wie Wachstumsfaktorentzug, hyperosmotischer Stress, UV- oder  $\gamma$ -Bestrahlung, sowie durch Bindung von Fas an die Zelloberfläche aktiviert. Konkrete Hinweise auf eine Beteiligung der SAPKs im Apoptoseprozess stammen vor allem aus Studien mit neuronal-differenzierten PC12 Zellen, von denen einige nach NGF-Entzug Apoptose eingehen. Die Expression von dominanten Inhibitoren der JNK- und p38 MAPK-Signalwege (Kinase-inaktive MKK4 und MKK3) konnte unter diesen Bedingungen Apoptose erfolgreich unterbinden, während konstitutiv aktive MKK4 und MKK3 in Gegenwart von Serum Apoptose unterstützten (XIA *et al.*, 1995). Die Stimulierung von ERK1/2-Kaskaden durch konstitutiv aktive MEK verhinderte dagegen den programmierten Zelltod nach Serumentzug (XIA *et al.*, 1995). Diese Erkenntnisse lassen zudem vermuten, dass die Balance zwischen der Stärke der ERK- und SAPK-Signale ausschlaggebend sein könnte für die Entscheidung der Zelle, entweder ihr Überleben zu unterstützen oder Apoptose einzugehen (XIA *et al.*, 1995). Weitere Fakten, die eine Aktivierung der SAPKs im Verlauf der Apoptose belegen, wurden auch durch den Einsatz von Caspaseinhibitoren gewonnen. Diese können eine Aktivierung der SAPKs verhindern (CAHILL *et al.*, 1996; JUO *et al.*, 1997; TOYOSHIMA *et al.*, 1997). Außerdem wurde nachgewiesen, dass eine Bindung von Liganden an Fas-Rezeptoren SAPKs stimulieren (s. Kap. 1.5.1.4 und 1.5.2.3) und der dadurch ausgelöste apoptotische Prozess von SB203580 unterdrückt werden kann (GOILLOT *et al.*, 1997). Der p38-spezifische Inhibitor SB203580 (s. Kap. 1.5.2.1) kann ebenfalls Glutamat-induzierte Apoptose in Neuronen verhindern (KAWASAKI *et al.*, 1997). Den womöglich schlüssigsten Beleg der Notwendigkeit einer Aktivierung von JNKs und Phosphorylierung von c-Jun im Verlauf einer neuronalen Apoptose wurde durch die Beobachtung erbracht, dass in *JNK3*-defizienten Mäusen hippocampale Neuronen in einem wesentlich geringeren Ausmaß durch Kainat-induzierte Apoptose absterben als vergleichbare Wildtyp-Individuen (YANG *et al.*, 1997).

Im Kontrast zu diesen Befunden, die eine pro-apoptotische Wirkung der SAPK-Signalwege demonstrieren, gibt es jedoch eine wachsende Zahl an Untersuchungen die belegen, dass die Aktivierung von SAPKs vor einer durch Stress-ausgelösten Apoptose schützen. Der eindeutigste Beweis für eine anti-apoptotische Funktion von c-Jun stammt aus Experimenten mit *c-Jun*-defizienten Fibroblasten, die im Vergleich zu den Wildtypzellen nach UV-Bestrahlung eine wesentlich höhere Sterberate aufwiesen (WISDOM *et al.*, 1999). Versuche

mit BAF3 prä-B Zellen, die nach IL-3-Entzug Apoptose eingehen und bei denen nach Wiederaufnahme von IL-3 eine JNK-Aktivierung feststellbar war (SMITH *et al.*, 1997), stützen diese Beobachtung.

Diese widersprüchlichen Belege für sowohl pro- als auch anti-apoptotische Wirkungen von SAPK-Signalkaskaden können zur Zeit noch nicht gänzlich erklärt werden. Sicherlich spielt bei diesen konträren Entscheidungen der Zelle die Art des Stimulus sowie der Zelltyp eine wesentliche Rolle (KYRIAKIS, 1999; WIDMANN *et al.*, 1999). Die Stimulierung der SAPKs während der Apoptose induziert jedenfalls eine verstärkte Expression von Proteinen, die für den Fortgang des programmierten Zelltods notwendig sind. Dies scheint jedoch eher ein begleitender und kein auslösender Faktor im Verlauf der Apoptose zu sein (TIBBLES und WOODGETT, 1999).

### 1.5.3.2 Kontrolle des Zellzyklusses

Auch in der Kontrolle des Zellzyklusses spielt die Aktivierung der SAPKs eine Rolle. Durch zahlreiche Studien konnte belegt werden, dass während einer durch Onkogene oder Wachstumsfaktoren induzierten Transformation der Zelle neben der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade auch SAPKs stimuliert werden (TIBBLES und WOODGETT, 1999). Die Aktivierung der SAPK-Signaltransduktionswege erfolgt unter diesen Umständen vermutlich durch Rac1 und Cdc42 (KYRIAKIS, 1999).

### 1.5.3.3 Steuerung der Morphogenese

Die Stimulierung der SAPK-Signalwege, scheint in zahlreichen morphogenetischen Vorgängen von essentieller Bedeutung zu sein.

In *D. melanogaster* konnte z. B. eine Beteiligung der JNK-Kaskade und des Homologs von c-Jun (DJUN) an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen nachgewiesen werden (BOHMANN *et al.*, 1994; PEVERALI *et al.*, 1996; KOCKEL *et al.*, 1997; RIESGO-ESCOVAR und HAFEN, 1997). So starben beispielsweise Fruchtfliegenmutanten in einer frühen Phase der Embryogenese, die weder DJUN noch DJNK oder das MKK7-homologe HEP exprimieren konnten (GLISE *et al.*, 1995; SLUSS *et al.*, 1996; TIBBLES und WOODGETT, 1999).

SAPK-Signalwege nehmen aber auch in der Morphogenese von Säugern eine zentrale Position ein, wie anhand von *MKK4*-defizienten Mäusen nachgewiesen werden konnte, die am 12. Tag nach der Befruchtung im Uterus starben (GANIATSAS *et al.*, 1998). In die

Entwicklung und Differenzierung des Immunsystems der Säuger sind sie ebenfalls involviert (NISHINA *et al.*, 1997; SWAT *et al.*, 1998).

#### 1.5.3.4 Induktion von Immunreaktionen

Die SAPKs besetzen zudem eine Schlüsselrolle in der Induktion spezifischer Immunantworten nach Ligation von Antigenen an T-Zell-Rezeptoren (TZR).

T-Zell-Aktivierung und die dadurch ausgelöste IL-2-Synthese über den TZR-Komplex benötigt die Kostimulation von CD28, das wiederum an B7-1 und B7-2 Antigen-präsentierende Zellen bindet. Durch die simultanen TZR- und CD28-Signale werden SAPKs synergetisch aktiviert (SU *et al.*, 1994). Dies induziert eine IL-2-Expression über eine Aktivierung des IL-2-Promotors (FARIS *et al.*, 1996). Die SAPKs regulieren ferner das IL-2-enhancer Element (HOFFMEYER *et al.*, 1998) und stabilisieren die mRNA von IL-2 in aktivierten T-Zellen (CHEN *et al.*, 1998). Die von den SAPKs vermittelte Expression von IL-2 bewirkt letztendlich eine T-Zell-Proliferation.

Eine direkte Beteiligung der p38 MAPKs an der Stimulierung der IL-2-Synthese nach TZR/CD28-Koaktivierung konnte durch eine entweder über die Expression von dominant-negativer MKK6 oder in Folge der Zugabe von SB203580 induzierte Unterdrückung der transkriptionalen Aktivierung des IL-2-Promotors nachgewiesen werden (MATSUDA *et al.*, 1998).

Die Expression von IL-2 sowie die des IL-2-Rezeptors nach T-Zell-Aktivierung führt im Verlauf der T-Zell-Proliferation zu einer positiven Rückkopplung, denn durch die induzierte IL-2-Synthese werden erneut ERK-, JNK- und p38 MAPK-Signalwege aktiviert. Diese synergetischen Effekte fördern die T-Zell-Proliferation (CRAWLEY *et al.*, 1997). Der Prozess wird durch die Signale des cytotoxischen T-Lymphocyten Antigens 4 (CTLA-4) beendet, eines Zelloberflächenmoleküls, das im Verlauf der T-Zell-Aktivierung induziert wird. Die Ligation von CTLA-4 unterdrückt die SAPK-Stimulierung und somit die T-Zell-Proliferation sowie die IL-2-Produktion (CALVO *et al.*, 1997).

Auch in B-Zellen werden SAPKs nach Bindung von Liganden an CD40-Rezeptoren aktiviert (SAKATA *et al.*, 1995; BERBERICH *et al.*, 1996; SUTHERLAND *et al.*, 1996). In B-Zellen ist der CD40-Rezeptor in die Proliferation und das Überleben der Zellen als auch die Differenzierung von B-Gedächtnis-Zellen sowie das Mischen der Immunglobulinklassen involviert.

Im Fall der Fruchtfliege *D. melanogaster* werden DJNK, Homologe der p38 MAPKs und p38-aktivierende Kinasen (HAN *et al.*, 1998) ebenso durch das LPS-Pathogen stimuliert, wie die SAPKs in Zellen höherer Tiere (s. Kap. 1.5.2.1). Da die SAPK-Aktivierung an der Stimulierung des Immunsystems der Insekten und Säuger beteiligt ist, muss davon

ausgegangen werden, dass diese biologische Funktion der SAPKs im Verlauf der Evolution konserviert wurde.

### **1.5.3.5 Initiation von Entzündungsprozessen**

Die Signaltransduktionskaskaden der SAPKs haben neben einer Reihe weiterer Signalwege (von z. B. ERK oder NF- $\kappa$ B) auch eine herausragende Funktion in der Initiation und Propagierung von Entzündungsprozessen.

Akute Inflammation ist eine sehr facettenreiche Antwort auf eine mikrobielle Invasion oder den Verlust der Gewebeintegrität. Bakterielle Produkte wie LPS können unter diesen Gegebenheiten akute Reaktionen des Organismus auslösen und die Aktivierung von Cytokin-synthetisierenden Makrophagen bewirken (TIBBLES und WOODGETT, 1999). Konjugate von LPS-bindenden Proteinen aktivieren dabei die SAPK-Kaskade durch Ligation mit dem Zelloberflächenrezeptor CD14 (HAMBLETON *et al.*, 1996). Die Aktivierung der SAPKs ist z. B. für eine effiziente Translation der mRNA von TNF $\alpha$  nötig (SWANTEK *et al.*, 1997). Außerdem kann die TNF $\alpha$ -Synthese durch CSAIDs, die spezifisch p38 $\alpha$ - und p38 $\beta$ -Isoformen inhibieren können (s. Kap. 1.5.2.1), gehemmt werden.

Die SAPKs sind jedoch nicht nur über die von ihnen stimulierte Expression proinflammatorischer Cytokine an Entzündungsprozessen beteiligt, sondern auch durch die Aktivierung der Stickstoffmonoxid Synthetase (DA SILVA *et al.*, 1997) oder von Metallproteasen der Matrix (REUNANEN *et al.*, 1998). Ferner wird die Expression der Cyclooxygenase 2 durch SAPK-Signalwege unter diesen Umständen stimuliert, wodurch diese Signaltransduktionskaskade mit der Prostaglandinsynthese verbunden wird (XIE und HERSCHMANN, 1995 und 1996).

## **1.5.4 Die YSAPK HOG1 und osmotischer Stress**

### **1.5.4.1 Bedeutung der Osmoregulation für die Zelle**

Die Aufrechterhaltung der intrazellulären Konzentration anorganischer Ionen und die des Zellvolumens ist für die Funktion einer Zelle von essentieller Bedeutung. Sie wird realisiert durch einen selektiven, energieverbrauchenden Transport von Elektrolyten über die Plasmamembran sowie durch die metabolische Regulation des Gehalts an organischen Osmolyten im Cytoplasma (YANCEY *et al.*, 1982; STEIN, 1990). Ein Anstieg der externen Osmolarität (Hyperosmose) induziert eine Reihe physiologischer Prozesse, dazu zählen eine temporäre Unterbrechung des Zellwachstums und der -teilung, eine Zerstörung des organisierten

Aktincytoskeletts und eine vorübergehende Reduktion in der allgemeinen Genexpression (GUSTIN *et al.*, 1998). Die Zellen reagieren adaptiv auf diese Situation, indem sie eine osmoregulatorische Modulation des Wasser- und Ionenflusses über die Zellmembran vornehmen und verstärkt die Synthese von organischen Osmolyten sowie von Makromolekülschützenden Proteinen induzieren. Diese Adaption an hyperosmotische Stressbedingungen wird ausgelöst durch sensorische Komponenten und Signaltransduktionselemente, die eine Veränderung der osmotischen Stärke des extrazellulären Milieus registrieren und diese Informationen in das Zellinnere weiterleiten.

#### 1.5.4.2 Reaktion auf Hyperosmose durch HOG1 in *S. cerevisiae*

In den Zellen von *S. cerevisiae* spielt die Synthese des Osmolyts Glycerin eine zentrale Rolle in der adaptiven Reaktion auf hyperosmotische Bedingungen. BREWSTER *et al.* (1993) konnte anhand von Studien mit Osmoregulations-defekten Hefemutanten (*Osm<sup>s</sup>*) den High Osmolarity Glycerol (HOG)-Signalweg nachweisen. Diese Signaltransduktionskaskade wird durch Hyperosmose aktiviert und induziert nachfolgend u. a. die Expression Glycerinsynthetisierender Gene (GUSTIN *et al.*, 1998; KÜLTZ und BURG, 1998; LEWIS *et al.*, 1998; WIDMANN *et al.*, 1998). In Folge der verstärkten Glycerinsynthese und einer rapiden Abnahme der Glycerinpermeabilität der Plasmamembran durch Inhibition des wichtigsten Glycerintransporters FPS1 (LUYTEN *et al.*, 1995; SUTHERLAND *et al.*, 1997) kann die intrazelluläre Glycerinkonzentration bis in den molaren Bereich angehoben werden (REED *et al.*, 1987; MEIKLE *et al.*, 1988). Dadurch versucht die Zelle, die Abnahme des Zellvolumens zu reduzieren (KÜLTZ *et al.*, 1997).

Der HOG-Signalweg besteht aus einer Verbindung der beiden primären Osmosensoren SLN1 und SHO1 mit einem jeweils nachgeschalteten MAPK-Modul (zusammengesetzt aus den MAPKKs SSK2/SSK22 oder STE11, der MAPKK PBS2 und der MAPK HOG1) (detaillierte Übersicht s. Abb. 1.13) (BREWSTER *et al.*, 1993; MAEDA *et al.*, 1994 und 1995). Die Klonierung der beiden zentralen Komponenten dieses Signalwegs PBS2 und HOG1 gelang durch Versuche, den *Osm<sup>s</sup>*-Phänotyp mit genomischen DNA-Fragmenten funktional zu komplementieren (BREWSTER *et al.*, 1993). Die aus dem *HOG1*-Gen abgeleitete AS-Sequenz zeigte in einem Vergleich mit anderen Mitgliedern der MAPK-Familie die höchste Übereinstimmung zu den der SAPK1/JNK- und der SAPK2/p38 MAPK-Subfamilie sowie zu einer Reihe anderer SAPK-homologer Enzyme aus diversen Hefestämmen, die zusammen die YSAPK-Subfamilie bilden (s. Kap. 1.4.1). Basierend auf der funktionalen Komplementierung *HOG1*-defizienter Mutanten (*HOG1-Δ1*), der hohen Similarität ihrer AS-Sequenzen und dem gemeinsamen Glycin-Rest im konservierten TGY-Motiv kann die p38 MAPK als das am nächsten zu HOG1 verwandte Säugerhomolog

angesehen werden (HAN *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu den SAPKs der Tiere (s. Kap. 1.5.1.2 und 1.5.2.2) wird diese YSAPK ausschließlich durch Hyperosmose aktiviert (SCHÜLLER *et al.*, 1994).

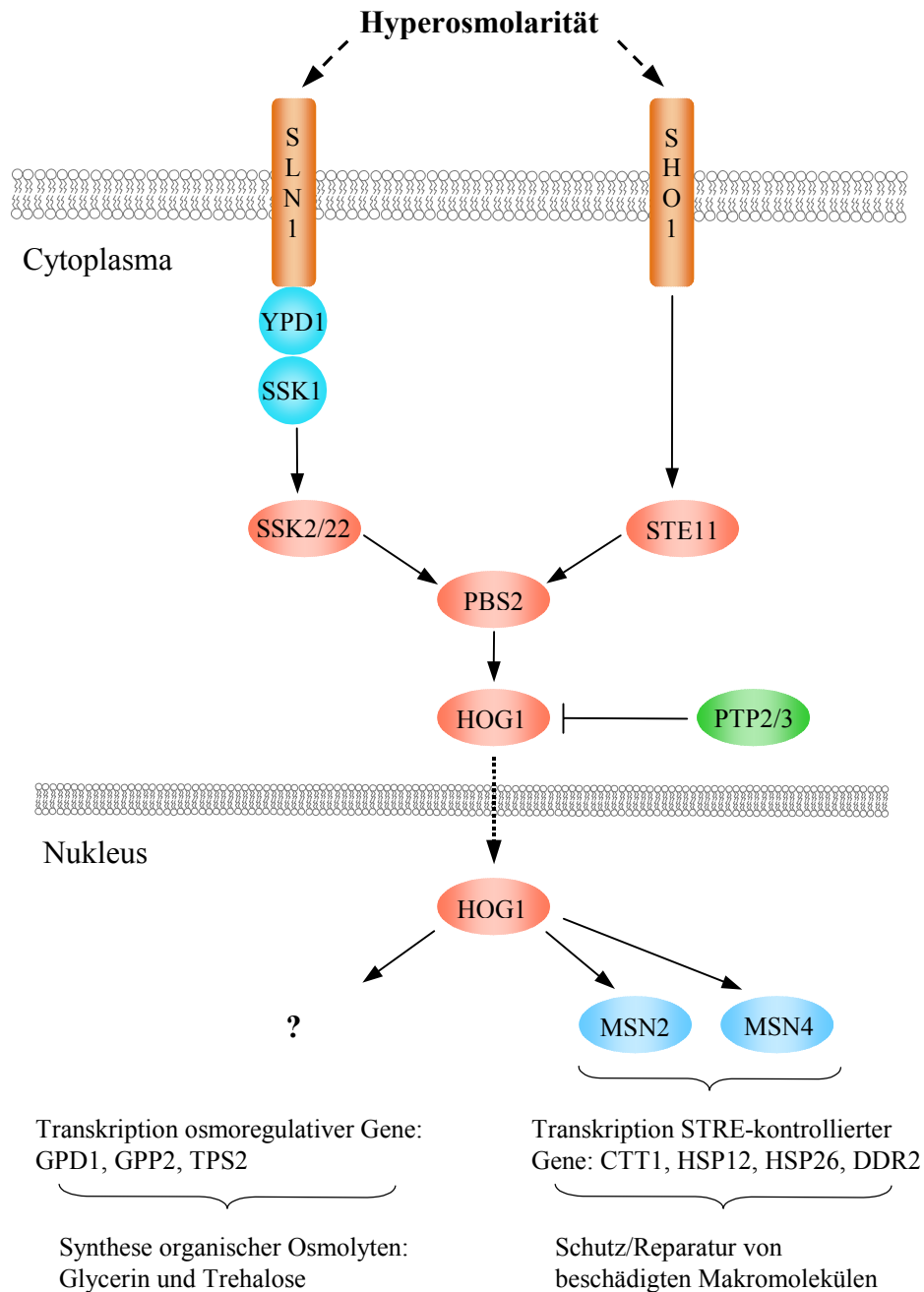
Nach der Aktivierung wird HOG1 im Nukleus akkumuliert (REISER *et al.*, 1999). Dort kann diese YSAPK die induzierbaren Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren MSN2 sowie MSN4 phosphorylieren, die daraufhin mit Stress Response Elements (STREs) von Promotoren assoziieren und demzufolge die Transkription STRE-kontrollierter Gene stimulieren (s. Abb. 1.13) (MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 1996; SCHMITT und MCENTEE, 1996; GORNER *et al.*, 1998). Zu dieser Genklasse gehören u. a. die Gene der cytosolischen Katalase T 1 (CTT1) (HARTIG und RUIS, 1986), HSP12 (PRAEKELT und MEACOCK, 1990), HSP26 (PETKO und LINDQUIST, 1986) sowie das des DNA-Damage-Responsive 2 (DDR2)-Proteins (KOBAYASHI und MCENTEE, 1990). Aufgrund der Präsenz von STREs können diese Gene neben Hyperosmose auch durch andere Stress-auslösende Stimuli (z. B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Hitzeschock) aktiviert werden (SCHÜLLER *et al.*, 1994). Sie schützen unter diesen Bedingungen Proteine und DNA, oder helfen beschädigte Makromoleküle zu reparieren (SCHÜLLER *et al.*, 1994; KÜLTZ und BURG, 1998).

Gene einer anderen Klasse, die im Kontrast zu Letzterer nur über Hyperosmose und somit ausschließlich durch HOG1 aktiviert werden, kodieren für Glycerin-synthetisierende Enzyme, wie die Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase 1 (GPD1) (ALBERTYN *et al.*, 1994) oder Glycerin-3-Phosphatase 2 (GPP2) (NORBECK *et al.*, 1996), sowie für die Trehalose-Phosphat Phosphatase 2 (TPS2) (RUIS und SCHÜLLER, 1995), die eine Bildung des Glycerin-kompatiblen Osmolyts Trehalose katalysiert (s. Abb. 1.13). Bislang konnten jedoch keine aktivierenden Transkriptionsfaktoren dieser Genklasse nachgewiesen werden.

Der HOG-Signalweg wird durch die Tyr-PPs PTP2 (GUAN *et al.*, 1992; JAMES *et al.*, 1992; OTA und VARSHAVSKY, 1992) und PTP3 (JACOBY *et al.*, 1997; WURGLER-MURPHY *et al.*, 1997) sowie durch die PP2C-homologen Ser/Thr-PPs PTC1, PTC2 und PTC3 (MAEDA *et al.*, 1993) inhibiert (s. Abb. 1.13).

#### 1.5.4.3 Komponenten des HOG-Signalwegs

Wie bereits angedeutet, aktiviert *S. cerevisiae* über die beiden primären Osmosensoren SLN1 und SHO1 bei hyperosmotischem Stress 2 Signalwege, die zu einer Phosphorylierung und Stimulierung der HOG1-spezifischen MAPKK PBS2 führen (s. Abb. 1.13) (MAEDA *et al.*, 1994 und 1995). PBS2 phosphoryliert daraufhin Threonin und Tyrosin im TGY-Motiv von HOG1, wodurch diese YSAPK aktiviert wird (BREWESTER *et al.*, 1993). Beide Osmosensoren fungieren in diesem Zusammenhang jedoch auf unterschiedliche Weise.



**Abb. 1.13:**

Der HOG-Signaltransduktionsweg von *S. cerevisiae*. Dargestellt sind die Signalkomponenten, die für die Weiterleitung des hyperosmotischen Signals verantwortlich sind. Ebenso sind die physiologischen Effekte nach Stimulierung der HOG-Kaskade aufgeführt. Die Pfeile repräsentieren eine Aktivierung der entsprechenden Signalkomponenten; der gepunktete Pfeil dokumentiert die Translokation des aktivierten HOG1 in den Nukleus; der stumpf endende Pfeil bedeutet eine Inhibition von Komponenten des Signalwegs.

Das transmembrane Protein SLN1 bildet mit dem Signalregulator SSK1 und dem beide Signalkomponenten verbindenden Protein YPD1 ein Signalsystem (s. Abb. 1.13), das analog zu dem „Zwei-Komponenten-System“ der Prokaryoten funktioniert (WURGLER-MURPHY und SAITO, 1997). Solche Systeme konnten bislang nur in Bakterien, Pilzen und Pflanzen

nachgewiesen werden (KÜLTZ und BURG, 1998). Ein typisches prokaryotisches „Zwei-Komponenten-System“ ist aus einem Sensor- und einem Signalregulormolekül aufgebaut. Das sensorische Protein besitzt dabei eine extrazelluläre Domäne sowie eine cytoplasmatische His-Kinase Domäne. Das Signalregulatorprotein verfügt dagegen über eine Empfängerdomäne sowie eine DNA-bindende Domäne und repräsentiert die cytosolische Komponente des Signalwegs. In *S. cerevisiae* findet sich ein solches System prinzipiell wieder, allerdings mit den Ergänzungen eines zwischen dem primären Osmosensor und Signalregulator vermittelnden Proteins und eines sich anschließenden MAPK-Moduls (s. Abb. 1.13) (WIDMANN *et al.*, 1999).

Der primäre Osmosensor SLN1 besteht aus einer extrazellulären Sensordomäne, einer intrazellulären His-Kinase Domäne und einer Phosphat-Empfänger Domäne. Er ist unter isoosmotischen Bedingungen aktiv. Dabei wird ein konservierter Histidin-Rest in der Kinase Domäne autophosphoryliert, woraufhin der Phosphatrest auf einen Aspartat-Rest der Empfänger Domäne eines zweiten SLN1-Moleküls transferiert wird. Von dort aus wird er auf einen Histidin-Rest des YPD1-Proteins und anschließend auf ein Aspartat-Rest der Empfänger Domäne von SSK1 übertragen. Dadurch wird der Signalregulator inaktiviert (POSAS *et al.*, 1996). Bei Hyperosmolarität dagegen wird die His-Kinase Domäne von SLN1 inhibiert, infolgedessen SSK1 nicht phosphoryliert und inaktiviert werden kann. Dadurch ist dieser Signalregulator in der Lage, die nachgeschalteten MAPKKs SSK2/SSK22 und somit das HOG1-Modul zu stimulieren (MAEDA *et al.*, 1994).

Der zweite Osmosensor SHO1 wird im Gegensatz zu SLN1 durch Hyperosmose aktiviert, woraufhin das transmembrane Protein anhand seiner intrazellulären SH3-Domäne an eine Prolin-reiche Sequenz von PBS2 assoziiert (MAEDA *et al.*, 1995). Die MAPKK kann dann als Gerüstprotein (s. Kap. 1.4.3) die weiteren Komponenten dieses HOG1-Moduls (STE11 und HOG1, s. Abb. 1.13) miteinander verbinden (POSAS und SAITO, 1997). Dadurch wird verhindert, dass die durch Hyperosmose stimulierte MAPKKs STE11 die Pheromon- und Filamentationskaskade unspezifisch aktiviert (s. Kap. 1.4.3).

Neben der Induktion osmoprotektiver Gene, scheint eine weitere Aufgabe des HOG-Signalwegs die Kontrolle des Zellzyklusses zu sein. Hyperosmose bewirkt außer den geschilderten Vorgängen auch eine Unterbrechung des zellulären Wachstums- und Teilungszyklus, die mit dem Verlust eines organisierten Aktincytoskeletts korreliert. Sowohl die Fortführung des Zyklusses im Anschluss an die G2 Phase als auch die Reorganisation des Aktinskeletts bei hyperosmotischem Stress verlaufen womöglich unter einer Kontrolle von HOG1 (GUSTIN *et al.*, 1998).

## 2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Beim Übergang von einzelligen zu mehrzelligen Organismen wurden aufgrund der wesentlich komplexeren Zell-Zell-Interaktionen in Metazoen neue Signalwege etabliert. Da Schwämme die einfachsten und ursprünglichsten multizellulären Tiere sind, eignen sie sich gut als Modellsystem zur Erforschung von Signaltransduktionsprozessen.

Die SAPKs stellen hoch konservierte zentrale Signalkomponenten dar, die durch zahlreiche Zellstress-auslösende Stimuli aktiviert werden und in vielen biologischen Prozessen eine Schlüsselposition einnehmen. Einige voran- und nachgeschaltete Elemente der SAPK-Module wurden bereits im marinen Schwamm *S. domuncula* identifiziert (GAMULIN *et al.*, 1997; KRUSE *et al.*, 1997).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung von Mitgliedern der *SAPK1/JNK*- und *SAPK2/p38 MAPK*-Subfamilie der *MAPKs* aus dem Schwamm *S. domuncula*. Diese sollten zunächst mittels degenerierter Primer aus der cDNA-Bibliothek dieser Spezies isoliert werden. Außerdem sollte die Aufklärung der Exon/Intron-Struktur ihrer Gene erfolgen. Der Vergleich ihrer Genstruktur mit der von SAPKs aus anderen Metazoen (Protostomia und Deuterostomia) sollte außerdem Hinweise auf die molekulare Evolution der *SAPK*-Gene ergeben. Durch die Verwendung von Antikörpern, die jeweils die dualphosphorylierte Form der JNK- oder p38-Proteine erkennen, sollte anhand von Western Blots herausgefunden werden, welche Zellstress-auslösenden Stimuli eine Aktivierung der SAPKs des Schwamms induzieren. Für die weitere Charakterisierung dieser SAPKs wurden auch Studien mit dem p38-spezifischen Inhibitor SB203580 und Northern Blots durchgeführt.

Es wird angenommen, dass die JNKs und p38 MAPKs der Metazoen von der einzigen SAPK der Hefe (HOG1) abstammen (CAFFREY *et al.*, 1999). Der Vergleich ihrer AS-Abfolgen bestätigt diese Vermutung (KÜLTZ, 1998; KÜLTZ und BURG, 1998). Außerdem existieren einige Studien, die belegen, dass *HOG1*-defiziente Hefestämme mit JNKs und p38 MAPKs funktional komplementiert werden können (GALCHEVA-GARGOVA *et al.*, 1994; HAN *et al.*, 1994; KUMAR *et al.*, 1995; HAN *et al.*, 1998; KAWASAKI *et al.*, 1999). Um zu untersuchen, ob auch die SAPKs des Schwamms in der Lage sind, die Funktion des HOG1-Proteins der Hefe zu übernehmen, sollten *HOG1-Δ1*-Nullmutanten mit den Schwamm-Kinasen rekombiniert werden. Durch Immunfluoreszenzmikroskopie sollte außerdem die Bestimmung der intrazellulären Lokalisation der aktivierten SAPKs in den Hefezellen erfolgen.

## 3 MATERIAL und METHODEN

### 3.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den folgenden Firmen in p.a.-Qualität bezogen: FLUKA (Buchs, CH), ICN BIOMEDICALS (Eschwege), MERCK (Darmstadt), ROTH (Karlsruhe) und SIGMA (Deisenhofen).

### 3.2 Geräte

Brutschrank	BE-400	MEMMERT, Schwabach
DNA-Sequenzierer	LI-COR Modell 4200 L	MWG BIOTECH, Ebersberg
Elektrophoresekammern:	MiniProtean <sup>®</sup> II	BIORAD, München
	Mini-Sub <sup>®</sup> Cell GT	BIORAD, München
	2012 Maxiphor	LKB, Bromma, SWE
Fluoreszenzmikroskop	AH3BT3	OLYMPUS, Hamburg
Gefrierschränke:	-20°C	LIEBHERR, Ochsenhausen
	-80°C	NUNC, Wiesbaden
Heizblock	UNITEK HB-130	SALMON ELECTRONICS Beds, UK
Incubator und Schüttler:	Certomat <sup>®</sup> H	BRAUN, Melsungen
	Certomat <sup>®</sup> R	BRAUN, Melsungen
Kühlschrank		LIEBHERR, Ochsenhausen
Magnetrührer mit Heizplatte	MR 3000 (HEIDOLPH)	NEOLAB, Heidelberg
Mikrowelle	M 9237	SAMSUNG, UK
Mörser und Pistill		BENDER&HOBEIN, Bruchsal
Multiscanner	TITERTEK Multiskan <sup>®</sup> Plus	LABSYSTEMS, Finnland
Orbitalschwenker	Polymax 1040T (HEIDOLPH)	NEOLAB, Heidelberg
pH-Meter	PH 320/Set-2	WTW, Weilheim
PhosphorImager	MolecularImager GS-525	BIORAD, München
Pipetten:	Pipetman	GILSON, Villieres-Le-Bel, F
	Reference	EPPENDORF, Hamburg
Quarzküvette	QS 1.000	PHARMACIA, Freiburg
Reinraumarbeitsplatz	8580	KÖTTERMANN, Uetze-Hängingen
Rotoren:	GSA	DUPONT, Bad Homburg
	HB 6	DUPONT, Bad Homburg
Semi-Dry-Blotting-Kammer	Trans-Blot <sup>®</sup> SD	BIORAD, München
Sonifizierer	B-12/15 (BRANSON)	HEINEMANN, Schwäbisch Gmünd
Spannungsgeräte	PowerPac 200 und 300	BIORAD, München
Speed Vac	SVC 100/RH 40-11	SAVAVANT INSTRUMENTS, Farmingdale, USA
Spektralphotometer:	GeneQuant II	PHARMACIA, Freiburg
	SmartSpec <sup>™</sup> 3000	BIORAD, München
Sterilisator	FDL 115	WTB BINDER, Tuttlingen
Thermocycler	Touchdown	HYBAID/AGS, Heidelberg
Transilluminator- und Geldokumentationssystem		UVP LIMITED, Cambridge, UK
Umkehrmikroskop		HUND, Wetzlar

Umwälzthermostat	Julabo Exatherm U3	KÜHN&BAEYER, Nidderau
Videoprinter	UP 860 CE	SONY, UK
UV-Crosslinker	Stratalinker 1800	STRATAGENE, Amsterdam, NL
UVB-Lampe (20 W)	UV-B TL 12RS	PHILIPS, Hamburg
Vortexer	Reax 2000 (HEIDOLPH)	NEOLAB, Heidelberg
Waagen:	PB 300	METTLER, Giessen, CH
	MC BA 100	SARTORIUS, Göttingen
Wasserbad (beheizbar)	3047	KÖTTERMANN, Uetze-Hängingen
Zentrifugen:	Kontron Z 364	BERTHOLD HERMLE, Gosheim
	Kühlzentrifuge 5402	EPPENDORF, Hamburg
	Sorvall RC-5B	DUPONT, Bad Homburg
	Zentrifuge 5415 C	EPPENDORF, Hamburg
	Qualitron DW-41	ROTH, Karlsruhe

### 3.3 Verbrauchsmaterialien

Acid washed glass beads ( $\varnothing$ 425-600 $\mu$ m)	SIGMA, Deisenhofen
Aluminiumfolie	MELITTA, Minden
Einwegspritzen (2, 5, 10 und 20 ml)	BRAUN, Melsungen
Elektrodenpapier	AMERSHAM, Braunschweig
Entwickler und Fixierer für Röntgenfilme	KODAK, Paris, F
Falcon Reaktionsgefäße (5, 10 und 50 ml)	BECTON&DICKINSON, New Jersey, USA
Frischhaltefolie	MELITTA, Minden
Microstrips (0,2 ml, tubes und caps)	DIANOVA, Hamburg
Nagellack	CHICAGO, Erkrath
Nylonmembran (positiv geladen)	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
Objektträger	IDL, Nidderau
Omnistrips (0,3 ml tubes und caps)	DIANOVA, Hamburg
Papierfalthandtücher TorkClassic	APURA, Mainz
Parafilm M	AMERICAN NATIONAL CAN, Greenwich, USA
Pasteurpipetten	WU, Mainz
Petrischalen	BECTON&DICKINSON, New Jersey, USA
	NUNC, Wiesbaden
	GREINER, Frickenhausen
pH-Indikatorstäbchen	MERCK, Darmstadt
Pipettenspitzen	ROTH, Karlsruhe
Pipettenspitzen mit Filtereinsatz	BIOZYM, Hess. Oldendorf
Plastikfolie (SEVERIN)	bezogen über NEOLAB MIGGE, Heidelberg
Plastikpipetten (5, 10 und 25 ml)	BECTON&DICKINSON, New Jersey, USA
PVDF-Membran (Immobilon-P)	MILLIPORE, Bedford, USA
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	BRAND, Wertheim
Reaktionsgefäße (2,0 ml)	EPPENDORF, Hamburg
Röntgenfilm New RX (FUJI)	bezogen über BECHTHOLD, Kelkheim
Sterilfilter (0,2 $\mu$ m)	NALGENE, Rochester, USA
Videoprinterpapier	ROTHAAR&SCHRÖDER, Heidelberg
24 und 96 well-Platten	NUNC, Wiesbaden

### 3.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIAP)

*Bam*HI

BioTherm™ DNA-Polymerase

FirePol DNA-Polymerase

Lyticase (25000 U)

*Taq* DNA-Polymerase

T4 DNA-Ligase

MBI, St. Leon-Rot

MBI, St. Leon-Rot

GENECRAFT, Münster

OÜ SOOLIS, Tara, EST

SIGMA, Deisenhofen

ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim

MBI, St. Leon-Rot

### 3.5 Kits

BM Chemoluminescence Blotting Substrate (POD)

Epicurian Coli® XL1-Blue Supercompetent Cells

Geneclean® Spin Kit

High Pure™ Plasmid Isolation Kit

High Pure™ PCR Product Purification Kit

PCR DIG Probe Synthesis Kit

*pGEM*®-T Cloning Kit I

QIAGEN Genomic DNA Purification Kit

QIAfilter™ Plasmid Midi Kit

Sequi Therm EXCEL™ II DNA Sequencing Kit

SUPERSCRIPT™ Preamplification System

for First Strand cDNA Synthesis

Thermo Sequenase fluorescent labelled primer

cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP

Yeast DNA Isolation Kit

ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim

STRATAGENE, Amsterdam, NL

BIO 101, La Jolla, USA

bezogen über DIANOVA, Hamburg

ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim

ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim

LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe

PROMEGA, Mannheim

QIAGEN, Hilden

QIAGEN, Hilden

BIOZYM, Hess. Oldendorf

LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe

AMERSHAM-PHARMACIA,

Braunschweig

STRATAGENE, Amsterdam, NL

### 3.6 Antikörper

#### 3.6.1 Primärantikörper

Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments

Anti-His (C-Term)

Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182)

Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)

p-JNK (G-7)

p38 MAP Kinase

SAPK/JNK

ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim

INVITROGEN, Groningen, NL

NEB, Frankfurt

NEB, Frankfurt

SANTA CRUZ, Heidelberg

NEB, Frankfurt

NEB, Frankfurt

### 3.6.2 Sekundärantikörper

Anti-Kaninchen Cy3	DIANOVA, Hamburg
Anti-Maus Cy3	DIANOVA, Hamburg
Anti-Maus HRPO	DIANOVA, Hamburg
Anti Rabbit HRPO	NEB, Frankfurt

### 3.7 Molekulargewichtsmarker

High Molecular Weight Marker (LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe)

DNA-Fragmente der Längen 8271, 8612, 10086, 12220, 15004, 17057, 19399, 22621, 24776, 29942, 33498, 38416 und 48502 Bp

Low DNA Mass™ Ladder (LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe)

DNA-Fragmente der Längen (Bp)/Konzentration (ng/μl) 100/2,5; 200/5; 400/10; 800/20; 1200/30 und 2000/50

RNA Molecular Weight Marker I (ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim)

RNA-Fragmente der Längen 310, 438, 575, 1049, 1517, 1821, 2661, 4742 und 6948 Basen

RNA Molecular Weight Marker I, DIG-labeled (ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim)

RNA-Fragmente der Längen 0,3; 0,4; 0,6; 1,0; 1,6; 1,9; 2,8; 5,3 und 7,4 kB

SDS-Page Standards, broad range (BIORAD, München)

Zusammengesetzt aus folgenden Proteinen: Aprotinin (6,5 kD), Lysozym (14,4 kD), Trypsininhibitor (21,5 kD), Carbonatanhydrase (31 kD), Ovalbumin (45 kD), Serumalbumin (66,2 kD), Phosphorylase b (97,4 kD), β-Galactosidase, (116,25 kD) und Myosin (200 kD)

123 Bp DNA Ladder™ (LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe)

DNA-Fragmente der Längen 123 Bp x n (n = 1, 2, 3, usw.)

1 kB Plus DNA Ladder™ (LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe)

DNA-Fragmente der Längen 100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000, 1650, 2000, 3054, 4072, 5000, 6108, 7126, 8144, 9126, 10180, 11198 und 12216 Bp

### 3.8 Vektoren

cDNA-Vektor	<i>λ-ZAP-Express/pBK-CMV</i> (STRATAGENE, Amsterdam, NL) Konstruktion der cDNA-Bibliothek: KRUSE <i>et al.</i> (1997).
PCR-Klonierungsvektor	<i>pGEM<sup>®</sup>-T</i> (PROMEGA, Mannheim)
PCR-Matrize für <i>HOG1</i>	<i>pJB30</i> (erhalten von Dr. M. Gustin, Rice University, Houston, USA)
Hefe-Expressionsvektor	<i>pVT103-U</i> (erhalten von Dr. Ivana Weygand-Durasevic, Department of Biochemistry, Faculty of Science and Mathematics, University of Zagreb, Zagreb, HRV)

### 3.9 Bakterienstamm

XL1-Blue MRF' (STRATAGENE, Amsterdam, NL)

$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^q\text{Z}\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^r\text{)]}$

### 3.10 Hefestämme

**Wildtyp:** BY4741, Acc. Nr.: Y00000

MATa his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0

**HOG1- $\Delta$ 1-Nullmutante:** BY4741-*HOG1*, Acc. Nr.: Y02724

MATa his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0 YLR113w::Kan MX4

Beide Hefestämme wurden über EUROSCARF, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt, Institut für Mikrobiologie, Frankfurt bezogen.

### 3.11 Nährmedien für Bakterienkulturen

#### LB-Medium

10 g/l Trypton/Pepton aus Casein

5 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt und die Lösung anschließend autoklaviert.

#### LB/Ampicillin und LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal Platten

Dem LB-Medium wurde Bacto-Agar (LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe) in einer Konzentration von 15 g/l zugegeben und die Lösung anschließend autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Flüssigkeit auf 50°C wurde Ampicillin (100 µg/ml) und alternativ IPTG (0,5 mM) sowie X-Gal (80 µg/ml in N,N'-DMF gelöst) hinzugefügt. Je 20 ml wurden dann in Petrischalen (Ø 85 mm) unter sterilen Bedingungen ausgegossen und die Platten nach dem Erstarren dunkel bei 4°C gelagert. Vor dem Verwenden wurden sie für eine halbe Stunde auf 37°C im Brutschrank temperiert.

### 3.12 Nährmedien für Hefekulturen

#### YEPD-Medium

YEPD Broth (LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe) wurde in einer Konzentration von 50 g/l gelöst und anschließend autoklaviert.

#### YEPD-Platten

Dem YEPD-Medium wurde Bacto-Agar (LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe) in einer Konzentration von 16 g/l zugefügt und die Lösung daraufhin autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 50°C wurden je 20 ml der Suspension unter sterilen Bedingungen in Petrischalen (Ø 85 mm) ausgegossen und nach dem Erstarren dunkel bei 4°C gelagert.

**Synthetisches Komplettmedium ohne Uracil (SK-Ura-Medium)**

1,7	g/l	Yeast Nitrogen Base (LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe)
5,0	g/l	Ammoniumsulfat
1,35	g/l	Aminosäure/Purin-Mischung*

(\* besteht aus einer Mischung von jeweils 1 g der folgenden Substanzen: Adeninsulfat, L-Alanin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Aspartat, L-Cystein, L-Glutamat, L-Glutamin, Glycin, L-Isoleucin, L-Lysin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Serin, L-Threonin, L-Tyrosin und L-Valin)

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 5,9 eingestellt und die Lösung anschließend autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 50°C erfolgte die Zugabe von Glucose (2 %; w/v), L-Histidin (800 µM), L-Leucin (800 µM) und L-Tryptophan (320 µM). Die Lösung wurde dunkel bei 4°C gelagert.

**SK-Ura-Platten**

Dem SK-Ura-Medium wurde in einer Konzentration von 20 g/l Bacto-Agar (LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe) zugegeben und die Lösung nach dem Autoklavieren und dem darauffolgenden Abkühlen auf 50°C unter sterilen Bedingungen in Petrischalen (Ø 85 mm) ausgegossen (je 20 ml). Nach dem Erstarren wurden die Platten dunkel bei 4°C gelagert.

**3.13 Primer**

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma MWG BIOTECH, Ebersberg bezogen. Die Orientierung ist jeweils in 5'→3' Richtung angegeben. Außerdem sind deren berechnete Tm-Werte (s. Kap. 3.15.1.3) aufgeführt.

**3.13.1 Primer zur Isolierung von *S. domuncula* JNK (SDJNK) und p38 MAPK (SDp38) aus der cDNA-Bibliothek**

SDJNKdeg_R1:	A/GTT IGC A/GTC CAT IAA/G C/TTC CAT	56-68°C
SDp38deg_R1:	T/CCT IGT IGC IAC A/GTA ICC IGT CAT	66-80°C
SDJNK_F1:	GAG CTA CGA CTA ATG AAG AT	56°C
SDp38_F1:	AAT GAG GAC TGT GAG CTT CGG A	66°C
SDp38RT_F1:	ATT ATG CTG ATC CTG ACG ATG	60°C
SDp38RT_R1:	ACA CTG TCT ATC AAT GCA GTT	58°C

**3.13.2 Primer zur Isolierung von SDJNKge und SDp38ge**

SDJNKgap_F1:	GCT AAT GGA TGC TAA CCT TTG	60°C
SDJNKgap_R1:	CTC TGT GTA TGA TCC CAG CT	60°C
SDJNKgap_R2:	TTC AGT GAG CAG TCC TCC TT	60°C
SDJNKgap_R3:	GTA GGT TAA GGT ACA CTA GTT G	62°C
SDJNKgen_F1:	CCG ACC GCC ATA ATG TCT TCA	64°C
SDJNKgen_F2:	TCT TCA TCC GAC TAT TAC TCT CA	64°C
SDJNKgen_R1:	TGC TTA ATC CCA CAG AGA AGC	62°C
SDJNKgen_R2:	TGT ATG ATC CCA GCT GAA TGT AAG	68°C

<b>SDJNKgen_R3:</b>	TGT ACG TGC CAG ACC AAA GT	60°C
<b>SDJNKgen_R4:</b>	CTT GTA CTT CAT GCC GAC GAT AA	66°C
<b>SDJNKgen_FA:</b>	ATC AGC TTC TCT GTG GGA TTA	60°C
<b>SDJNKgen_FB:</b>	CCC AGT AAC ATT GTG GTG AAG	62°C
<b>SDJNKgen_FC:</b>	TAC ATT CAG CTG GGA TCA TAC	60°C
<b>SDJNKgen_RA:</b>	AGG AGT TAT ATG TCT TGA CTT CC	64°C
<b>SDJNKgen_RB:</b>	CTT GAC TTC CTC ATA AAT TCG AG	64°C
<b>SDJNKgen_RC:</b>	AGT ATT TAT TAG TGT TAG GAG TTA	60°C
<b>SDJNKgen_RD:</b>	AGT GTT AGG AGT TAT ATG TCT TGA	64°C
<b>SDp38gen_F1:</b>	GCT GTT CAA GTC TTG CCT G	58°C
<b>SDp38gen_F2:</b>	GAT GGA GCT GTT CAA GAC T	56°C
<b>SDp38gen_R1:</b>	TAA GCT TTG TTG GTA GAG GG	58°C
<b>SDp38gen_R2:</b>	TAA TCT CGT CAA GGA CCA G	56°C

### 3.13.3 Primer zur Synthese der DNA-Sonden von *SDJNK* und *SDp38*

<b>SDJNKlab_F1:</b>	analog zu SDJNKF1	56°C
<b>SDJNKlab_R1:</b>	AGG AGT TAT ATG TCT TGA CTT	56°C
<b>SDp38lab_F1:</b>	analog zu SDp38gen_F1	58°C
<b>SDp38lab_R1:</b>	analog zu SDp38gen_R1	58°C

### 3.13.4 Primer zur Konstruktion der rekombinanten *pVT103-U* Hefe-Expressionsvektoren mit *HOG1*, *SDJNK* und *SDp38*

<b>SCHOGexp_F1:</b>	GGA TCC ATG ACC ACT AAC GAG GAA TT	56°C
<b>SCHOGexp_R1:</b>	GGA TCC TCA (GTG ATG) <sub>3</sub> CTG TTG GAA CTC ATT AGC GTA	60°C
<b>SDJNKexp_F1:</b>	GGA TCC GCC ATA ATG TCT TCA TCC GA	58°C
<b>SDJNKexp_R1:</b>	GGA TCC TCA (GTG ATG) <sub>3</sub> GGA GTT ATA TGT CTT GAC TTC	58°C
<b>SDp38exp_F1:</b>	GGA TCC GCG ATG GCT GTT CAA GTC T	58°C
<b>SDp38exp_R1:</b>	GGA TCC TCA (GTG ATG) <sub>3</sub> TAA GCT TTG TTG GTA GAG GGT	60°C

### 3.13.5 Vektorprimer

<b>(-40) Reverse:</b>	GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG	70°C
<b>(-40) Forward:</b>	AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT	70°C
<b>M13 Reverse:</b>	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G	56°C
<b>M13 (-20):</b>	GTA AAA CGA CGG CCA GT	52°C
<b>SP6:</b>	TTT AGG TGA CAC TAT AGA ATA C	58°C
<b>T7:</b>	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GG	56°C
<b>BK Reverse:</b>	ACA GGA AAC AGC TAT GAC CTT G	64°C
<b>CMVF:</b>	CTT GAT TAC GCC AAG CTC	54°C
<b>CMVR:</b>	TAG GGC GAA TTG GGT ACA C	58°C
<b>T3:</b>	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	56°C
<b>PVT103-UF:</b>	TGC TGT CTT GCT ATC AAG TA	56°C
<b>PVT103-UR:</b>	AGA AGT GTC AAC AAC GTA TC	56°C

### 3.13.6 Sequenzierprimer (IRD800 gelabelt)

<b>(-40) Reverse:</b>	GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG	70°C
<b>(-40) Forward:</b>	AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT	70°C
<b>M13 Reverse:</b>	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G	56°C
<b>M13 (-20):</b>	GTA AAA CGA CGG CCA GT	52°C
<b>SP6:</b>	TTT AGG TGA CAC TAT AGA ATA C	58°C
<b>T7:</b>	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GG	56°C
<b>BK Reverse:</b>	ACA GGA AAC AGC TAT GAC CTT G	64°C
<b>CMVF:</b>	CTT GAT TAC GCC AAG CTC	54°C
<b>CMVR:</b>	TAG GGC GAA TTG GGT ACA C	58°C
<b>T3:</b>	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	56°C
<b>PVT103-UF:</b>	TGC TGT CTT GCT ATC AAG TA	56°C
<b>PVT103-UR:</b>	AGA AGT GTC AAC AAC GTA TC	56°C
<b>SDJNKS_F1:</b>	TCT GTA TTG TGA GTC TCA AC	56°C
<b>SDp38S_F1:</b>	CAC CTG AGA TCA TGC TCA AT	58°C
<b>SDJNKgF1:</b>	AGC TAC TAC AGG TTA TCT AC	56°C
<b>SDJNKgF2:</b>	TGT AAG TGC TAC CTG ACT G	56°C
<b>SDJNKgF3:</b>	GGC ATG AAG TAC AAG GAG A	56°C
<b>SDJNKgF4:</b>	CGC ATG AAC TTC AGC AGG	56°C
<b>SDJNKgF5:</b>	CCT AAC AGT GTA ATG CTG AT	56°C
<b>SDJNKgF6:</b>	TAT GAT CGA CCA TCT TCA TTA	56°C
<b>SDJNKgF7:</b>	ATC CAC TGT ATG CAT GTG TT	56°C
<b>SDJNKgF8:</b>	GAA GAT GAC AGC TGC TTA AA	56°C
<b>SDp38gF1:</b>	GTT CTC ACC TGC ATC TAC T	56°C
<b>SDp38gF2:</b>	AGG TTC TCC AAC TGA CGT A	56°C
<b>SDp38gF3:</b>	GGT GGA CAT ATG GTC TGT T	56°C

## 3.14 Computerprogramme und Internet-Dienste zur Auswertung von DNA-Sequenzen

### 3.14.1 Computerprogramme

Sequenzvergleiche und phylogenetische Analysen:

CLUSTALW 1.7 (THOMPSON *et al.*, 1994).

Freeware. Zu beziehen über: <ftp.ebi.ac.uk>

Translation von Nukleotidsequenzen sowie Berechnung des G/C-Gehalts und Auflistung der Restriktionsschnittstellen einer DNA-Sequenz:

DNASIS V5.00.

HITACHI-SOFTWARE. Zu beziehen über: MWG BIOTECH

Grafische Umsetzungen eines Sequenzvergleichs:

GENEDOC 2.4 (NICHOLAS *et al.*, 1997).

Freeware. Zu beziehen über: <http://www.cris-com/~Ketchup/genedoc.shtml>

### 3.14.2 Internet-Dienste

Online-Sequenzvergleiche anhand von Nukleotid- und Protein-Datenbanken:

BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990; 1997): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>

FASTA (PEARSON und LIPMAN, 1988): <http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/>

Online-Zugriffe auf Nukleotid- und Protein-Datenbanken:

ENTREZ (BENSON *et al.*, 1999): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>

Online-Identifizierungen von Protein-Domänen und Strukturmotiven:

PROFILE (BUCHER *et al.*, 1996): [http://www.isrec.isb-sib.ch/software/pfscan\\_form.html](http://www.isrec.isb-sib.ch/software/pfscan_form.html)

PROSITE (BAIROCH *et al.*, 1992): <http://ebi.ac.uk/searches/prosite.input.html>

Online-Berechnungen von diversen Proteinparametern:

PROTPARAM: <http://expasy.ch/cgi-bin/protparam>

## 3.15 DNA-Techniken

### 3.15.1 Die Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) kann ein bestimmter DNA-Strang, dessen flankierende Sequenzen bekannt sind, selektiv aus einem DNA-Gemisch vervielfältigt werden (SAIKI *et al.*, 1985; MULLIS *et al.*, 1986). Das Prinzip dieser *in vitro* Technik beruht auf einer zyklischen Wiederholung der folgenden Schritte: [1] Die doppelsträngige DNA-Matrize wird durch Hitzeeinfluss (95°C) zu Einzelsträngen denaturiert. [2] Ein Absenken der Temperatur erlaubt anschließend die Bindung spezifischer Oligonukleotidprimer (Vorwärts- und Rückwärts-Primer) an die entsprechend komplementären Sequenzen der DNA (Annealing). Die Temperatur bei der diese Hybridisierung erfolgt wird Schmelz- oder Hybridisierungstemperatur ( $T_m$ ) genannt. Sie ist u. a. abhängig von der Basenzusammensetzung und Länge der Primer (s. Kap. 3.15.1.3). [3] Bei einer Temperatur von 74°C werden die Primer durch eine enzymatische Anlagerung von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) entlang der Matrize verlängert (Elongation), so dass eine zum Ausgangsstrang komplementäre Sequenz synthetisiert wird. In Folge einer 30-40maligen Wiederholung der Schritte [1]-[3] entstehen millionenfache Kopien des gewünschten DNA-Abschnitts.

Eine nach heutigen Maßstäben vernünftige Anwendung dieser Technik wurde allerdings erst durch den Einsatz von hitzestabilen DNA-Polymerasen, wie z. B. die sog. *Taq*-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (SAIKI *et al.*, 1988), und Geräten zur Steuerung der Zyklustemperatur (sog. Thermocyclern) möglich.

#### 3.15.1.1 PCR-Zusammensetzung und Temperaturzyklen

Für eine typische PCR wurden folgende Komponenten in einem 0,2 ml Microstrip tube zusammengegeben:

x	µl	steriles <i>Aqua bidest.</i> (variierte nach PCR-Ansatz)
5	µl	10 x PCR-Puffer
1	µl	dNTP-Mix (10mM)
1	µl	Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)
1	µl	Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)
x	µl	Matrize (variierte nach PCR-Ansatz)
0,5	µl	thermostabile DNA-Polymerase (5 U/µl)
50	µl	

Bei der Verwendung von cDNA als Matrize wurden 1-2 µl der cDNA-Bibliothek (s. Kap. 3.8) eingesetzt, bei genomischen Vervielfältigungen wurden hingegen 100 ng sonifizierte DNA (s.

Kap. **3.15.12.3**) und jeweils 2 µl an Primer zugefügt. Die PCR wurde in dem Thermocycler Touchdown mit folgenden Temperaturzyklen durchgeführt:

Schritt 1:	5 min	95°C	initiale Denaturierung der DNA-Matrize
Zyklen 1-35:	30 sec	95°C	Denaturierung der DNA-Doppelstränge
	30 sec	T <sub>m</sub>	Annaeling der Primer
	60 sec/kB	74°C	Elongation der Primer entlang der Matrize

Um ein anschließendes T-A-Cloning der PCR-Produkte (s. Kap. **3.15.5.1**) zu ermöglichen, erfolgte noch ein terminaler Schritt bei 74°C für 10 min, durch den an das 3'-Ende der amplifizierten DNA ein Adennukleotid angehängt wurde (CLARK, 1988).

Wurde eine Checking-PCR durchgeführt (s. Kap. **3.15.9**), waren lediglich 30 Zyklen zur Amplifikation des DNA-Abschnitts erforderlich.

Die Annealing-Temperaturen und -Zeiten wurden für jede Anwendung empirisch optimiert.

Bei genomischen Amplifikationen wurden längere Denaturierungs- (60 sec) und Annaeling-Zeiten (45 sec) gewählt.

Die anhand von PCR vervielfältigten DNA-Fragmente wurden anschließend mittels Gelelektrophorese (s. Kap. **3.15.2**) analysiert.

#### **10 x PCR-Puffer**

100	mM	Tris-HCl, pH 8,5
15	mM	MgCl <sub>2</sub>
500	mM	KCl
1	mg/ml	Gelatine

#### **dNTP-Mix**

10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP

### **3.15.1.2 Primerdesign**

Bei der Gestaltung der Primer (18-25 Bp) musste zunächst darauf geachtet werden, dass innerhalb dieser keine Sequenzwiederholungen auftraten. Des weiteren sollte der G/C-Gehalt der Oligonukleotide zwischen 40-60 % liegen. Das am 3'-Ende vorliegende Triplet wurde so konstruiert, dass es sich weder mit einer im eigenen Primer (Haarnadelschleife) noch mit einer im Gegen-Primer (Dimerisierung) befindlichen komplementären Sequenz binden konnte. Um ein Ablösen des Primers von der Matrize mit dem 3'-Ende der Oligonukleotidkette zu vermeiden, wurde versucht, die Primer mit G oder C enden zu lassen. Außerdem erfolgte die Gestaltung der Primerpaare so, dass die Differenz ihrer T<sub>m</sub>-Werte (s. Kap. **3.15.1.3**) nicht mehr als 2°C betrug.

Um DNA-Fragmente unbekannter Sequenz aus der cDNA-Bibliothek mittels PCR zu vervielfältigen, wurden sog. degenerierte Primer verwendet. Zur Konstruktion dieser wurden zunächst die aus cDNA-Sequenzen abgeleiteten AS-Abfolgen eines zu isolierenden Gens aus

möglichst vielen Pilzen, Invertebraten und Vertebraten über die Online-Datenbank FASTA ausgewählt und anschließend anhand des Programms CLUTALW 1.7 miteinander verglichen. Der degenerierte Rückwärtsprimer wurde dann für die am höchsten konservierte Protein-domäne konstruiert. Beim Primerdesign musste darauf geachtet werden, dass die Degeneriertheit der Primer nicht mehr als 100 betrug.

### **3.15.1.3 Berechnung der Schmelztemperatur der Primer**

Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer wurde nach folgender Annäherungsformel (THEIN und WALLACE, 1986) berechnet:

$$T_m = (\text{Anzahl von A und T}) \times 2^\circ\text{C} + (\text{Anzahl von G und C}) \times 4^\circ\text{C}$$

Wenn sich ein Primerpaar bezüglich der  $T_m$  unterschieden hatte, wurde die niedrigere  $T_m$  als Annealing-Temperatur ausgewählt. Wurde bei der Konstruktion der degenerierten Primer ein Inosin verwendet, ging dieses mit einer Temperatur von  $2^\circ\text{C}$  in die Gleichung ein.

## **3.15.2 DNA-Gelelektrophorese**

Die DNA besitzt durch ihre Phosphatgruppen eine negative Gesamtladung und wandert demzufolge in einem elektrischen Feld Richtung Anode. Verläuft diese Elektrophorese in Gegenwart einer festen, elektrisch und chemisch inerten Matrix mit einer definierten Porengröße, so ist die Wanderungsgeschwindigkeit eines DNA-Fragments aufgrund des dreidimensionalen Netzwerks umgekehrt proportional zu dem Logarithmus seines Molekulargewichts (MCDONELL und STUDIER, 1977).

### **3.15.2.1 Analytische und präparative DNA-Agarosegele**

In den meisten Fällen wurde ein 1 %iges Agarosegel verwendet, da sich diese Prozentigkeit für eine Auftrennung von Fragmenten der Größe zwischen 0,5-10 kB eignet. Ansonsten wurde eine, für die Größe des aufzutrennenden Fragments, geeignete Agarosekonzentration gewählt. Dafür wurde pulverförmige Agarose aus Meeresalgen in TBE-Puffer zum Kochen gebracht und nach dem Abkühlen auf  $60^\circ\text{C}$  in eine Form gegossen. Anschließend wurde ein Kamm zur Anfertigung der Taschen eingesetzt. Nach dem Erstarren des Gels wurde dieses in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und die, mit dem 6 x Proben-

puffer in einem Verhältnis von 5:1 vermischen, DNA-Proben in die Geltaschen pipettiert. Als DNA-Längenstandards fungierten die im Kap. 3.7 erwähnten Produkte. Die horizontale Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 4-5 V pro cm Abstand der Elektroden durchgeführt und abgestoppt, wenn die Bromphenolblau-Lauffront (bewegt sich bei ca. 300 Bp großen DNA-Molekülen) etwa zwei Drittel des Gels erreicht hatte. Für präparative Gele zur Extraktion von DNA-Fragmenten (s. Kap. 3.15.4) erfolgte die Auswahl einer größeren Kammaussparung, um mehr Probenvolumen auftragen zu können. Die Dicke dieser Gele betrug nie mehr als 0,4-0,5 cm.

**TBE-Puffer (Laufpuffer)**

90 mM Tris-HCl, pH 8,3  
90 mM Borsäure  
2 mM EDTA

**6 x Probenpuffer**

40 % (w/v) Saccharose  
0,25 % (w/v) Bromphenolblau

### 3.15.2.2 Detektion der DNA im Agarosegel und Dokumentation der Gele

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele für 10-30 min in eine Lösung von Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) gelegt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet spezifisch an Nukleinsäuremoleküle, indem er sich zwischen benachbarte Basen einlagert (interkaliert). Wird nun das Gel mit UV-Licht einer Wellenlänge zwischen 254 und 360 nm bestrahlt, so absorbiert der DNA-Farbstoffkomplex diese Energie und das Ethidiumbromid emittiert seinerseits eine Fluoreszenzstrahlung von 590 nm (orange) (SAMBROOK *et al.*, 1989). Dadurch werden noch DNA-Mengen von bis zu 10 ng sichtbar gemacht.

Die Dokumentation der Gele erfolgte mit Hilfe eines Transilluminator- und Geldokumentationssystems. Die Bilder der aufgenommenen Gele wurden mit diesem System bearbeitet, ausgedruckt und auf Diskette gespeichert.

### 3.15.3 Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen

Für eine weitere Manipulation der durch PCR oder Restriktion erhaltenen DNA-Moleküle ist es oft notwendig, die eventuell störenden Bestandteile, wie Enzyme, Primer und Salze, aus den vorangegangenen Reaktionen zu entfernen.

Die Aufreinigung dieser Ansätze erfolgte durch Verwendung des High Pure™ PCR Product Purification Kits. Bei der Verwendung dieses Kits wird die Tatsache zunutze gemacht, dass Nukleinsäuren in Anwesenheit hoher Konzentrationen von chaotropen Salzen, die die Struktur des Wasser verändern, an Silicagel-Oberflächen adsorbieren (HAMAGUCHI und GEIDUSCHEK, 1962; VOGELSTEIN und GILLESPIE, 1979). An den Säulen dieses Kits können sich bis zu 10 µg DNA ab 100 Bp Länge binden. Die Verunreinigungen fließen durch,

Salze werden mit einem ethanolhaltigen Puffer herausgewaschen. Die Elution der DNA erfolgte entweder mit TE-Puffer oder *Aqua bidest.* Sämtliche Materialien und Puffer waren Bestandteile des Kits. Alle Zentrifugationen erfolgten bei 10.000 x g und RT für 1 min.

Vor der Hinzufügung von 500 µl des Bindepuffers (P1) wurden zunächst die PCR- oder Restriktionsansätze mit TE-Puffer, pH 8,0 auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Nach dem Vortexen wurde die Lösung auf eine Säule gegeben und anschließend zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule daraufhin insgesamt 2 x mit jeweils 500 µl P2-Puffer gewaschen. Vor der Elution erfolgte noch ein weiterer Zentrifugationsschritt, um den restlichen P2-Puffer zu entfernen. Die Elution geschah durch Zugabe von 50 µl *Aqua bidest.* oder TE-Puffer und einer anschließenden Zentrifugation, wobei der DNA-haltige Durchfluss in einem neuen Reaktionsgefäß aufgefangen wurde.

### 3.15.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegele

Für verschiedene Zwecke (z. B. bei Subklonierungen von DNA-Fragmenten; s. Kap. 3.15.5.1/2) ist es notwendig, die durch ein präparatives Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente (s. Kap. 3.15.2.1) wieder aus der Gelmatrix zu extrahieren. Dafür muss zunächst die DNA umgebende Matrix aufgelöst werden. Anschließend kann die freigewordene DNA in Gegenwart einer hohen Konzentration chaotropher Salze an Silicagelpartikel gebunden und nach dem Waschen wieder eluiert werden. Für die Elution von DNA aus Agarosegele wurde der GeneClean<sup>®</sup> Spin Kit verwendet. Sämtliche Materialien und Puffer waren Bestandteile des Kits. Alle Zentrifugationen erfolgten bei 10.000 x g und RT für 1 min.

Die entsprechende DNA-Bande wurde zunächst mit einem sauberen Skalpell aus einem, mit Ethidiumbromid gefärbten (s. Kap. 3.15.2.2), Agarosegel unter UV-Beleuchtung herausgeschnitten. Die UV-Expositionszeit wurde dabei so kurz wie möglich gehalten, um mögliche DNA-Schädigungen zu vermeiden. Anschließend wurde dieses DNA-haltige Gelstück in 400 µl GC Spin Glassmilk gegeben und bei 56°C 10 min geschmolzen. Zwischendurch wurde immer wieder kurz gevortext. Danach wurde die Suspension in ein GC Spin Filter pipettiert und zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule daraufhin 2 x mit jeweils 500 µl GC Spin New Wash gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift schloss sich noch eine Zentrifugation an, um die Säule zu trocknen. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 50 µl *Aqua bidest.* oder TE-Puffer und eine nachfolgende Zentrifugation, wobei der DNA-haltige Durchfluss in einem neuen Reaktionsgefäß aufgefangen wurde. Um die DNA-Konzentration anschließend zu ermitteln und die Qualität der Elution zu überprüfen, wurde mit 5 µl des Eluats ein analytisches Gel angefertigt (s. Kap. 3.15.2). Dabei wurde der DNA-Längensstandard Low DNA Mass<sup>™</sup> Ladder verwendet.

### 3.15.5 Ligation

Als Ligation wird die Verknüpfung eines Vektormoleküls mit dem zu klonierenden DNA-Fragment bezeichnet. Dieser Vorgang wird z. B. durch die T4 DNA-Ligase katalysiert. *In vivo* repariert dieses Enzym alle Einzelstrangbrüche, die in der doppelsträngigen DNA auftreten können. *In vitro* können aufgereinigte T4 DNA-Ligasen die Enden eines DNA-Moleküls oder die unterschiedlicher DNA-Fragmente unter Ausbildung einer ATP-verbrauchenden Phosphodiesterbindung miteinander verknüpfen (ENGLER und ZIMMERMANN, 1982).

#### 3.15.5.1 Ligation von PCR-Produkten mittels T-A-Cloning

Bei dieser Art der Ligation wurden PCR-Amplifikate mit freien 3'-Adenosin-Überhängen (s. Kap. 3.15.1.1) und ein im Handel erhältlicher, bereits linearisierter Vektor mit zwei freien 3'-Thymidin-Überhängen verwendet. Eine Ligation mittels überstehender Enden ist wesentlich effizienter als über glatte Enden. In dieser Arbeit wurde der *pGEM<sup>®</sup>-T* Cloning Kit verwendet.

Dabei wurden jeweils 50 ng *pGEM<sup>®</sup>-T* Vektor sowie aufgereinigtes PCR-Produkt (s. Kap. 3.15.3) und je 1 µl 10 x Ligase Puffer sowie T4 DNA Ligase vereinigt und mit *Aqua bdest.* auf 10 µl aufgefüllt. Dieser Ligationsansatz wurde bei 4°C über Nacht inkubiert. Eine anschließende Erhitzung des Ansatzes für 10 min bei 65°C diente der Inaktivierung des Enzyms.

#### 3.15.5.2 Ligation von Restriktionsfragmenten

In diesen Fällen wurde zunächst der zirkuläre Vektor (s. Kap. 3.15.6.2) mit der gleichen Restriktionsendonuklease, wie das zur Ligation vorgesehene DNA-Fragment (s. Kap. 3.15.6.1), geschnitten. Daraus resultierten zueinander komplementäre (kohäsive) Enden, durch die sich das Vektormolekül mit dem zu subklonierenden DNA-Fragment verbinden konnte.

In dieser Arbeit wurde eine T4 DNA Ligase mit dem zugehörigen 10 x Ligase-Puffer von MBI verwendet, ansonsten waren alle weiteren Schritte und Mengenangaben identisch mit den im Kap. 3.15.5.1 beschriebenen.

### 3.15.6 Manipulation von DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Basensequenzen in einem DNA-Doppelstrang und schneiden beide Stränge innerhalb oder in der Nähe dieser Erkennungssequenz (SMITH und WILCOX, 1970). Bakterien besitzen solche Enzyme als Schutz vor fremder DNA (z. B. Bakteriophagen-DNA). In der Molekularbiologie werden rekombinant hergestellte Restriktionsendonukleasen benutzt, um Nukleinsäuren selektiv zu schneiden. Daraufhin können diese in einen, mit dem gleichen Enzym behandelten, Vektor subkloniert werden (s. Kap. 3.15.5.2). Die hier verwendeten Restriktionsendonukleasen und deren jeweilige 10 x Restriktionspuffer stammten von der Firma MBI.

#### 3.15.6.1 Restriktion rekombinanter *pGEM*<sup>®</sup>-*T*-Klone

Das für eine Subklonierung (s. Kap. 3.15.5.2) vorgesehene DNA-Fragment wurde zunächst anhand einer PCR (s. Kap. 3.15.1) mit Primern, deren jeweiliges 5'-Ende mit der spezifischen Erkennungssequenz, des später zur Restriktion eingesetzten Enzyms, versehen war, amplifiziert, aufgereinigt (s. Kap. 3.15.3) und daraufhin mittels T-A-Cloning in *pGEM*<sup>®</sup>-*T* Vektor ligiert (s. Kap. 3.15.5.1). Die Wahl der Endonuklease richtete sich nach den im DNA-Fragment existierenden Schnittstellen sowie nach denjenigen, die in dem für die erste Ligation (*pGEM*<sup>®</sup>-*T*) und in dem zur weiteren Subklonierung (z. B. *pVT103-U*) vorgesehenen Vektor anzutreffen waren. Zum Herausschneiden des in *pGEM*<sup>®</sup>-*T* ligierten DNA-Fragments wurden später 10 µg des, durch eine Mini-Plasmidpräparation (s. Kap. 3.15.11.1) gewonnenen, rekombinanten *pGEM*<sup>®</sup>-*T* Vektors eingesetzt und mit der Restriktionsendonuklease (2-4 U/µg DNA) sowie dem jeweiligen 10 x Restriktionspuffer versehen. Dieser Ansatz wurde anschließend mit *Aqua bidest.* auf ein adäquates Volumen aufgefüllt und bei 37°C 2 h inkubiert. Danach wurde der Verdau durch Hitzeinaktivierung (Temperatur und Zeit abhängig von der Wahl des Enzyms) abgestoppt und aufgereinigt (s. Kap. 3.15.3). Zur Isolierung des aus *pGEM*<sup>®</sup>-*T* herausgeschnittenen DNA-Fragments wurde anschließend ein präparatives Agarosegel (s. Kap. 3.15.2.1) durchgeführt und die gewünschte DNA-Bande eluiert (s. Kap. 3.15.4).

#### 3.15.6.2 Restriktion der zur weiteren Subklonierung vorgesehen Vektoren

Zum Schneiden von zirkulären Vektoren wurden 5 µg des Plasmids mit 10-20 U der entsprechenden Endonuklease sowie dem 10 x Restriktionspuffer zusammengegeben und mit *Aqua bidest.* auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Alle weiteren Schritte waren ansonsten

identisch mit den in Kap. 3.15.6.1 beschriebenen. Um eine Religation des Vektors zu vermeiden, wurde der Verdau anschließend mit alkalischer Phosphatase (CIAP), die freie 5'-Enden dephosphoryliert, behandelt. Das Enzym sowie der dazugehörige Puffer stammten von der Firma MBI. Dafür wurde der gesamte aufgereinigte Verdau (s. Kap. 3.15.3) (entspricht 5 µg DNA) mit 2 U an CIAP und entsprechender Menge an 10 x CIAP-Puffer versehen, mit *Aqua bidest.* aufgefüllt und bei 37°C 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine 15 minütige Hitzeinaktivierung bei 85°C abgestoppt und danach aufgereinigt (s. Kap. 3.15.3). Um die Vollständigkeit des Verdau zu überprüfen, wurde anschließend mit 2 µl der Aufreinigung ein DNA-Agarosegel (s. Kap. 3.15.2.1) durchgeführt.

### 3.15.7 Transformation von Bakterien

Als Transformation wird die Aufnahme von fremder DNA in lebende Zellen bezeichnet. Die transformierten Zellen wachsen und teilen sich und tragen so zu einer Vermehrung des eingeschleusten DNA-Moleküls bei. Die Aufnahme von Fremd-DNA über die Barriere der Zellwand ist bei Bakterien ein natürlicher aber eher seltener Prozess. Um jedoch eine ausreichend hohe Aufnahme für gentechnologische Anwendungen zu erzielen, müssen die Bakterien zunächst kompetent gemacht werden. Ein Hitzeschock von 42°C fördert zusätzlich die DNA-Aufnahme.

#### 3.15.7.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Um Bakterien effizient transformieren zu können, müssen die Zellen einer physikalischen und/oder chemischen Prozedur unterzogen werden, durch die sie eine erhöhte Aufnahmefähigkeit für DNA-Moleküle (Kompetenz) erlangen. Die Herstellung kompetenter Bakterien erfolgte nach einem Protokoll von NISHIMURA *et al.* (1990). Der genaue Mechanismus, der bei dieser Methode zu einer erhöhten Kompetenz führt, konnte bislang noch nicht identifiziert werden. Als sicher gilt jedoch, dass  $Mg^{2+}$ -Ionen in einem kohlenstoffreichen Medium die Transformationseffizienz deutlich erhöhen (HANAHAN, 1983). Die Lagerung der Zellen in einem Glycerin-PEG- $Mg^{2+}$ -Medium steigert zusätzlich ihre Kompetenz. Als Bakterienart wurde der *Escherichia coli*-Stamm XL1 Blue MRF' verwendet.

Zunächst wurden 5 ml einer tetrazyklinhaltigen (10 µg/ml) Suspensionskultur (s. Kap. 3.15.10.1) von *E. coli* in 500 ml Medium A verdünnt und bis zur midlogarithmischen Phase ( $OD_{600} = 0,4$ ) bei 250 Upm und 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 10 min auf Eis gekühlt und anschließend durch eine Zentrifugation (1500 x g, 10 min, 4°C) pelletiert. Nach der Resuspendierung der Bakterien mit 5 ml kaltem Medium A und der anschließenden

Vermischung mit 25 ml Medium B, wurden sie in 100 µl-Aliquots aufgeteilt sowie in fl. Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

#### **Medium A**

0,2 % (w/v) Glucose  
10 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
mit sterilem LB-Medium auffüllen  
und sterilfiltrieren

#### **Medium B**

36 % (w/v) Glycerin  
12 % (w/v) PEG  
12 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
mit sterilem LB-Medium auffüllen  
und sterilfiltrieren

### **3.15.7.2 Überprüfung der Kompetenz**

Die Überprüfung der Transformationseffizienz neu hergestellter, kompetenter *E. coli* erfolgte durch eine Transformation von 0,1 und 1,0 ng *pGEM<sup>®</sup>-T*. Am folgenden Tag wurden die Kolonien auf beiden Platten gezählt und die Transformationseffizienz mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Transformationseffizienz} = \text{Kolonien}/\mu\text{g Plasmid}$$

Die Kompetenz der verwendeten Bakterien lag in der Regel bei 10<sup>6</sup> bis 10<sup>7</sup> Kolonien/µg Plasmid.

### **3.15.7.3 Transformation kompetenter Bakterien**

Ein 100 µl Aliquot der eingefrorenen, kompetenten *E. coli* Zellen (s. Kap. 3.15.7.1) wurde zunächst langsam auf Eis aufgetaut und anschließend mit ca. 5 µl Ligationsansatz (s. Kap. 3.15.5.1/2), bzw. 1 ng Plasmid, inkubiert (auf Eis). Nach einem 45sekündigen Hitzeschock bei 42°C wurden die Bakterien mit 1 ml LB-Medium versetzt und dann bei 250 Upm für 1 h bei 37°C inkubiert (Expression des auf dem Plasmid lokalisierten Antibiotikaresistenzgens). Danach wurden die Bakterien durch eine Zentrifugation (4.500 x g, 5 min, RT) pelletiert, mit 50 µl LB-Medium vorsichtig resuspendiert und anschließend mit einem abgeflammteten Drigalsky-Spatel auf LB/Ampicillin Platten (s. Kap. 3.11), bzw. wenn eine Blau-Weiß-Selektion (3.15.8) möglich war, auf LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal Platten (s. Kap. 3.11) ausgestrichen. Das Wachstum der Bakterienkolonien erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

Im Fall, dass Bakterien mit *pGEM<sup>®</sup>-T* Vektoren, deren DNA-Insertionen mehr als 2 kB betragen, oder mit rekombinanten Expressionsvektoren transformiert werden sollten, wurden ultrakompetente Zellen des Epicurian Coli<sup>®</sup> XL1-Blue Supercompetent Cells Kits verwendet

(gleiches Protokoll). Dabei wurden 75 µl Aliquots der eingefrorenen Zellen pro Transformation verwendet.

### 3.15.8 Blau-Weiß-Selektion transformierter Bakterien

Da bei einer Transformation nur ein geringer Anteil der kompetenten Bakterien das Vektormolekül aufnimmt, muss dieser folglich von den nicht transformierten Bakterien selektiert werden. Aufgrund dessen werden Plasmide verwendet, die Antibiotikaresistenzgene (z. B. *Amp<sup>r</sup>*) tragen, so dass nur die Transformanten auf antibiotikahaltigen Nährböden wachsen können. Viele der Klonierungsvektoren besitzen indes noch einen weiteren Selektionsmarker, der rekombinante Transformanten, die den Vektor mit DNA-Insertion tragen, von den nichtrekombinanten Transformanten unterscheiden lässt, die nur den mit sich selbst ligierten Vektor (ohne DNA-Insertion) aufgenommen haben. Diese Plasmide tragen das *lac-Z'*-Gen, welches für eine UE der  $\beta$ -Galaktosidase kodiert. Wenn diesem vollständigen Enzym in Anwesenheit des Induktors IPTG das Galactoseanalog X-Gal angeboten wird, erfolgt die Umsetzung dieser Substanz zu einem dunkelblauen Farbstoff. Da das *lac-Z'*-Gen in der Klonierungsstelle (MCS) lokalisiert ist, wird es bei rekombinanten Vektoren von der DNA-Insertion unterbrochen. Daher kann durch das unvollständige Enzym keine Farbstoffbildung erfolgen, so dass die rekombinanten Klone weiß erscheinen, während die nichtrekombinanten Transformanten sich durch ihre Blaufärbung deutlich abheben.

### 3.15.9 Checking-PCR

Bakterienkolonien können mit Hilfe dieser Technik schnell und bequem auf die Existenz von rekombinanten Plasmiden untersucht werden. Dies ist besonders von Vorteil, wenn der verwendete Vektor keine Möglichkeit zur Blau-Weiß-Selektion (s. Kap. 3.15.8) bietet. Außerdem lässt sich damit die Größe der einligierten DNA-Fragmente bestimmen.

Dabei wurde mit einer sterilen Pipettenspitze jeweils eine Bakterienkolonie von einer Platte (s. Kap. 3.15.7.3) gepickt und sofort in 30 µl LB/Ampicillin resuspendiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C und 250 U/min wurde 1 µl dieser Suspension anschließend für eine PCR (s. Kap. 3.15.1) mit Primern, die die MCS des Plasmids flankierten, eingesetzt. Durch eine nachfolgende Gelelektrophorese (s. Kap. 3.15.2) konnte die Größe der Inserts bestimmt werden.

### 3.15.10 Kultivierung von Bakterien für die Plasmid-Präparation

#### 3.15.10.1 Die Suspensionskultur

Das Kulturmedium sollte eine ausgewogene Mischung der lebensnotwendigen Nährstoffe enthalten, so dass die Bakterien möglichst effizient sich teilen und somit vermehren können. Ein solches Medium ist das Luria-Bertani Medium (LB-Medium; s. Kap. 3.11). Im Fall, dass die Bakterien mit einem Plasmid transformiert wurden, das eine Ampicillinresistenz vermittelt (z. B. *pGEM<sup>®</sup>-T*, *pVT103-U* oder *pJB30*), wurde dem Medium noch das entsprechende Antibiotikum in einer Konzentration von 100 µg/ml zugefügt (SAMBROOK *et al.*, 1989). Dafür wurden die Bakterien entweder von einer Platte oder einem Glycerinstock gepickt und in 5 ml LB/Ampicillin-Medium inokuliert. Ging eine Checking-PCR (s. Kap. 3.15.9) voraus, wurden 5 µl der Bakteriensuspension überimpft. Die Kulturen wurden anschließend für 12-16 h bei 37°C und 250 Upm inkubiert.

#### 3.15.10.2 Herstellung eines Glycerinstocks

850 µl einer Suspensionskultur wurden mit 150 µl 96 %igen Glycerin versetzt, gevortext und in fl. Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

#### 3.15.11 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde der High Pure™ Plasmid Isolation Kit verwendet. Mit diesem können bis zu 10 µg Plasmid-DNA aus 0,5 bis 4 ml einer Bakterien-Suspensionskultur säulenchromatographisch aufgereinigt werden. Sollten größere Mengen an hochgereinigter Plasmid-DNA gewonnen werden (z. B. für eine nachfolgende Transformation von Hefezellen; s. Kap. 3.17.3), wurde der QIAfilter™ Plasmid Midi Kit benutzt. Bei Verwendung der QIAGEN tip100-Säulen kann aus 25 ml Kulturen bis zu 100 µg hochreine Plasmid-DNA gewonnen werden, sofern es sich um einen Vektor mit hoher Kopienanzahl in der Zelle handelt. In beiden Fällen werden die Bakterien nach ihrer Zentrifugation zunächst in einem RNase A-haltigen Suspensionsuffer (P1) resuspendiert und anschließend durch ein SDS/NaOH-haltigen Lysispuffer (P2) aufgebrochen. Die alkalischen Bedingungen führen zu einer Denaturierung der Proteine während die RNase A, die ebenfalls freigesetzte RNA zum größten Teil abbaut. Daraufhin wird das Lysat durch Zugabe eines Bindepuffers (P3) neutralisiert. Die hohe Konzentration chaotropher Salze bewirkt eine Präzipitierung der chromosomalen DNA, der Proteine und des SDS, während die Plasmide in Lösung bleiben. Ein

zweiter nützlicher Effekt ist, dass nach Abtrennung dieser Komponenten voneinander (durch Zentrifugation) diese Salzkonzentration genutzt werden kann, um die Plasmid-DNA an eine Silicagel-Oberfläche zu adsorbieren (HAMAGUCHI und GEIDUSCHEK, 1962; VOGELSTEIN und GILLESPIE, 1979). Nach dem Waschen der Säule mit einem Isopropanol-haltigen Puffer können die DNA-Moleküle mit TE-Puffer oder *Aqua bidest.* eluiert werden. Alle benötigten Materialien und Puffer waren Bestandteile der Kits. Ferner wurden alle Zentrifugationen, sofern nicht anders beschrieben, bei 10.000 x g und RT durchgeführt.

### 3.15.11.1 Mini (Spin)-Plasmidpräparation

2 ml einer Suspensionskultur (s. Kap. 3.15.10.1) wurden zunächst für 5 min bei 1.500 x g und 4°C zentrifugiert und die pelletierten Zellen anschließend mit 250 µl an RNase A-haltigen Puffer P1 resuspendiert. Danach wurden 250 µl P2-Puffer zugegeben, das Reaktionsgefäß 5 x vorsichtig invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nachdem 350 µl eisgekühlter Bindepuffer (P3) hinzugefügt und erneut vorsichtig invertiert wurde, schloss sich eine 5minütige Inkubation auf Eis an. Nach einer Zentrifugation für 10 min wurde der Plasmid-haltige Überstand auf eine Säule gegeben und für 1 min zentrifugiert, wobei der Durchfluß verworfen wurde. Anschließend wurden auf die Säule 700 µl des Waschpuffers P5 aufgetragen und wiederum 1 min zentrifugiert. Nach einer weiteren 1minütigen Zentrifugation zum Trocknen der Säule wurde durch Zugabe von 50 µl TE-Puffer oder *Aqua bidest.* und einer erneuten Zentrifugation die DNA eluiert und nachfolgend deren Konzentration photometrisch bestimmt (s. Kap. 3.15.13).

### 3.15.11.2 Midi-Plasmidpräparation

5 ml einer Suspensionskultur (s. Kap. 3.15.10.1) wurden zunächst für 8 h bei 37°C und 250 Upm inkubiert, anschließend 1:1000 in 25 ml LB/Ampicillin-Medium verdünnt und weiter über Nacht kultiviert. Die Zellen der gesamten Kultur wurden dann durch eine Zentrifugation bei 6.000 x g für 15 min bei 4°C pelletiert und ferner in 4 ml P1-Puffer resuspendiert. Dann wurden 4 ml Lysispuffer (P2) zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Nachdem 4 ml eisgekühlter P3-Puffer zugefügt und der Ansatz vorsichtig 5 x invertiert wurde, wurde die Suspension in eine QIAfilter-Midi Cartridge gegossen und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde sie auf eine, zuvor mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte, QIAGEN tip100-Säule gegeben. Nachdem das gesamte Lysat durch die Säule gelaufen war, wurde sie 2 x mit je 10 ml QC-Puffer gewaschen und dann mit 5 ml QF-Puffer eluiert. Danach wurde die DNA durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol gefällt und für 30 min bei 4°C und 15.000 x g

zentrifugiert. Das DNA-reiche Pellet wurde daraufhin mit 2 ml an 70 %igen Ethanol gewaschen, erneut bei 15.000 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert, danach für 5-10 min bei RT getrocknet und anschließend in einem angemessenen Volumen an TE-Puffer oder *Aqua bidest.* aufgenommen. Dann folgte die photometrische Bestimmung der DNA-Ausbeute (s. Kap. 3.15.13).

### **3.15.12 Präparation und Weiterbehandlung genomischer DNA**

#### **3.15.12.1 Präparation genomischer DNA aus *S. domuncula***

Um genomische DNA aus dem Schwamm zu isolieren, muss das Gewebe vorher mechanisch dissoziiert und die einzelnen Zellen mit einem Lysispuffer aufgeschlossen werden. Die dadurch freigesetzte DNA kann anschließend aufgereinigt und konzentriert werden. In dieser Arbeit wurde diesbezüglich ein leicht modifiziertes Protokoll der Firma QIAGEN gewählt. Zur Aufreinigung der genomischen DNA wurde der QIAGEN Genomic DNA Purification Kit verwendet, der alle benutzten Materialien und Puffer enthielt.

Frischgewebe von *S. domuncula* (5 g) wurde mit einem Skalpell abgetrennt und nach kurzem Waschen in *Aqua dest.* sofort in fl. Stickstoff überführt. Die tiefgefrorenen Gewebestücke wurden danach in einem ebenfalls mit fl. Stickstoff tiefgekühlten Mörser zu feinem Pulver zerrieben. Anschließend wurden 19 ml Lysispuffer G2 sowie 1 ml Proteaselösung (20 mg/ml) hinzugefügt und vorsichtig gevortext. Nach einer 2stündigen Inkubation bei 50°C wurde die Suspension, um grobe Partikel zu entfernen, für 10 min bei 5.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Lysatüberstand wurde dann auf eine, zuvor mit 10 ml QBT-Puffer äquilibrierte, QIAGEN Genomic Tip 500/G-Säule gegeben. Dabei wurde die DNA unter dem in Kap. 3.15.3 und 3.15.11 erwähnten Prinzip an eine Silicagel-Oberfläche gebunden. Die Säule wurde dann 2 x mit jeweils 15 ml QC-Puffer gewaschen und die DNA anschließend mit dem gleichen Volumen an QF-Puffer eluiert. Durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol wurde die DNA gefällt und bei 8.000 x g und 4°C für 20 min zentrifugiert. Das DNA-haltige Pellet wurde nach dem Dekantieren des Überstandes noch mit 70 %igen Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert sowie anschließend mit TE-Puffer aufgenommen. Die Ausbeute der DNA wurde daraufhin photometrisch bestimmt (s. Kap. 3.15.13) und die DNA-Qualität durch ein analytisches Gel (s. Kap. 3.15.12.2) überprüft.

### 3.15.12.2 Analytisches Gel

Dafür wurden 3 µg der isolierten genomischen DNA auf ein 0,5 %iges Agarosegel aufgetragen, bei 0,8 V/cm über Nacht aufgetrennt (s. Kap. 3.15.2.1) und mit Ethidiumbromid nachgewiesen (s. Kap. 3.15.2.2). Als Standard diente der High Molecular Weight Marker.

### 3.15.12.3 Sonifizierung genomischer DNA für eine nachfolgende PCR-Amplifikation

In vielen Fällen sind für anschließende PCR-Amplifikationen genomische DNA-Bruchstücke von geringen Größen (1-50 kB) effizientere Matrizen als längere Fragmente ( $\geq 50$  kB). Unter Berücksichtigung dieser Tatsache wurde ein Teil der isolierten DNA (s. Kap. 3.15.12.1) für 30 sec auf der Stufe 1 des Sonifizierers B12/15 geschert.

### 3.15.13 Messung der Konzentration und Reinheit einer Nukleinsäurelösung

Die Nukleinsäurekonzentration lässt sich mit Hilfe der UV-Absorptionsspektroskopie sehr genau ermitteln. Dabei ist die Menge der, von der Nukleinsäure absorbierten, UV-Strahlung proportional zu dem Gehalt der DNA, bzw. RNA, in der Lösung. Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht ein Absorptionswert von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml RNA (AUSUBEL *et al.*, 1987-2000). Anhand der UV-Spektroskopie lässt sich auch die Reinheit einer Nukleinsäurelösung kontrollieren, dabei liegt bei reinen Proben das Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm bei ca. 1,8. Geringere Relationen weisen auf Verunreinigungen, z. B. durch Proteine, hin.

Alle Messungen wurden mit dem Spektralphotometer Genequant II durchgeführt. 100 µl einer 1:20 oder 1:50 verdünnten Nukleinsäurelösung wurden in die Quarzküvette QS 1.000 pipettiert und die Absorptionen bei 260 und 280 nm gemessen. Das Gerät war so programmiert, dass es sowohl die Konzentration als auch die Reinheit der DNA/RNA angeben konnte.

### 3.15.14 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die DNA-Sequenzierung ist eine Methode, um die Nukleotidabfolge in einem DNA-Bereich zu ermitteln. Die Sequenzierung der, in Vektoren inklonierten, DNA-Fragmente erfolgte anhand der Didesoxy-Methode nach SANGER *et al.* (1977). Bei dieser Kettenabbruch-

Methode bindet ein markierter Primer an die einzelsträngige DNA-Matrize und dient als Ausgangspunkt für die Synthese des komplementären Strangs durch eine geeignete DNA-Polymerase in Anwesenheit der 4 dNTPs. Im Gegensatz zur üblichen PCR (s. Kap. 3.15.1) wird bei dieser zyklischen Sequenzierung jedoch nur ein Primer eingesetzt. Dieser Umstand führt lediglich zu einer linearen Amplifizierung der Matrize. Außerdem befindet sich in jedem der 4 parallelen Reaktionsansätze einer DNA-Matrize jeweils eins der insgesamt 4 möglichen Didesoxynukleotide (ddNTPs). Der Einbau dieser dNTP-Analoga führt zu einem Abbruch des weiteren Wachstums der Polynukleotidkette, da ihnen das 3'-Hydroxylende fehlt, um die nächste Phosphodiesterbindung zu knüpfen. So entstehen Fragmente verschiedener Länge mit je einem ddNTP am 3'-Ende. Die DNA-Doppelstränge der 4 Ansätze werden dann durch Hitze denaturiert, getrennt nebeneinander auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und unter Hochspannung ihrer Länge nach aufgetrennt. Bei der Sequenzierung wurde der automatische DNA-Sequenzierer LI-COR 4200L benutzt. Dieser Apparat kann anhand eines eingebauten Lasers, der die gesamte Breite eines Gels in regelmäßigen Abständen erfasst, den IRD800-Farbstoff der Primer (als Bestandteil der DNA-Ketten) anregen, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu emittieren. Die ausgesendete Strahlung wird wiederum durch einen Scanner erfasst, der seinerseits die Informationen an einen Computer weiterleitet. Mit der entsprechenden Software (Image Collection) kann daraufhin ein Bild des gesamten Gels erstellt werden.

#### 3.15.14.1 Gießen der Sequenziergele

Zum Gießen der Sequenziergele wurde die Zweikomponentenlösung Sequagel XR der Firma BIOZYM verwendet, wobei 24 ml der Komponente I und 6 ml der Komponente II miteinander vermischt und anschließend durch einen Sterilfilter (0,2 µm) von Partikeln gereinigt wurden. Danach wurden 175 µl 10 %iges APS zugegeben und die Gellösung sofort zwischen 2, zuvor gründlich mit *Aqua bidest.* und Isopropanol gereinigten, Glassplatten gegossen. Zuletzt wurde der Vorkamm in das noch flüssige Gel gesteckt und fixiert. Die Polymerisationszeit betrug mindestens 2-3 h.

#### 3.15.14.2 Die Sequenzierreaktion

Für die zyklische Sequenzierung wurde in der Regel der Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP verwendet. Dieser beinhaltet alle nötigen Reagenzien für die Kettenabbruchreaktion bis auf die DNA-Matrize und den

gelabelten Primer. Das im Kit anstelle von dGTP enthaltende 7-deaza-dGTP soll Kompressionen, die während des Gellaufs erfolgen können, verhindern.

Ein Sequenzierreaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

1,3	µg	DNA
1	µl	IRD800 gelabelter Primer (2 pmol/µl)
x	µl	<i>Aqua bidest.</i>
19	µl	

Jeweils 4,5 µl dieser DNA/Primer-Mischung wurden auf insgesamt 4 verschiedene Ansätze verteilt und mit je 1,5 µl von einem der 4 Terminationsmixe A, C, G, T versetzt (in 0,2 ml Microstrip tubes).

Um jedoch schwierige DNA-Matrizen mit inversen oder tandemartigen Wiederholungen sowie Regionen mit hohem G/C-Gehalt zu sequenzieren, wurde der SequiTherm EXCEL™ II DNA Sequencing Kit verwendet. Dieser Kit enthielt ebenfalls alle notwendigen Komponenten für die Kettenabbruchreaktion.

Es wurden dabei folgende Reagenzien zusammengegeben:

1	µg	DNA
1	µl	IRD800 gelabelter Primer (2 pmol/µl)
7,2	µl	SequiTherm EXCEL II Sequencing Buffer
1	µl	SequiTherm EXCEL II DNA Polymerase (5 U/µl)
x	µl	<i>Aqua bidest.</i>
17	µl	

Jeweils 4 µl dieser DNA/Primer-Mischung wurden auf 4 verschiedene Ansätze verteilt und mit je 2 µl von einem der 4 Terminationsmixe A, C, G, T versetzt (in 0,2 ml Microstrip tubes).

Die sich anschließende PCR wurde in dem Thermocycler Touchdown mit folgenden Temperaturzyklen durchgeführt:

Schritt 1:	3 min	95°C	initiale Denaturierung der DNA-Matrize
Zyklen 1-30:	30 sec	95°C	Denaturierung der DNA-Doppelstränge
	30 sec	T <sub>m</sub>	Annaeling der Primer
	60 sec	70°C	Elongation der Primer entlang der Matrize

Anschließend wurden die Reaktionsansätze zur Denaturierung erneut bei 95°C für 2 min inkubiert, sofort auf Eis gestellt und mit je 3 µl Stop-Puffer vereinigt.

**Stop-Puffer**

95	% (v/v)	Formamid
0,1	% (w/v)	Xylencyanol
0,1	% (w/v)	Bromphenolblau
10	mM	EDTA

**3.15.14.3 Auftragung der Proben und Gellauf**

Nach der Polymerisation des Acrylamidgels wurde der Vorkamm vorsichtig entfernt, die entstandene Tasche von Gelresten befreit und die eingespannten Glasplatten mit dem Gel in eine dafür vorgesehene Vorrichtung des Sequenziererapparats eingehängt. Anschließend wurde ein 45minütiger Vorlauf mit frisch hergestellten 1 x TBE-Puffer (s. Kap. 3.15.2.1) bei 50°C und 1.500 V begonnen, der zur Äquilibration des Gels diente. Nachdem ein sog. Haifischzahnkamm in das Gel gesteckt wurde, erfolgte die Pipettierung von 1,3 µl der abgestoppten Reaktionsansätze (s. Kap. 3.15.14.2) A,C,G,T direkt nebeneinander in die Taschen. Die nachfolgende Elektrophorese (gleiche Bedingungen wie im Vorlauf) lief 6-7 h unter der Kontrolle des BaseImagerIR/Data Collection V02.31 Programms.

**3.15.14.4 Auswertung der Sequenziergele**

Die gespeicherten Bildinformationen wurden mittels einer geeigneten Software (BaseImagerIR/Image Analysis V4) automatisch bearbeitet. Die resultierenden Sequenzen wurden dann nochmal manuell kontrolliert sowie gegebenenfalls korrigiert und abschließend im FASTA-Format gespeichert, damit sie für eine Bearbeitung mit nachfolgenden Programmen oder Online-Diensten (s. Kap. 3.14) zur Verfügung stehen konnten.

**3.16 RNA-Techniken****3.16.1 DMPC-Behandlung von Lösungen und Verbrauchsmaterialien**

Bei Arbeiten mit RNA ist es unbedingt notwendig, vorher alle Lösungen und Materialien, die mit der RNA in Kontakt treten, mit einem RNase-Inhibitor wie Dimethylpyrocarbonat (DMPC) zu behandeln. DMPC bindet kovalent an Tyrosin- und Histidinresten der RNAsen und zerstört infolgedessen deren Struktur (LEONARD *et al.*, 1970).

Zur Herstellung von RNase-freiem Wasser wurde *Aqua bidest.* mit 0,1 % (v/v) DMPC versetzt und 30 min gerührt. Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit diesem

DMPC-H<sub>2</sub>O hergestellt, sowie alle unsterilen Verbrauchsmaterialien damit behandelt. Nach einer Inkubation über Nacht wurden sie 1 h autoklaviert.

### 3.16.2 RNA-Präparation aus *S. domuncula* mittels TRIzol<sup>®</sup>-Reagenz

TRIzol<sup>®</sup> der Firma LIFE TECHNOLOGIES ist ein aus einer monophasischen Lösung von Phenol und Chloroform bestehendes Reagenz zur Isolierung von Total-RNA aus Zellen und Gewebe. Bei dem von CHOMOCZYNSKI und SACCHI (1987) entwickelten Verfahren stellt das TRIzol<sup>®</sup> während der Homogenisierung und Lyse die Integrität der RNA sicher. Alle Zentrifugationen erfolgten bei 12.000 x g und 4°C.

Zur Isolierung der Total-RNA wurde dem Schwamm 1 g Frischgewicht mit einem Skalpell abgetrennt, kurz in *Aqua dest.* gespült und sofort in fl. Stickstoff überführt. Anschließend wurde das tiefgefrorene Gewebe mit einem gekühlten Mörser zu feinem Pulver zerrieben und dann in 6 ml TRIzol<sup>®</sup>-Reagenz aufgenommen. Nach gründlichem Vortexen und einer 5minütigen Inkubation bei RT wurde das Homogenisat 10 min zentrifugiert und der Überstand in 6 Fraktionen zu je 1 ml aliquotiert. In jedes Aliquot wurden daraufhin 200µl Chloroform gegeben und nach kurzem Vortexen diese Ansätze 3 min bei RT inkubiert. Im Anschluss an eine 15minütige Zentrifugation wurde die wässrige RNA-haltige Phase abgenommen, erneut in 6 gleiche Fraktionen aufgeteilt und mit jeweils 0,5 ml Isopropanol versetzt (zum Fällen der RNA). Nach kurzem Vortexen wurden die Proben für 10 min bei RT inkubiert und anschließend 10 min zentrifugiert. Dann wurde das RNA-haltige Pellet mit 75 %igen Ethanol gewaschen und in einem geeigneten Volumen von DMPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Anschließend konnte die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA bestimmt (s. Kap. 3.15.13) sowie deren Qualität elektrophoretisch überprüft werden (s. Kap. 3.16.3.1).

### 3.16.3 RNA-Gelelektrophorese

Die RNA lässt sich analog zur DNA in einem elektrischen Feld mittels einer vernetzten, inertten Matrix der Größe nach auftrennen. Um jedoch Sekundärstrukturen einzelsträngiger RNA zu verhindern, müssen denaturierende Reagenzien, wie z. B. Formaldehyd, dem Agarosegel zugefügt werden (LEHRBACH *et al.*, 1977).

### 3.16.3.1 Analytische RNA-Agarosegele

Um für einen Northern Blot (s. Kap. 3.16.4) zunächst die isolierte Total-RNA (s. Kap. 3.16.2) zu separieren, bzw. um die Qualität der RNA-Präparation zu überprüfen (s. Kap. 3.16.3.2), wurden 1 %ige Agarosegele angefertigt. Damit die Elektrophoresekammer und der Kamm von RNAsen befreit wurden, wurden sie über Nacht in eine 1 %ige (w/v) SDS-Lösung gelegt und vor der Verwendung mit DMPC-H<sub>2</sub>O und Isopropanol abgespült. Anschließend wurden 0,5 g Agarose in 5 ml 10 x MOPS-Puffer und 42,3 ml DMPC-H<sub>2</sub>O aufgekocht, nach dem Abkühlen auf 50°C mit 2,7 ml deionisierten Formaldehyd vermischt und danach in die Gelform gegossen. Für einen nachfolgenden Northern Blot wurden 7,5 µg (für eine Überprüfung der Qualität der isolierten RNA wurden lediglich 2,5 µg) der Total-RNA und 30 ng der Marker-RNA mit dem 4 x Probenpuffer im Verhältnis 3:1 vermischt, bei 65°C für 15 min erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt. Nach dem Abkühlen konnten diese Proben in die Geltaschen pipettiert werden. Die Elektrophorese erfolgte bei 3 V pro cm Abstand der Elektroden in Gegenwart von 1 x MOPS-Puffer.

#### 10 x MOPS-Puffer (pH 7,0)

200 mM MOPS  
50 mM Natriumacetat  
10 mM EDTA

#### 4 x Probenpuffer

45,5 % (v/v) deionisiertes Formamid  
15 % (v/v) deionisiertes Formaldehyd  
10 % (v/v) 10 x MOPS  
10 % (v/v) Glycerin  
0,1 % (w/v) Bromphenolblau

#### deionisiertes Formaldehyd oder Formamid

100 ml Formaldehyd oder Formamid 30 min mit 5 g Ionenaustauscher Resin AG<sup>®</sup> 501-X8 (BIORAD) rühren.

### 3.16.3.2 Detektion aufgetrennter RNA mit Toluidinblau

Im Anschluss an die Elektrophorese (s. Kap. 3.16.3.1) wurden die Gele für 10 min in eine Toluidinblaulösung gelegt und anschließend über Nacht in DMPC-H<sub>2</sub>O entfärbt. Danach konnte die ribosomale RNA identifiziert und somit die Qualität der präparierten Total-RNA überprüft werden.

#### Toluidinblaulösung

1 % (w/v) Toluidinblau  
40 % (v/v) Methanol

### 3.16.4 Northern Blot

Bei dieser Technik wird die zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennte RNA auf ein geeignetes Trägermaterial transferiert und anschließend immobilisiert (ALWINE *et al.*, 1977). Der Northern Blot erlaubt in Kombination mit der Hybridisierung einer DNA-Sonde eine Identifikation und Größenbestimmung der RNA-Transkripte.

#### 3.16.4.1 Kapillartransfer und Immobilisierung der RNA

Nach der Elektrophorese (s. Kap. 3.16.3.1) wurde das Gel mit der Unterseite nach oben auf ein zuvor zurechtgeschnittenes Elektrodenpapier, welches mit seinen Enden in beide Reservoirs einer Elektrophoresekammer reichte, gelegt. Anschließend wurde eine positiv geladene Nylonmembran der gleichen Größe des Gels auf selbiges platziert, mit 2 weiteren Lagen Elektrodenpapier überdeckt und mit einem 8-10 cm hohen Stapel aus Papierfalt- handtüchern überschichtet. Nachdem die Reservoirs mit 20 x SSC-Puffer befüllt waren, wurde die Apparatur mit Frischhaltefolie versiegelt und mit einem Gewicht gleichmäßig beschwert. Der Kapillartransfer fand über Nacht statt. Danach wurde die Membran kurz getrocknet und die RNA durch UV-Strahlung mit einer Energie von 900  $\mu$ J auf ihr fixiert (Crosslinking).

#### 3.16.4.2 Detektion immobilisierter RNA mit Methylenblau

Zur Detektion aufgetrennter und immobilisierter Total-RNA sowie zum Visualisieren des nicht gelabelten RNA Molecular Weight Marker I wurde die Membran nach dem Immobilisieren (s. Kap. 3.16.4.1) kurz in 1 x SSPE-Puffer angefeuchtet und daraufhin für 10 min in eine Methylenblaulösung gelegt. Das Entfärben erfolgte durch eine 15minütige Inkubation in 1 x SSPE-Puffer.

##### 20 x SSPE-Puffer (pH 7,4)

3	M	NaCl
200	mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
20	mM	EDTA

##### Methylenblaulösung

0,02	% (w/v)	Methylenblau
50	mM	Natriumacetat, pH 5,2

### 3.16.4.3 DIG-Markierung der DNA-Sonden

Die Markierung der DNA-Sonden erfolgte mit Hilfe des PCR-DIG Probe Synthesis Kits, dessen Prinzip auf einem Einbau DIG-markierter Nukleotide während einer PCR-Reaktion (s. Kap. 3.15.1) beruht.

Für die Markierungsreaktionen wurden folgende Komponenten in einem 0,2 ml Microstrip tube zusammengegeben:

31,2	µl	steriles <i>Aqua bidest.</i>
5	µl	10 x PCR-Puffer
5	µl	dNTP-Mix
5	µl	PCR DIG Probe Synthesis Mix
1	µl	Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)
1	µl	Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)
1	µl	Matrize (entsprechend 10 pg Plasmid-DNA)
0,8	µl	Expand High Fidelity (3,5 U/µl)
50	µl	

Die PCR wurde in dem Thermocycler Touchdown mit folgenden Temperaturzyklen durchgeführt:

Schritt 1:	3 min	95°C	initiale Denaturierung der DNA-Matrize
Zyklen 1-35:	30 sec	95°C	Denaturierung der DNA-Doppelstränge
	30 sec	T <sub>m</sub>	Anneling der Primer
	4 min	72°C	Elongation der Primer entlang der Matrize

Abschließend erfolgte ein Elongationsschritt bei 72°C für 20 min. Danach wurde der PCR-Ansatz aufgereinigt (s. Kap. 3.15.3).

### 3.16.4.4 Hybridisierung und Detektion mit CDP-Star™

Im Anschluss an einen Kapillartransfer und einer Immobilisierung der RNA auf der positiv geladenen Nylonmembran (s. Kap. 3.16.4.1) erfolgte die Inkubation des Blots mit vorgewärmter Hybridisierungslösung (1 ml/5 cm<sup>2</sup>, 2 h, 42°C) in einem beheizbaren Wasserbad. Die aufgereinigte DNA-Sonde (s. Kap. 3.16.4.3) wurde währenddessen für 10 min bei 95°C denaturiert, sofort auf Eis gestellt und danach in einer Konzentration von 2 µl/ml in die Membran umgebende Hybridisierungslösung pipettiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C. Danach wurde die Membran 2 x 5 min mit 2 x SSC-Puffer, 0,1 % (w/v) SDS bei RT und 2 x 15 min mit 0,1 x SSC-Puffer, 0,1 % (w/v) SDS bei 42°C gewaschen (Stringenzwaschen). Nach einer kurzen Äquilibration in P1-Puffer erfolgte eine 30minütige Blockie-

rung in P2-Puffer, worauf sich eine 60minütige Inkubation mit 1:10.000 in P2-Puffer verdünnten und mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Anti-Digoxigenin Antikörper anschloss. Unspezifisch gebundener Antikörper wurde dann durch 2maliges Waschen mit P1-Puffer, 0,1 % (v/v) Tween 20 entfernt. Im Anschluss an ein kurzes Äquilibrieren der Membran in P3-Puffer wurde selbige kurz getrocknet und dann für 2 min mit 1 ml des Chemolumineszenzsubstrats CDP-Star™ ready to use (ROCHE DIAGNOSTICS) inkubiert. Danach wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und mit dem für Chemolumineszenz empfindlichen Röntgenfilm New RX in eine lichtundurchlässige Kassette gelegt. Die Expositionszeit richtete sich nach der Stärke des Signals und konnte im Zeitraum von einer bis mehreren Minuten liegen.

**20 x SSC-Puffer (pH 7,0)**

3 M NaCl  
300 mM Natriumcitrat

**P1-Puffer (pH 7,5)**

100 mM Maleinsäure  
150 mM NaCl

**High-SDS-Hybridisierungs-Puffer (in 5 x SSC)**

7 % (w/v) SDS  
50 % (v/v) deionisiertes Formamid  
0,1 % (w/v) N-Laurylsarcosin  
2 % (v/v) Blockingreagenz  
50 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0

**P2-Puffer**

10 % (w/v) Blockingreagenz in P1-Puffer

**P3-Puffer**

100 mM NaCl  
100 mM Tris-HCl, pH 9,5

### 3.16.5 Reverse Transkription von mRNA mit nachfolgender PCR

Durch eine Reverse Transkription unter Verwendung von Oligo(dT)-Primern kann eukaryotische Poly(A)-mRNA in ihre komplementäre, einzelsträngige DNA (cDNA) konvertiert werden. Diese cDNA lässt sich daraufhin mit genspezifischen Vorwärts- und Rückwärts-Primern durch eine PCR amplifizieren. Diese beiden Schritte werden zusammengefasst als *RT-PCR* bezeichnet. In dieser Arbeit wurde im ersten Schritt als Reverse Transkriptase die Superscript™ II des Kits SUPERSCRIPT™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (der zudem alle weiteren benötigten Reagenzien enthielt) verwendet. Bei der darauffolgenden PCR kam eine übliche *Taq*-Polymerase zum Einsatz.

Zu 5 µg Total-RNA wurden 0,5 µg Oligo(dT)-Primer gegeben und mit DMPC-H<sub>2</sub>O auf 12 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 10 min bei 70°C wurde der Ansatz für 1 min auf Eis gestellt und anschließend mit 7 µl eines Reaktionsgemischs vermengt. Dieses enthielt folgende Komponenten: 2 µl 10 x PCR-Puffer, 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und 2 µl DTT (0,1 M). Im Anschluss an eine 5minütige Inkubation bei 42°C wurden 200 U Superscript™ II zugegeben und bei 42°C 50 min inkubiert. Nach einer 15minütigen Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase bei 70°C konnte die so gewonnene cDNA als Matrize für eine PCR (s. Kap. 3.15.1) eingesetzt werden.

## 3.17 Hefekulturen

### 3.17.1 Kultivierung der Hefe

Hefe kann analog zu *E. coli* in flüssigen Medien sowie auf der Oberfläche von Agar-Platten wachsen. Dabei wird sie entweder routinemäßig in Yeast Extract, Peptone, Dextrose (YEPD)-Medium oder im Fall einer Selektion von Transformanten in einem synthetischen Komplett (SK)-Medium bei 30°C kultiviert (GUTHRIE und FINK, 1991; AUSUBEL *et al.*, 1987-2000). Diese Medien (s. Kap. 3.12) enthalten alle notwendigen Nährstoffe und Salze, damit die Zellen optimal wachsen und sich teilen können.

#### 3.17.1.1 Zellausstrich auf Agar-Platten („working stock Platten“)

Von den zuvor angefertigten Agar-Platten wurden Hefezellen eines Klons mit einer sterilen Impföse abgenommen und auf neuen YEPD- oder SK-Ura-Platten (s. Kap. 3.12) ausgestrichen. Nach einer 4-5tägigen Inkubation im Brutschrank bei 30°C wurden die Platten herausgenommen, mit Parafilm versiegelt und bis zum weiteren Gebrauch oder einem erneuten Zellausstrich bei 4°C gelagert (maximal 6 Wochen). Die auf diesen „working stock Platten“ befindlichen Klone konnten innerhalb des angegebenen Zeitraums jederzeit in/auf frischen Medium/Platten weiterkultiviert werden.

#### 3.17.1.2 Die Suspensionskultur

Die Zellen eines Hefeklons wurden ausgehend von „working stock Platten“ (s. Kap. 3.17.1.1) oder Glycerinstocks (s. Kap. 3.17.1.4) in 7 ml YEPD- oder SK-Ura-Medium inokuliert und bei 30°C und 300 Upm kultiviert, bis die entsprechende Zelldichte (s. Kap. 3.17.1.3) erreicht wurde.

#### 3.17.1.3 Messung der optischen Dichte einer Hefekultur

Das Wachstum einer Hefekultur kann verfolgt werden, indem die optische Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) gemessen wird. Dabei wird die zu bestimmende Probe einer Suspensionskultur in den Strahlengang eines Photometers gegeben und mit Licht einer Wellenlänge von 600 nm durchstrahlt. Die Lichtmenge, die durch die Kultur dringt, wird erfasst und die optische

Dichte (Absorption) berechnet. Bei 600 nm entspricht eine OD-Einheit von *S. cerevisiae* etwa  $3 \times 10^7$  Zellen/ml (AUSUBEL *et al.*, 1987-2000).

Zur Bestimmung der optischen Dichte wurde das Spektralphotometer SmartSpec™ 3000 verwendet. Dabei wurden 100 µl der zu messenden Kultur entnommen, in eine Quarzküvette pipettiert und die OD<sub>600</sub> gemessen. Als Referenzwert diente das zur Kultivierung verwendete Medium.

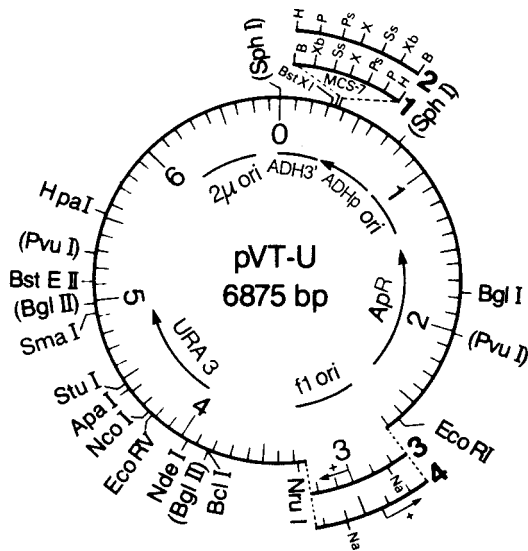
#### 3.17.1.4 Herstellung der Glycerinstocks

Hefezellen können in Gegenwart von 15 % Glycerin und Temperaturen unterhalb -60°C für länger als 5 Jahre präserviert werden (GUTHRIE und FINK, 1991; AUSUBEL *et al.*, 1987-2000).

1 ml einer 16-18 h alten (mittlere logarithmische Phase,  $\sim 1-5 \times 10^7$  Zellen/ml) Suspensionskultur (s. Kap. 2.17.1.2) wurde mit 450 µl einer Glycerin/Kulturmedium (1:1)-Mischung versetzt, gevortext sowie sofort in fl. Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte anschließend bei -80°C.

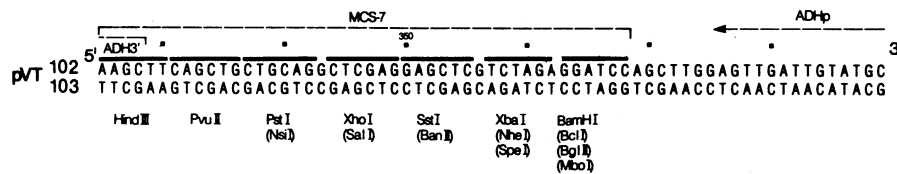
#### 3.17.2 Konstruktion der rekombinanten *pVT103-U* Vektoren

Hefevektoren können abhängig von der Art ihrer Replikation in die 5 folgenden Gruppen eingeteilt werden: [1] yeast integrating plasmids (YIp), [2] yeast linear plasmids (YLp), [3] yeast replicating plasmids (YRp), [4] yeast centromere plasmids (YCp) und [5] yeast episomal plasmids (YEp). Bis auf die YLp stammen alle von ihrem konstruktionalen Ursprung von Bakterienplasmiden ab und können aufgrund dessen sowohl in *E. coli* als auch in Hefe gehalten und repliziert werden (Shuttle-Vektoren) (GUTHRIE und FINK, 1991; AUSUBEL *et al.*, 1987-2000). Demzufolge tragen diese Vektoren auch 2 für die Selektion geeignete Gene. Das eine vermittelt dabei eine Antibiotikaresistenz zur Selektion von *E. coli* (in der Regel *Amp<sup>r</sup>*), während das andere, ein dominantes Hefegen, das auch als rezessive Nullmutation im Hefegenom präsent ist, zur Selektion von Hefezellen genutzt werden kann. Der in dieser Arbeit verwendete Shuttle-Vektor *pVT103-U* (s. Abb. 3.1A/B) (VERNET *et al.*, 1987) gehört zur Klasse der YEp, deren Mitglieder sich durch eine hohe Anzahl in der Hefezelle (20-50 Kopien) und somit auch durch eine hohe mitotische Stabilität auszeichnen. Dies ist zurückzuführen auf die Präsenz des 2 µ Origin (2 µ ori), das eine autonome, extrachromosomale Replikation des Plasmids in der Hefezelle vermittelt. Die durch den *ADHI*-Promotor (*ADHp*) gesteuerte Transkription gewährleistet eine konstitutive Expression des rekombinanten Proteins (VERNET *et al.*, 1987).



**Abb. 3.1A:**

Physikalische und genetische Karte des pVT103-U Shuttle-Vektors (nach Vernet et al., 1987). Das E. coli ori, das 2  $\mu$  ori und das Phagen f1 ori sind dargestellt. Ebenso ist die Position der Gene URA3 und  $\beta$ -Lactamase ( $Ap^R$ ) sowie die Richtung ihrer Transkription und außerdem die Orientierung des ADHp sowie die Position der ADH 3'-Sequenz aufgezeigt. Angegeben ist ferner die Lage der MCS und die zur Verfügung stehenden Restriktionsschnittstellen des Vektors.



**Abb. 3.1B:**

Sequenz und Orientierung der MCS des pVT103-U Shuttle-Vektors (nach Vernet et al., 1987).

Für die Expression des JNK- und p38-Proteins aus *S. domuncula* (JNK\_SD und p38\_SD) sowie des HOG1-Proteins aus *S. cerevisiae* in der *HOG1-Δ1*-Nullmutante (s. Kap. 3.10) wurden folgende cDNA-Intervalle von *SDJNK*: [-6]-[+1123], *SDp38*: [-3]-[+1117] und *HOG1*: [+1]-[+1308], die jeweils den gesamten kodierenden Bereich der Sequenz entsprechen, mit den im Kap. 3.13.4 angegebenen Primern per PCR (s. Kap. 3.15.1) amplifiziert. Dabei diente die cDNA-Bibliothek von *S. domuncula* (s. Kap. 3.8) als Matrize zur Amplifikation der beiden *SAPKs* des Schwamms, während für die Vervielfältigung des *HOG1*-Gens das Plasmid *pJB30* (BREWSTER et al., 1993) verwendet wurde. Aufgrund der Konstruktion der Rückwärtsprimer sollten Fusionsproteine mit einem C-terminalen 6 x Histag exprimiert werden. Nach der Aufreinigung der PCR-Produkte (s. Kap. 3.15.3) wurden diese über T-A-Cloning mit dem *pGEM<sup>®</sup>-T* Vektor ligiert (s. Kap. 3.15.5.1) sowie daraufhin Epicurian Coli<sup>®</sup> XL1-Blue Supercompetent Cells mit den Konstrukten transformiert (s. Kap. 3.15.7.3) und schließlich auf LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal-Platten (s. Kap. 3.11) ausplattiert. Mittels der Blau-Weiß-Selektion (s. Kap. 3.15.8) wurden die Klone identifiziert und mit einer Checking-PCR (s. Kap. 3.15.9) die Größe der klonierten DNA-Inserts festgestellt. Die positiven Klone mit der richtigen Größe der Inserte wurden in LB/Ampicillin-Medium über Nacht kultiviert (s. Kap. 3.15.10.1). Im Anschluss an eine Mini-Plasmidpräparation (s. Kap. 3.15.11.1) wurden die klonierten PCR-Fragmente sequenziert (s. Kap. 3.15.14) und dadurch

auf ihre Korrektheit überprüft. Die positiven, rekombinanten *pGEM<sup>®</sup>-T* Plasmide wurden dann mit *BamHI* verdaut (s. Kap. 3.15.6.1) und das herausgeschnittene DNA-Insert in einem präparativen Agarosegel (s. Kap. 3.15.2.1) isoliert, anschließend eluiert (s. Kap. 3.15.4) und mit dem ebenfalls *BamHI*-behandelten, dephosphorylierten (s. Kap. 3.15.6.2) *pVT103-U* Vektor ligiert (s. Kap. 3.15.5.2). Epicurian Coli<sup>®</sup> XL1-Blue Supercompetent Cells wurden daraufhin mit diesen rekombinanten Shuttle-Vektoren transformiert und die Transformanten auf LB/Ampicillin-Platten selektiert (s. Kap. 3.15.7.3) sowie anschließend mittels Checking-PCR (s. Kap. 3.15.9) überprüft. Die Klone mit der korrekten Größe der DNA-Inserts wurden dann in LB/Ampicillin kultiviert (s. Kap. 3.15.10.1) und ihre Vektoren mit einer Mini-Plasmidpräparation (s. Kap. 3.15.11.1) isoliert. Die Orientierung der einligierten DNA-Fragmente sowie die Richtigkeit ihrer Nukleotidabfolge wurden anhand einer erneuten Sequenzierung (s. Kap. 3.15.14) untersucht. Die *pVT103-U* Vektoren, die *HOG1* in der richtigen Leserichtung (5'→3') enthielten, wurden mit *pVT103-U+HOG1-sense* bezeichnet, während diejenigen, die *SDJNK* oder *SDp38* in der korrekten/reversen Leserichtung beinhalteten, mit *pVT103-U+SDJNK-sense/-antisense* oder *pVT103-U+SDp38-sense/-antisense* benannt wurden. Von den einwandfreien Klonen wurden schließlich Glycerinstocks (s. Kap. 3.15.10.2) angefertigt.

### 3.17.3 Transformation von Hefe

Plasmide können anhand der Elektroporation (MEILHOC *et al.*, 1990), der Spheroplast-Transformation (HINNEN *et al.*, 1978) oder der Lithiumacetat-Transformation (ITO *et al.*, 1983) in Hefezellen eingeschleust werden. Die Lithiumacetat-Methode stellt die am häufigsten angewandte Technik dar, bei der durch die Anwesenheit von Lithiumionen und Polyethylenglykol (PEG) nach einem noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus die Zellen für DNA-Moleküle durchlässig gemacht werden. Ein Hitzeschock erhöht zudem noch die Transformationseffizienz. Die Transformanten werden schließlich auf sog. „drop out Platten“ selektiert. In dieser Arbeit wurde eine von CHEN *et al.* (1991) weiterentwickelte Lithiumacetat-Transformations-Methode (One-Step-Transformation; s. Kap. 3.17.3.1) verwendet, mit der 10<sup>5</sup> bis 10<sup>6</sup> Transformanten pro µg Plasmid-DNA erhalten werden können.

#### 3.17.3.1 One-Step-Transformation von Hefe

In dieser Arbeit wurde die *HOG1-Δ1*-Nullmutante (s. Kap. 3.10) mit den *pVT103-U+HOG1-sense*, *pVT103-U+SDJNK-sense/-antisense* oder *pVT103-U+SDp38-sense/-antisense* Vektoren (s. Kap. 3.17.2) transformiert. Für diesen Zweck wurden pro Transformationsansatz

$5 \times 10^7$  Zellen einer Suspensionskultur (s. Kap. 3.17.1.2) in der frühen stationären Phase ( $\sim 2,5 \times 10^8$  Zellen/ml) nach Messung der  $OD_{600}$  (s. Kap. 3.17.1.3) durch eine Zentrifugation bei  $10.000 \times g$  und RT für 4 sec pelletiert und nach einem Waschschrift mit 200  $\mu$ l One-Step-Puffer in 100  $\mu$ l desselbigen resuspendiert. Anschließend wurden 1  $\mu$ g Plasmid, gewonnen durch eine Midi-Plasmidpräparation (s. Kap. 3.15.11.2), sowie 5  $\mu$ l sonifizierte und gekochte Lachs-Sperma-DNA (EUROBIO, BEL) zugefügt, der Ansatz gevortext und bei  $45^\circ\text{C}$  für 30 min inkubiert (Hitzeschock). Danach wurden die Zellen bei 750 Upm und RT für 2 min zentrifugiert, mit 200  $\mu$ l 1 M Sorbitol-Lösung gewaschen und nach einer erneuten Zentrifugation mit 300  $\mu$ l SK-Ura-Medium (s. Kap. 3.12) resuspendiert und auf SK-Ura-Platten (s. Kap. 3.12) mit einem abgeflamten Drigalsky-Spatel zur Selektion (s. Kap. 3.17.3.2) ausplattiert. Die auf diese Weise hergestellten Klone wurden im weiteren Verlauf der Arbeit mit *HOG1- $\Delta$ 1+HOG1-sense*, bzw. *HOG1- $\Delta$ 1+SDJNK-sense/-antisense* oder *HOG1- $\Delta$ 1+SDp38-sense/-antisense* bezeichnet.

#### **One-Step-Puffer**

200	mM	Lithiumacetat
100	mM	DTT
40	% (v/v)	PEG

### **3.17.3.2 Selektion und Kultivierung der Transformanten auf “drop out Platten”**

Wie schon angedeutet, besitzen Shuttle-Vektoren zur Selektion in Hefe ein dominantes Gen zur Synthese von z. B. Leucin (*LEU2*), Histidin (*HIS3*) oder Tryptophan (*TRP1*). Der in dieser Arbeit verwendete Vektor *pVT103-U* verfügt in diesem Zusammenhang über das *URA3*-Gen. Wenn ein Hefestamm, der aufgrund einer rezessiven Nullmutation seines *URA3*-Gens (*ura3 $\Delta$ 0*) diese Base nicht synthetisieren kann, mit dem *pVT103-U* Vektor transformiert wird, können anschließend nur dessen Transformanten auf Selektionsplatten ohne Uracil („Uracil drop out Platten“ = SK-Ura-Platten; s. Kap. 3.12) wachsen und sich teilen, da nur sie das zum Überleben essentielle Uracil bilden können.

Die transformierten und auf SK-Ura-Platten ausplattierten Hefezellen (s. Kap. 3.17.3.1) wurden 4-5 Tage bei  $30^\circ\text{C}$  im Brutschrank zur Selektion kultiviert, die daraufhin gewachsenen Klone mit einer sterilen Impföse abgenommen und in 7 ml SK-Ura-Medium (s. Kap. 3.12) bei  $30^\circ\text{C}$  und 300 Upm 16-18 h kultiviert. Anschließend wurden für ihre weitere Kultivierung „working stock Platten“ (s. Kap. 3.17.1.1) und Glycerinstocks (s. Kap. 3.17.1.4) angefertigt.

Um zu prüfen, ob die Transformanten tatsächlich den gewünschten Vektor mit dem richtigen Insert trugen, wurden kompetente Bakterien mit den Vektoren retransformiert.

Zu diesem Zweck wurde jeweils 1 ml der Suspensionskulturen bei  $10.000 \times g$  und RT für 4 sec zentrifugiert, die Pellets mit fl. Stickstoff gefroren, bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut und mit je 20  $\mu$ l

des im Yeast DNA Isolation-Kit enthaltenen Lysispuffers versetzt. Die Suspension wurde dann für 5 min bei 95°C erhitzt und bei 10.000 x g für 30 sec zentrifugiert. Danach wurden 2 µl dieses Plasmid-haltigen Überstands für eine Transformation von Epicurian Coli® XL1-Blue Supercompetent Cells (s. Kap. 3.15.7.3) eingesetzt, die Transformanten auf LB/Ampicillin-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Mit den daraufhin gewachsenen Klonen wurde eine Checking-PCR (s. Kap. 3.15.9) durchgeführt.

### 3.17.4 Detektion der rekombinanten SAPKs

Um die Expression der rekombinanten, mit einem C-terminalen 6 x His-tag versehenen, SAPKs nachzuweisen, wurden ausgehend von „working stock Platten“ (s. Kap. 3.17.1.1) die nichttransformierte *HOG1-Δ1*-Nullmutante (s. Kap. 3.10) in 7 ml YEPD-Medium (s. Kap. 3.12) sowie die *HOG1-Δ1+HOG1-sense*, *HOG1-Δ1+SDJNK-sense/-antisense* und die *HOG1-Δ1+SDp38-sense/-antisense* Klone (s. Kap. 3.17.3.1) in 7 ml SK-Ura-Medium (s. Kap. 3.12) 16 h bei 30°C und 300 Upm kultiviert. Danach wurden die Suspensionskulturen 1:20 mit frischem Medium verdünnt und weiterkultiviert, bis eine OD<sub>600</sub> von 1,0 (s. Kap. 3.17.1.3) erreicht war. Anschließend wurden aus den Zellen gemäß Kap. 3.19.2 Proteinlysate gewonnen und nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen (s. Kap. 3.19.3) die Proteingemische durch eine SDS-PAGE (s. Kap. 3.19.4) aufgetrennt sowie daraufhin mittels Western Blot-Transfer (s. Kap. 3.19.5) auf eine immobilisierende PVDF-Membran übertragen. Die immunologische Detektion der rekombinanten SAPKs (s. Kap. 3.19.5) erfolgte durch Verwendung eines monoklonalen Anti-His (C-Term) Primärantikörpers und eines mit HRPO-gekoppelten Anti-Maus IgG Sekundärantikörpers.

### 3.17.5 Komplementierungsstudien

Um zu untersuchen, ob die beiden SAPKs aus *S. domuncula* das verwandte HOG1-Protein funktional ersetzen können, wurden zunächst Suspensionskulturen (s. Kap. 3.17.1.2) der Wildtyp Hefe (s. Kap. 3.10) sowie der nichttransformierten *HOG1-Δ1*-Nullmutante (s. Kap. 3.10) als Kontrollen in YEPD-Medium (s. Kap. 3.12) angefertigt. Parallel dazu wurden Suspensionskulturen der *HOG1-Δ1+HOG1-sense*, *HOG1-Δ1+SDJNK-sense/-antisense* sowie *HOG1-Δ1+SDp38-sense/-antisense* Klone (s. Kap. 3.17.3.1) in SK-Ura-Medium (s. Kap. 3.12) hergestellt (s. Kap. 3.17.4). Nach einer 16stündigen Inkubation wurden diese Kulturen 1:20 mit frischem Medium verdünnt und weiterkultiviert, bis eine OD<sub>600</sub> von 1,0 (s. Kap. 3.17.1.3) erreicht war. Anschließend wurden die jeweiligen Klone in einer Dichte von 220 Zellen/cm<sup>2</sup> auf je 1/7 der Fläche von 0,6 M NaCl enthaltenden YEPD-Platten ausplattiert und

3 Tage bei 30°C im Brutschrank kultiviert. Danach wurden die bewachsenen Platten zur Dokumentation gescannt.

### 3.17.6 Nachweis der Aktivierung der rekombinanten SAPKs

Zur Detektion der aktivierten (dualphosphorylierten) SAPKs wurden gemäß Kap. 3.17.4 Suspensionskulturen (3.17.1.2) der im Kap. 3.17.5 erwähnten Hefeklone kultiviert, anschließend 1:20 mit frischem Medium verdünnt und solange weiterkultiviert, bis sich eine OD<sub>600</sub> von 1,0 (s. Kap. 3.17.1.3) eingestellt hatte. Danach wurden die Zellen bei 750 x g und RT für 10 min zentrifugiert, die Pellets darauffolgend mit 7 ml 0,6 M NaCl enthaltenden YEPD-Medium resuspendiert und für 0 (Kontrolle) bis 120 min bei 30°C und 300 Upm inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden von den entnommenen Zellen Proteinlysate angefertigt (s. Kap. 3.19.2), deren Proteinkonzentrationen bestimmt (s. Kap. 3.19.3), die Proteingemische mittels SDS-PAGE (s. Kap. 3.19.4) aufgetrennt und durch einen anschließenden Western Blot (s. Kap. 3.19.5) auf eine immobilisierende PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis der phosphorylierten Proteine HOG1 und p38<sub>SD</sub> erfolgte durch Verwendung des polyklonalen Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) Antikörpers, während phosphoryliertes JNK<sub>SD</sub> anhand des polyklonalen Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Antikörpers detektiert wurde (s. Kap. 3.19.5). Als Sekundärantikörper wurde der mit HRPO-gekoppelte Anti-Kaninchen IgG Antikörper benutzt.

### 3.17.7 Immunfluoreszenzmikroskopie und Kernfärbung von Zellen

Anhand von Immunfluoreszenzfärbungen können spezifische Antigene in einer Zelle nachgewiesen und lokalisiert werden. Das Prinzip dieser Technik beruht analog zum Western Blot auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Im Fall der indirekten Immunfluoreszenz detektiert der Primärantikörper ein Antigen, worauf dieser wiederum von einem mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper erkannt wird. Der gekoppelte Farbstoff emittiert eine sichtbare Fluoreszenzstrahlung, nachdem er mit einer kürzeren Wellenlänge angeregt wurde. In Kombination zu dieser immunzytochemischen Methode kann der Zellkern durch Färbung der nuklearen DNA mit DAPI nachgewiesen werden.

In diesem Fall wurden Suspensionskulturen (s. Kap. 3.17.1.2) der nichttransformierten *HOG1-ΔI*-Nullmutante (s. Kap. 3.10) sowie der transformierten Klone *HOG1-ΔI+HOG1-sense*, *HOG1-ΔI+SDJNK-sense* und *HOG1-ΔI+SDp38-sense* (s. Kap. 3.17.3.1) gemäß Kap. 3.17.4 kultiviert, danach 1:20 mit frischem Medium verdünnt und weiterkultiviert, bis eine OD<sub>600</sub> (s. Kap. 3.17.1.3) von 0,8-1,0 (exponentielle Phase) erreicht wurde. Anschließend

wurden die Zellen bei 750 x g für 10 min bei RT zentrifugiert, danach die Pellets mit 5 ml 0,6 M NaCl enthaltenden YEPD-Medium oder mit YEPD-Medium ohne zusätzliches NaCl (Negativkontrollen) resuspendiert und für 10 min bei 30°C und 300 Upm inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen durch Zugabe von 670 µl 37 %igen (v/v) Formaldehyd sowie von 600 µl 1 M KP-Puffer 2 h bei RT fixiert, dann bei 350 x g für 5 min bei RT zentrifugiert und das Pellet schließlich mit 0,1 M KP-Puffer vorsichtig resuspendiert. Nach den Waschschritten mit 1 x 0,1 M KP-Puffer und mit 2 x des 1,2 M Sorbitol enthaltenden 0,1 M KP-Puffers wurden die Zellen 16 h bei 4°C in 1 ml des zuletzt erwähnten Puffers inkubiert. Zum Abbau der Zellwand wurden davon 500 µl (~10<sup>8</sup> Zellen) mit 2,5 µl β-Mercaptoethanol und 200 U Lyticase (SIGMA) versetzt und für 30 min bei 30°C inkubiert. Die Degradierung der Zellwand wurde währenddessen mikroskopisch überprüft und die Spheroblasten anschließend für 5 min bei 350 x g (RT) zentrifugiert, wobei schließlich das Pellet mit 500 µl des 1,2 M Sorbitol enthaltenden 0,1 M KP-Puffers aufgenommen wurde. 50 µl der Suspension wurden dann auf vorher mit Poly-L-Lysin (70-150 kD; SIGMA) beschichteten und 3 x mit PBS-Puffer gewaschenen Deckgläsern (Ø 12 mm) aufgebracht. Die Adhäsionszeit betrug 15 min. Nach dem Absaugen des flüssigen Überstandes, wurden die Zellen durch Waschen mit jeweils -20°C kaltem Methanol (6 min) und Aceton (30 sec) dehydriert sowie danach 3 min luftgetrocknet. Nach 5 x Waschen mit jeweils 250 µl PBS/BSA-Puffer für je 2 min (Rehydrierung) schloss sich eine 30minütige Inkubation bei RT im gleichen Puffer an. Anschließend wurden 100 µl des jeweiligen Primärantikörpers [Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) Antikörper, zur Detektion des phosphorylierten HOG1, bzw. p38\_SD, und p-JNK (G-7) Antikörper zum Nachweis des phosphorylierten JNK\_SD] in einer Verdünnung von 1:100 in PBS/BSA-Puffer 1 h bei RT appliziert. Nach 5 x Waschen mit PBS/BSA-Puffer schloss sich eine 1stündige Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gekoppelten und 1:200 in PBS/BSA-Puffer verdünnten Sekundärantikörper [Anti-Kaninchen Cy3, bzw. Anti-Maus Cy-3] bei RT im Dunkeln an. Im Anschluss an eine Wiederholung der Waschschriffe wurden die Zellkerne durch Zugabe von 100 µl der 1:1000 in PBS/BSA-Puffer verdünnten DAPI-Stammlösung (5 min, RT, dunkel) angefärbt. Nach erneutem Waschen wurden die Deckgläser mit den behandelten Zellen auf mit je einem Tropfen Mounting-Medium versehene Objektträger gelegt und mit Nagellack versiegelt. Für die anschließende Mikroskopie wurde das Fluoreszenzmikroskop AH3BT3 mit integrierter Digitalkamera Colourview 12 benutzt. Es wurden folgende Wellenlängen verwendet: 553 und 575 nm (Anregung und Detektion von Cy3) sowie 350 und 460 nm (Anregung und Detektion von DAPI). Die digitalisierten Bilder wurden schließlich mit der Software anaLYSIS Docu V3.00 (SOFT IMAGING SYSTEM) bearbeitet.

**1 M KP-Puffer (pH 6.5)**

685	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
315	mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O

**PBS/BSA-Puffer (pH 7,3)**

137	mM	NaCl
2,7	mM	KCl
6,5	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,5	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2	mg/ml	BSA

**DAPI-Stammlösung (in PBS/BSA-Puffer)**

1	mg/ml	DAPI
---	-------	------

**Mounting-Medium (in PBS/BSA-Puffer)**

50	mg/ml	DABCO
50	% (v/v)	Glycerin

## 3.18 Schwammzucht

### 3.18.1 Haltung der Schwämme

Die Schwämme der Spezies *S. domuncula* wurden in der nördlichen Adria in der Nähe von Rovinj (HRV) aus Tiefen zwischen 10 und 30 m eingesammelt und in mit Meerwasser befüllten Kühlboxen nach Mainz transportiert. Dort wurden sie in permanent gefilterten, artifiziellen Meerwasser (hergestellt aus dem Meeressalz „Tropic Marin“ der Firma DR. BINDER GmbH, Wartenberg) bei 16°C bis zur weiteren Verwendung gehalten. Dem Wasser wurden 2 x pro Woche 4 ml Phytoplankton („Marin Niedere Tiere Futter“ der Firma AMTRA AQUARISTIK, Rodgau) und 2 x pro Monat Vitamine und Spurenelemente („Vitamine & Mineral Supplement“ der Firma KENT MARINE, Marietta, GA) zugefügt. Die Einsiedlerkrebse der Spezies *Paguristres oculatus*, die in der Schale bestimmter Molluskenarten (z. B. *Trunculariopsis trunculus*) leben, die wiederum von *S. domuncula* bewachsen sind, wurden 2 x die Woche mit 5 g Krill gefüttert. Die Salinität des Wassers wurde 2 x pro Woche kontrolliert und gegebenenfalls eingestellt (spezifische Dichte ca. 1,028 g/l)

**Abb. 3.2:**

Meeresaquarium zur Haltung verschiedener Schwammspezies (u. a. *S. domuncula*) in den Laboren des Mainzer Instituts.

Foto von Prof. Dr. W.E.G. Müller.

### 3.18.2 Stressinduktionen

Für die Versuche wurden lebende, gereinigte Schwämme in gleiche Stücke geschnitten und in Behältern mit gefiltertem und belüfteten Meerwasser, das auf die entsprechenden Stressbedingungen eingestellt war, inkubiert. Für die einzelnen Experimente wurden jeweils Teile desselben Individuums verwendet. Die Wassertemperatur betrug, falls nicht anders angegeben, 16°C. Folgende Experimente zur Stimulation der SAPKs wurden durchgeführt:

**(1) Osmotischer Schock:**

Inkubation der Schwammstücke bei 0,25; 0,5 (Kontrolle); 0,75; 1 und 2 M NaCl für 30 min sowie zusätzlich bei 1 M NaCl für 0 (Kontrolle), 3, 10, 20, 60, 120 und 180 min.

**(2) Endotoxin Schock:**

Inkubation der Schwammstücke mit 30 µg LPS/ml für 0 (Kontrolle), 1, 3, 6, 12, 24 und 48 h.

**(3) Okadainsäure (OA) Schock:**

Inkubation der Schwammstücke mit 1,5 ng OA/ml für 0 (Kontrolle), 1, 2, 3 und 6 Tage.

**(4) Hitzeschock:**

Inkubation der Schwammstücke bei 26°C für 0 (Kontrolle), 1, 2, 3 und 6 h.

**(5) Oxidativer Schock:**

Inkubation der Schwammstücke mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 0 (Kontrolle), 3, 10, 60 und 180 min.

**(6) UVB-Bestrahlung:**

Bestrahlung der Schwammstücke mit einer Dosis von 30 J/m<sup>2</sup> außerhalb des Wasser und anschließende Inkubation für 0 (Kontrolle), 30 und 60 min im Meerwasser.

Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden von den entnommenen Zellen Proteinlysate (s. Kap. 3.19.1) hergestellt, die Proteinkonzentrationen bestimmt (s. Kap. 3.19.3), das Proteingemisch durch eine SDS-PAGE (s. Kap. 3.19.4) aufgetrennt und mittels Western Blot (s. Kap. 3.19.5) auf eine immobilisierende PVDF-Membran transferiert. Zum Nachweis der phosphorylierten Proteine JNK<sub>SD</sub> oder p38<sub>SD</sub> wurden die phosphospezifischen, polyklonalen Antikörper Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) oder Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) verwendet, während das gesamte JNK<sub>SD</sub> oder p38<sub>SD</sub> Protein mit den phosphounspezifischen Antikörpern SAPK/JNK oder p38 MAP Kinase nachgewiesen wurde. Diese Primärantikörper wurden mit einem HRPO-gekoppelten Anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörper detektiert.

## 3.19 Protein-Techniken

### 3.19.1 Proteinpräparation aus *S. domuncula*

Um Proteine aus Schwammzellen zu isolieren, muss das Gewebe zunächst mechanisch dissoziiert und die dadurch vereinzelt Zellen mit einem Lysispuffer aufgeschlossen werden. Damit die Proteine nicht durch ebenfalls freigesetzte Proteasen abgebaut werden, wurden dem Lysispuffer der Protease-Inhibitor-Mix CΦmplete™ Mini (ROCHE DIAGNOSTICS) zugegeben und alle Schritte unter einer ständigen Kühlung der Proben (4°C) durchgeführt.

Je 1 g Frischgewebe von *S. domuncula* wurde nach der jeweiligen Inkubationszeit (s. Kap. 3.18.2) mit einem Skalpell abgetrennt und direkt in fl. Stickstoff überführt. Anschließend wurde das tiefgefrorene Gewebe in einem ebenfalls mit fl. Stickstoff gekühlten Mörser zu feinem Pulver homogenisiert und danach mit eisgekühltem, frisch angesetzttem Lysispuffer A (1 ml/g Frischgewebe) aufgenommen. Dieses Homogenisat wurde 30 min unter mehrmaligem Vortexen auf Eis inkubiert und im Anschluss daran bei 10.000 x g für 15 min und 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde danach noch 2 bis 3 x unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert, bis ein klares Lysat erhalten wurde. Die Proteinkonzentration der Rohextrakte wurde anschließend photometrisch bestimmt (s. Kap. 3.19.3), die Lysate aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

#### Lysispuffer A

20	mM	Tris-HCl, pH 7,5
140	mM	NaCl
1	mM	EDTA
1	% (v/v)	Nonidet P40

#### jeweils frisch hinzugeben:

10	mM	NaF
1	mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
1		Tablette CΦmplete™ Mini/10ml

### 3.19.2 Proteinpräparation aus *S. cerevisiae*

Hefezellen müssen für die Herstellung von Proteinextrakten aufgrund ihrer Zellwand mechanisch aufgeschlossen werden. Dies kann beispielsweise durch die Verwendung von acid washed glass beads geschehen. Analog zur Proteinpräparation aus Schwammgewebe (s. Kap. 3.19.1) wurde dem Lysispuffer der Protease-Inhibitor-Mix CΦmplete™ Mini hinzugefügt und alle Schritte bei 4°C vollzogen. Die Proteinisolierung erfolgte nach einer modifizierten Methode von REISER *et al.* (1999).

Je 6-7 x 10<sup>7</sup> Zellen wurden einer Suspensionskultur nach Ablauf der Inkubationszeit (s. Kap. 3.17.4/6) und Messung der optischen Dichte (s. Kap. 3.17.1.3) entnommen, in ein eisgekühltes 2 ml Reaktionsgefäß überführt und durch eine 10minütige Zentrifugation bei 3.000 x g und 4°C pelletiert. Nach Verwerfung des Überstands, wurden die Zellen mit 500 µl eisgekühltem, frisch angesetzttem Lysispuffer B resuspendiert und mit dem gleichen Volumen an

gekühlten acid washed glass beads versetzt. Dieser Ansatz wurde dann 3 x 5 min bei 4°C gevortext und bei 3.000 x g und 4°C für 1 min zentrifugiert. Der daraus resultierende proteinhaltige Überstand wurde erneut zentrifugiert (10.000 x g, 10 min, 4°C) und danach dessen Proteinkonzentration photometrisch bestimmt (s. Kap. 3.19.3). Das Lysat wurde daraufhin aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

**Lysispuffer B**

100	mM	MOPS
10	mM	EGTA
1	% (v/v)	DMSO
0,1	% (v/v)	Triton X 100

**jeweils frisch hinzugeben:**

1	mM	DTT
10	mM	NaF
1	mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
1		Tablette CΦmplete™ Mini/10ml

### 3.19.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration eines Lysats wurde die photometrische Methode nach BRADFORD (1976) verwendet. Das in diesem Fall eingesetzte Roti-Quant (ROTH) enthält den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G 250, der in allen Ladungszuständen vorkommt und in Abhängigkeit seiner Ladung bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbiert. Durch Bindung an ein Protein wird der Farbstoff in den anionischen Zustand überführt. Dieser Übergang bewirkt eine Veränderung des Absorptionsmaximums, die durch spektroskopische Messung bei 595 nm nachgewiesen werden kann.

150 µl an verdünntem Proteinlysate (s. Kap. 3.19.1/2), bzw. verschiedene BSA-Verdünnungen mit definierten Konzentrationen, wurden in die wells einer 96er Platte pipettiert und mit je 150 µl Roti-Quant vermischt (die der gleichen Behandlung unterzogenen Blindproben bestanden nur aus Lysispuffer). Anschließend konnte die Absorption bei 595 nm mit einem Multiscanner ermittelt werden. Alle Proben wurden dabei 3fach bestimmt, um einen Mittelwert bilden zu können. Anhand der durch die BSA-Verdünnungsreihe ermittelten Eichkurve konnten die Proteinkonzentrationen der Lysate berechnet werden.

### 3.19.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine gemäß ihres Molekulargewichts getrennt (LAEMMLI, 1970). Das bei der Methode verwendete Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet durch hydrophobe Wechselwirkungen an Proteine und bewirkt neben einer Denaturierung dieser, dass der gebildete Proteinkomplex eine stark negative Gesamtladung erhält und bei einer anschließenden Elektrophorese zur Anode wandert. Die Gelmatrix wird durch eine radikalische Polymerisation von Acrylamid in Anwesenheit quervernetzender Monomere wie N,N'-Methylenbisacrylamid hergestellt. Als Polymerisations-

starter werden in der Regel APS und TEMED zugegeben. Somit entsteht ein Molekularsieb, das die Proteine in Abhängigkeit ihrer Größe unterschiedlich schnell durchwandern können. Eine hohe Auftrennung der Proteine wird durch ein Zweikomponentengel erreicht (LAEMMLI, 1970). Dabei wird zunächst ein Trenngel polymerisiert und anschließend ein großporiges Sammelgel aufgegossen. Für das Gießen der 0,75 mm dicken, vertikalen Gele (6 x 8 cm) und der nachfolgenden Gelelektrophorese wurde das MiniProtean<sup>®</sup> II-System der Firma BIORAD verwendet.

	<u>Trenngel (10 %)</u>	<u>Sammelgel (6 %)</u>
<i>Aqua bidest.</i>	4,0 ml	5,3 ml
Rotiphorese Gel 30	3,3 ml	2,0 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	-
1 M Tris-HCl, pH 6,8	-	2,5 ml
20 % (w/v) SDS	50 µl	50 µl

Nachdem die Glasplatten mit Isopropanol gereinigt und mit den beiden Abstandhaltern versehen waren, wurden sie in die entsprechende Gießapparatur eingespannt. Anschließend wurde das Trenngel mit 100 µl 10 %igem APS und 10 µl TEMED versehen, zwischen die Platten gegossen und mit einer dünnen Isopropanolschicht überzogen. Nach einer 30minütigen Polymerisation bei RT wurde der Alkohol entfernt, ein Teflonkamm zur Aussparung der Probenaschen eingesetzt, das Sammelgel mit den beiden Polymerisationsstartern vermischt und auf das Trenngel gegossen. Danach schloss sich eine 45minütige Polymerisation bei RT an.

Die Proteinextrakte und der Molekulargewichtsmarker (SDS-Page Standards, broad range) wurden 4:1 mit dem 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C denaturiert, bevor sie in die Geltaschen (10 µg Gesamtprotein; s. Kap. 3.19.3) pipettiert wurden. Danach wurde SDS-Laufpuffer in die Elektrophoresekammer gefüllt und eine Spannung von zunächst 90 V angelegt. Wenn die Lauffront die Grenze von Sammel- und Trenngel erreichte, wurde diese auf 180 V erhöht. Die Elektrophorese wurde gestoppt, nachdem die Front aus dem Gel ausgetreten war.

#### 5 x SDS-Probenpuffer

250	mM	Tris-HCl, pH 6,8
50	% (w/v)	Saccharose
10	% (w/v)	SDS
12,5	% (v/v)	β-Mercaptoethanol
0,2	% (w/v)	Bromphenolblau

#### SDS-Laufpuffer

25	mM	Tris
192	mM	Glycin
0,1	% (w/v)	SDS

### 3.19.5 Western Blot

Als Western Blot wird der Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine (s. Kap. 3.19.4) auf eine immobilisierende Membran bezeichnet. Anschließend können die transferierten Proteine mit immunologischen Methoden nachgewiesen werden (TOWBIN *et al.*, 1979). Für den Transfer wurde die Semi-Dry-Blotting-Kammer Trans-Blot<sup>®</sup> SD verwendet. Nach der SDS-PAGE (s. Kap. 3.19.4) wurde das Gel aus der Apparatur genommen und auf 8 Lagen mit Blotting-Puffer getränktem Elektrodenpapier gelegt. Anschließend wurde darauf die exakt zugeschnittene, vorher mit Methanol aktivierte und in Blotting-Puffer äquilibrierte, PVDF-Membran Immobilon-P platziert sowie 8 weitere Lagen befeuchtetes Elektrodenpapier aufgebracht. Dieses „Sandwich“ wurde daraufhin mit der Membran Richtung Anode orientiert auf den Pluspol der Kammer gelegt und luftblasenfrei ausgerollt. Nach Beendigung des „Semi-Dry“-Transfers bei 1 mA/cm<sup>2</sup> für 75 min wurde die Markerspur abgetrennt und mit Amidoschwarz entwickelt, während der restliche Blot nach kurzem Waschen in TBS-Puffer über Nacht bei 4°C in einer 3 %igen Blockierungslösung [Blocking Reagenz des BM Chemoluminescence Blotting Substrate (POD)-Kits entsprechend in TBS-Puffer verdünnt] inkubiert wurde. Im Anschluss daran wurde die Membran 4 x 5 min mit TBS-Puffer, 0,5 % (v/v) Tween 20 (TBST) gewaschen und 60 min mit einem 1:2.000 in TBST verdünnten Primärantikörper in Anwesenheit von 0,3 % (v/v) Blocking Reagenz inkubiert. Nach 4 x Waschen mit TBST für jeweils 5 min wurde ein mit HRPO-gekoppelter Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 in TBST, 0,3 % (v/v) Blocking Reagenz für 60 min aufgegeben. Anschließend wurde die Membran 4 x mit TBST und 1 x mit TBS für je 5 min gewaschen und nach kurzem Trocknen mit 1 ml des HRPO-Substrats BM Chemoluminescence Blotting Substrate (POD) 2 min inkubiert. Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte wie im Kap. 3.16.4.4 beschrieben.

#### Blotting-Puffer

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
20 % (v/v) Methanol

#### TBS-Puffer

20 mM Tris-HCl, pH 7,5  
140 mM NaCl

#### Amidoschwarzfärber

40 % (v/v) Methanol  
10 % (v/v) Essigsäure  
0,1% (w/v) Amidoschwarz

#### Entfärber

80 % (v/v) Methanol  
5 % (v/v) Essigsäure

### 3.19.6 Inhibitorstudie mit SB203580

Gemäß Kap. 3.18.2 wurde Schwammgewebe für 30 min in Gegenwart von 1 M NaCl inkubiert. Nachdem von diesem ein Proteinlysate angefertigt (s. Kap. 3.19.1) und dessen Proteinkonzentration gemessen (s. Kap. 3.19.3) wurde, erfolgte eine Immunpräzipitierung mit dem phosphospezifischen, polyklonalen Antikörper Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182). Dabei wurden jeweils 0,5 µg dessen zu 2 der insgesamt 3 Präzipitierungsansätze gegeben. Ein dritter Ansatz enthielt keinen Antikörper (Negativkontrolle). Die Immunpräzipitierungen verliefen in Gegenwart von jeweils 500 µl des Lysispuffer A (s. Kap. 3.19.1), der zu diesem Zweck zusätzlich mit 25 mM β-Glycerinphosphat, 0,5 mM DTT und 2 mM Natrium-Pyrophosphat versehen wurde. Nach einer 2stündigen Inkubation bei 4°C wurden zu jedem der Ansätze 10 µl Protein G Plus/Protein A Agarose (CALBIOCHEM) beigefügt und die Suspensionen für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 1.000 x g und 4°C für 5 min wurden die an Agarose beads gebundenen Immunkomplexe jeweils 2 x mit 500 µl des Lysispuffer A und erneut 2 x mit 500 µl des Kinase Puffers gewaschen sowie in 30 µl des zuletzt erwähnten Puffers aufgenommen. Alle 3 Präzipitierungsansätze wurden darauffolgend mit je 2 µg Myelin Basic Protein (MBP) (SIGMA) und 50 µM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (8 Ci/mmol) (SIGMA) versetzt (Gesamtvolumen: 40 µl). Einer der Ansätze enthielt zudem den p38-spezifischen Inhibitor SB203580 (ALEXIS) in einer Konzentration von 10 µM. Dieser wurde noch vor Zugabe des MBP hinzugefügt. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 30°C wurden die Kinase Reaktionen durch Zugabe von jeweils 10 µl an 5 x SDS-Probenpuffer (s. Kap. 3.19.4) gestoppt und auf ein SDS-Polyacrylamidgel zwecks elektrophoretischer Auftrennung der Proteine gegeben (s. Kap. 3.19.4). Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde die Autoradiographie des Gels anhand einer PhosphorImager-Analyse mit dem Gerät MolecularImager GS-525 detektiert und mit Hilfe der Software Molecular Analyst (BIORAD) bearbeitet.

#### **Kinase Puffer**

25 mM HEPES, pH 7,5  
25 mM β-Glycerophosphat  
25 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>  
0,5mM DTT

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Isolierung und Charakterisierung der cDNA-Klone

#### 4.1.1 Isolierung der cDNA-Klone aus *S. domuncula*

Zur Isolierung von Mitgliedern der *SAPK1/JNK*- und *SAPK2/p38 MAPK*-Subfamilie aus der cDNA-Bibliothek des marinen Schwamms *S. domuncula* (s. Kap. 3.8) wurden PCRs (s. Kap. 3.15.1) mit jeweils einem degenerierten genspezifischen Rückwärtsprimer (s. Kap. 3.15.1.2) und dem vorwärtsgerichteten Vektorprimer T3 (s. Kap. 3.13.5) durchgeführt. Mit dieser Primerkombination sollte zunächst das 5'-Ende der entsprechenden *SAPK*-Klone amplifiziert werden.

Um die Lage des degenerierten *SAPK1/JNK*-spezifischen Primers zu bestimmen, wurden die abgeleiteten AS-Sequenzen der folgenden *SAPK1/JNK*-Gene mit Hilfe des Programms CLUSTALW 1.7 untereinander verglichen: *H. sapiens JNK1* [Acc. Nr.: L26318], *JNK2 $\alpha$ 1* [U34821] sowie *JNK3 $\alpha$ 1* [U34820], *D. melanogaster DJNK* [U49180], *Gallus gallus c-Jun N-terminale Kinase 2 $\alpha$ 1* [AB000807], *Cyprinus carpio JNKb* [AB001744], *C. elegans JNK-1* [AB024085], *Mus musculus MAP Kinase 10 (JNK3)* [Q61831] und *Rattus norvegicus MAP Kinase 10 (JNK3)* [P49187]. Der anhand dieses Vergleichs konstruierte und mit SDJNKdeg\_R1 bezeichnete Primer (s. Kap. 3.13.1) richtete sich gegen die Nukleotidsequenz, die für das JNK-spezifische Motiv „MELMDAN“ kodiert (s. Abb 4.1 und 4.3).

Zur Konstruktion des degenerierten *SAPK2/p38 MAPK*-spezifischen Primers wurden die abgeleiteten AS-Sequenzen der folgenden *SAPK2/p38 MAPK*- sowie *YSAPK*-Gene gegenübergestellt: *H. sapiens CSBP2* [L35264] und *p38 $\beta$  MAP Kinase* [U53442], *D. melanogaster MAP Kinase* [U86867], *C. carpio p38 MAPK* [D83274], *C. elegans Ser/Thr-Protein Kinase* [U58752], *M. musculus MAP Kinase* [U10871], *R. norvegicus p38 MAP Kinase* [U73142], *Xenopus laevis MPK2* [X80751] sowie *Canis familiaris p38 MAP Kinase* [AF003597] und *S. cerevisiae HOG1* [L06279]. Der daraus entwickelte Primer SDp38deg\_R1 (s. Kap. 3.13.1) richtete sich gegen die Nukleotidsequenz, die für das p38 MAPK-spezifische Motiv „MTGYVATR“ kodiert (s. Abb. 4.2 und 4.3).

Das mit der Kombination der Primer T3 und SDJNKdeg\_R1 [bzw. SDp38deg\_R1] bei einer Annealing-Temperatur von 56°C [66°C] erhaltene PCR-Produkt von ca. 450 Bp [650 Bp] Größe wurde nach seiner Aufreinigung (s. Kap. 3.15.3) in *pGEM<sup>®</sup>-T* ligiert (s. Kap. 3.15.5.1). Nach einer Plasmidpräparation (s. Kap. 3.15.11.1) wurden die beiden subklonierten PCR-Fragmente mit den Primern T7 und SP6 (s. Kap. 3.13.6) sequenziert (s. Kap. 3.15.14).

Basierend auf diesen Sequenzen wurde zur Isolierung des fehlenden 3'-Endes, des mit SDJNKdeg\_R1 [bzw. SDp38deg\_R1] amplifizierten Klons, der Vorwärtsprimer SDJNK\_F1

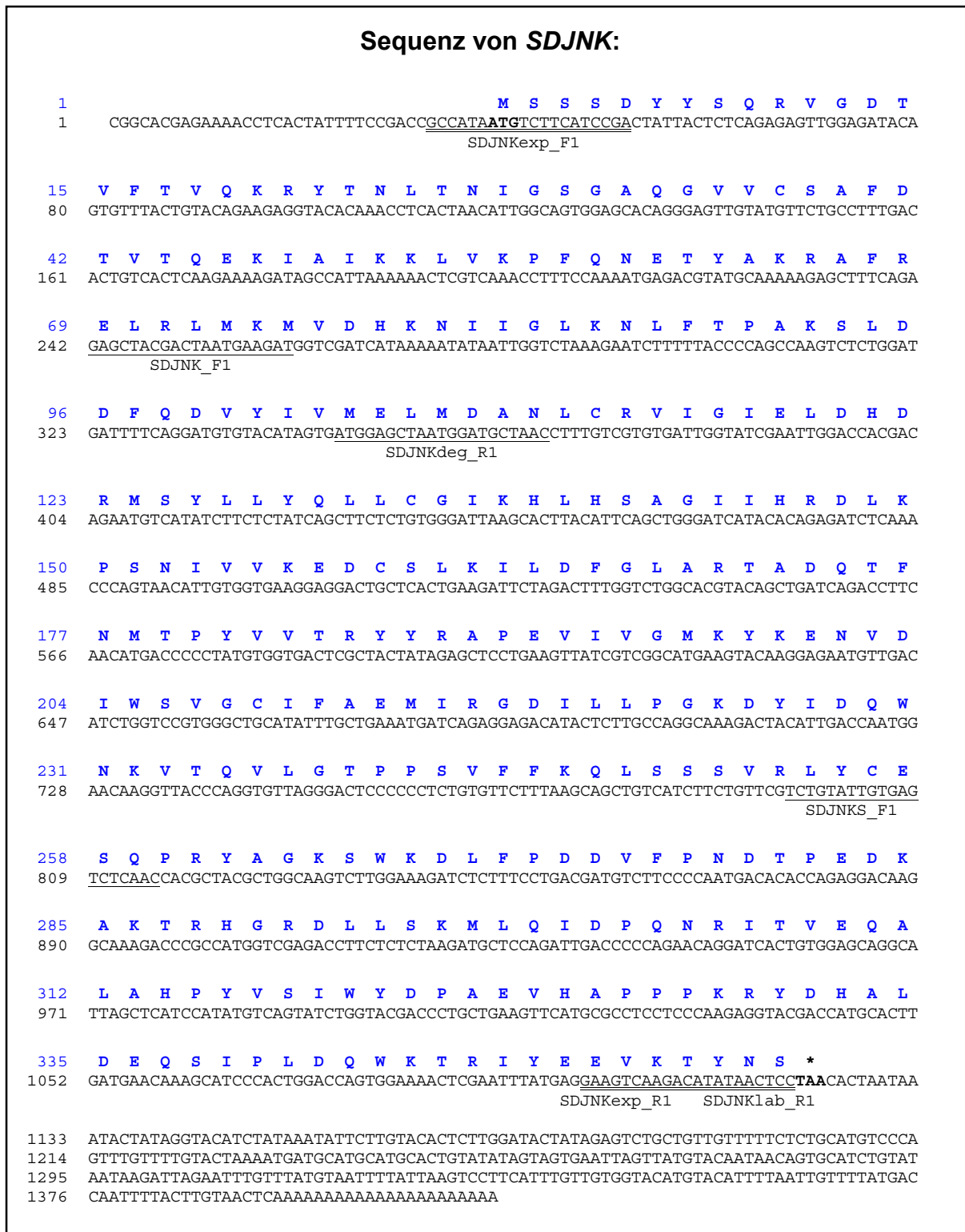
[SDp38\_F1] konstruiert (s. Kap. 3.13.1 und Abb. 4.1 sowie 4.2). In nachfolgenden PCRs wurde dieser mit dem rückwärtsgerichteten Vektorprimer T7 (s. Kap. 3.13.5) kombiniert. Das in der Folge gewonnene PCR-Produkt der Größe 900 Bp [1 kB] wurde dann ebenfalls subkloniert und mit den Primern T7, SP6 und SDJNKS\_F1 [SDp38S\_F1] (s. Kap. 3.13.6 und Abb. 4.1 sowie 4.2) sequenziert. Zur weiteren Kontrolle wurde mittels einer RT-PCR (s. Kap. 3.16.5) und der Primerkombination SDp38RT\_F1/R1 (s. Kap. 3.13.1 und Abb. 4.2) ein Teil des mit SDp38\_F1 isolierten 3'-Endes nochmals amplifiziert und erneut sequenziert. Die vollständigen cDNA-Sequenzen und ihre abgeleiteten AS-Sequenzen sind in Abb. 4.1 sowie 4.2 dargestellt.

#### 4.1.2 Identifizierung und Charakterisierung der cDNA-Klone

Zur Identifizierung der beiden cDNA-Klone wurden ihre vollständigen Sequenzen anhand des BLAST Algorithmusses mit Nukleotid- und Protein-Datenbanken verglichen (s. Kap. 3.14.2). Dadurch konnten sie eindeutig als Mitglieder der *SAPK1/JNK*-, bzw. *SAPK2/p38 MAPK*-, Subfamilie der *MAPKs* identifiziert werden.

Der *SAPK1/JNK*-spezifische Klon wies mit 61 bis 67 % identischen AS die höchsten Homologien zu Mitgliedern der *SAPK1/JNK*-Subfamilie auf. Erst an Position 34 erschien mit 46 % Identität in der BLAST-Liste eine SAPK [*M. Musculus* p38 MAPK], die nicht dieser Subfamilie zugeordnet werden konnte. Aufgrund des Resultats wurde dieser cDNA-Klon *SDJNK* genannt (s. Abb. 4.1).

Der *SAPK2/p38 MAPK*-spezifische Klon zeigte mit 64 bis 69 % identischen AS die größten Übereinstimmungen zu Mitgliedern der *SAPK2/p38 MAPK*-Subfamilie. Erst an 31. Stelle wurde mit 55 % identischen AS in der BLAST-Liste eine SAPK [*S. cerevisiae* HOG1] aufgeführt, die einer anderen MAPK-Subfamilie angehörte. Folglich wurde dieser cDNA-Klon mit dem Namen *SDp38* bezeichnet (s. Abb. 4.2).



**Abb. 4.1:**

Nukleotidsequenz und abgeleitete **AS-Abfolge** des cDNA-Klons SDJNK [Acc. Nr.: AJ291511]. Das Start-ATG und das Stop-Codon sind **fett** dargestellt. Die Positionen der im Text beschriebenen Primer sind unterstrichen (der Primer SDJNKlab\_F1 entspricht SDJNK\_F1). Doppelt unterstrichen sind die Primerpositionen, die zur Herstellung von rekombinanten Hefe-Expressionsvektoren verwendet wurden.



Der cDNA-Klon *SDJNK* verfügt über eine Länge von 1407 Nukleotiden, wobei der Poly-[A]-Schwanz ab der 1394. Base beginnt. Der OLR der abgeleiteten AS-Sequenz verläuft durchgehend von Nukleotid 1 bis zum Stop-Codon TAA [Nukleotide 1121-1123]. Die Nukleotide 1128-1133 stellen das Polyadenylierungssignal AATAAA (ZARKOWER *et al.*, 1986) dar. Das Start-Codon für Methionin befindet sich an Position 38-40. Der an das Start-ATG angrenzende Bereich entspricht nicht vollständig der Konsensussequenz für eine Translationsinitiation, die in den meisten mRNAs der Vertebraten vorhanden ist (Konsensussequenz: GCCA/GCCATGG; KOZAK, 1991). Die hoch konservierte Purinbase in Position -3 (A) ist zwar vorhanden, jedoch fehlt das ebenso wichtige G in Position +4.

Das abgeleitete Protein besteht aus 361 AS und wurde mit JNK\_SD bezeichnet. Mit Hilfe des ONLINE-Programms PROTPARAM wurde ein Molekulargewicht von 41,6 kD berechnet. Der isoelektrische Punkt liegt bei 7,61.

*SDp38* weist insgesamt 1370 Nukleotide auf. Ab Nukleotidposition 1325 ist ein Poly-[A]-Schwanz vorhanden. Der durchgehende OLR der abgeleiteten AS-Sequenz beginnt an Position 14. Er wird durch das Stop-Codon TGA an Nukleotidposition 1115-1117 unterbrochen. Ein trunkiertes Polyadenylierungssignal AATA (s. oben) ist vorhanden [Nukleotide 1202-1205]. Das Start-ATG befindet sich an Position 17-19. In diesem Klon sind die beiden elementaren Basen der KOZAK-Sequenz (s. oben) gegenwärtig.

Das abgeleitete Protein p38\_SD setzt sich aus 366 AS zusammen und hat ein Molekulargewicht von 42,1 kD. Der isoelektrische Punkt liegt bei 5,14.

### **4.1.3 Vergleich der beiden SAPK-Sequenzen mit Sequenzen aus Datenbanken**

Um die Proteinsignaturen der beiden SAPK-Sequenzen untereinander sowie mit denen anderer SAPKs zu vergleichen, wurden neben *SDJNK* und *SDp38* weitere *SAPK*-Gene von Hefen, Protostomia und Deuterostomia aus Datenbanken ausgewählt (s. Abb. 4.3). Deren abgeleiteten AS-Sequenzen wurden mittels CLUSTALW 1.7 verglichen. Die Darstellung des Vergleichs erfolgte über GENEDOC 2.4 (s. Abb. 4.3). Die Auswertung des Alignments mit Hilfe des statistischen Reports von GENEDOC 2.4 diente auch der Feststellung des Gehalts an identischen AS (s. Abb. 4.4).

**JNK\_SD** : -----MSSSDYYSSQRVGD : 13  
 JNK (Ce) : PSSSGRDDDAVSLDSCQSVYSPVRHHINSGTGGGILMEPSSIHVPENYYSVTIIGE : 110  
 JNK (Dm) : -----MTTAQHQHHTVEVGD : 15  
 JNK (Cc) : -----MNKNKREKEFYSDVVDG : 17  
 JNK (Gg) : -----MSDSKCDSQFYSVQVAD : 17  
 JNK (Hs) : -----MSDSKCDSQFYSVQVAD : 17  
**p38\_SD** : -----MAVQVLPENPAKPGYYKMELFK : 22  
 p38 (Ce) : -----MFPQTMDHILHPTPREGYYVVELNR : 26  
 p38 (Dm) : -----MSVSIITKKFYKLDINR : 16  
 p38 (Cc) : -----MSQKERPTFHRQEVNK : 16  
 p38 (Xl) : -----MSSNQSYVFYRQELNK : 16  
 p38 (Hs) : -----MS-QERPTFYRQELNK : 15  
 HOG1 (Sc) : -----MTTNEEFIRTOIFG : 14

Q<sub>37</sub> I + II \*1 \*2 \*3  
 ▼ ▼ ▼ ▼ ▼

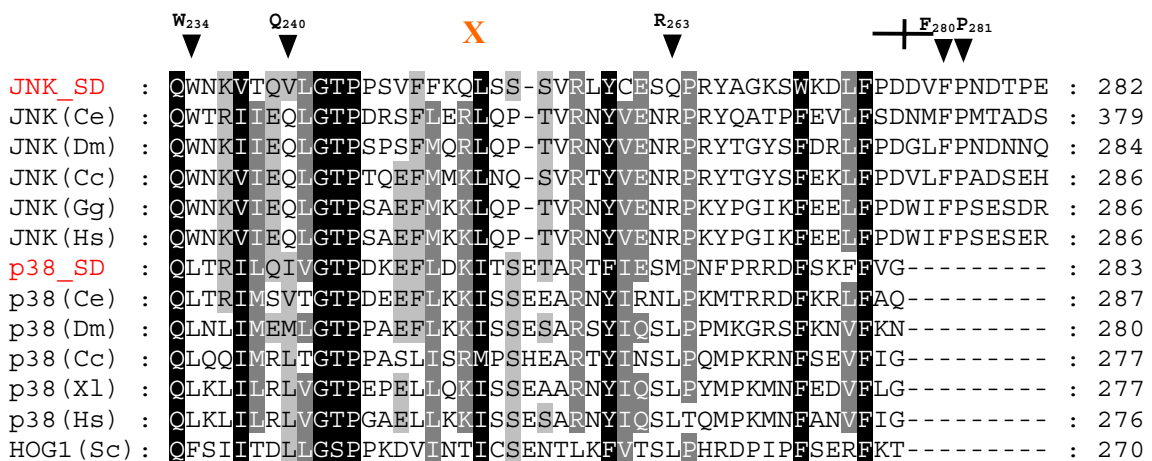
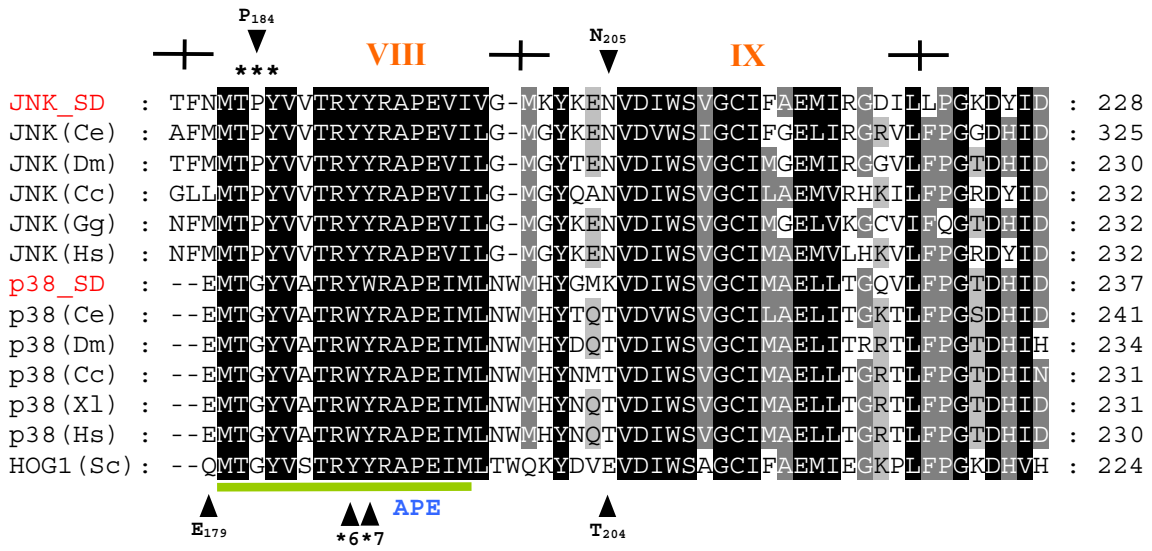
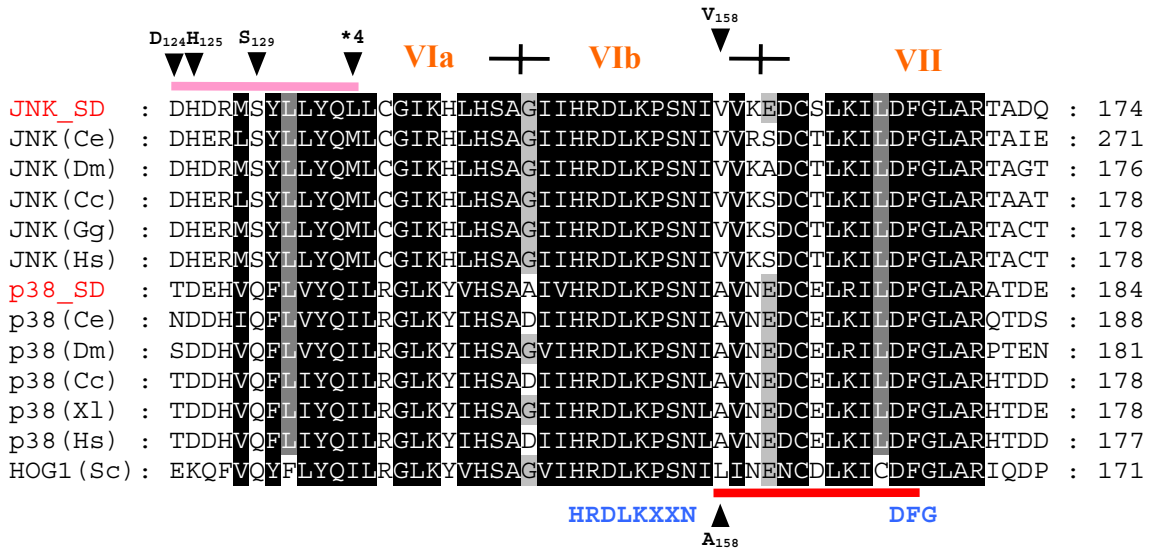
**JNK\_SD** : TVFTVQKRYTNLTNIGSGAOGVVCSAFDTVTQEKIAIKKLVKPFONETYAKRAFR : 68  
 JNK (Ce) : AQMVVLKRYONLRLIGSGAOGIVCSAFDITVRNEQVAIKKLSRPFONVTHAKRAYR : 165  
 JNK (Dm) : TNFTIHSRYINLRPIGSGAOGIVCAAYDTITQQNVAIKKLSRPFONVTHAKRAYR : 70  
 JNK (Cc) : STFTVLKRYONLRPIGSGAOGIVCSAYDHNLERNVAIKKLSRPFONQTHAKRAYR : 72  
 JNK (Gg) : STFTVLKRYOQLKPIGSGAOGIVCAAFDITVGINVAVKKLSRPFONQTHAKRAYR : 72  
 JNK (Hs) : STFTVLKRYOQLKPIGSGAOGIVCAAFDITVGLISVAVKKLSRPFONQTHAKRAYR : 72  
**p38\_SD** : TVWEAPEFYQDLSPIGTGAYGTVCSAIDTRYNVRVALKKLARPFOTAVHAKRTYR : 77  
 p38 (Ce) : SVVVVFNYYINLTPIGTGAYGTVCAAECTRSGTRVAIKKFNRPFSIIHARRTYR : 81  
 p38 (Dm) : TEWEIPDIYQGLQPVGSGAYGOVSKAVVRGTNMHVAIKKLSRPFOSAVHAKRTYR : 71  
 p38 (Cc) : TIWEVPVRYONLSPVGSAYGAYGTVCSAIDTRYNVRVALKKLARPFOSIIHAKRTYR : 71  
 p38 (Xl) : TLWEVPDRYONLTPVGSAYGAYGTVCSSFDTRTALRIAVKKLSRPFOSIIHAKRTYR : 71  
 p38 (Hs) : TIWEVPERYONLSPVGSAYGAYGTVCSSFDTRTALRIAVKKLSRPFOSIIHAKRTYR : 70  
 HOG1 (Sc) : TVEETNRYNDLNPVGMGAFLVCSATDITLTSQPVAIKKIMKPFSTAVLAKRTYR : 69

GXGXXG AXKXL S<sub>62</sub>

III + IV Q<sub>95</sub> + V N<sub>114</sub> C<sub>116</sub> M<sub>121</sub> L<sub>123</sub>  
 ▼ ▼ ▼ ▼ ▼

**JNK\_SD** : ELRLMKMVDHKNIIIGLKNLFTP---AKSLDDFQDVYIVMELMDANLCRVIGIE-L : 119  
 JNK (Ce) : ELKMLSLVNHKNIIIGILNCFTP---QKKLDEFNDLYIVMELMDANLCQVIQMD-L : 216  
 JNK (Dm) : EFKLMKLVNHKNIIIGLLNAFTP---QRNLEEFQDVYIVMELMDANLCQVIQMD-L : 121  
 JNK (Cc) : ELVLMKYVNHKNIIICLLNVFTS---QKTLEEFQDVYIVMELMDANLCQVIQME-L : 123  
 JNK (Gg) : ELVLLKCVNHKNIIISLLNVFTP---QKSLLEEFQDVYIVMELMDANLCQVIHME-L : 123  
 JNK (Hs) : ELVLLKCVNHKNIIISLLNVFTP---QKTLEEFQDVYIVMELMDANLCQVIHME-L : 123  
**p38\_SD** : ELRYLKHMKHENIIGLLDVFSP---ASTFEEFQDVYIVMHLMGSDLNNIIRQOQL : 129  
 p38 (Ce) : ELRLLRCMCHENIIDLLDVFFTP---NENVNDIEDVYFVSMLMGADLSNIIKIQRL : 133  
 p38 (Dm) : ELRLLKHMMAHENVIIGLLDFHHPHANGSLENFQQVYLVTHLMDADLNNIIRMOHL : 126  
 p38 (Cc) : ELRLLKHMKHENVIIGLLDVFFTP---ATSLEEFNDVYLVTHLMGADLNNIVKCQKL : 123  
 p38 (Xl) : ELRLLKHMKHENVIIGLLDVFSP---AKSFEEFNDVYLVTHLMGADLNNIVKCQKL : 123  
 p38 (Hs) : ELRLLKHMKHENVIIGLLDVFFTP---ARSLLEEFNDVYLVTHLMGADLNNIVKCQKL : 122  
 HOG1 (Sc) : ELKLLKHLRHENLIICLQDIFLS-----PLEDIYFVTELOGTDLHRLQLQTRPL : 116

\*5 T<sub>106</sub>



**XI** V<sub>323</sub>

⊕ ⊖

```

JNK_SD : D-KAKTRHGRDLLSKMLQIDPQNRITVEQALAHPHYVSIWYDPAEVHAPPKRYDH : 336
JNK (Ce) : S-RLTGAQARDLLSRMLVIDPERRISVDDALRHPYVNVWFDEIEVYAPPPLPYDH : 433
JNK (Dm) : NSRRKASDARNLLSKMLVIDPEQRISVDEALKHEYINVWYDAEEVDAPAPEPYDH : 339
JNK (Cc) : N-KLKASQARDLLSKMLVIDASKRISVEEALQHPYINVWYDPAEVEAPPVITDK : 340
JNK (Gg) : D-KLKTSQARDLLSKMLVIDPKRISVDEALRHPYITVWYDPAEAEAPPQIYDA : 340
JNK (Hs) : D-KIKTSQARDLLSKMLVIDPKRISVDEALRHPYITVWYDPAEAEAPPQIYDA : 340
p38_SD : ----ANPDVNLLEQLLSMDPDRRPTAEEALAHPHYFVNYADPDDEPNSPP--YDD : 332
p38 (Ce) : ----ATPQAIDLLEKMLHLDPDRRPTAKEAMEHEYLAAAYHDETDEPIAEE--MDL : 336
p38 (Dm) : ----ANPLAIDLLEKMLELDAEKRITAAEALSHPLYLEKYAEP SVEQTSPP--YDH : 329
p38 (Cc) : ----ANPQAVDLEKMLVLDTDKRI TAAEALAHPHYFAQYHDPDDEPEAEP--FDQ : 326
p38 (Xl) : ----ANPQAVDLEKMLVLDTDKRI TAAEALAHSYFAQYHDPDDEPIAEP--YDQ : 326
p38 (Hs) : ----ANPLAVDLEKMLVLDSDKRITAAQALAHAYFAQYHDPDDEPVADP--YDQ : 325
HOG1 (Sc) : ----VEPDVLDLLEKMLVLDPKKRITAADALAHPHY SAPHYHDPDDEPVADAK--FDW : 320
    
```

```

JNK_SD : ALDEQSIPIIDQWKTRIYEEVKTYNS----- : 361
JNK (Ce) : NMD-VEQNVDSWREHIFRELTDMARTHDIYS----- : 463
JNK (Dm) : SVDEREHTVEQWKELIYEEVMDWEAHNTNNRTR----- : 372
JNK (Cc) : QLEEREHTVEEWKELIYKEVLDWEERMKNGAIRGQPSPLGAAVINGSPQPSSSSS : 395
JNK (Gg) : QLEEREHATEEWKELIYKEVMDWEERSKNGVVKDQPSAQMQQ----- : 382
JNK (Hs) : QLEEREHATEEWKELIYKEVMDWEERSKNGVVKDQPSAQMQQ----- : 382
p38_SD : TFEKLEQDQLGWKKLVLEDTTAFQTDPTLYQQSL----- : 366
p38 (Ce) : NDDVRADTIDEWKKLIWEEISDFQKNVAFADDEEEDDEEKMES----- : 377
p38 (Dm) : SFEDMDLPVDKWKELIYKEVTNFKPPPSYAQVLKDVK----- : 366
p38 (Cc) : SFESRELDIEEWKQTYEEVISFEPPVFDGDEMES----- : 361
p38 (Xl) : SFESRELDIEEWKRLTYEEVTCFVPPPLDSEEMES----- : 361
p38 (Hs) : SFESRDLLIDEWKSITYDEVISFVPPPLDQEEMES----- : 360
HOG1 (Sc) : HFNDADLPVDTWRVMMYSEILD FHKIGGSDGQIDISATFDDQVAAATAAAAQAQA : 375
    
```

**Abb. 4.3:**

Alignment der abgeleiteten AS-Sequenz von SDJNK [*JNK\_SD*] und SDp38 [*p38\_SD*] mit folgenden Sequenzen: *C. elegans* JNK-1 [*JNK (Ce)*; AB024085], *D. melanogaster* DJNK [*JNK (Dm)*; U49180], *C. carpio* JNKa [*JNK (Cc)*; D83273], *G. gallus* JNK-2α1 [*JNK (Gg)*; AB000807], *H. sapiens* JNK2β1 [*JNK (Hs)*; U35002], *C. elegans* Ser/Thr Protein Kinase [*p38 (Ce)*; U58752], *D. melanogaster* MAP Kinase [*p38 (Dm)*; U86867], *C. carpio* p38 MAP Kinase [*p38 (Cc)*; D83274], *X. laevis* MAP Kinase-2 [*p38 (Xl)*; X80751], *H. sapiens* CSBP2 [*p38 (Hs)*; L35264] und *S. cerevisiae* HOG1 [*HOG1 (Sc)*, L06279].

Die unterschiedlichen Graustufungen zeigen den Grad der Übereinstimmung an (schwarz 100 %; dunkelgrau ≥ 80 %; hellgrau ≥ 60 % identische AS). Lücken werden durch (–) symbolisiert. Oberhalb des Alignments sind die Grenzen (⊕) der PK-Subdomänen I-XI sowie charakteristische AS-Reste (▼) und Motive (–) der SAPK1/JNK-Mitglieder eingezeichnet. Unterhalb sind dagegen charakteristische AS-Reste (▲) und Motive (–) der SAPK2/p38 MAPK-Mitglieder, das allgemeine Motiv (←) der MAPKs sowie die generellen Konsensussequenzen der PKs dargestellt. Das Dualphosphorylierungsmotiv TXY ist mit \*\*\* markiert. Die zur Isolierung von SDJNK, bzw. SDp38, verwendeten degenerierten Primer richteten sich gegen das Motiv „MELMDAN“ [AS 104-110, bezüglich *JNK\_SD*], bzw. gegen „MTGYVATR“ [AS 186-193, bezüglich *p38\_SD*].

Anhand des Alignments wurde deutlich, dass beide PKs des Schwamms in Analogie zu den anderen SAPKs hauptsächlich aus einer PK-Domäne bestehen, die in 12 Subdomänen (I-XI) unterteilt wird und typisch für Eukaryoten ist (s. Abb. 4.3). Besonders die Subdomänen VIa-VIII sind hoch konserviert. Außerdem wurden folgende PK-spezifische Konsensussequenzen identifiziert (HANKS *et al.*, 1988; HANKS und HUNTER, 1995): [1] **GXGXXG** in Subdomäne I, [2] **AXKXL** in Subdomäne II, [3] **HRDLKXXN** in Subdomäne VIb, [4] **DFG** in Subdomäne VII und [5] **APE** in Subdomäne VIII. Diese Motive sind in beiden SAPKs aus *S. domuncula* zu 100 % konserviert. Die in Subdomäne VIb lokalisierte Sequenz enthält außerdem das für Ser/Thr-PKs typische Motiv DLKPEN (HANKS *et al.*, 1988; HANKS und HUNTER, 1995). Bis auf eine AS-Position stimmen beide SAPKs des Schwamms vollständig mit diesem überein (s. Abb. 4.3).

In Subdomäne VIII (s. Abb. 4.3) befindet sich eine Sequenzsignatur (—), die kennzeichnend für alle Mitglieder der MAPKs ist und das für diese PK-Familie charakteristische Dualphosphorylierungsmotiv TXY (\*\*\*) enthält (KÜLTZ, 1998): [LIVM][TS]X[YX][LIVM]XT-[KR][WY]YRXPX[LIVM][LIVM]. Die Proteinsignatur von p38\_SD ist bezüglich dieser Konsensussequenz nicht zu 100 % konserviert. Hier sind die Positionen der Reste Y (\*6) und W (\*7) im Vergleich zu anderen MAPKs gegeneinander ausgetauscht. Dagegen entspricht JNK\_SD diesem allgemeinen Motiv der MAPKs vollständig. Erkennbar ist weiterhin, dass JNK\_SD analog zu anderen SAPK1/JNK-Mitgliedern das typische TPY-Motiv besitzt. Demgegenüber weist p38\_SD an gleicher Position übereinstimmend mit den SAPK2/p38 MAPK-Mitgliedern sowie mit *S. cerevisiae* HOG1 das für diese SAPKs charakteristische TGY-Motiv auf.

Bezüglich der SAPK1/JNK-Subfamilie wurden 2 spezifische Sequenzsignaturen (—) nachgewiesen (KÜLTZ, 1998): LSRPFQNXTHAKRAY [über die Subdomäne II und III sich erstreckend] sowie MXLDHXR[LIVM]SYLLYQM [über die Subdomäne V und VIa sich erstreckend] (s. Abb. 4.3). JNK\_SD weicht bezüglich des zuerst erwähnten Motivs an 3 AS-Positionen ab. Dabei wird ein S durch ein V (\*1), ein H durch ein Y (\*2) sowie ein Y durch ein F (\*3) ersetzt. Hinsichtlich des zuletzt aufgeführten Konsensusmotivs unterscheidet sich JNK\_SD an 2 AS-Positionen. Zum einen ist der für SAPK1/JNK-Mitglieder charakteristische Rest M<sub>121</sub> [bezüglich JNK (Hs)] gegen ein I ausgetauscht und zum anderen ist am C-terminalen Ende dieses Motivs ein M durch ein L substituiert (\*4). Von den insgesamt 18 SAPK1/JNK-spezifischen AS-Positionen (KÜLTZ, 1998) können in JNK\_SD 14 gefunden werden. Zu diesen zählen die Reste Q<sub>37</sub>, N<sub>114</sub>, C<sub>116</sub>, M<sub>121</sub>, L<sub>123</sub>, D<sub>124</sub>, H<sub>125</sub>, S<sub>129</sub>, V<sub>158</sub>, P<sub>184</sub>, N<sub>205</sub>, W<sub>234</sub>, F<sub>280</sub> und P<sub>281</sub> [JNK (Hs)] (s. Abb. 4.3). Dagegen ist Q<sub>95</sub> [JNK (Hs)] durch ein A, Q<sub>240</sub> [JNK (Hs)] durch ein V und R<sub>263</sub> [JNK (Hs)] durch ein Q ersetzt (Austausch von M<sub>121</sub> s. oben).

Im Bezug auf die SAPK2/p38 MAPK-Subfamilie konnten 2 spezifische Sequenzsignaturen (—) identifiziert werden (KÜLTZ, 1998): LL[KR]X[LIVM]XHEN[LIVM]IXLLDVF[TS]P

[über die Subdomäne III und IV sich erstreckend] und AVNEDCEL[KR][LIVM]DF [über die Subdomäne VIb und VII sich erstreckend] (s. Abb. 4.3). Hinsichtlich des zuerst erwähnten Konsensusmotivs weicht p38\_SD lediglich an einer Position ab. Es handelt sich dabei um den N-terminalen AS-Rest L dieses Motivs, der gegen ein Y im Schwammprotein ausgetauscht ist (\*5). Im Hinblick auf die zuletzt erwähnte Konsensussequenz ist p38\_SD zu 100 % identisch. Von den insgesamt 5 AS-Positionen, die für die Mitglieder der SAPK2/p38 MAPK-Subfamilie kennzeichnend sind (KÜLTZ, 1998), wurden 2 in p38\_SD nachgewiesen (s. Abb. 4.3). Dabei handelt es sich um die Reste A<sub>158</sub> und E<sub>179</sub> [bezüglich p38 (Ce)]. Die AS-Position S<sub>62</sub> [p38 (Ce)] ist, wie im Fall von HOG1, bei p38\_SD durch ein T substituiert. Ferner sind T<sub>106</sub> [p38 (Ce)] durch ein M und T<sub>204</sub> [p38 (Ce)] durch ein K ersetzt.

Wie schon erwähnt, konnte durch das Alignment auch der Gehalt identischer AS der analysierten SAPKs ermittelt werden (s. Abb. 4.4).

	identische AS mit JNK_SD (in %)		identische AS mit p38_SD (in %)
JNK (Ce)	47	p38 (Ce)	56
JNK (Dm)	63	p38 (Dm)	59
JNK (Cc)	55	p38 (Cc)	62
JNK (Gg)	60	p38 (XI)	65
JNK (Hs)	61	p38 (Hs)	64
p38_SD	40	JNK_SD	40
HOG1 (Sc)	32	HOG1 (Sc)	37

**Abb. 4.4:**

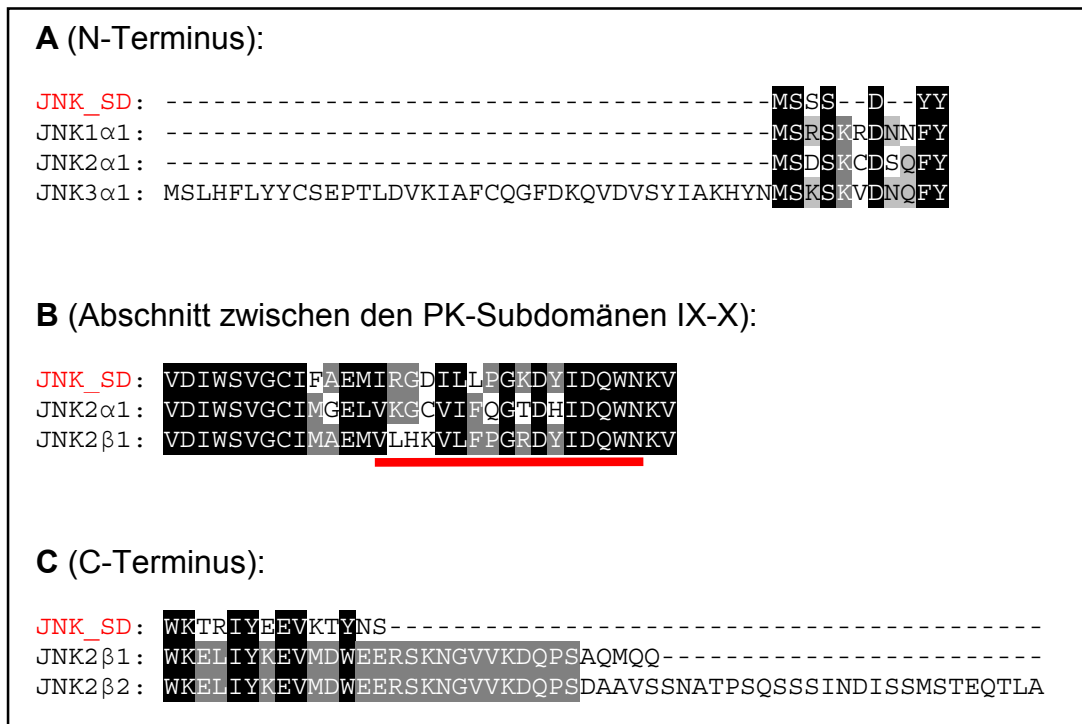
Ermittlung des Gehalts identischer AS zwischen JNK\_SD, bzw. p38\_SD, und den jeweils aufgeführten SAPKs anhand des in Abb. 4.3 präsentierten Alignments und des statistischen Reports von GENEDOC 2.4 (Bezeichnung der Sequenzen s. Abb. 4.3).

Diese Gegenüberstellung veranschaulicht, dass beide SAPKs des Schwamms auch hinsichtlich des Gehalts identischer AS zu ihren jeweiligen Subfamilienmitgliedern ähnlicher sind als zueinander (s. Abb. 4.4). Damit wird die Analyse des in Abb. 4.3 präsentierten Alignments (anhand dessen für JNK\_SD und p38\_SD separat spezifische Motive und AS-Reste der SAPK1/JNK- und SAPK2/p38 MAPK-Subfamilie identifiziert werden konnten) noch einmal bestätigt. Dies dokumentiert zudem, dass die evolutionäre Trennung beider Subfamilien (s. Kap. 5.1) schon vor der Entwicklung der Schwämme stattgefunden haben muss. Ferner grenzen sich beide SAPKs aus *S. domuncula* aufgrund ihrer Identitäten gegenüber *S. cerevisiae* HOG1, einen Repräsentant der YSAPK-Subfamilie, ab (s. Abb. 4.4).

Weiterhin wurde untersucht, ob JNK\_SD möglicherweise mit einer der 10 JNK-Isoformen (s. Kap. 1.5.1.1) signifikant übereinstimmt. Diese kommen vornehmlich in höheren Deuterostomia vor. Mit Hilfe dieser Analyse sollte herausgefunden werden, welche von diesen Isoformen ursprünglich existierte und von welcher die anderen demzufolge phylogenetisch abstammen. Um dies zu überprüfen, wurde JNK\_SD mit den aus *H. sapiens* stammenden JNK-Isoformen JNK1 $\alpha$ 1 [Acc. Nr.: L26318], JNK1 $\alpha$ 2 [U34822], JNK1 $\beta$ 1 [U35004], JNK1 $\beta$ 2 [U35005], JNK2 $\alpha$ 1 [U34821], JNK2 $\alpha$ 2 [L31951], JNK2 $\beta$ 1 [U35002], JNK2 $\beta$ 2 [U35003], JNK3 $\alpha$ 1 [U34820] und JNK3 $\alpha$ 2 [U34819] mittels CLUSTALW 1.7 verglichen sowie mit Hilfe des statistischen Reports von GENEDOC 2.4 analysiert.

Dadurch konnte ermittelt werden, dass JNK\_SD mit keiner der JNK-Isoformen eine entscheidende Übereinstimmung aufweist. Werden jedoch von den 3 *JNK*-Genen jeweils deren  $\alpha$ 1- sowie  $\alpha$ 2-Isoformen mit der JNK des Schwamms verglichen, fällt zumindest auf, dass JNK\_SD die geringste Identität zu beiden JNK3-Isoformen aufweist [bezüglich JNK3 $\alpha$ 1: 57 % und JNK3 $\alpha$ 2: 52 % identische AS]. Die JNK aus *S. domuncula* besitzt des weiteren eine höhere Übereinstimmung mit der jeweils kürzeren Spleißvariante der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoformen der JNK1- sowie JNK2-Proteine [61-62 %]. Im Vergleich dazu weisen die JNK-Isoformen mit einem verlängerten C-Terminus geringere Identitäten auf [55-56 %]. Eine weiterreichende Klassifizierung von JNK\_SD bezüglich der JNK-Isoformen ist jedoch nicht möglich. Der Vergleich von JNK\_SD mit den jeweils analogen Isoformen der JNK1- und JNK2-Proteine zeigte, dass die JNK des Schwamms nahezu gleiche Identitäten in Bezug auf diese Varianten besitzt [JNK1 $\alpha$ 1: 62 %, JNK2 $\alpha$ 1: 61 %, JNK1 $\beta$ 1: 62 %, JNK2 $\beta$ 1: 62 %, JNK1 $\alpha$ 2: 56 %, JNK2 $\alpha$ 2: 55 %, JNK1 $\beta$ 2: 56 % und JNK2 $\beta$ 2: 56 %]. Zusammenfassend kann als Ergebnis festgehalten werden, dass JNK\_SD weder eine entscheidende Übereinstimmung mit JNK1- oder JNK2-Proteinen aufweist noch eine signifikante Identität zu deren  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Isoformen existiert. Vermutlich handelt es sich bei der JNK des Schwamms um eine Vorläuferform der JNK-Proteine.

Zur Verdeutlichung dieses Ergebnisses wurden die Sequenzbereiche, die für eine Unterscheidung der JNK-Isoformen maßgebend sind, von repräsentativen JNKs aus *H. sapiens* mit JNK\_SD mittels CLUSTALW 1.7 verglichen und durch GENEDOC 2.4 dargestellt (s. Abb. 4.5).



**Abb. 4.5:**

Alignment der abgeleiteten AS-Sequenzbereiche von SDJNK [*JNK<sub>SD</sub>*; AS 1-7 in **A**, 202-233 in **B** und 348-361 in **C**] mit den aus *H. sapiens* stammenden JNK-Isoformen: JNK1α1 [L26318; AS 1-11], JNK2α1 [U34821; AS 1-11 in **A** und 206-237 in **B**], JNK3α1 [U34820; AS 1-49], JNK2β1 [U35002; AS 206-237 in **A** und 352-382 in **B**] und JNK2β2 [U35003; AS 352-406]. Es wurden lediglich die 3 Sequenzbereiche ausgewählt, die für eine Klassifizierung der JNK-Isoformen entscheidend sind: **A**: N-Terminus, **B**: Abschnitt zwischen den PK-Subdomänen IX und X sowie **C**: C-Terminus. Die unterschiedlichen Graustufungen zeigen den Grad der Übereinstimmung an (schwarz 100 %; dunkelgrau ≥ 80 %; hellgrau ≥ 60 % identische AS). Lücken werden durch (–) symbolisiert. Das zur Unterscheidung der α- und β-Isoformen ausschlaggebende Motiv ist mit (–) dargestellt (**B**).

Abb. 4.5A zeigt den Vergleich der N-Termini zwischen JNK<sub>SD</sub> und den α1-Isoformen der 3 JNK-Gene. Auf diese Weise wird deutlich, dass die JNK des Schwamms analog zu den JNK1- und JNK2-Proteinen keinen verlängerten N-Terminus besitzt. Dieser ist lediglich für die JNK3-Isoformen charakteristisch (s. Kap. 1.5.1.1).

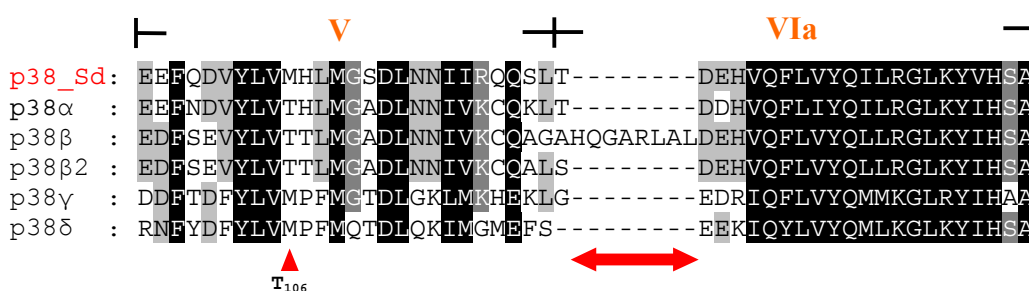
Ein sich über die Grenzen der PK-Subdomänen IX und X erstreckender Sequenzbereich von JNK2α1, JNK2β1 und JNK<sub>SD</sub> ist in Abb. 4.5B dargestellt. Das in dem Bereich lokalisierte Motiv (–) ist ausschlaggebend für die Unterscheidung der α- und β-Isoformen der JNK1- sowie JNK2-Proteine (s. Kap. 1.5.1.1). Es ist zu erkennen, dass JNK<sub>SD</sub> mit keiner der beiden Isoformen entscheidend übereinstimmt.

In Abb. 4.5C sind die C-Termini der verschiedenen langen Spleißvarianten der JNK-Proteine (s. Kap. 1.5.1.1) JNK2β1 und JNK2β2 dem C-terminalen Ende von JNK<sub>SD</sub> gegenübergestellt. Dadurch wird ersichtlich, dass auch dieser Bereich des Schwammproteins keine signifikante Übereinstimmung mit den JNK-Isoformen des Menschen besitzt.

Um zu überprüfen, ob auch p38\_SD mit einer p38-Isoform (s. Kap. 1.5.2.1) signifikant übereinstimmt, wurde dessen Sequenz mit den aus *H. sapiens* stammenden Isoformen p38 $\alpha$  [Acc. Nr.: L35264], p38 $\beta$  [U53442], p38 $\beta$ 2 [U92268], p38 $\gamma$  [X79483] und p38 $\delta$  [AF015256] mittels CLUSTALW 1.7 verglichen und mit Hilfe des statistischen Reports von GENEDOC 2.4 untersucht.

Durch diese Analyse wurde deutlich, dass p38\_SD die höchste Übereinstimmung mit p38 $\alpha$  aufweist [64 % identische AS], gefolgt von p38 $\beta$ 2 [61 %] und p38 $\beta$  [59 %]. Die Isoformen p38 $\gamma$  [50 %] sowie p38 $\delta$  [49 %] besitzen mit Abstand die geringsten Identitäten hinsichtlich p38\_SD.

Zur weiteren Untersuchung wurden die PK-Subdomänen V und VIa, die bei p38 MAPKs für die Unterscheidung ihrer Isoformen von großer Bedeutung sind, mit den zuvor vollständig analysierten p38 MAPK-Mitgliedern (s. oben) mittels CLUSTALW 1.7 verglichen und mit Hilfe von GENEDOC 2.4 gegenübergestellt (s. Abb. 4.6).



**Abb. 4.6:** Alignment der PK-Subdomänen V und VIa von p38\_SD [AS 104-151] mit den von p38-Isoformen aus *H. sapiens*: p38 $\alpha$  [L35264; AS 97-144], p38 $\beta$  [U53442; AS 97-152], p38 $\beta$ 2 [U92268; AS 100-147], p38 $\gamma$  [X79483; AS 98-144] und p38 $\delta$  [AF015256; AS 97-144]. Die unterschiedlichen Graustufungen zeigen den Grad der Übereinstimmung an (schwarz 100 %; dunkelgrau  $\geq$  80 %; hellgrau  $\geq$  60 % identische AS). Lücken sind durch (-) symbolisiert. Die für die  $\beta$ -Isoform typische Insertion ist mit ( $\leftrightarrow$ ) und die für die Sensitivität gegenüber dem Inhibitor SB203580 ausschlaggebende AS-Position T106 [bezüglich p38 $\alpha$ ] ist mit ( $\blacktriangle$ ) gekennzeichnet.

Der in Abb. 4.6 dargestellte Vergleich zeigt, dass p38\_SD zu Beginn der Subdomäne VIa keine Insertion besitzt. Diese ist lediglich für die p38 $\beta$ -Isoform charakteristisch (s. Kap. 1.5.2.1).

Der für die Sensitivität gegenüber dem Inhibitor SB203580 kritische AS-Rest befindet sich an Position 106 [bezüglich p38 $\alpha$ ] (s. Kap. 1.5.2.1 und Abb. 4.6). Im Unterschied zu den SB203580-sensitiven Isoformen p38 $\alpha$ , p38 $\beta$  und p38 $\beta$ 2, die an dieser Position ein T besitzen, kommt bei p38\_SD dort ein M vor (s. Abb. 4.6). Da p38 $\gamma$  und p38 $\delta$  an vergleichbarer Stelle ebenfalls ein M aufweisen (s. Abb. 4.6) und diese Isoformen bezüglich SB203580 unsensitiv sind (s. Kap. 1.5.2.1) wird angenommen, dass sich p38\_SD ebenso wenig durch diesen Inhibitor hemmen lässt (s. Kap. 4.2). Diese Vermutung steht damit im Gegensatz zu dem vorab

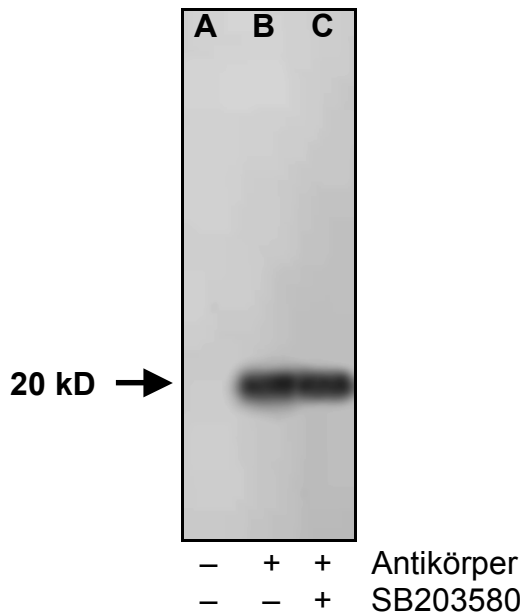
ermittelten Ergebnis bezüglich des Gehalts identischer AS. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass p38\_SD eine ursprüngliche Form der p38 $\alpha$ /p38 $\beta$  MAPK darstellt. Wird hingegen die Sensitivität gegenüber SB203580 in den Mittelpunkt gestellt, muss die p38 MAPK des Schwamms vielmehr mit den weniger identischen Isoformen p38 $\gamma$  und p38 $\delta$  (s. oben) verglichen werden.

## 4.2 Inhibitorstudie mit SB203580

Aufgrund der Sequenzanalyse (s. Kap. 4.1.3 und Abb. 4.6) wird angenommen, dass p38\_SD nicht durch den p38-spezifischen Inhibitor SB203580 gehemmt werden kann. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde eine *in vitro* Kinase-Studie durchgeführt.

Dafür wurde gemäß Kap. 3.19.6 Gewebe von *S. domuncula* in hyperosmotischem Medium inkubiert und das daraufhin aktivierte p38\_SD mit dem phosphospezifischen Phospho-p38 MAP Kinase Antikörper (s. Kap. 3.6.1) immunpräzipitiert. Die sich anschließende Protein Kinase Reaktion erfolgte in Anwesenheit des Substrats MBP und [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (s. Kap. 3.19.6). Zu einem dieser Ansätze wurde die Pyridinylimidazolkomponente SB203580 in einer Konzentration von 10  $\mu$ M beigefügt (dies erfolgte vor Substratzugabe). Die verschiedenen Reaktionsansätze wurden durch eine SDS-PAGE (s. Kap. 3.19.4) elektrophoretisch aufgetrennt und die Autoradiographie des Gels mit Hilfe eines PhosphorImagers (s. Kap. 3.19.6) dokumentiert (s. Abb. 4.7).

Die Autoradiographie des Gels demonstrierte, dass der p38-spezifische Inhibitor SB203580 in einer Konzentration von 10  $\mu$ M die Protein Kinase Reaktion nicht hemmen konnte (s. Abb. 4.7). In Abwesenheit des Phospho-p38 MAPK Antikörpers, war keine Phosphorylierung des p38-spezifischen Substrats MBP (HAN *et al.*, 1998) zu erkennen (Spur A). Wurde dagegen dieser phosphospezifische Antikörper bei der Immunpräzipitierung zugegeben, konnte ein starkes Signal beobachtet werden (Spur B). Dies stimmte mit der Größe von MBP (20kD; ROTH *et al.*, 1987) überein. Ein messbarer Unterschied in der Stärke des Signals war nicht feststellbar, wenn SB203580 beigefügt wurde (Spur C). Dieses Ergebnis belegt somit die aus der Sequenzanalyse gewonnene Vermutung, dass p38\_SD nicht durch den kompetitiven Inhibitor (SB203580) einiger p38-Isoformen gehemmt wird (s. Kap. 4.1.3).

**Abb. 4.7:**

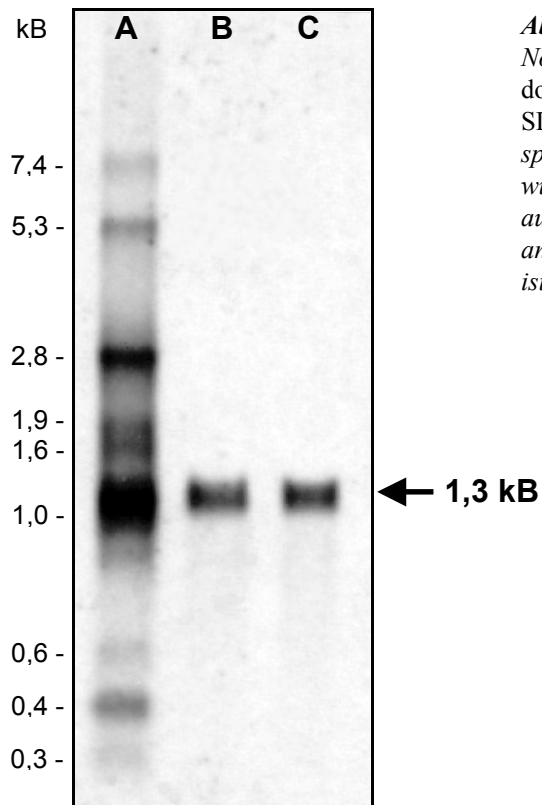
Einfluss der Pyridinylimidazolkomponente SB203580 auf die Phosphorylierung des Substrats MBP durch immunpräzipitiertes p38<sub>SD</sub>. Immunpräzipitationen wurden mit Proteinlysaten von hyperosmotisch behandeltem Schwammgewebe in Abwesenheit (-; Spur A) und Anwesenheit (+; Spur B und C) des phosphospezifischen Antikörpers Phospho-p38 MAP Kinase durchgeführt. Die Protein Kinase Reaktion erfolgte daraufhin in Abwesenheit (-; Spur A und B) sowie in Gegenwart von 10 µM (+; Spur C) des potentiellen Inhibitors SB203580. Der Inhibitor wurde vor Substratzugabe beigelegt. Die im Reaktionsgemisch enthaltenen Proteine wurden anschließend mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die Autoradiographie des Gels ist abgebildet.

### 4.3 Northern Blot-Analysen

Zur Bestimmung der Gesamtlänge beider *SAPK*-mRNAs wurden Northern Blots durchgeführt (s. Kap. 3.16.4).

Dabei erfolgte die Auftrennung von zunächst jeweils 7,5 µg Total-RNA (s. Kap. 3.16.2) und 30 ng des DIG-markierten RNA Molecular Weight Markers (s. Kap. 3.7) durch ein RNA-Agarosegel (s. Kap. 3.16.3). Zum Nachweis der RNA von *SDJNK* wurde mit den Primern *SDJNKlabF1* und *SDJNKlabR1* (s. Kap. 3.13.3 und Abb. 4.1) eine 880 Bp lange DIG-markierte Sonde konstruiert (s. Kap. 3.16.4.3). Für die Detektion der *SDp38*-mRNA wurde mit der Primerkombination *SDp38labF1* und *SDp38labR1* (s. Kap. 3.13.3 und Abb. 4.2) eine 1100 Bp lange Sonde synthetisiert (s. Kap. 3.16.4.3). Die Hybridisierung dieser DNA-Sonden fand bei einer Temperatur von 42°C statt. Die Chemolumineszenz des Northern Blots ist in Abb. 4.8 dargestellt.

Mit beiden Sonden konnte jeweils eine etwa 1,3 kB große Bande nachgewiesen werden (s. Abb. 4.8). Damit stimmten die Längen der mRNAs und die der korrespondierenden cDNA-Klone (s. Kap. 4.1.2) überein. Dies beweist, dass beide cDNA-Sequenzen vollständig isoliert wurden und dass vermutlich keine weiteren Spleißvarianten der beiden *SAPKs* existieren, die sich zumindest in ihrer Größe unterscheiden.



**Abb. 4.8:**

Northern Blot-Analyse mit Total-RNA aus *S. domuncula*. Die Membran wurde mit einer SDJNK-spezifischen (Spur B) und einer SDp38-spezifischen (Spur C) Sonde behandelt. In Spur A wurde ein DIG-markierter RNA Längenstandard aufgetragen, dessen Fragmentgrößen in kB angegeben sind. Die Chemolumineszenz des Blots ist abgebildet.

## 4.4 Genomische Sequenz von *SDJNK* und *SDp38*

### 4.4.1 Isolierung und Charakterisierung der genomischen Klone

Zur Analyse der Exon/Intron-Struktur beider *SAPK*-Gene und zwecks phylogenetischer Untersuchungen wurden die Sequenzen von *SDJNK* und *SDp38* auch auf genomischer Ebene bestimmt. Dies diente außerdem als Kontrolle der cDNA-Basenabfolge.

Dazu wurden verschiedene PCRs (s. Kap. 3.15.1) mit den im Kap. 3.13.2 angegebenen Primern sowie mit genomischer DNA (s. Kap. 3.15.12) als Matrize durchgeführt. Die amplifizierten Fragmente wurden nach Ligation in *pGEM*<sup>®</sup>-*T* (s. Kap. 3.15.5.1) und einer Plasmidpräparation (s. Kap. 3.15.11.1) sequenziert (s. Kap. 3.15.14). Dabei wurden die in Kap. 3.13.6 aufgeführten, genspezifischen Primer SDJNKgF1-F8 sowie SDp38gF1-F3 neben T7 und SP6 verwendet. Die erhaltenen genomischen Fragmente ergaben die vollständige Exon/Intron-Struktur innerhalb des kodierenden Bereichs von *SDJNK* [*SDJNKge*] und *SDp38* [*SDp38ge*] (s. Abb. 4.9 und 4.10).

Sequenz von *SDJNKge*:

**M S S S D Y Y S Q R V G D T V F T V Q K R Y T N L T N**  
 1 ATGTCCTTCATCCGACTATTACTCTCAGAGGGTAGGGGATACAGTGTCTTACTGTACAGAAGAGGTACACAAACCTCACTAAC  
  
**I G S G A Q G V V C [1]**  
 82 ATTGGCAGTGGAGCACAGGGAGTTGTATG**GTAAGTYATACTCTTGTGTAGGTGGCTTATGAATAGATCTCTAGTATTGAAT**  
 163 **ACAATTACACAAACATACAGTCTCTGTGATAGGTTGTACAGTAATGGCTTATAGAGAGATTCTTAATAATAATATATGTAAT**  
 244 **TAGATACATTAATTTTACAGAACTGTCAGTCTCTGTGTACATGTAGTTAGACTCTTGACTGTGTAATGGCTTATGTTG**  
 325 **AATAGATCCCAAGCGTTGATTACATTAATAAGAAACATACGGTTGTGTGGTACAGTGTAGGTCAGAGTCTTGTGAATGAAA**  
 406 **ATGGCTTATAGCGAGACCAGGCTCCTATATAATCCWGGCAGTTAAATACATTTTACAGATATGTACAGTTGTGTGATACATG**  
 487 **TGGGTTAGGCTCATGTGTGTAGATATGGCTTACAGATTCATGTACATGTGTTCCAAAAGTTTATTTTTATCAATCTACTAT**  
 568 **ATGTACAAATGTAAACAGGCTAYATTATACATGTAAGTAAAGATCCCATATTGTTTTATAGGCTATTTAATACACCATACTA**  
 649 **AAGCTACTACAGGTTATCTACAGTACTTGAACACTAGACAACCTAGTGTACCTTAACTACACAATCATCAAGATTAATGAC**  
 730 **GATTAACAGCAATGTGTAGTGTAGATGGTAAGCAATAAATAGGACAGACACAACATAACTATCTAGATAGAAATATAA**  
 811 **TAATGCAACCAGATGCTTGACCTTGAGAGTCAAGAAAGATGGGTTAAAGATCTTTGATGGTACCATTTCATCTGGTCTTTA**  
 892 **CAATAAATAACCATTTGTCGATAGAAATTTGAAGTAAAAAAGTACACTGTAGCTATTGCTGTGAGCACTAGTGGATTTG**  
 973 **TTTTGTCTAGAAAATGTATTGGTCAGCAGTTTTAAATTTGGCTGGTACTGTGAGTCTCATTTGTAGTATAAGTATAGG**  
 1054 **AACGTGTTAGTGGTAATGTCGCCCTAACAGTGTAACTGATGCTGATTTGAGCAGCAATTTTCTACTTATCAACAAATTTCCGATAAG**  
 1135 **TAGGAATTTCTGTAAATATTGAGAGAGATTTTCTGAATCATCACTTTGTGTCAGTGTCTATTATTAGACTTGTGTTGTGAT**  
 1216 **TATGTCGTGTTTGTATATATACTCTTTCTGAACACACACACACACACACACACTCACCCACTCACTCACACACAC**  
 1297 **ACACACACACACCTAATCACTCTCTAATACATGTACATGTACCTAATCACGCACTCACTCACACAACACAGGTTGTCGT**  
 1378 **GTATCTACACAAAAATGTTATCCGTTACACAGCTCACACACACACACACACTCACTCACACACACACACTCACTC**  
 1459 **ACCACACACACACACACTCACTCACACACACACACTCACTCACTCACACACACACACACAGCACACAC**

**S A F D T V T Q E K I A I K K L V K P F Q N E T**  
 1540 **ACACCCAGTTCTGCCTTTGACACTGTCACTCAAGAAAAGATAGCCATTAAAAACTCGTCAAACCTTTTCCAAAATGAGACG**

**Y A K R A F R E L R L M K M V D H K N [2]**  
 1621 **TATGCAAAAAGAGCTTTTACAGAGCTACGACTAATGAAGATGGTCGATCATAAAAAATGTAAGTATCATGTCAATATTCACC**  
 1702 **ACATCAAAGGGCTTATCTACAACATCTATAGATAAGCAATATACATGTACATATGTAGTGTGCTGTGCTGTYCCTTGTATGTA**  
 1783 **TTTATATGTACATATATTGTGCATTTTGTATTTGTGGTTTTGAAAATGAATGTTACAGGATAATGTGGTATTGTAAGGGT**  
 1864 **ATCCCCCATAACATGCACTCTACATGATTGTGGTTCATGCATAACAAAAGACAAATACCTTACATGTTGTTTTTGCACCA**  
 1945 **GGCAATATGTGGTATTTTGGGACACAACTAGTTGACTGTTTTAGAGAGGGTTGCTGATTGTAGAGTGTACCACAGCTTAA**

**I I G L K N L F T P A K S L D D F Q D**  
 2026 **CAGTTCTGTTTTTCTTTCTTTCAGATAATTGGTCTAAAGAATCTTTTTACCCAGCCAGTCTCTGGATGATTTTCAGAT**

**V [3]**  
 2107 **GTGTAAGTCGCAGTTCCTAATTTGATTAGTTCCTCAACCACAATGCTTTGAGTTCAGAGTACAAAAGTTGGCACATCTATA**  
 2188 **GAATATATATTGTAGTTACTATGTACCAAATTTAAGCATCTCTGATAGGATTCAGTACAGAGTTACAACCATGTGAAGAATG**  
 2269 **ATAAAGTACTGTATATCACATAATTACAACACCAGTAAAGAATAATCACCTTTGGGCCCTCATGTGACAAAAACGGATGAA**  
 2350 **TTTGTTTAGGGACACAGTCAGGTAGCACTTACATTTAGTGTGGCTGTAATCACATGACATACGGTATTCAAAAGGTACA**  
 2431 **TGTATGAATATTTTGTTCATTTGTGTTTTAGAAAGGCTGTCTGTCTCTTTATCTCTGTTGTGTTGACTTTCACTAGTTTT**  
 2512 **CTGTTTTGATTGAAAGTTAGTTTGTATCTTTTGTAGATGTTAATGTTTTCCTCAGTTGACCTTATCAGCTTTTGTATGAT**  
 2593 **ATTCCTGATAGCTTGAATTCATGTGTACTGTACATCTGATTGAGGTGTCCATTGTACAAACATGTAGATTTGGTAGTTC**  
 2674 **CCATAAAGAGTTGCTTTGACACATGTATACATGACGTATTCTGTTGACATGAAACACGTATAGGGGTAACCTGCTTCTCTG**  
 2755 **TCCATCATGTTACCTGGGGTTGCAGAACATTGTAATTTAGACATGTCAAACAATAATACCCCCCCCCACACACACAC**

**Y I V M E L M D A N L C R V I G I**  
 2836 **ACACACATACACACACACACATACACGTTACATAGTGTAGGAGCTAATGGATGCTAACCTTTGTCGTGTGATTGGTAT**

**E L D H D R M S Y L L Y Q L L C G I K [4]**  
 2917 **CGAATTGGACCACGACAGAATGTCATATCTTCTCTATCAGCTTCTCTGTGGGATTAAGGTAATGGTGTTTAGTGGGTTGGG**  
 2998 **CCTCTCTAATAAAGCACCTCTCTATTAAGGCCCTTGTGTAATTTGGTACATCTCTATTGAGCCCCCTTCTTTTAAAGAG**  
 3079 **TCCACCTCTCTATTGAAGCCCCCTGCTTGTCTTAACTTATCTAAAGAGACTATCTCTCTATTGAGCCCCCTTGTCAAGTCC**  
 3160 **CAATGTACATGTAGAGTGTACATGTATATGTACAGATGACGATAATTCATTCCTACCTGTCTAATAGTGGACCTGTGTGA**

**H L H S A G I I H R [5]**  
 3241 **AACTTGTAATTTCTTTCTTCTCCATAGCACTTACATTCAGCTGGGATCATAACAGAGTAAGTAATTTGCTTGTGTTGT**

**D L K P S**  
 3322 **GCAAAGTTATTAATAATGCTTTGGCTGGGACAGTTTGTGAGTTGTTTTATCATCAATTTTTTCTCAGACTCTCAAACCCAG**

**N I V V K E D C S L K [6]**  
 3403 **TAACATTTGTGGTGAAGGAGGACTGCTCACTGAAGGTAACATAGATCTATGTATTGACTGTTTGGATCAGTACAAGTATACTA**  
 3484 **GTATATTGCACGTGTACACACTATAACAACATTTGCACAGACCTTACACACATGAAAACCTAGTACAACCTAGTGTACCTTTA**  
 3565 **ACCTACACAATCATCAAGATTAATGATCTTAAACAGCAATGTGTAGTGTAGGCGGTAAGCAAATAAATAGGACAGACACAA**  
 3646 **CACATAACTATCTAGATAGAAAATAAATAATGCAACCAGGATGCTTACCTTGAGAGTCAAGAAAGATGGGTTTACATCTG**  
 3727 **CATGTACTTACATGAAGGCTTTTATTGTTTATAGTGTGATTAGCTAACACTATGATGTCTTTTCAATTTTCTGCACTGTCCA**

**I L D F G L A R T A D Q T F N M T P Y V V T R Y Y R A**  
 3808 **GATTCTAGACTTTGGTCTGGCACGTACAGCTGATCAGACCTTCAACATGACCCCTATGTGGTACTCGCTACTATAGAGC**



Nukleotidaustausch entdeckt werden, der im Vergleich zur cDNA-Sequenz eine veränderte AS-Abfolge zur Konsequenz hätte.

### Sequenz von *SDp38ge*:

```

M A V Q V L P E N P A K P G Y Y K M E L F K T V W E A
1  ATGGCTGTTCAAGTCTTGCCTGAAAATCCAGCAAAGCCTGGCTATTACAAGATGGAGCTGTTCAAGACTGTCTGGGAGGCT

P E R Y Q D L S P I G T G A Y G T V C [1]
82  CCAGAGAGGTATCAAGATCTCAGTCTTATTGGACAGGGCGTATGGGACCGTGTGGTGGAGCTTGTGTTTTAATAAATTATA
163  GCTATAGTATAGTAGCTAGCAGCCTTAGCCAGCAGCTAGAAGTATACTTTATAGAGAGACTGTCCCTCCCCAATACGGTA
244  TCAAAAACAAAATTAGCAAGTGGTATGATCAGCTGACTAATCACTTAGTCTTGTCTACCTTTGTCTTCCATGCTCATAAT

S A I D T R Y N V R V A L K K L A R P F
325  TTTTCATCAGCCCCACTCAGCTCTGCTATAGACACGAGGTACAATGTTCTGTGGCCTTGAAGAACTAGCCCGTCCGTT

Q T A V H A K R T Y R E L R Y L K H M K H E N [2]
406  CCAGACAGCTGTACATGCCAAAAGAACTTATAGGGAGCTGCGTTACCTCAAACATATGAAACATGAAAATGTCAGTTTATCA
487  AACACACACGCACACACACCTGTACTGCATATAGCACATCATACTGTTATATAATAGAGTGAATGTCATTGTGTTTCCACA
568  CAGGGGAATATGAGGGGACCCTATATTGTTTCTACGTGGTTATACAAGTCCCCATGTTGTTGATCTCCCCCACAG

I I G L L D V F S P A S T F E E F Q D V [3]
649  ATAATTGGTCTGTTGGATGTGTTCTCACCTGCATCTACTTTTGAAGAATTTCCAGGATGTGTGAGTCATCAATGCATGTTAC

Y L
730  CACTGACTGGTTTGTGTTAGCCAGTATGCCCCTACTGCTCACTCTACTTTGATATACTGATGTATCATCCCTAGGTACCTT

V M H L M G S D L N N I I R Q Q S L T D E H V Q F L V
811  GTGATGCATTTGATGGGCTCTGATTTGAACAATATTATTCGTGAGCAATCACTCACTGATGAACACGTCACGTTTGGTTC

Y Q I L R G L K [4]
892  TACCAGATCCTCAGAGGACTCAAGGTGAGTCCATTGTCAAACCACTGGGAAACAATGAATAATGCCGTTATCCTCATTAC
973  TGTCTGTACATGTGTGTGTGTATGCGTGCATGATGTGTGTGTCATGTGTGTGTCATAGCATAAAGTAGTATAT
1054  GAAATTCGACGCTGCAAAATCAATGTGGTCTGTACTTGTGCTGAGTCAGATGGGGCACCACCATTCTGTTTACTGTCTGTGAT

Y V H S A A I V H R D L
1135  TTTAATTAAAGGAAATCCCCAATCATGTTTGTCTGTGTACAGTATGTCCACTCTGCTGCGATTGTCCATCGTGATCTGA

K P S N I A V N E D C E L R [5]
1216  AACCAAGCAACATAGCTGTCAATGAGGACTGTGAGCTTCGGGTGAGCTGTTGTCTAGTGTGTCAGTACCACACACGTGATAT
1297  ATGACTATGAGTAAATGACCCATGTGTAGTATGTGCTCTAACATACTGTAGTCATTACATGTAGTATAGCTACAGCTAA

I L D F G L A R A T D E E M T G Y V A
1378  TTAATTATGTTTACATTATGCAGATCTTGGATTTTGGTCTGGCCGAGCTACTGATGAGGAGATGACTGGCTATGTGGCCA

T R Y W R A P E I M L N W M H Y G M K V D I W S V G C
1459  CGAGGTATTGGAGGGCACCTGAGATCATGCTCAATTGGATGCATTATGGAATGAAGTGGACATATGGTCTGTTGGGTGTA

I M A E L L T G Q V L F P G T D [6]
1540  TCATGGCAGAAGTCTGACTGGGCAAGTTCTCTTCCGGGAAGTACCCTATCCCTTGTGATACACTACTAGAAAGGTTACA
1621  TGACCAGTATATAGTTTAAAGGTAGTTTGTAAATACAGTAATGGCTAAGTCCACAAGGGTCCCCCTTGGGTTTACAAAGG
1702  CTAGATGTACACAAGGGTCCCCCTTGGGTTTACAAAGGCTAGATGTACACTAGGGTCCCCCTTGGGTCGACAAAGGCT

H I D Q L T R I L Q
1783  GGGTTATATCTCTCAAGCACTGGTGTGCATTCTTGTGACAAGGTGATTTAGATATTGACCAGCTGACTAGAATCTTACAAA

I V G T P D K E F L D K I T S E T [7]
1864  TTGTGGGCACACCAGACAAAAGAATTTCTGGACAAAATCACAAGTGAAGTGTGAGATCTTTGTGTACAATGTAACAGTCTA
1945  TGTCTGTGGCATTTAAGGAATGTGGGATAGCGGTGACGATTTCCCTCATTTCCTTAAATATGTGATTATCATAACTAAG
2026  TTATGGCATGTACTAGAGTGTACATACGTACTACTAACAAATGAGTATTGAATTTGCTGTATGTGGTATCTATGATTTTG

A R T F I E S M P N F P R R D F S K
2107  ACACAAGCACACACACACACGCACAGGCAAGGACATTTATTGAGTCAATGCCAAACTTTCCTCGTCGCGACTTTTCAA

F F V G A N P D A V N L L E Q L L S M D P D R R P T A
2188  GTTCTTTGTTGGTGCTAACCTGATGCAGTCAACCTCTTGGAGCAGTTGTTGAGTATGGACCCAGACAGGAGACCGACTGC

E E A L A H P Y F V N Y A D P D D E [8]
2269  TGAGGAGGCCCTGGCTCATCCATACTTTGTCAATTATGCTGATCCTGACGATGAGGTGGATCATGTGATAAAGTGGATGTT

```

```

                P N S P P
2350 ATGTTGACATTTAGATGACTGTTGTGTACACACACACATACTCATACTTACACACACACACACAGCCTAATAGTCCCTCC
        Y D D T F E K L E Q D Q L G W K [9]
2431 TTATGACGATACATTTGAGAACTTGAGCAAGACCAACTTGGTTGGAAAAGTAAGTGCATAATTATAAGAAATACTTGTAG
2512 ACATCTGTATACTAATTACCCATTGGGGACCCCTTATGTACATCAACCTGTTAAAGATGCTAGAGAATTGATTGACCTTTGC

        K L V L D E I T A F Q T D P T L Y Q Q S L *
2593 CCCTACAGAACTGGTCCGTGACGAGATTACTGCCTTTCAAACCGACCCACCCTCTACCAACAAAGCTTATGA

```

**Abb. 4.10:**

Nukleotidsequenz und abgeleitete **AS-Abfolge** des Klons *SDp38ge* [Acc. Nr.: AJ307674]. Die kodierenden Sequenzen sind schwarz, die Introns **rot** dargestellt. Die Reihenfolge der Introns ist in den Klammern angegeben.

Vom Start-ATG bis zum Stop-Codon (TGA) ist *SDp38ge* 2665 Bp lang. Die kodierende Sequenz wird lediglich durch 9 Introns unterbrochen. Verglichen mit *SDJNKge* sind die nichtkodierenden Bereiche im Durchschnitt wesentlich kürzer. Beide Gegebenheiten führen dazu, dass der Anteil der Introns an der Gesamtlänge des Klons nur 59 % [1564 Bp] beträgt. Das kürzeste Intron besteht aus 93 Bp [Intron 8], das längste aus 263 Bp [Intron 4]. Alle Introns folgen ausnahmslos der GT-AG Regel (s. oben). Ebenso wie bei *SDJNKge* konnte kein Nukleotidaustausch nachgewiesen werden, der hinsichtlich der cDNA-Sequenz eine andere AS-Abfolge bedingen würde. Außerdem wurden in beiden *SAPK*-Genen Abschnitte mit repetitiven „CACA“-Sequenzen gefunden (s. Abb 4.9 und 4.10). Ansonsten wiesen die Intronsequenzen der beiden Gene keine signifikanten Übereinstimmungen auf (Alignment nicht abgebildet).

#### 4.4.2 Vergleich der Exon/Intron-Struktur von *SDJNKge* mit *SDp38ge* sowie mit *SAPK*-Genen anderer Metazoen

Um die Organisation der beiden *SAPK*-Gene des Schwamms zu analysieren, wurden die Intronpositionen von *SDJNKge* und *SDp38ge* miteinander verglichen. Zu diesem Zweck erfolgte mit Hilfe des Programms CLUSTALW 1.7 ein Vergleich der jeweils analogen Exonabschnitte beider *SAPK*-Gene [auf Nukleotid- und AS-Basis] (Alignments nicht abgebildet).

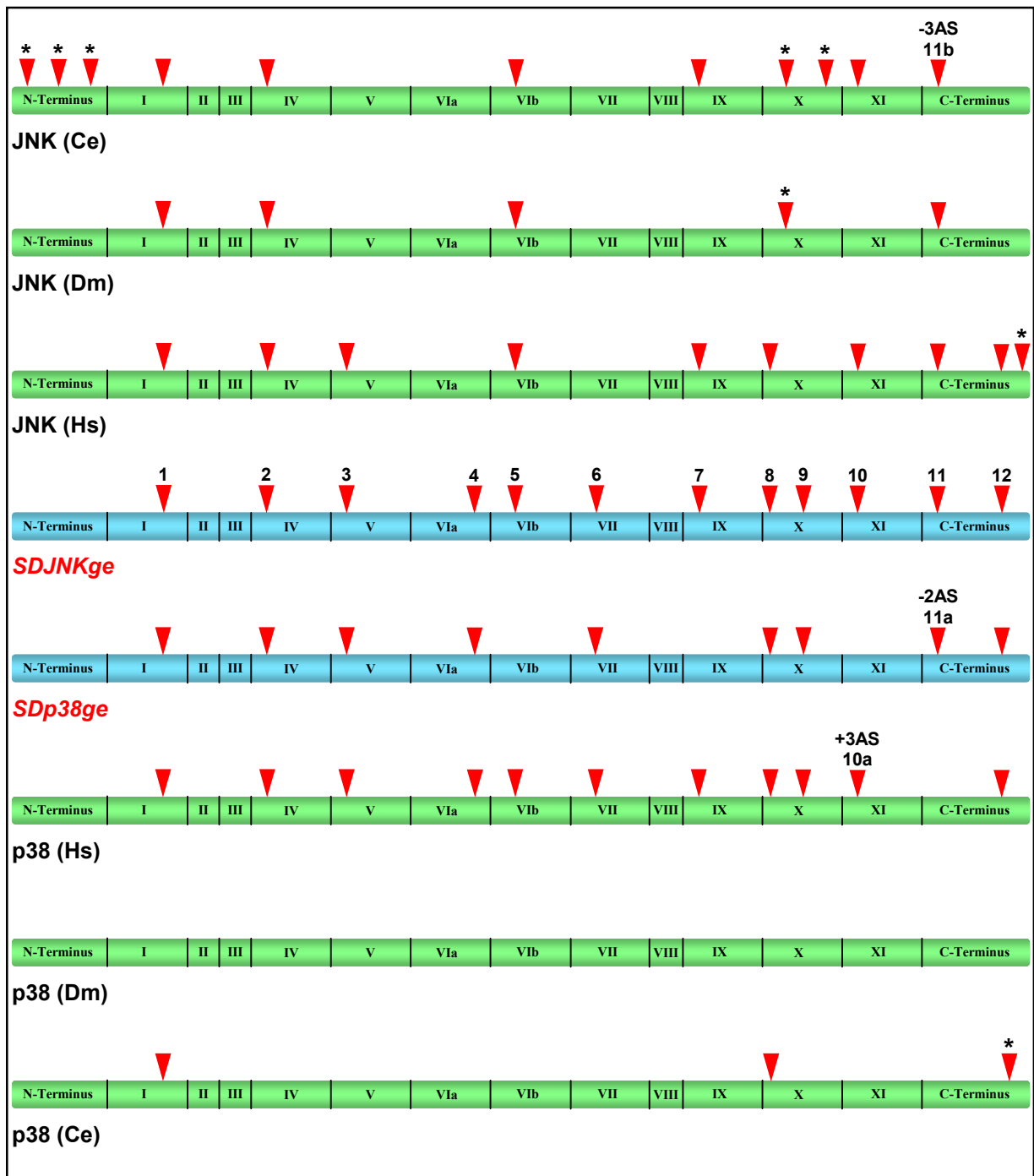
Die Analyse zeigte, dass 8 der 12 Intronpositionen von *SDJNKge* auch in *SDp38ge* exakt konserviert sind (s. Abb. 4.11). Dabei unterbrechen diese Introns die kodierenden Sequenzen nicht nur an gleichen/vergleichbaren AS-Positionen, sondern auch ausnahmslos an identischen Positionen innerhalb des entsprechenden Triplettkodes. Lediglich ein Intron, welches sich im schwach konservierten C-Terminus befindet, ist im Vergleich zu Intron 11 von *SDJNKge* um 2 AS-Positionen [6 Nukleotide] verschoben (s. Abb. 4.11; Intron 11a). Drei Introns von *SDJNKge* [Intron 5, 7 und 10] sind nicht in *SDp38ge* vorhanden (s. Abb. 4.11).

In Analogie zur vorangegangenen Analyse wurden die Exon/Intron-Strukturen der beiden Gene aus *S. domuncula* mit den von ausgewählten *SAPK*-Genen aus *C. elegans*, *D. melanogaster* und *H. sapiens* verglichen (Alignments nicht abgebildet). Deren Sequenzen wurden diesbezüglich von verschiedenen Online-Datenbanken abgerufen.

Der Vergleich verdeutlichte, dass sämtliche Intronpositionen [12], die in beiden *SAPK*-Genen des Schwamms existieren, im Verlauf der Evolution konserviert wurden. Die meisten Introns der aus *C. elegans*, *D. melanogaster* und *H. sapiens* stammenden *JNK*- oder *p38*-Gene unterbrechen die kodierenden Sequenzen an exakt den gleichen Stellen (bezüglich der AS-Position und der Position innerhalb des entsprechenden Triplettkodes!), wie in beiden *SAPK*-Genen aus *S. domuncula* (s. Abb. 4.11). Ferner wurden noch einige nichtkonservierte Intronpositionen identifiziert (\*). Diese phylogenetisch „jüngeren“ Introns konnten hauptsächlich in den Genen beider Protostomia gefunden werden. Bis auf wenige Ausnahmen befinden sich diese außerhalb der konservierten PK-Domäne (s. Abb. 4.11).

Die beiden *p38*-Gene von *D. melanogaster* [*p38A* und *p38B*] weisen innerhalb des kodierenden Bereichs keine Introns auf (s. Abb. 4.11). Das *p38*-Gen aus *C. elegans* besitzt 3 Introns, von denen 2 an konservierten Positionen lokalisiert sind, die auch in beiden *SAPK*-Genen des Schwamms existieren. Das Dritte ist dagegen an einer neuen Stelle im C-Terminus positioniert (s. Abb. 4.11). Die *JNK*-Gene von *C. elegans*, bzw. *D. melanogaster*, werden durch 11, bzw. 5, Introns unterbrochen (s. Abb. 4.11). Sechs Introns des *JNK*-Gens aus *C. elegans* konnten auch im *JNK*-Gen von *S. domuncula* gefunden werden, wobei nur das Intron im C-Terminus um 3 AS-Positionen [9 Nukleotide] im Vergleich zu Intron 11 von *SDJNKge* verschoben ist (s. Abb. 4.11; Intron 11b). Drei neue Positionen befinden sich im außergewöhnlich langen N-Terminus. Zwei weitere einzigartige Introns wurden in der Subdomäne X nachgewiesen, wobei eins davon auch im *JNK*-Gen von *D. melanogaster* präsent ist (s. Abb. 4.11). Die restlichen 4 Introns des *JNK*-Gens von *D. melanogaster* unterbrechen die kodierende Sequenz an konservierten Positionen (s. Abb. 4.11).

Im Unterschied zu den *SAPK*-Genen beider Protostomia sind die Intronpositionen der humanen Gene bezüglich der des Schwamms wesentlich höher konserviert (s. Abb. 4.11). Die 4 analysierten *p38*-Gene [*p38 $\alpha$* , *p38 $\beta$* , *p38 $\gamma$*  und *p38 $\delta$* ] weisen 11 Introns auf, wobei alle an identischen Positionen lokalisiert sind und ausnahmslos in *SDJNKge* [11 gemeinsame Introns] und *SDp38ge* [8 gemeinsame Introns] gefunden wurden (s. Abb. 4.11). Nur das Intron in der Subdomäne XI ist um 3 AS-Positionen [9 Nukleotide] im Vergleich zu Intron 10 von *SDJNKge* verschoben (s. Abb. 4.11; Intron 10a). Zudem wurde ein im C-Terminus lokalisiertes Intron eliminiert (s. Abb. 4.11). Bis auf das letzte Intron im C-Terminus sind sämtliche Intronpositionen des *JNK*-Gens von *H. sapiens* [*JNK1 $\alpha$ 2*] ebenfalls konserviert und konnten ohne Ausnahme im *JNK*-Gen [9 gemeinsame Introns] und *p38*-Gen [6 gemeinsame Introns] von *S. domuncula* gefunden werden (s. Abb. 4.11).



**Abb. 4.11:**

Schematische Präsentation der Intronpositionen (▼) in beiden SAPK-Genen aus *S. domuncula* [*SDJNKge* und *SDp38ge*] (blau) und in den SAPK-Genen aus *C. elegans* [*JNK-1 (JNK (Ce); CELB0478)* und Ser/Thr Protein Kinase (*p38 (Ce); CELB0218*)], *D. melanogaster* [*DJNK (JNK (Dm); DMU49249)*, die Gene *p38A (AF035546)* und *p38B (AC000616)* sind zusammen als *p38 (Dm)* dargestellt] sowie *H. sapiens* [*JNK1α2 (JNK1α2 (Hs); ACO16397)*, die Gene *p38α* und *p38δ (HS179N16)* sowie *p38β* und *p38γ (HS402G11)* sind zusammen als *p38 (Hs)* dargestellt] (grün). Die den N- und C-Terminus sowie die PK-Subdomänen I-XI kodierenden Regionen sind nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. Die 12 Intronpositionen in *SDJNKge* sind ihrer Reihenfolge nach aufgeführt. Mit (\*) sind die Introns markiert, deren Position bezüglich *SDJNKge* nicht konserviert sind. Im Fall der Introns 10a [*p38 (Hs)*], 11a [*SDp38ge*] und 11b [*JNK (Ce)*] ist die Anzahl der verschobenen AS-Positionen bezüglich *SDJNKge* angegeben.

## 4.5 Western Blot-Analysen

Um zu untersuchen, welche Zellstress-auslösenden Stimuli eine Aktivierung (Dualphosphorylierung) der JNK und p38 MAPK des Schwamms induzieren, wurden Schockexperimente durchgeführt (s. Kap. 3.18.2). Dafür wurden Gewebestücke von *S. domuncula* in Meerwasser unter folgenden Bedingungen inkubiert: Osmotischer Schock [(a) 0,25-2 M NaCl für 30 min sowie (b) 1 M NaCl für 0-180 min], Endotoxin Schock [30 µg LPS/ml für 0-48 h], Okadainsäure (OA) Schock [1,5 ng OA/ml für 0-6 Tage], Hitzeschock [26°C für 0-6 h], Oxidativer Schock [100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 0-180 min] und UVB-Bestrahlung [Dosis: 30 J/m<sup>2</sup> mit 0-60 min Postinkubation in Meerwasser]. Nach Herstellung der Proteinlysate (s. Kap. 3.19.1) und Bestimmung der Proteinkonzentrationen (s. Kap. 3.19.3) wurden 10 µg Gesamtprotein über eine SDS-PAGE (s. Kap. 3.19.4) aufgetrennt und auf eine Membran transferiert (s. Kap. 3.19.5). Zum Nachweis der aktivierten SAPKs erfolgte die Behandlung der Blots (s. Kap. 3.19.5) mit den phosphospezifischen Antikörpern Phospho-SAPK/JNK oder Phospho-p38 MAP Kinase (s. Kap. 3.6.1). Diese erkennen selektiv das dualphosphorylierte TXY-Motiv der jeweiligen aktivierten SAPK. Um dagegen den Gesamtgehalt der SAPKs im Schwamm nachzuweisen, wurden die phosphounspezifischen Antikörper SAPK/JNK oder p38 MAP Kinase verwendet (s. Kap. 3.6.1). Die Detektion erfolgte mit dem Chemolumineszenz-System von ROCHE DIAGNOSTICS (s. Kap. 3.5).

Die Inkubation mit unterschiedlichen NaCl-Molaritäten verdeutlichte, dass die JNK und p38 MAPK nur durch hyperosmotische Salzkonzentrationen aktiviert werden. In Gegenwart von 0,25 M NaCl (hypoosmotische Bedingungen bezüglich Meerwasser) konnte keine Phosphorylierung von JNK\_SD oder p38\_SD beobachtet werden (s. Abb. 4.12 A1 und B1). Auch unter isoosmotischen Bedingungen [0,5 M NaCl], war kein Signal zu erkennen (A1 und B1). Lediglich bei höheren Salzkonzentrationen [0,75-2 M NaCl] konnte mit den Antikörpern Phospho-SAPK/JNK oder Phospho-p38 MAP Kinase bei 42 kD oder 44 kD jeweils eine spezifische Bande nachgewiesen werden (A1 und B1). Diese Signale stimmen in etwa mit dem theoretischen Molekulargewicht von JNK\_SD [41,6 kD] und p38\_SD [42,2 kD] überein. Zudem nahm die Intensität dieser Signale mit steigender NaCl-Konzentration zu (A1 und B1). Dagegen wurde in sämtlichen Proteinlysaten mit den phosphounspezifischen Antikörpern SAPK/JNK oder p38 MAP Kinase ein gleich starkes Signal bei 42 kD oder 44 kD beobachtet (A2 und B2). Demnach hatte sich der Gesamtgehalt der SAPKs während des Experiments im Schwamm nicht verändert. Lediglich der Gehalt der aktivierten (dualphosphorylierten) Form nahm unter den hyperosmotischen Bedingungen zu.

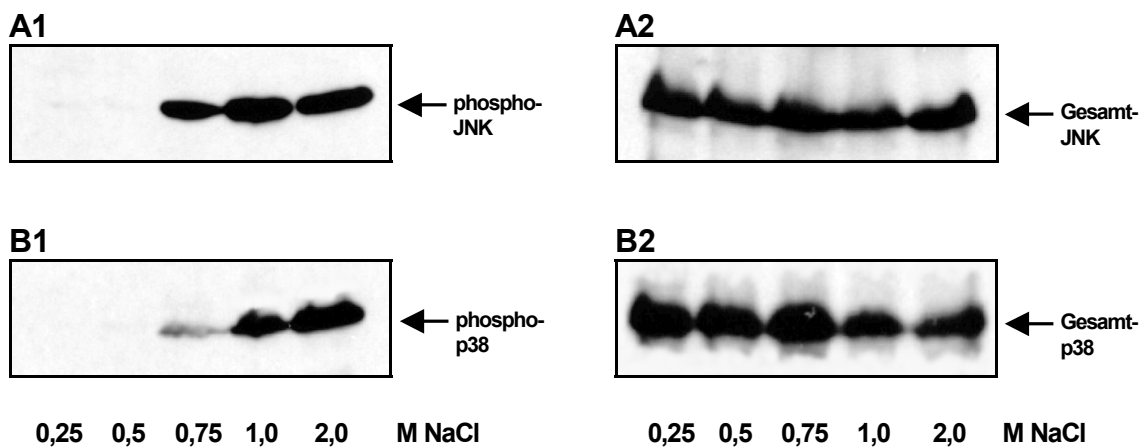
Zur Analyse der Phosphorylierungskinetik beider SAPKs wurden Schwammstücke in Anwesenheit von 1 M NaCl inkubiert. Dieser Versuch zeigte, dass unter diesen hyperosmotischen Bedingungen die JNK nach 10 min und die p38 MAPK bereits nach 3 min aktiviert werden. In den Lysaten konnte unter Verwendung des Phospho-SAPK/JNK Antikörpers ein Signal auf der Höhe von 42 kD nachgewiesen werden, während mit dem Antikörper Phospho-p38 MAP Kinase eine spezifische Bande der Größe von 44 kD detektiert wurde (s. Abb. **4.12 C1** und **D1**). Die Stärke dieser Signale stieg mit zunehmender Inkubationszeit an (**C1** und **D1**). In den Kontrollen (Zeitpunkt 0) konnte dagegen keine Phosphorylierung der SAPKs beobachtet werden (**C1** und **D1**). Mit den phosphounspezifischen Antikörpern wurde in sämtlichen Lysaten ein vergleichbarer Gehalt an gesamtem JNK\_SD und p38\_SD Protein nachgewiesen (**C2** und **D2**). Der mit den phosphospezifischen Antikörpern detektierte Anstieg der Signalstärke beruhte demzufolge allein auf einer Zunahme der phosphorylierten Form dieser SAPKs.

Auch das Endotoxin LPS bewirkte in einer Konzentration von 30 µg/ml eine signifikante Aktivierung beider SAPKs. Dabei wurde mit den phosphospezifischen Antikörpern dokumentiert, dass nach einer einstündigen Inkubation in Anwesenheit dieser Substanz sowohl JNK\_SD als auch p38\_SD im Vergleich zu ihren Kontrollen (Zeitpunkt 0) verstärkt phosphoryliert werden (s. Abb. **4.12 E1** und **F1**). Die Signale erreichten innerhalb von 12-48 Stunden ihre maximale Intensität (**E1** und **F1**). Wie in den vorangegangenen Experimenten, konnte mit den phosphounspezifischen Antikörpern ein gleich hoher Gehalt an gesamter JNK und p38 MAPK im Schwamm während der Versuchsphase nachgewiesen werden (**E2** und **F2**).

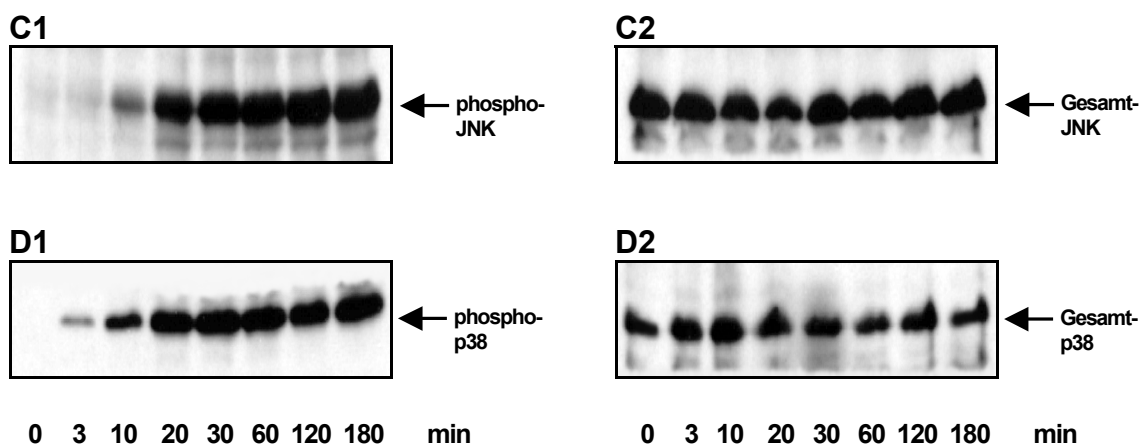
Des Weiteren wurde der Einfluss der toxischen Substanz OA auf die Aktivierung beider SAPKs untersucht. Diesbezüglich konnte aufgezeigt werden, dass eine Inkubation in Gegenwart von 1,5 ng OA/ml ebenfalls eine Stimulierung der JNK und p38 MAPK zur Folge hatte. Die Phosphorylierungskinetik beider SAPKs wies jedoch gewisse Unterschiede auf. Während JNK\_SD bereits nach einem Tag in Anwesenheit dieses Inhibitors der PP1/2A phosphoryliert wurde, konnte im Fall von p38\_SD eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle (Zeitpunkt 0) erst nach 2 Tagen beobachtet werden (s. Abb. **4.12 G1** und **H1**). Ferner wurde im Unterschied zu JNK\_SD das Aktivierungsmaximum nicht nach 2 sondern erst nach 6 Tagen erreicht (**G1** und **H1**). Mit den phosphounspezifischen Antikörpern konnte erneut ein stabiler Gehalt an gesamter JNK und p38 MAPK im Verlauf des Experiments nachgewiesen werden (**G2** und **H2**).

Alle weiteren Schockexperimente führten zu keiner Aktivierung der beiden SAPKs. Weder eine erhöhte Temperatur [9°C über der Umgebungstemperatur] noch die Gegenwart von 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bewirkten eine Phosphorylierung der SAPKs (s. Abb. 4.12 I-L). Auch in Folge einer UVB-Bestrahlung [30 J/m<sup>2</sup>] erfolgte sowohl bei der JNK als auch bei der p38 MAPK keine Stimulierung (s. Abb. 4.12 M und N).

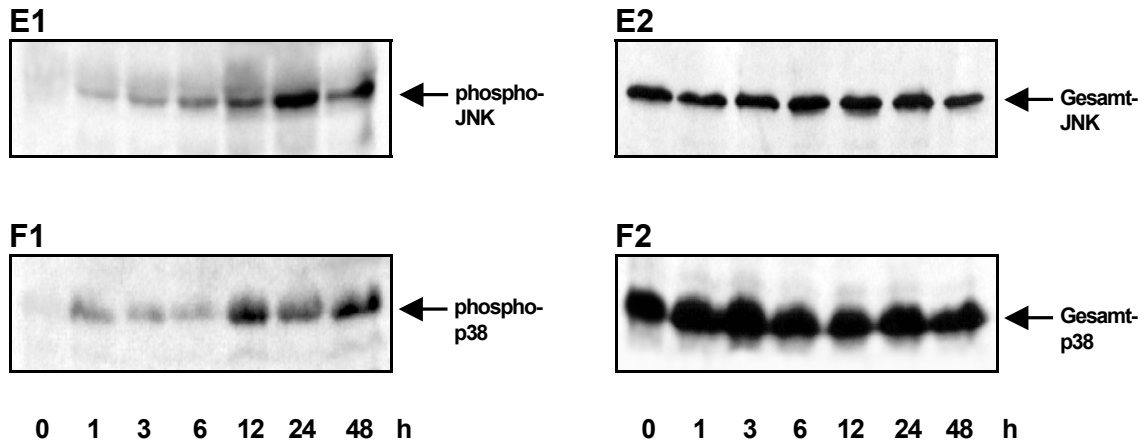
### NaCl (30 min)



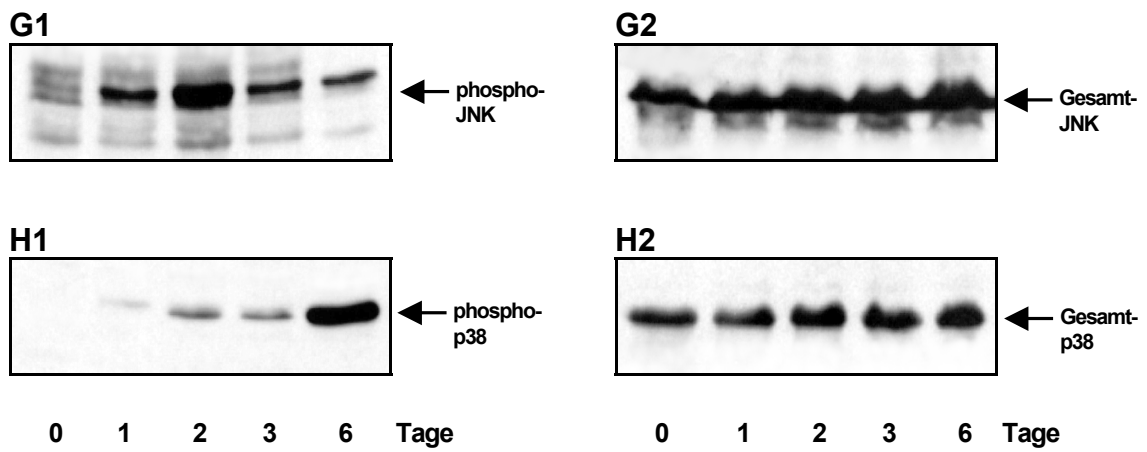
### NaCl (1 M)

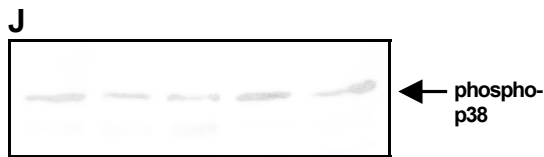
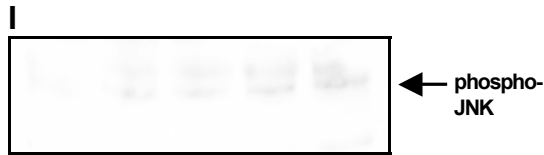


**LPS (30µg/ml)**

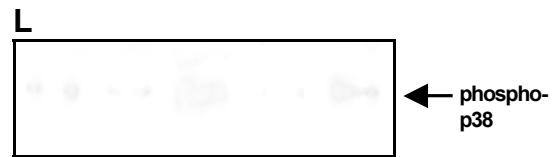
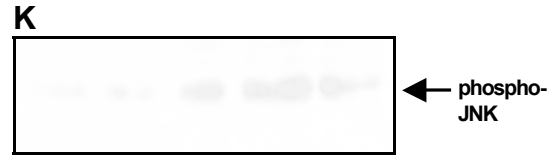


**OA (1,5 ng /ml)**

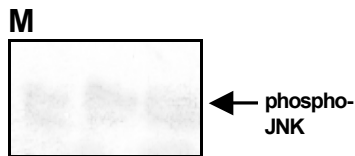


**Hitze (26°C)**

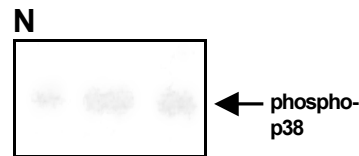
0 1 2 3 6 h

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM)**

0 3 10 60 180 min

**UVB (30 J/m<sup>2</sup>)**

0 30 60 min



0 30 60 min

**Abb. 4.12:**

Effekt unterschiedlicher Zellstress-auslösender Stimuli auf die Aktivierung (Dualphosphorylierung) der JNK und p38 MAPK aus *S. domuncula*. Um die Stimulierung beider SAPKs nachzuweisen, wurden phosphospezifische Antikörper verwendet, die selektiv das dualphosphorylierte TXY-Motiv der jeweiligen SAPK erkennen. Zusätzlich wurden die Blots mit je einem phosphounspezifischen Antikörper inkubiert (bis auf die Proben der letzten 3 Schockexperimente). Dies diente der Bestimmung des Gesamtgehalts der SAPKs im Schwammgewebe. **A1-B2** zeigt die Reaktion auf osmotischen Stress. Dafür wurden Gewebestücke in Meerwasser mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen (0,25–2 M) 30 min inkubiert. 10 μg Gesamtprotein des im Anschluss gewonnenen Lysats wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Chemolumineszenz des Blots ist abgebildet. Die Pfeile markieren die Position der (phosphorylierten) JNK und p38 MAPK. Der zeitliche Effekt von hyperosmotischem Stress ist in **C1-D2** abgebildet. Zu diesem Zweck wurde Gewebe einer Konzentration von 1 M NaCl ausgesetzt (0-180 min) und anschließend analysiert. Des Weiteren wurden die Zellen mit 30 μg LPS/ml inkubiert (0-48 h). Das Ergebnis ist in **E1-F2** aufgeführt. **G1-H2** zeigt die Reaktion auf den Phosphataseinhibitor OA. Diesbezüglich erfolgte eine Inkubation in Gegenwart von 1,5 ng OA/ml (0-6 Tage). Der Einfluss einer erhöhten Temperatur (+ 9°C) ist in **I** und **J** dargestellt. Ferner wurden Schwammstücke einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 100 μM ausgesetzt (abgebildet in **K** und **L**) sowie mit UVB-Licht (30 J/m<sup>2</sup>) bestrahlt und 0-60 min postinkubiert (aufgeführt unter **M** und **N**).

## 4.6 Funktionsstudien mit *HOG1*-defizienter Hefe

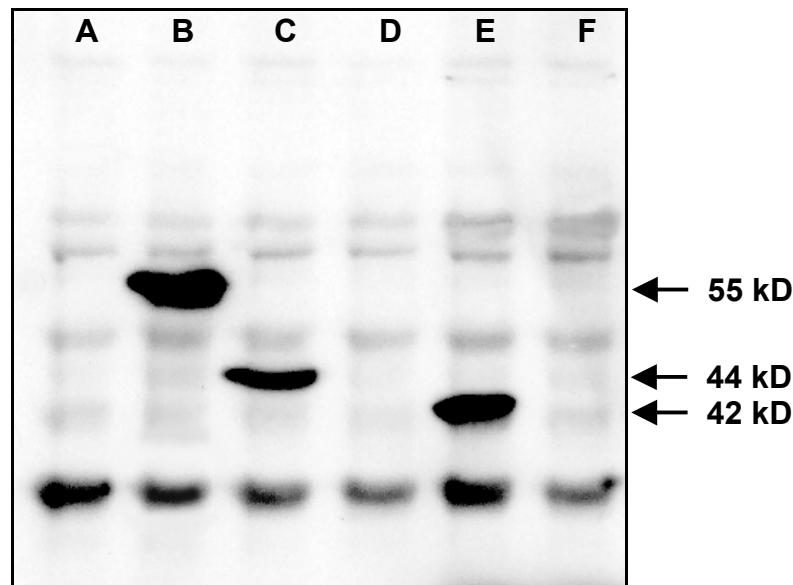
### 4.6.1 Konstruktion der SAPK-Expressionsklone

Wie bereits im Kap. 1.4.1 erwähnt, verfügen auch Hefen über SAPKs. Diese sog. YSAPKs gehören, zusammen mit den JNKs und p38 MAPKs der Metazoen, zur SAPK-Untergruppe der MAPKs (s. Kap. 1.4.1). Das in Folge von hyperosmotischem Stress aktivierte HOG1-Protein aus *S. cerevisiae* (SCHÜLLER *et al.*, 1994) stellt eine YSAPK dar, die eng mit den SAPKs der multizellulären Tiere verwandt ist. Das konnte durch Studien mit *HOG1*-Deletionsmutanten nachgewiesen werden (GALCHEVA-GARGOVA *et al.*, 1994; HAN *et al.*, 1994; KUMAR *et al.*, 1995; HAN *et al.*, 1998; KAWASAKI *et al.*, 1999).

In Analogie zu diesen Arbeiten sollte anhand eines *HOG1*-defizienten Hefestamms untersucht werden, ob die JNK oder p38 MAPK des Schwamms die Funktion des HOG1-Proteins übernehmen kann. Dazu wurde jeweils der gesamte kodierende Bereich der cDNA-Klone *SDJNK* und *SDp38* sowie der des *HOG1*-Gens von *S. cerevisiae* (Positivkontrolle) mit PCR amplifiziert und sowohl in sense (5'→3')- als auch antisense (3'→5')-Orientierung in den Expressionsvektor *pVT103-U* subkloniert (s. Kap. 3.17.2). Anschließend wurden die Zellen einer *HOG1-Δ1*-Nullmutante (s. Kap. 3.10) mit den rekombinanten Vektoren transformiert (s. Kap. 3.17.3.1) und durch Verwendung von SK-Ura-Platten selektioniert (s. Kap. 3.17.3.2). Diese Hefeklone wurden mit *HOG1-Δ1+SDJNK-sense/-antisense*, *HOG1-Δ1+SDp38-sense/-antisense* sowie *HOG1-Δ1+HOG1-sense* bezeichnet.

### 4.6.2 Nachweis der rekombinanten SAPKs durch Western Blot-Analyse

Um zu überprüfen, ob die transformierten *HOG1-Δ1*-Nullmutanten die rekombinanten SAPKs exprimierten, wurden Western Blots durchgeführt (s. Kap. 3.17.4). Da die rekombinanten Proteine aufgrund der Konstruktion der Expressionsvektoren mit einem C-terminalen 6 x His-tag versehen wurden (s. Kap. 3.17.2), konnten die Proteinlysate (s. Kap. 3.19.2) der transformierten Klone und der nichttransformierten Nullmutante (Negativkontrolle) nach Auftrennung über eine SDS-PAGE und dem Transfer auf eine Membran mit einem Antikörper inkubiert werden, der spezifisch an C-terminale His-Reste bindet (s. Kap. 3.17.4). Die Chemolumineszenz des Western Blots ist in Abb. 4.13 dargestellt.



**Abb. 4.13:**

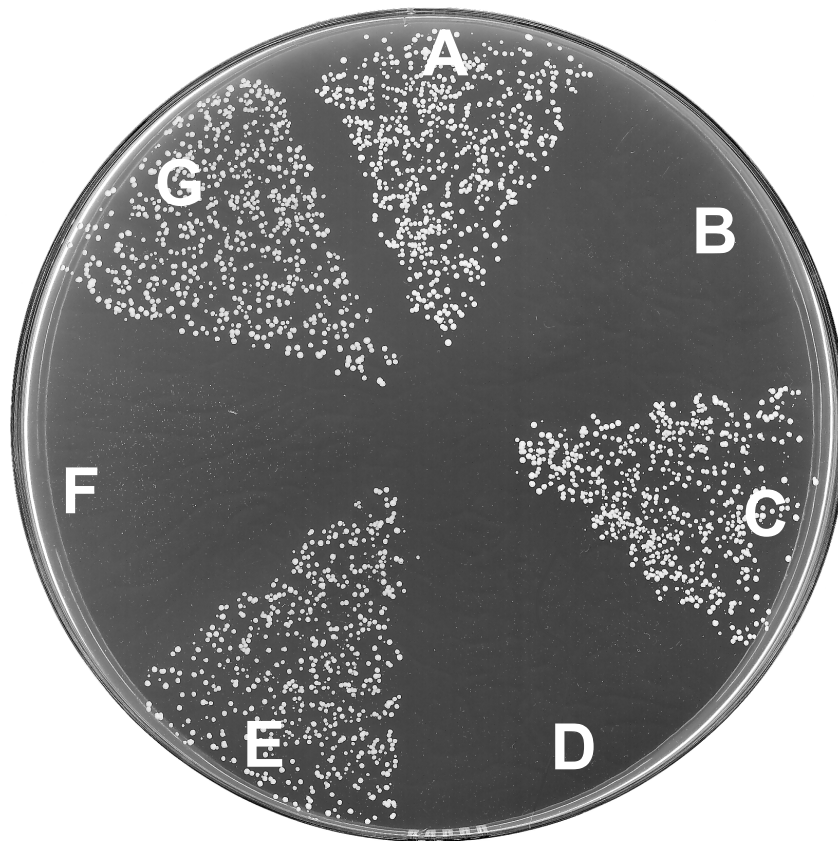
Nachweis der Expression rekombinanter SAPKs in HOG1-defizienter Hefe mittels Western Blot-Analyse. Spur **A**: Proteinlysat der nichttransformierten HOG1- $\Delta$ 1-Nullmutante (Negativkontrolle). Spur **B-F**: Proteinlysate der transformierten Nullmutanten, deren Expressionsvektor pVT103-U entweder HOG1-sense (**B**), SDp38-sense (**C**), SDp38-antisense (**D**), SDJNK-sense (**E**) oder SDJNK-antisense (**F**) DNA enthielt. Die Lysate wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Membran mit einem Antikörper inkubiert, der spezifisch an C-terminale His-Reste bindet. Die Chemolumineszenz des Blots ist abgebildet.

Anhand der Abb. 4.13 wird ersichtlich, dass sämtliche Transformanten, deren Expressionsvektor entweder *SDJNK*, *SDp38* oder *HOG1* in sense Orientierung beinhaltetete, auch die entsprechende SAPK translatierten. Im Lysat der nichttransformierten Nullmutante fiel lediglich auf der Höhe von 30 kD ein Signal auf (Spur **A**). Da diese Bande auch in allen anderen Spuren erschien und nicht mit der Größe der rekombinanten SAPKs übereinstimmte, konnte sie als unspezifisch bewertet werden. Das Proteinlysat des Klons, in dessen Vektor *HOG1* in sense Orientierung eingefügt wurde (*HOG1- $\Delta$ 1+HOG1-sense*), ergab ein spezifisches Signal auf der Höhe von 55 kD (Spur **B**). Damit entspricht die Größe dieses Proteins exakt dem Literaturwert von HOG1 (BREWSTER *et al.*, 1993). Auch im Lysat des Klons *HOG1- $\Delta$ 1+SDp38-sense*, dessen Vektor *SDp38* in sense Richtung beinhaltetete, konnte die Expression eines spezifischen Proteins festgestellt werden (Spur **C**), dessen Molekulargewicht von 44 kD mit dem von p38\_SD übereinstimmte (s. Kap. 4.5). Dagegen konnte in der zugehörigen antisense Kontrolle (*HOG1- $\Delta$ 1+SDp38-antisense*) keine spezifische Bande nachgewiesen werden (Spur **D**). Wurde *SDJNK* in sense Orientierung in *pVT103-U* subkloniert, war es möglich, im Lysat des damit transformierten Klons *HOG1- $\Delta$ 1+SDJNK-sense* ein der Größe von JNK\_SD (42 kD; s. Kap. 4.5) entsprechendes Protein nachzuweisen (Spur **E**). In der antisense Kontrolle (*HOG1- $\Delta$ 1+SDJNK-antisense*) konnte wiederum kein spezifisches Signal entdeckt werden (Spur **F**).

### 4.6.3 Funktionale Komplementierung des HOG1-Proteins durch die JNK und p38 MAPK des Schwamms

Die Hefe *S. cerevisiae* benötigt das *HOG1*-Gen, um unter hyperosmotischen Bedingungen überleben zu können (BREWESTER *et al.*, 1993).

Aufgrund dieser Tatsache wurden zur Klärung der Frage, ob die beiden SAPKs aus *S. domuncula* das hefeeigene HOG1 funktional ersetzen können, Zellen des Wildtyps (s. Kap. 3.10) (Positivkontrolle), der nichttransformierten *HOG1-Δ1*-Nullmutante (Negativkontrolle) sowie der transformierten Klone *HOG1-Δ1+HOG1-sense* (weitere Positivkontrolle), *HOG1-Δ1+SDp38-sense/-antisense* und *HOG1-Δ1+SDJNK-sense/-antisense* gemäß Kap. 3.17.5 auf 0,6 M NaCl enthaltendem YEPD-Agar ausplattiert. Nach 3-tägiger Kultivierung wurde die Platte zur Dokumentation gescannt (s. Abb. 4.14).



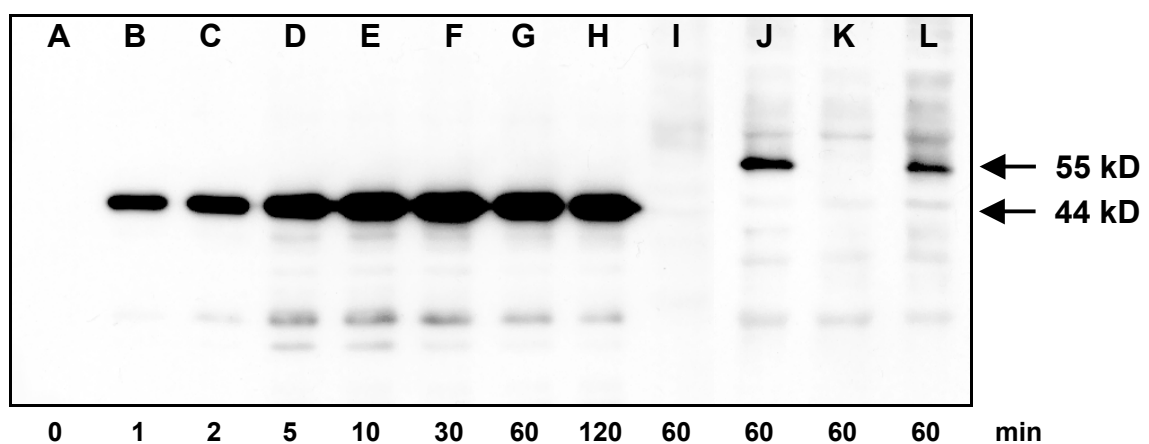
**Abb. 4.14:**

Funktionale Komplementierung des hefeeigenen HOG1-Proteins durch die JNK und p38 MAPK aus *S. domuncula*. Folgende Hefeklone wurden diesbezüglich auf 0,6 M NaCl enthaltendem YEPD-Agar ausplattiert: Wild Typ (A), nichttransformierte *HOG1-Δ1*-Nullmutante (B), *HOG1-Δ1+HOG1-sense* (C), *HOG1-Δ1+SDp38-antisense* (D), *HOG1-Δ1+SDp38-sense* (E), *HOG1-Δ1+SDJNK-antisense* (F) und *HOG1-Δ1+SDJNK-sense* (G). Nach 3-tägiger Kultivierung bei 30°C wurde die Platte zur Dokumentation des Wachstums der Klone gescannt.

Die Abb. 4.14 zeigt, dass nur der HOG1-enhaltende Wildtyp und die transformierten Nullmutanten, deren Expressionsvektoren entweder *SDJNK*, *SDp38* oder *HOG1* in sense Orientierung enthielten, auf dem hyperosmotischen Nährboden wachsen konnten (A, C, E und G). Zwischen diesen Klonen konnte bezüglich der Stärke des Wachstums kein Unterschied festgestellt werden. Das deutet daraufhin, dass beide SAPKs des Schwamms die Funktion von HOG1 zu 100% übernehmen konnten. Im Gegensatz dazu wurde bezüglich der antisense Kontrollen eine Inhibition des Wachstums festgestellt (D und F). Auch die untransformierte Nullmutante wuchs nicht in Gegenwart von 0,6 M NaCl (B).

#### 4.6.4 Phosphorylierung der rekombinanten SAPKs in Folge von hyperosmotischem Stress

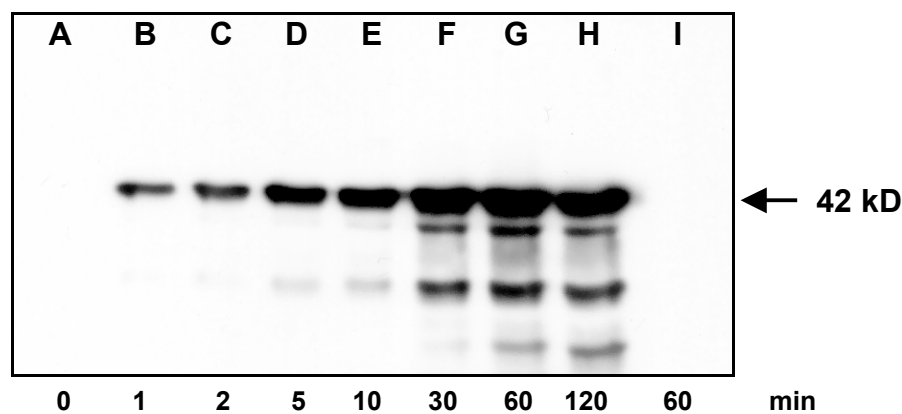
Um die Phosphorylierung der rekombinanten SAPKs nachzuweisen, wurden Zellen der im Kap. 4.6.3 aufgeführten Klone in 0,6 M NaCl enthaltendem YEPD-Medium inkubiert (s. Kap. 3.17.6). Die nach Ablauf der Inkubationszeit hergestellten Proteinlysate (s. Kap. 3.19.2) wurden anschließend über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran überführt (s. Kap. 3.17.6). Zur Detektion der aktivierten SAPKs wurden die im Kap. 3.17.6 angegebenen phosphospezifischen Antikörper verwendet. Wie bereits im Kap. 4.5 erwähnt, erkennen diese spezifisch das dualphosphorylierte TXY-Motiv der jeweiligen aktivierten SAPK. In der Abb. 4.15 und 4.16 ist die Chemolumineszenz der Western Blots dargestellt.



**Abb. 4.15:**

*Phosphorylierung der p38 MAPK aus *S. domuncula* und des hefeeigenen HOG1-Proteins durch Hyperosmose. Die Zellen folgender Hefeklone wurden diesbezüglich in 0,6 M NaCl enthaltendem YEPD-Medium inkubiert: HOG1- $\Delta$ 1+SDp38-sense (Spur A-H), HOG1- $\Delta$ 1+SDp38-antisense (Spur I), Wild Typ (Spur J), nichttransformierte HOG1- $\Delta$ 1-Nullmutante (Spur K) und HOG1- $\Delta$ 1+HOG1-sense (Spur L). Proteinlysate wurden nach Ablauf der jeweils angegebenen Inkubationszeit hergestellt und über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Membran wurden sie mit dem phosphospezifischen Antikörper Phospho-p38 MAPK behandelt (s. Text). Die Chemolumineszenz des Western Blots ist abgebildet.*

Wurden Zellen des Klons *HOG1-Δ1+SDp38-sense* in Gegenwart von 0,6 M NaCl inkubiert, konnte bereits nach einer Minute eine Phosphorylierung der 44 kD großen p38 MAPK des Schwamms festgestellt werden (s. Abb. 4.15; Spur B). Im Vergleich dazu wurde in der Kontrolle (Zeitpunkt 0) keine Phosphorylierung nachgewiesen (Spur A). Wie anhand der Intensität des Signals erkennbar ist, nahm der Phosphorylierungsgrad von p38<sub>SD</sub> im Verlauf der Inkubation (bis 120 min) zu (Spur C-H). Wurde hingegen die antisense Kontrolle oder die nichttransformierte Nullmutante (Negativkontrolle) 60 min einer Konzentration von 0,6 M NaCl ausgesetzt, konnte keine Phosphorylierung festgestellt werden (Spur I und K). Eine Phosphorylierung des 55 kD großen HOG1-Proteins war nachweisbar, wenn Zellen des Wildtyps oder des Klons *HOG1-Δ1+HOG1-sense* (Positivkontrollen) unter den gleichen Bedingungen inkubiert wurden (Spur J und L).



**Abb. 4.16:**

*Phosphorylierung der JNK aus S. domuncula durch Hyperosmose. Zu diesem Zweck wurden Zellen der Hefeklone HOG1-Δ1+SDJNK-sense (Spur A-H) und HOG1-Δ1+SDJNK-antisense (Spur I) in 0,6 M NaCl enthaltendem YEPD-Medium inkubiert. Nach Ablauf der jeweils angegebenen Inkubationszeit wurden Proteinlysate hergestellt und über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Membran wurden sie mit dem phosphospezifischen Antikörper Phospho-SAPK/JNK behandelt (s. Text). Die Chemolumineszenz des Western Blots ist dargestellt.*

Wurden Zellen des Klons *HOG1-Δ1+SDJNK-sense* mit 0,6 M NaCl enthaltendem Nährmedium inkubiert, konnte die Phosphorylierung der 42 kD großen JNK des Schwamms schon nach einer Minute beobachtet werden (s. Abb. 4.16; Spur B). Bezüglich der Kontrolle (Zeitpunkt 0), war keine Phosphorylierung zu erkennen (Spur A). In Übereinstimmung mit der Phosphorylierungskinetik von p38<sub>SD</sub> (s. oben) nahm der Phosphorylierungsgrad von JNK<sub>SD</sub> während der Inkubation (bis 120 min) zu (Spur C-H). Die antisense Kontrolle ergab nach Ablauf der 60minütigen Inkubation mit 0,6 M NaCl kein entsprechendes Signal (Spur I).

#### 4.6.5 Intrazelluläre Lokalisation der aktivierten SAPKs in Hefe

In Abwesenheit eines aktivierenden Stimulus diffundiert das HOG1-Protein zyklisch zwischen Cytoplasma und Zellkern (REISER *et al.*, 1999). Wenn diese YSAPK jedoch aufgrund hyperosmotischer Stressbedingungen durch die vorangeschaltete MAPKK PBS2 phosphoryliert wird, kann eine Akkumulation ihrerseits im Nukleus beobachtet werden (REISER *et al.*, 1999).

Zur Überprüfung der Hypothese, dass sich beide SAPKs des Schwamms bezüglich der intrazellulären Lokalisation wie das hefeeigene HOG1 verhalten, wurden Zellen der transformierten Klone *HOG1-Δ1+HOG1-sense* (Positivkontrolle), *HOG1-Δ1+SDp38-sense* und *HOG1-Δ1+SDJNK-sense* sowie der nichttransformierten Nullmutante (Negativkontrolle) 10 min einer Konzentration von 0,6 M NaCl ausgesetzt und anschließend fixiert (s. Kap. 3.17.7). Parallel dazu wurden die gleichen Zellen unter isoosmotischen Bedingungen inkubiert (weitere Negativkontrollen; s. Kap. 3.17.7). Um die intrazelluläre Lokalisation der aktivierten SAPKs nachzuweisen, wurden mit den Zellen daraufhin Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt (s. Kap. 3.17.7). Dabei wurden die phosphorylierten Proteine HOG1 und p38 mit dem Antikörper Phospho-p38 MAP Kinase nachgewiesen, während die aktivierte JNK durch den p-JNK (G-7) Antikörper detektiert werden konnte (s. Kap. 3.17.7). Beide Antikörper erkennen selektiv das dualphosphorylierte TXY-Motiv der jeweiligen aktivierten SAPK (s. Kap. 4.5). Ferner wurden Cy-3 gekoppelte Sekundärantikörper verwendet (s. Kap. 3.17.7). Das Ergebnis der Immunfluoreszenzfärbungen ist in Abb. 4.17 dargestellt.

Falls die Zellen der Positivkontrolle *HOG1-Δ1+HOG1-sense* unter isoosmotischen Bedingungen inkubiert wurden, konnte keine Immunfluoreszenz festgestellt werden (s. Abb. 4.17 A3). Erfolgte hingegen eine Inkubation dieser Zellen in Gegenwart von 0,6 M NaCl, wurde eine deutlich Immunfluoreszenz, vor allem an der Position der Zellkerne und in ihrer unmittelbaren Umgebung, beobachtet (B3). Um die Position der Kerne zu lokalisieren, wurden die Zellen parallel mit DAPI gefärbt (s. Kap. 3.17.7) (A2 und B2). Außerdem wurde jeweils ein Lichtbild des ausgewählten Kameraausschnitts aufgenommen (A1 und B1).

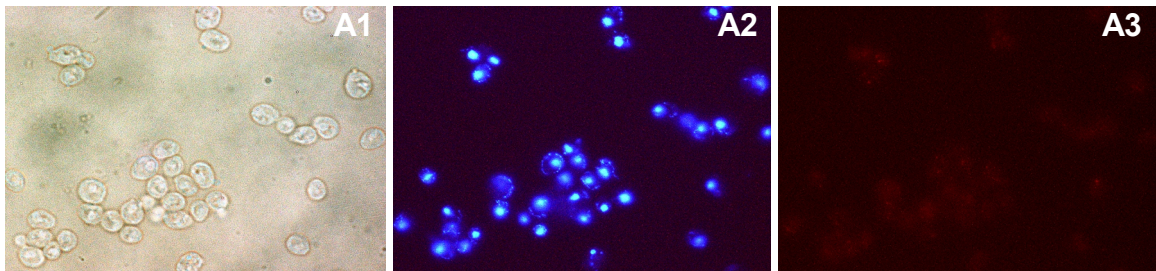
Eine vergleichbare Immunfluoreszenz der Zellkerne und ihrer Umgebung konnte beobachtet werden, wenn die Zellen der Klone *HOG1-Δ1+SDp38-sense* und *HOG1-Δ1+SDJNK-sense* mit 0,6 M NaCl inkubiert wurden (D3 und F3). Im Gegensatz dazu konnte in den isoosmotischen Kontrollen keine Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (C3 und E3). Diese Beobachtungen belegen somit die Vermutung, dass sich beide SAPKs des Schwamms bezüglich der intrazellulären Lokalisation wie das hefeeigene HOG1 verhalten.

Als zusätzliche Kontrollen wurden Zellen der nichttransformierten Nullmutante nach Inkubation in Anwesenheit von 0,6 M NaCl mit den Antikörpern Phospho-p38 MAP Kinase oder p-JNK (G-7) behandelt. Hinsichtlich dieser Hintergrundkontrollen der Primärantikörper

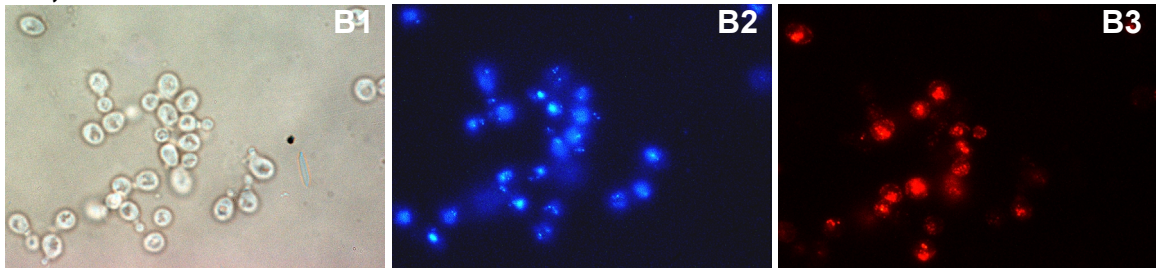
war keine spezifische Fluoreszenzstrahlung feststellbar (**G** und **H**). Ebenso konnte keine Immunfluoreszenz wahrgenommen werden, wenn der Primäantikörper nicht hinzugegeben wurde (Hintergrundkontrolle des Cy3-gekoppelten Antikörpers; **I**).

### HOG1- $\Delta$ 1+HOG1-sense

Isoosmose

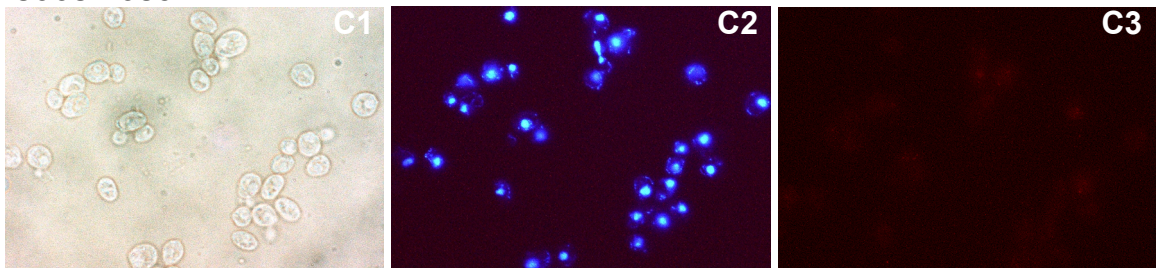


+ 0,6 M NaCl

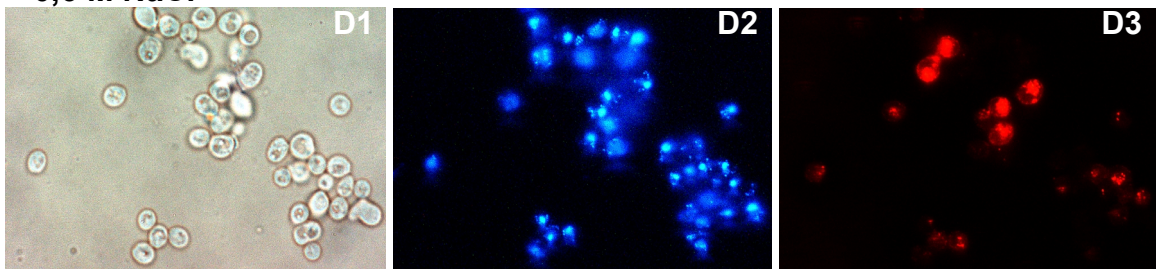


### HOG1- $\Delta$ 1+SDp38-sense

Isoosmose

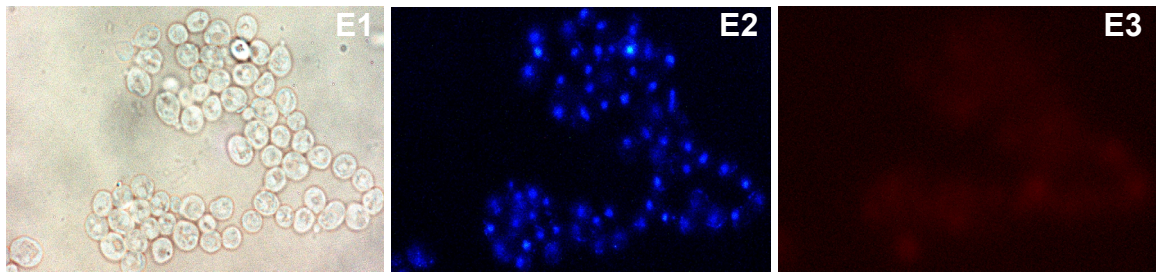


+ 0,6 M NaCl

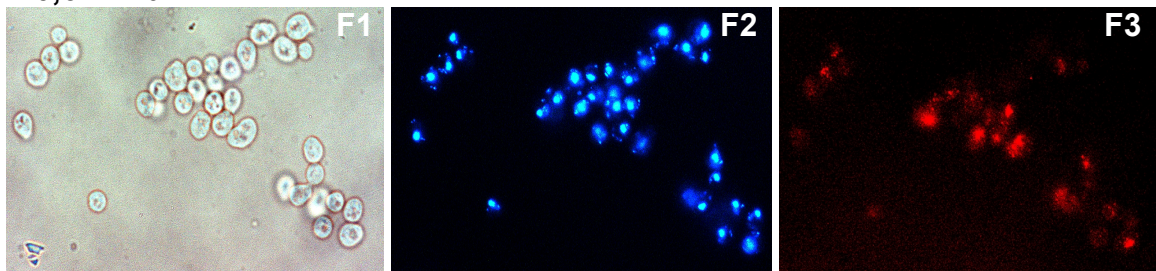


## HOG1- $\Delta$ 1+SDJNK-sense

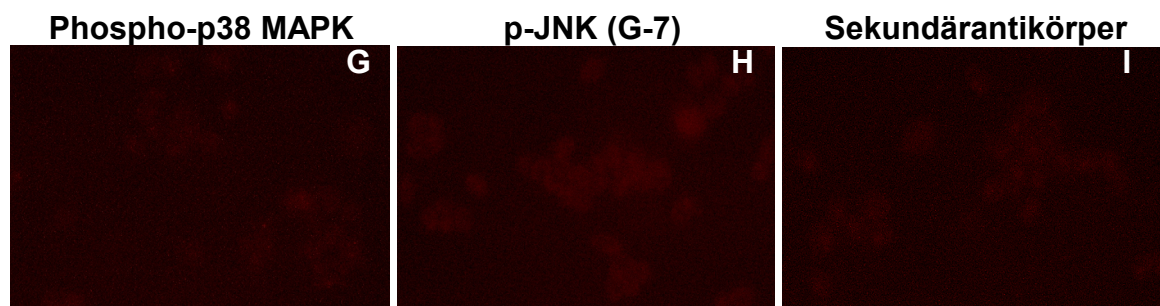
### Isoosmose



### + 0,6 M NaCl



## HOG1- $\Delta$ 1



### Abb. 4.17:

Intrazelluläre Lokalisation der durch Hyperosmose aktivierten SAPKs in *S. cerevisiae*. Die Zellen folgender Hefeklone wurden 10 min in 0,6 M NaCl enthaltendem YEPD-Medium inkubiert und anschließend fixiert: HOG1- $\Delta$ 1+HOG1-sense (Reihe **B**), HOG1- $\Delta$ 1+SDp38-sense (Reihe **D**) und HOG1- $\Delta$ 1+SDJNK-sense (Reihe **F**). Zur Kontrolle fand eine Inkubation der gleichen Zellen unter isoosmotischen Bedingungen (YEPD-Medium ohne zusätzliches NaCl) statt (Reihe **A**, **C** und **E**). Die Detektion der phosphorylierten HOG1- und p38-Proteine erfolgte mit dem Antikörper Phospho-p38 MAP Kinase, während aktivierte JNK mit dem p-JNK (G-7) Antikörper nachgewiesen wurde (s. Text). Die nukleare Akkumulation der aktivierten SAPKs konnte anhand einer Fluoreszenzmikroskopie bei 553/575 nm (Cy3-gekoppelter Sekundärantikörper) beobachtet werden (rechte Spalte). Um die Position der Zellkerne aufzuzeigen, wurden die Zellen zusätzlich mit DAPI behandelt. Die Visualisierung dieser Kernfärbung erfolgte durch eine Fluoreszenz bei 350/460 nm (mittlere Spalte). Als weitere Kontrollen wurden Zellen der nichttransformierten Nullmutante in Gegenwart von 0,6 M NaCl 10 min inkubiert und mit dem Antikörper Phospho-p38 MAP Kinase oder p-JNK (G-7) (**G** und **H**) sowie nur mit dem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (**I**) behandelt. Vergrößerung: 400x.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Analyse der cDNA-Sequenzen

Für die Isolierung von Mitgliedern der *SAPK*-Untergruppe der *MAPKs* aus dem marinen Schwamm *S. domuncula* wurden PCRs mit der cDNA-Bibliothek dieser Spezies unter Verwendung von *SAPK1/JNK*- und *SAPK2/p38 MAPK*-spezifischen degenerierten Primern (s. Kap. 4.1.1) durchgeführt. Es konnten daraufhin 2 unterschiedliche Klone (*SDJNK* und *SDp38*; s. Abb. 4.1 und 4.2) isoliert werden. Beide besitzen einen durchgehenden OLR, der im Fall von *SDJNK* für ein aus 361 AS bestehendes Protein (*JNK\_SD*; Mw = 41,6 kD) und im Fall von *SDp38* für ein 366 AS großes Protein (*p38\_SD*; Mw = 42,1 kD) kodiert (s. Kap. 4.1.2). Der das Start-ATG flankierende Bereich weist in beiden Klonen eine signifikante Homologie zur KOZAK-Sequenz auf (s. Kap. 4.1.2). Ein vollständiges Polyadenylierungssignal wurde nur in *SDJNK* gefunden. *SDp38* besitzt eine trunkierte Variante dessen (s. Kap. 4.1.2). Diese Beobachtung ist allerdings nicht ungewöhnlich für cDNA-Sequenzen aus Schwämmen (PFEIFFER *et al.*, 1993; WIENS *et al.*, 1998). Dass beide Klone über einen Poly-[A]-Schwanz verfügen, weist daraufhin, dass ihre Isolierung vollständig erfolgte. Northern Blot-Analysen mit genspezifischen Sonden bestätigten diese Annahme (s. Kap. 4.3 und Abb. 4.8).

Der Vergleich mit Nukleotid- und Proteinsequenzen aus Online-Datenbanken mittels des BLAST Algorithmusses verdeutlichte, dass beide Klone zur *SAPK*-Untergruppe der *MAPKs* gehören (s. Kap. 4.1.2). Dabei stimmt *SDJNK* am ehesten mit Mitgliedern der *SAPK1/JNK*-Subfamilie überein, während *SDp38* die höchste Homologie zu Mitgliedern der *SAPK2/p38 MAPK*-Subfamilie aufweist (s. Kap. 4.1.2).

Nach ihrer Identifizierung wurden die abgeleiteten AS-Abfolgen von *SDJNK* (*JNK\_SD*) und *SDp38* (*p38\_SD*) mit den Sequenzen der JNKs sowie p38 MAPKs aus Protostomia und Deuterostomia sowie mit der von HOG1 aus *S. cerevisiae* durch ein Alignment verglichen (s. Kap. 4.1.3). Dieser Vergleich zeigte u. a., dass in Übereinstimmung mit den anderen SAPKs beide Kinasen des Schwamms hauptsächlich aus einer für Eukaryoten typischen PK-Domäne bestehen, die in 12 Subdomänen (I-XI) unterteilt wird (s. Abb. 4.3). Auffällig ist weiterhin, dass vor allem der zentrale Bereich der katalytischen Domäne (Subdomänen VIa bis VIII) hoch konserviert ist (s. Abb. 4.3).

In beiden SAPKs aus *S. domuncula* konnten außerdem PK-spezifische Motive identifiziert werden (s. Abb. 4.3). Dazu zählt das in der Subdomäne I lokalisierte GXGXXG-Motiv, welches für die ATP-Bindung zuständig ist und das in den Phosphattransfer involvierte Motiv

AXKXL der Subdomäne II (HANKS *et al.*, 1988; HANKS und HUNTER, 1995). Zu den für PKs typischen Sequenzen gehört auch das HRDLKXXN-Motiv in Subdomäne VIb, in dem sich entweder die für Ser/Thr-PKs charakteristische Sequenz DLKPEN oder die für Tyr-PKs spezifische Sequenz DL[RA]A[AR]N befindet (HANKS *et al.*, 1988; HANKS und HUNTER, 1995). In Analogie zu den anderen SAPKs ist das für Ser/Thr-PKs typische Motiv in beiden Kinasen des Schwamms zu fast 100 % konserviert (s. Abb. 4.3). Auch das in der Subdomäne VII befindliche DFG-Motiv ist vollständig in beiden SAPKs aus *S. domuncula* erhalten. Dieses mit den Phosphatgruppen des Adenosintri-phosphats über  $Mg^{2+}$ -Salzbrücken interagierende Motiv repräsentiert den am höchsten konservierten Bereich der katalytischen Domäne und ist demzufolge in allen eukaryotischen PKs wiederzufinden (HANKS *et al.*, 1988; HANKS und HUNTER, 1995). Das gleichermaßen konservierte Motiv APE in Subdomäne VIII, das in der Literatur auch als Schlüsselindikator der katalytischen Domäne bezeichnet wird (HANKS *et al.*, 1988; HANKS und HUNTER, 1995), ist ebenfalls in beiden Schwamm-Kinasen präsent.

Außerdem besitzen beide SAPKs aus *S. domuncula* die einzige MAPK-spezifische Sequenzsignatur, aufgrund der sich die Mitglieder dieser PK-Familie von allen anderen eukaryotischen PKs unterscheiden (s. Abb. 4.3). Dieses Motiv ist in der langen C-terminalen Falte der MAPKs lokalisiert und für deren Aktivierung notwendig (KÜLTZ, 1998; KÜLTZ und BURG, 1998; COBB, 1999; SCHAEFFER und WEBER, 1999; WIDMANN *et al.*, 1999). Es beinhaltet einerseits die Phosphatbindestelle RXXRXP und andererseits das für Ser/Thr-PKs charakteristische Motiv G[TS]XX[YF]XAPE (HANKS *et al.*, 1988; HANKS und HUNTER, 1995; KÜLTZ, 1998; KÜLTZ und BURG, 1998). In dieser Konsensussequenz aller MAPKs ist zudem das Phosphorylierungsmotiv (TXY, SEG oder THE) sowie die Domäne zur Erkennung und Bindung der Phospho+1 Position der Substratproteine lokalisiert (KÜLTZ, 1998; KÜLTZ und BURG, 1998). Während die p38 MAPK des Schwamms analog zu sämtlichen Mitgliedern der SAPK2/p38 MAPK-Subfamilie und zu HOG1 (YSAPK) an der Phosphorylierungsstelle ein TGY-Motiv aufweist, besitzt die JNK übereinstimmend mit allen Mitgliedern der SAPK1/JNK-Subfamilie an dieser Position ein TPY-Motiv (s. Abb. 4.3).

Bezüglich der SAPKs aus *S. domuncula* konnten auch noch die beiden Motive identifiziert werden, die für deren jeweilige Subfamilie kennzeichnend sind (s. Abb. 4.3). Außerdem wurden hinsichtlich der Schwamm-Kinasen die meisten JNK-, bzw. p38-spezifischen, AS-Positionen wiedergefunden (s. Abb. 4.3). Diese befinden sich hauptsächlich in der Tasche des katalytischen Zentrums oder im Kernbereich der zahlreichen antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern (N-terminalen Falte). Sie sind möglicherweise für eine korrekte Faltung der PKs verantwortlich (KÜLTZ, 1998; KÜLTZ und BURG, 1998).

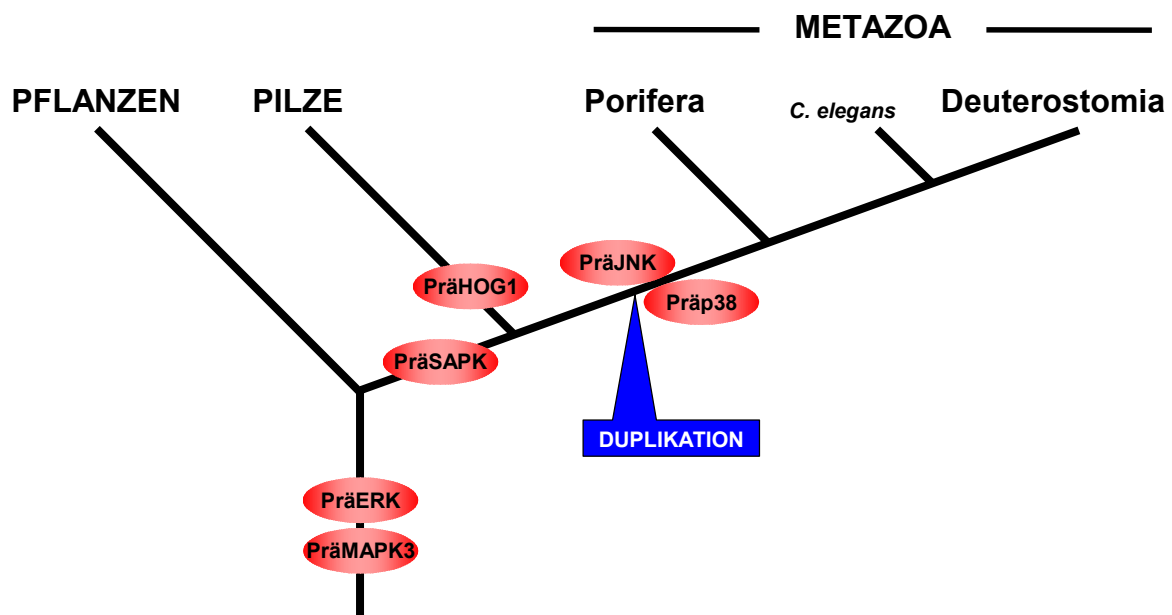
Aufgrund dieser homologen Motive/AS-Positionen müssen beide SAPKs des Schwamms den ausschließlich in Metazoen vorkommenden MAPK-Subfamilien SAPK1/JNK und SAPK2/p38 MAPK zugeordnet werden. Diese Feststellung wird zusätzlich durch den Ver-

gleich von identischen AS zwischen JNK\_SD, bzw. p38\_SD, und den im Alignment aufgeführten SAPKs aus anderen Metazoen und Hefen bestätigt (s. Abb. 4.4). Sowohl die JNK als auch die p38 MAPK aus *S. domuncula* weisen zu ihren jeweiligen Metazoen-spezifischen Subfamilienmitgliedern eine wesentlich höhere Homologie auf [47-63 % Identität (JNK\_SD); 56-65 % Identität (p38\_SD)] als zu der SAPK von *S. cerevisiae* (HOG1) [32 % Identität (JNK\_SD); 37 % Identität (p38\_SD)].

Die MAPK-Familie hat sich relativ früh nach Abspaltung der Eukaryoten aus dem Stamm der Organismen entwickelt und ist demzufolge zwischen 1 und 1,5 Mrd. Jahre alt (KÜLTZ, 1998). Die SAPKs sind im Gegensatz zu den Mitgliedern der beiden anderen MAPK-Untergruppen (ERK und MAPK3) in ihrer Verbreitung lediglich auf Pilze und Metazoen beschränkt. Daraus folgt, dass sich diese Untergruppe der MAPKs erst nach Abspaltung der Pflanzen vom gemeinsamen Stamm der Lebewesen gebildet hat (s. Abb. 5.1) und folglich die evolutionär Jüngste ist (KÜLTZ, 1998). Weiterführende phylogenetische Untersuchungen ergaben, dass vermutlich alle der heutzutage existierenden SAPKs der Metazoen aus dem einzigen *SAPK*-Gen der Hefe (*HOG1*) hervorgegangen sind (CAFFREY *et al.*, 1999). Diese Autoren fanden ebenfalls heraus, dass in einem phylogenetischen Stammbaum sämtliche JNKs und p38 MAPKs mit HOG1-Proteinen clustern. Ein solches Cluster konnte auch hinsichtlich ihrer jeweiligen vergleichbaren Aktivatorkinasen nachgewiesen werden. Die funktionale Komplementierung des HOG1-Proteins durch JNKs oder p38 MAPKs in *HOG1*-defizienten Hefestämmen (GALCHEVA-GARGOVA *et al.*, 1994; HAN *et al.*, 1994; KUMAR *et al.*, 1995; HAN *et al.*, 1998; KAWASAKI *et al.*, 1999) bestätigt diese Resultate. Aufgrund dieser Zusammenhänge wird angenommen, dass sich die JNK und p38 MAPK durch Duplikation und anschließender Diversifizierung eines gemeinsamen *HOG1*-verwandten Vorläufergens (*PräSAPK*) gebildet und somit voneinander getrennt haben (CAFFREY *et al.*, 1999) (s. Abb. 5.1). Aus diesem Grund sind die HOG1-Proteine der Hefen und die SAPKs der Metazoen echte Orthologe. Ein Vergleich der AS-Sequenzen zeigte, dass zwischen p38 MAPKs und HOG1 mehr als 50 % Ähnlichkeit besteht. Dagegen weisen JNKs einen geringeren Prozentsatz an ähnlichen AS bezüglich HOG1 auf (bis zu 50 %). Im Unterschied zu HOG1 und den p38 MAPKs besitzen sie außerdem ein anderes Dualphosphorylierungsmotiv (s. oben). Demnach muss die Diversifizierung der JNKs dynamischer erfolgt sein als die der p38 MAPKs (CAFFREY *et al.*, 1999). Nachfolgende Duplikationen der *JNK*- und *p38*-Gene ließen mindestens 7 *HOG1*-verwandte *SAPK*-Gene entstehen (3 *JNK*- und 4 *p38*-Gene), die vor allem in den Genomen höherer Vertebraten präsent sind.

Unter Berücksichtigung dieser Entstehungstheorie der SAPK1/JNK- und SAPK2/p38 MAPK-Subfamilie (s. Abb. 5.1) sowie den Beobachtungen, dass [1] der Schwamm sowohl eine JNK als auch eine p38 MAPK besitzt und dass [2] diese SAPKs zu ihren jeweiligen Subfamilienmitgliedern eine deutlich höhere Identität [s. oben] aufweisen als zueinander [40 % identische

AS; s. Abb. 4.4] muss angenommen werden, dass die Trennung der beiden Subfamilien deutlich vor der Entwicklung der Schwämme stattgefunden hat (s. Abb. 5.1). Bisher konnte die evolutionäre Separation beider SAPKs lediglich auf den Zeitraum zwischen der Abtrennung der Pilze vom gemeinsamen Pilz/Metazoen-Stamm und der späteren Abspaltung von *C. elegans* aus der Metazoen-Linie beschränkt werden (CAFFREY *et al.*, 1999) (s. Abb. 5.1). Da die 600-1000 Mio. Jahre alten Schwämme die einfachsten und ursprünglichsten multi-zellulären Tiere sind (SCHAECKE *et al.*, 1994; MÜLLER, 1998), müssen sich die Subfamilien SAPK1/JNK und SAPK2/p38 MAPK schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Entwicklung der Metazoen voneinander getrennt haben. Daher stellen die Schwämme auch die evolutionär ältesten mehrzelligen Tiere dar, bei denen eine Subklassifizierung der *SAPK*-Gene nachweisbar ist. Die Notwendigkeit der Bildung mehrerer *SAPK*-Gene ergab sich vermutlich zwingend aus der Multizellularität, da in Folge einer Wechselwirkung zwischen den Zellen eines Organismus und einer Spezialisierung der Zellen die Signaltransduktionsprozesse immer komplexer wurden. Infolgedessen übernahmen die SAPKs, verglichen zu ihrer ursprünglichen Aufgabe in den Pilz/Metazoen-Vorläufern (Osmoregulation), weitaus vielfältigere biologische Funktionen (s. Kap. 1.5.3).



**Abb. 5.1:**

Evolutionstheorie der 3 MAPK-Untergruppen (MAPK3, ERK und SAPK). Dargestellt ist der Zeitpunkt der Entstehung ihrer jeweiligen Vorläufer(Prä)formen. Erklärungen zu diesem Modell s. Text.

Aus evolutionärer Sicht wäre es sehr interessant, wenn SAPKs auch aus anderen primitiven Metazoen (z. B. Placozoa und Cnidaria) oder aus Protozoen isoliert werden könnten. Erst vor kurzem gelang die Klonierung einer durch Kälteschock und osmotischen Stress induzierbaren

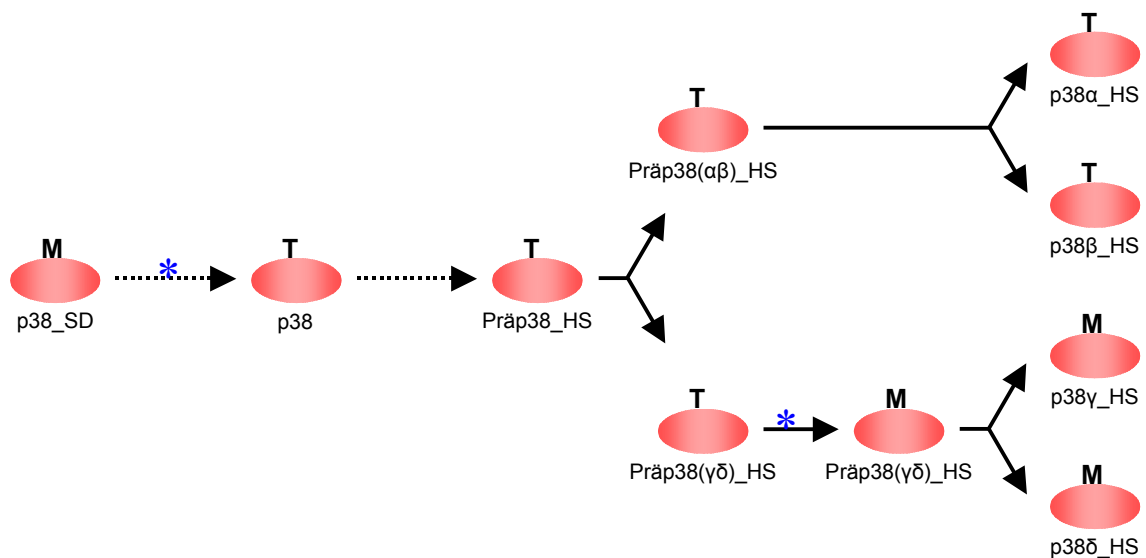
MAPK-verwandten Kinase aus den Protozoen *Tetrahymena thermophilum* und *T. pyriformis* (NAKASHIMA *et al.*, 1999). Die PKs dieser Einzeller stimmten in einem phylogenetischen Vergleich am ehesten mit HOG1, JNKs und p38 MAPKs überein. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass in beiden Kinasen der hoch konservierte Tyrosin-Rest im Dualphosphorylierungsmotiv durch ein Histidin ersetzt ist (TGH). Wahrscheinlich stellen die Gene dieser PKs Vorläuferformen der *JNK*- und *p38*-Gene der Metazoen dar.

Eine weitere auffällige Beobachtung ist, dass beide SAPK-Mitglieder des Schwamms eine weitaus höhere Übereinstimmung zu den orthologen Proteinen des Menschen (Deuterostomia) als zu denen von *C. elegans* (Protostomia) besitzen (s. Abb. 4.3 und 4.4). Diese Feststellung konnte zuvor schon mit anderen Genen/Proteinen aus Schwämmen gemacht werden (GAMULIN *et al.*, 2000).

Wie bereits erwähnt, existieren im Genom des Menschen (analog zu anderen Säugern) 3 *JNK*-kodierende Gene. Infolge eines alternativen Spleißens entstehen insgesamt 10 verschiedene Isoformen (s. Kap. 1.5.1.1). Ein AS-Vergleich der *JNK* aus *S. domuncula* mit diesen ergab, dass die Kinase des Schwamms mit keiner der *JNK*-Isoformen des Menschen entscheidend übereinstimmt (s. Kap. 4.1.3 und Abb. 4.5). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Entstehungstheorie der SAPKs und der phylogenetischen Position der Schwämme (s. oben), nach der die *JNK* des Schwamms eine ursprüngliche Form der noch heute in höheren Deuterostomia existierenden *JNK*s darstellt. Zudem konnten keine weiteren *JNK*-Gene oder Spleißvarianten dieser Kinase in *S. domuncula* gefunden werden (s. Kap. 4.1.3 und Abb. 4.8). Daher ist anzunehmen, dass Schwämme nur eine *JNK*-Form besitzen.

Ein Vergleich mit den humanen p38-Isoformen auf AS-Ebene zeigte, dass p38<sub>SD</sub> die höchste Übereinstimmung mit der Isoform p38 $\alpha$  aufweist [64 % identische AS], gefolgt von p38 $\beta$ 2 [61 %] und p38 $\beta$  [59 %]. Wesentlich geringere Homologien wurden im Bezug auf die p38 $\gamma$ - [50 %] sowie p38 $\delta$ -Isoform [49 %] festgestellt (s. Kap. 4.1.3). Aufgrund dieser Sequenzanalyse wurde allerdings auch vermutet, dass sich die p38 MAPK des Schwamms, analog zu den geringer homologen humanen Isoformen p38 $\gamma$  und p38 $\delta$ , nicht durch den p38-spezifischen Inhibitor SB203580 hemmen lässt (s. Kap. 4.1.3 und Abb. 4.6). Diese Vermutung wurde durch eine *in vitro* Kinase-Studie bestätigt (s. Kap. 4.2 und Abb. 4.7). Entscheidend für die Sensitivität einer p38-Isoform gegenüber SB203580 ist die in Abb. 4.3 und 4.6 mit T<sub>106</sub> markierte AS-Position [bezüglich p38 $\alpha$ ]. Wenn an dieser Stelle eine AS mit einer verhältnismäßig kleinen Seitenkette (wie z. B. Threonin bei p38 $\alpha$ , p38 $\beta$  und p38 $\beta$ 2; s. Abb. 4.6) vorliegt, passt die als kompetitiver Inhibitor wirkende Pyridinylimidazolkomponente in die ATP-bindende Tasche. Folglich wird das Adenosintriphosphat von dort verdrängt und das Substratprotein kann nicht mehr phosphoryliert werden. Die Mehrzahl der analy-

sierten p38 MAPKs (darunter auch die von *D. melanogaster*, *C. carpio* und *X. laevis*; s. Abb. 4.3) besitzen an dieser Position ein Threonin und sind daher sensitiv gegenüber SB203580. Wenn dagegen an dieser Stelle eine relativ große AS (wie z. B. Methionin bei p38 $\gamma$ , p38 $\delta$  und p38\_SD; s. Abb. 4.6) präsent ist, wird die Anlagerung des Inhibitors sterisch behindert und die enzymatische Übertragung des gammaständigen Phosphatrests von ATP auf das Substrat kann nicht mehr erfolgen. Erstaunlicherweise besitzen nur die p38 MAPK aus *S. domuncula* und die schon erwähnten p38-Isoformen des Menschen ein Methionin an dieser kritischen Position und sind folglich unsensitiv bezüglich SB203580.



**Abb. 5.2:**

Entstehungstheorie der 4 humanen p38-Isoformen (p38 $\alpha$ \_HS, p38 $\beta$ \_HS, p38 $\gamma$ \_HS und p38 $\delta$ \_HS). Abgebildet ist auch der für die Sensitivität gegenüber SB203580 kritische AS-Rest M oder T. Ein Austausch dieser AS ist mit \* gekennzeichnet. Genduplikationen werden durch gegabelte Pfeile symbolisiert. Erläuterungen zu diesem Modell s. Text.

Es ist deshalb anzunehmen, dass dieses Methionin der p38 MAPK des Schwamms in den evolutionär nachfolgenden p38-Isoformen durch einen Nukleotidaustausch zunächst in ein Threonin umgewandelt wurde (s. Abb. 5.2). Das sekundäre Wiederauftreten eines Methionins an dieser Position in der p38 $\gamma$ - und p38 $\delta$ -Isoform des Menschen könnte durch die Duplikation des humanen p38-Vorläufers erklärt werden. Diese führte zur Bildung einer p38( $\alpha/\beta$ )- und einer p38( $\gamma/\delta$ )-Vorgängerform, aus der durch jeweils eine weitere Duplikation die homologen Paare p38 $\alpha$ /p38 $\beta$  und p38 $\gamma$ /p38 $\delta$  hervorgingen (s. Abb. 5.2 und Kap. 5.3). Nach diesem Modell müsste die erneute Einführung des Methionins im Anschluss an die erste Duplikation der p38( $\gamma/\delta$ )-Vorgängerform erfolgt sein (s. Abb. 5.2). Nur so ist zu erklären, warum diese AS auch in der p38 $\gamma$ -verwandten Isoform p38 $\delta$  erscheint. Die im Vergleich zu den Isoformen p38 $\alpha$  und p38 $\beta$  geringere Homologie der p38 MAPK des Schwamms zu den p38 $\gamma$ - und p38 $\delta$ -

Isoformen ließe sich durch eine dynamischere Diversifizierung der *p38(γ/δ)*-Vorgängerform begründen.

Übereinstimmend mit der JNK konnten weder ein weiteres *p38*-Gen noch zusätzliche Spleißvarianten (s. Kap. 4.3 und Abb. 4.8) dieser Kinase in *S. domuncula* gefunden werden.

## 5.2 Analyse der genomischen Sequenzen

Von *SDJNK* und *SDp38* wurde auch die jeweilige genomische Sequenz ermittelt (s. Kap. 4.4.1 sowie Abb. 4.9 und 4.10). Obwohl beide *SAPK*-Klone für nahezu gleich große Proteine kodieren (s. Kap. 4.1.2), ist das entsprechende Gen der JNK (*SDJNKge*) in diesem Abschnitt 2,5 mal so lang, wie das der *p38* MAPK (*SDp38ge*). Während *SDJNKge* über 12 Introns verfügt, wird die kodierende Sequenz von *SDp38ge* lediglich durch 9 Introns unterbrochen. Das *JNK*-Gen besitzt im Durchschnitt wesentlich längere nichtkodierende Sequenzbereiche als das Gen der *p38* MAPK. Diese Gegebenheiten führen dazu, dass der Anteil der Introns an der Gesamtlänge von *SDJNKge* [83 %] im Vergleich zu dem von *SDp38ge* [59 %] deutlich höher ist. Bis auf repetitive „CACA“-Sequenzen weisen die Introns der beiden *SAPK*-Gene keine signifikanten Übereinstimmungen auf. Beide Gene des Schwamms verfügen jedoch über konservierte GT-AG Spleißstellen. Regulierende Motive oder kodierende Bereiche konnten innerhalb der Intronsequenzen nicht entdeckt werden (s. Kap. 4.4.1).

Werden die Längen der humanen und der aus *S. domuncula* stammenden *SAPK*-Gene miteinander verglichen, ist auffallend, dass die Gene des Menschen aufgrund der wesentlich ausgedehnteren nichtkodierenden Bereiche um ein Vielfaches länger sind. So ergeben beispielsweise die 11 Introns des humanen *p38α*-Gens eine Gesamtlänge von 79,2 kB, während die gesamte Länge der 9 Introns des *p38*-Gens aus *S. domuncula* nur 1,6 kB beträgt (obwohl die entsprechenden cDNA-Klone für nahezu gleich große Proteine kodieren). Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Gene des Schwamms generell dichter organisiert sind als die des Menschen.

## 5.3 Vergleich der Exon/Intron-Struktur von *SAPK*-Genen

Werden die Positionen der nichtkodierenden Bereiche der *SAPK*-Gene des Schwamms miteinander verglichen, wird deutlich, dass *SDJNKge* und *SDp38ge* über 8 identische Intronpositionen verfügen (s. Kap. 4.4.2 und Abb. 4.11). Diese Introns unterbrechen die kodierende Sequenz der beiden Gene nicht nur an exakt den gleichen/vergleichbaren AS-Positionen, sondern auch ausnahmslos an identischen Positionen innerhalb des entsprechenden Triplett-

kodes (identische Phase). Das Intron im schwach konservierten C-Terminus des *p38*-Gens (außerhalb der PK-Domäne) ist im Bezug auf das Gen der JNK lediglich um 2 AS-Positionen [6 Nukleotide] verschoben [Intron 11a]. Nur 3 Introns des *JNK*-Gens sind nicht in *SDp38ge* präsent (s. Abb. 4.11).

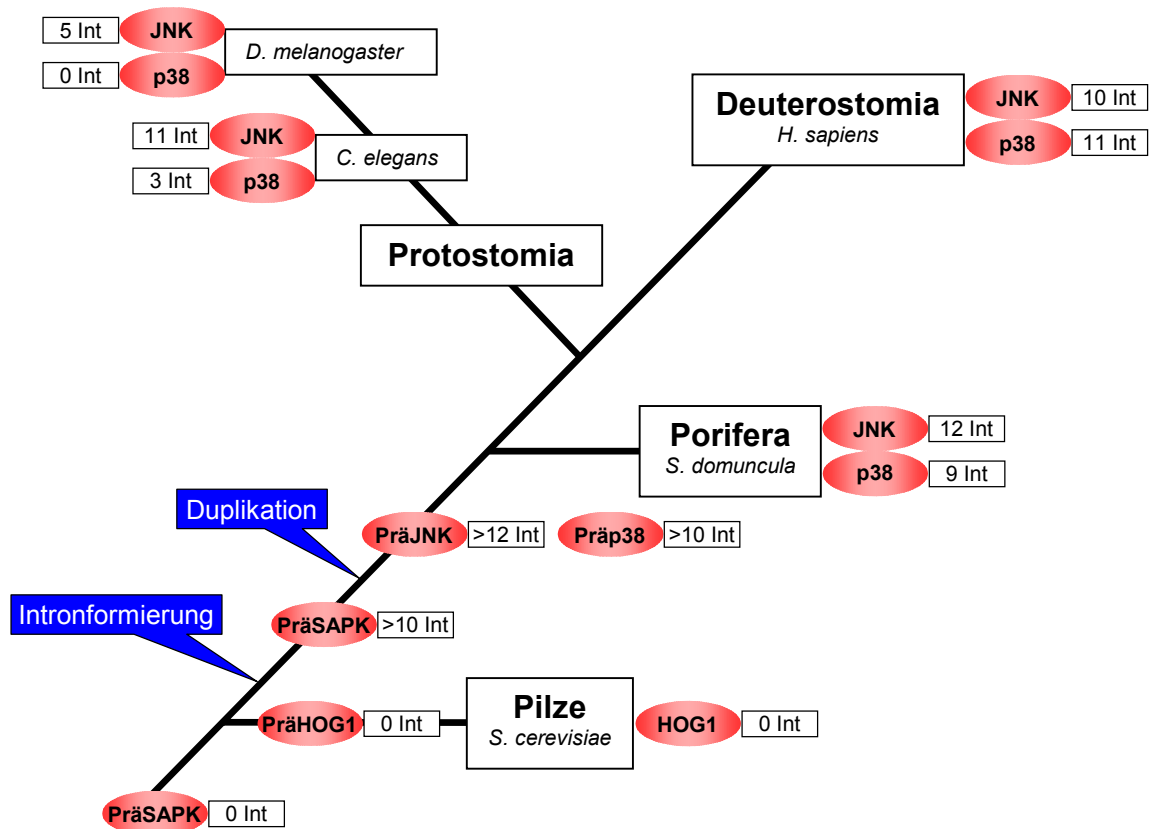
Diese außerordentlich hohe Übereinstimmung im Bezug auf die relative Lage der Introns in beiden *SAPK*-Genen aus *S. domuncula* ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Gene der JNK und p38 MAPK (zumindest im Schwamm) durch Duplikation eines gemeinsamen Vorläufergens entstanden sind (s. Kap. 5.1). Demzufolge muss dieses *HOG1*-verwandte Gen schon mindestens die 8 (9) Introns besessen haben, die noch heute gemeinsam in beiden *SAPK*-Genen des Schwamms existieren.

Ein Vergleich der Exon/Intron-Struktur der *SAPK*-Gene des Schwamms mit der von *SAPK*-Genen anderer Metazoen (*C. elegans*, *D. melanogaster* und *H. sapiens*) veranschaulichte, dass die Position sämtlicher 12 im *JNK*- und *p38*-Gen von *S. domuncula* präsenten Introns in einem bemerkenswert hohen Maß konserviert sind (s. Kap. 4.4.2 und Abb. 4.11). Die meisten Introns der analysierten *SAPK*-Gene unterbrechen die kodierende Sequenz an exakt den Positionen (hinsichtlich der AS-Position und der Phase des entsprechenden Triplettkodes!), die zuvor in beiden *SAPK*-Genen des Schwamms gefunden wurden (s. Abb. 4.11). Auffällig ist weiterhin, dass bis auf eine echte Ausnahme (Intron 10 des *JNK1 $\alpha$ 2*-Gens; s. Abb. 4.11) alle Intronpositionen der humanen *p38*-Gene (*p38 $\alpha$* , *p38 $\beta$* , *p38 $\gamma$*  und *p38 $\delta$* ) [11] sowie sämtliche des humanen *JNK1 $\alpha$ 2*-Gens [10] auch in den *SAPK*-Genen des Schwamms präsent sind. Die 4 *p38*-Gene des Menschen weisen dabei 8 gemeinsame Intronpositionen mit *SDp38ge* und 11 mit *SDJNKge* auf. Das humane *JNK1 $\alpha$ 2*-Gen besitzt dagegen 9 vergleichbare Intronpositionen mit *SDJNKge* und 6 mit *SDp38ge*. Das Intron 10 der *p38*-Gene aus *H. sapiens* weicht um lediglich 3 AS-Positionen [9 Nukleotide] im Vergleich zum Intron 10 des *JNK*-Gens von *S. domuncula* ab [Intron 10a] (s. Abb. 4.11). Da dieses Intron in einer schwächer konservierten Region (Subdomäne XI) vorliegt und es weder in den *SAPK*-Genen des Schwamms noch in den *p38*-Genen anderer Metazoen vorkommt, handelt es sich bei diesem wahrscheinlich um ein phylogenetisch „junges“ Intron.

Die Intronpositionen der analysierten *SAPK*-Gene von Protostomia sind, verglichen mit denen der erwähnten Gene aus *H. sapiens* (Deuterostomia), nicht so hoch konserviert (s. Abb. 4.11). In den *SAPK*-Genen von *C. elegans* und *D. melanogaster* konnten einige evolutionär „jüngere“ Intronpositionen identifiziert werden. Diese lagen hauptsächlich außerhalb der konservierten PK-Domäne. Dagegen wurden andere Introns sekundär eliminiert. Dies bestätigt die Beobachtung, dass die Gene des Schwamms zu denen des Menschen im Allgemeinen ähnlicher sind als zu denen von Protostomia (besonders *C. elegans*) (GAMULIN *et al.*, 2000). Aufgrund der Tatsache, dass beide *p38*-Gene der Fruchtfliege (*p38A* und *p38B*) keine Introns im kodierenden Sequenzbereich besitzen und der Beobachtung, dass das Gen der p38 MAPK

von *C. elegans* nur 3 Introns enthält, wovon lediglich 2 an konservierten Positionen lokalisiert sind, kann die Hypothese erstellt werden, dass die Protostomia (dazu gehören die meisten Invertebraten) eine Eliminierung der Introns aus dem *p38*-Gen bevorzugten. Eine ähnliche Situation existiert hinsichtlich der *JNK*-Gene der untersuchten Protostomia. Das Gen der *JNK* aus *D. melanogaster* weist nur 5 Introns auf, wovon eins an einer „neuen“ Position in der Subdomäne X erscheint. Interessanterweise ist dieses Intron auch im *JNK*-Gen von *C. elegans* präsent. Daher muss es schon im *JNK*-Vorläufergen beider Protostomia existiert haben. Vermutlich kann dieses spezielle Intron in den *JNK*-Genen vieler Invertebraten gefunden werden. Das Gen der *JNK* aus *C. elegans* besitzt außer diesem noch 10 weitere Introns. Davon sind lediglich 5 konserviert. Das Intron im schwach konservierten C-Terminus weicht um 3 AS-Positionen [9 Nukleotide] im Vergleich zum Intron 11 von *SDJNKge* ab [Intron 11b] (s. Abb. 4.11). Werden diese Indizien berücksichtigt, so kann bezüglich der *JNK*-Gene der Protostomia festgehalten werden, dass zwar einerseits die Eliminierung von konservierten Introns erfolgte (in Analogie zu den *p38*-Genen), aber andererseits (zumindest was *C. elegans* betrifft) auch zahlreiche „neue“ Introns eingefügt wurden. Diese Theorie steht im Einklang mit der dynamischeren Diversifizierung der *JNK*-Gene (s. Kap. 5.1).

Wird die zuvor erläuterte Evolutionstheorie der in Metazoen verbreiteten MAPK-Subfamilien *SAPK1/JNK* und *SAPK2/p38* MAPK zugrunde gelegt (s. Kap. 5.1), muss aufgrund der vorangestellten Ergebnisse folgende Entwicklung der *SAPK*-Gene angenommen werden: Bevor die Duplikation des *HOG1*-verwandten Vorläufergens (*PräSAPK*) erfolgte, um die *JNK* und *p38* MAPK zu bilden, besaß es mindestens die 10 Introns, die noch heute gemeinsam in den *JNK*- und *p38*-Genen der verbliebenen Metazoen präsent sind (s. Abb. 5.3). Da die Introns 10 und 11 von *SDJNKge* nur in *JNK*-Genen vorkommen, muss davon ausgegangen werden, dass das ursprüngliche Gen der *JNK* sogar 12 Introns enthielt (s. Abb. 5.3). Daraus folgt, dass die Intronpositionen der „modernen“ *JNK*- und *p38*-Gene älter sind als die Gene selbst. Es ist allerdings (noch) nicht möglich, den genauen Zeitraum anzugeben, innerhalb dessen diese ursprünglichen Introns in das Vorläufergen eingefügt wurden. Da das einzige *SAPK*-Gen der Hefe (*HOG1*) keine Introns besitzt (BREWESTER *et al.*, 1993), muss dieser Vorgang irgendwann zwischen der Abspaltung der Pilze aus dem gemeinsamen Pilz/Metazoen-Stamm und der Duplikation des *HOG1*-verwandten Vorläufergens erfolgt sein (s. Abb. 5.3). Wird das Alter der Schwämme betrachtet und ferner berücksichtigt, dass sie eine *JNK* und *p38* MAPK besitzen (s. Kap. 5.1), muss dieser Vorgang mehr als 1 Mrd. Jahre zurückliegen.



**Abb. 5.3:**

Entstehung der SAPK-Gene von Pilzen und Metazoen aus einem gemeinsamen Intron-losen Vorläufergen (PräSAPK). Neben den SAPK-Genen ist deren jeweilige Intronanzahl (Int) abgebildet. Der Zeitpunkt der Intronformierung und der Duplikation des HOG1-verwandten Vorläufergens der JNKs und p38 MAPKs ist ebenfalls dargestellt. Erklärungen zu diesem Modell s. Text.

Aufgrund der Tatsache, dass die konservierten Intronpositionen überwiegend in der PK-Domäne (mit Ausnahme der Subdomänen II, III und VIII) lokalisiert sind (s. Abb. 4.11) und diese Introns vornehmlich hoch konservierte Motive unterbrechen (Ergebnis nicht abgebildet), wird angenommen, dass die PK-Domäne des HOG1-verwandten Vorläufergens der Metazoen schon fertig ausgebildet war, bevor die Introns eingefügt wurden. Die am höchsten konservierte Intronposition befindet sich in der Subdomäne I (s. Abb. 4.11). Das Intron unterbricht den hoch konservierten Code von Cystein in Phase 2 [TG↓C/T] und konnte, bis auf die beiden p38-Gene von *D. melanogaster* (die sowieso kein Intron im kodierenden Bereich des Gens besitzen), in sämtlichen analysierten JNK- und p38-Genen nachgewiesen werden.

Im Genom des Menschen sind, wie schon mehrfach erwähnt, mindestens 4 p38-Gene vorhanden. Die Gene p38α und p38δ, die sich gemeinsam auf Chromosom 6 befinden, sind lediglich 22 kB voneinander entfernt. Der Abstand der p38β- und p38γ-Gene auf Chromosom 22 beträgt sogar nur 3,4 kB. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass diese 4 Gene des Menschen (wie in Kap. 5.1 beschrieben) durch 2 aufeinanderfolgende Duplikationen eines

gemeinsamen *p38*-Vorläufergens entstanden sind. Diese Vermutung wird außerdem durch den Vergleich identischer AS zwischen den *p38*-Isoformen unterstützt. Demzufolge besitzen die Paare *p38α/p38β* [73 % identische AS] und *p38γ/p38δ* [64 %] die zueinander höchsten Homologien. Wie ebenfalls bereits angeführt wurde, weisen alle 4 *p38*-Gene des Menschen 11 identische Introns auf. Davon sind 10 auch in anderen *p38*- und *JNK*-Genen vorhanden. Demzufolge besaß das humane *p38*-Vorläufergen schon sämtliche 11 Introns bevor die erste Duplikation erfolgte.

Ferner demonstriert diese Arbeit, dass in allen *p38*-Genen des Menschen das Intron in der Subdomäne XI um 3 AS-Positionen [9 Nukleotide] von der konservierten Position verschoben ist (Intron 10a; s. Abb. 4.11). Dieses „neue“ Intron muss demnach schon im *p38*-Vorläufergen des Menschen existiert haben und könnte der näheren Bestimmung des Zeitraums der Intronentstehung und Genduplikation(en) dienen. Geschah z. B. die Etablierung dieser Intronposition und die Duplikation des humanen *p38*-Vorläufergens evolutionär betrachtet erst spät, dürften die *p38*-Gene der anderen Säuger dieses „neue“ Intron nicht besitzen. Wenn dagegen diese Vorgänge zu einem relativ frühen Zeitpunkt erfolgten, müsste dieses Intron auch in den *p38*-Genen anderer Säuger/Vertebraten präsent sein. Leider waren nur die *p38*-Gene des Menschen über Online-Datenbanken verfügbar. Ein Vergleich mit *p38*-Genen anderer Säuger wäre aus den vorangegangenen Überlegungen vermutlich sehr aufschlussreich gewesen. Ebenso konnte im Rahmen dieser Arbeit lediglich eins der 3 humanen *JNK*-Gene (*JNK1α2*) analysiert werden (die anderen standen für einen Online-Zugriff ebenfalls nicht zur Verfügung).

Perspektivisch gesehen wäre es im Hinblick auf diese Daten interessant herauszufinden, ob die *JNK*- und *p38*-Gene im Schwammgenom auf dem gleichen Chromosom lokalisiert sind. Dies könnte mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse oder anhand einer „Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung“ (FISH) unter Verwendung von *SDJNKge*- und *SDp38ge*-spezifischen Sonden erfolgen. Bei einem positiven Ergebnis könnte zudem der Abstand zwischen beiden Genen ermittelt werden (z. B. durch PCR-Technik).

Eine hohe Übereinstimmung in den Intronpositionen zwischen den Genen des Schwamms und denen des Menschen konnte auch bezüglich des Gens des AIF und der Leukotrien-A4 Hydrolase (*LTA4*) nachgewiesen werden (BÖHM *et al.*, 2001b). Die Sequenzierung beider Gene aus *S. domuncula* zeigte, dass das *AIF*-Gen 6 und das *LTA4*-Gen 18 Introns besitzen. Fünf Intronpositionen des *AIF*-Gens und 17 des *LTA4*-Gens konnten in den entsprechenden humanen Genen exakt (hinsichtlich der AS-Position und der Phase des entsprechenden Triplettkodes!) wiedergefunden werden. Aufgrund dieser Daten ist zu vermuten, dass die meisten Introns, die in den Genen der Schwämme lokalisiert sind, auch mit hoher Wahrscheinlichkeit in den orthologen Genen der Säuger existieren.

## 5.4 Aktivierung der SAPKs durch Zellstress-auslösende Stimuli

### 5.4.1 Osmotischer Stress

Die meisten Zellen reagieren sehr sensibel auf osmotischen Stress, da dieser eine drastische Änderung des Zellvolumens zur Folge hat. Dieser Vorgang führt wiederum zu massiven Störungen bezüglich des Gleichgewichts der intrazellulären anorganischen Ionen (s. Kap. 1.5.4.1). Da jedoch bei allen Lebewesen die Konzentration der anorganischen Elektrolyte im Zellinneren hoch konserviert ist, können die Zellen größere Änderungen ihres Volumens nicht tolerieren. Der hohe Konservierungsgrad reflektiert nämlich eine evolutionär sehr alte Optimierung des Stoffwechsels, in einem bestimmten ionischen Milieu zu funktionieren (KÜLTZ und BURG, 1998). Aufgrund dessen existieren Mechanismen, die das Zellvolumen konstant halten und auf diese Weise die Homöostase der Ionenkonzentration kontrollieren. Unter diesem Aspekt spielt vor allem die Synthese von kompatiblen organischen Osmolyten eine bedeutende Rolle (KÜLTZ und BURG, 1998). In Folge von hyperosmotischem Stress synthetisiert z. B. die Hefe verstärkt Glycerin und Trehalose (s. Kap. 1.5.4.2). Dagegen sind Betain, Inositol, Taurin und Sorbitol die wichtigsten Osmolyte in den Zellen der Metazoen (NADKARNI *et al.*, 1999). Sie werden gebildet durch eine Induktion folgender Transportproteine oder Enzyme: [1] Betain/ $\gamma$ -Aminobuttersäure Transporter (BGT1), [2]  $\text{Na}^+$ -abhängiger Myo-Inositol Transporter (SMIT), [3] Taurin Transporter und [4] Aldolase Reduktase (AR) zur Synthese von Sorbitol. Da diese kompensatorischen Vorgänge erst mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung eintreten, führt osmotischer Stress oftmals zu Schädigungen von Makromolekülen (DNA und Proteine) und beeinträchtigt dadurch massiv die Zellfunktion (KÜLTZ und BURG, 1998).

In Hefen und in Tieren wird eine zelluläre Reaktion auf osmotischen Stress vornehmlich durch SAPKs vermittelt. Sowohl HOG1 als auch die verwandten JNKs und p38 MAPKs werden besonders durch Hyperosmose aktiviert und induzieren daraufhin die Transkription osmoprotektiver Gene (KÜLTZ *et al.*, 1997). So konnte z. B. durch Studien mit dem p38-spezifischen Inhibitor SB203580 herausgefunden werden, dass nach hyperosmotischem Stress die p38 MAPK an der Induktion von SMIT und BGT1 in einer renalen Epithelzelllinie sowie in Monocyten beteiligt ist (NADKARNI *et al.*, 1999). Außerdem löst diese SAPK die über ein Osmotic Response Element (ORE) gesteuerte Transkription der AR aus (NADKARNI *et al.*, 1999). In Folge von hyperosmotischem Stress wird vermutlich ebenfalls der Jak/STAT-Signaltransduktionsweg unter Beteiligung der p38 MAPK aktiviert (BODE *et al.*, 1999). Auch das in der Reaktion auf diverse Stressarten beteiligte *Sgk*-Gen wird durch Hyperosmose auf einem p38 MAPK-abhängigen Signalweg stimuliert (BELL *et al.*, 2000). Im Unterschied zur Hefe (s. Kap. 1.5.4.2) wurden in den Genomen der Tiere allerdings noch keine Gene

identifiziert, deren Aktivierung ausschließlich durch osmotischen Stress erfolgt (KÜLTZ *et al.*, 1997). Welche Sensoren oder Rezeptoren eine Veränderung im osmotischen Gradienten registrieren und wie diese Signale eine Stimulierung der SAPK-Signalkaskaden induzieren, konnte ebenfalls noch nicht geklärt werden. Bis heute sind in Metazoen weder Homologe von bakteriellen oder von aus Hefe stammenden „Zwei-Komponenten-Systeme“, noch primäre Osmosensoren gefunden worden, die SAPK-Signalwege regulieren (KÜLTZ und BURG, 1998).

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass eine Stimulierung der JNK und der p38 MAPK aus *S. domuncula* nur durch Hyperosmose [0,75-2 M NaCl] erfolgt (s. Kap. 4.5 und Abb. 4.12). Unter diesen Bedingungen konnte mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern in Western Blots eine starke Phosphorylierung der beiden SAPKs nachgewiesen werden (**A1** und **B1**). Im Gegensatz dazu löste hypoosmotischer Stress [0,25 M NaCl] keine Stimulierung dieser Kinasen aus (**A1** und **B1**). Um die zeitliche Verzögerung der SAPK-Aktivierung nach einem hyperosmotischen Signal zu bestimmen, wurden Schwammzellen in Gegenwart von 1 M NaCl inkubiert. Dies zeigte, dass die JNK bereits nach 10 min und die p38 MAPK schon nach 3 min phosphoryliert werden (**C1** und **D1**). In beiden Versuchsreihen wurde ein stabiler Gehalt am gesamten JNK- oder p38-Protein ermittelt (**A2**, **B2**, **C2** und **D2**). Letzteres lässt annehmen, dass beide SAPKs konstitutiv exprimiert werden. Demzufolge muss der mit den phosphospezifischen Antikörpern detektierte Anstieg des Signals allein auf einer Zunahme der phosphorylierten Form dieser SAPKs beruhen.

Diese Ergebnisse befinden sich im Einklang mit den Daten anderer Arbeitsgruppen. So konnte z. B. auch in neuronalen humanen Fibroblasten eine durch Hyperosmose induzierte Phosphorylierung der JNK und p38 MAPK nachgewiesen werden. Ebenso wie die SAPKs des Schwamms blieben diese unter hypoosmotischen Bedingungen inaktiviert. In weiterer Übereinstimmung mit den vorangestellten Resultaten wurde ein stabiler Gehalt an gesamter JNK und p38 MAPK nachgewiesen (LU *et al.*, 2000). In COS-7 Zellen, die zuvor mit 600 mM Sorbitol inkubiert wurden, konnte eine Phosphorylierung der p38 MAPK nach 5 min beobachtet werden (BODE *et al.*, 1999). Eine Stimulierung dieser SAPK wurde zudem in Mauszellen in Folge von hyperosmotischem Stress nachgewiesen (BELL *et al.*, 2000). Der zeitliche und konzentrationsabhängige Effekt des Stressors Sorbitol auf die Phosphorylierung von SAPKs konnte auch in Pankreaszellen der Ratte demonstriert werden (PARROT und TEMPLETON, 1999).

Im Gegensatz zur zentralen Rolle der SAPKs in der Vermittlung von hyperosmotischem Stress existieren konträre Ansichten über eine Beteiligung dieser Kinasen an der Weiterleitung hypoosmotischer Signale. Während einige Autoren nachwiesen, dass SAPK-Signalwege auch durch Hypoosmose stimuliert werden (ZHANG *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 2000), beobachteten andere das Gegenteil (SADOSHIMA *et al.*, 1996; LU *et al.*, 2000). Im Unterschied zu den Säugern wird in Hefezellen hypoosmotischer Stress ausschließlich auf

einem SAPK (HOG1)-unabhängigen Signaltransduktionsweg (über die MAPK MPK1) vermittelt (DAVENPORT *et al.*, 1995). Da Schwämme phylogenetisch die ursprünglichsten Metazoen sind und beide SAPKs aus *S. domuncula* in Übereinstimmung mit HOG1 nicht durch Hypoosmose aktiviert werden, ist zu vermuten, dass die SAPKs der Metazoen diese Funktion (falls überhaupt) erst später im Verlauf der Evolution übernahmen.

Außer den zentralen Komponenten der beiden SAPK-Signalkaskaden (JNK und p38 MAPK) konnten noch andere Mitglieder dieser Signalwege in *S. domuncula* gefunden werden. Dazu zählt die Ste20-homologe MAPKKKK Krs (KRUSE *et al.*, 1997) und die kleine GTPase Cdc42 (noch nicht publiziert). Beide Proteine stellen vorangeschaltete Signalelemente der SAPKs dar (s. Kap. 1.5.1.3 und 1.5.2.3). Erwähnenswert ist auch die Isolierung des SRF (SCHEFFER *et al.*, 1997) und eines dazugehörigen SRE (GAMULIN *et al.*, 1997) aus der gleichen Spezies. Sowohl die JNK als auch die p38 MAPK aktivieren den Transkriptionsfaktor Elk-1, der daraufhin mit dem SRF zu einem ternären Komplex assoziiert, worauf dieser an SRE von Promotoren binden kann (s. Kap. 1.5.1.2 und 1.5.2.2). Weitere Signalkomponenten der SAPK-Signaltransduktionswege konnten bislang noch nicht gefunden werden. Jedoch muss aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit sowie der Tatsache, dass SAPK-Signalwege in Hefen und in Metazoen weit verbreitet und ihre Signalkomponenten hoch konserviert sind (KÜLTZ und BURG, 1998; CAFFREY *et al.*, 1999), davon ausgegangen werden, dass die JNK- und p38 MAPK-Signalkaskaden im Schwamm vollständig existieren.

#### 5.4.2 Endotoxin (LPS)-induzierter Stress

Das Endotoxin LPS ist ein Hauptbestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien. Dieses pathogene Glycolipid stimuliert vorwiegend die Makrophagen und Monocyten, endogene Messenger zu produzieren und freizusetzen (SCHLETTER *et al.*, 1995; SWEET und HUME, 1996; FENTON und GOLENBOCK, 1998). Zu diesen Substanzen zählen bioaktive Lipide, Stickstoffmonoxid, Arachidonsäuremetaboliten und vor allem Cytokine, wie IL-1, IL-6 oder TNF $\alpha$  (SCHLETTER *et al.*, 1995; SANGHERA *et al.*, 1996). Die Cytokine binden anschließend an integrale Membranrezeptoren (TNFRs; s. Kap. 1.5.1.4) und potenzieren durch einen autokrinen Mechanismus ihre eigene Synthese. Eine hohe Ausschüttung dieser proinflammatorischen Moleküle in Folge einer massiven Infektion des betroffenen Organismus mit gramnegativen Bakterien führt zu schweren pathologischen Reaktionen und nicht selten zum septischen Schock (SCHLETTER *et al.*, 1995; VITTIMBERGA *et al.*, 1999). Die LPS-induzierte Synthese von Cytokinen wird ausgelöst durch eine Interaktion des Endotoxins mit der Oberfläche von Makrophagen oder Monocyten. Diese Assoziation wird erleichtert durch das LPS-bindende Protein LBP. Die LPS/LBP-Komplexe werden dann selektiv vom membranständigen Rezeptor CD14 erkannt und gebunden (ULEVITCH und

TOBIAS, 1994). CD14 besitzt jedoch keine intrinsische Domäne (es ist lediglich über ein Glycosylphosphatidylinositol-Molekül mit der Membran verankert) und ist aufgrund dessen nicht in der Lage, LPS-Signale in das Zellinnere weiterzuleiten. Daher wird angenommen, dass die CD14-Proteine das LPS adäquat für einige transmembrane Toll-like Rezeptoren (TLRs) präsentieren (VITA *et al.*, 1997; MOORE *et al.*, 2000). Denkbar ist auch ein Transfer des Endotoxins in das Cytosol der Zellen, wo es im Sinne eines Second Messengers wirken könnte (WRIGHT und KOLESNICK, 1995).

Wie zahlreiche Studien belegen, sind außer dem Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B und den ERKs in erster Linie die SAPK-Signalwege an einer LPS-induzierten Cytokinsynthese beteiligt (SWANTEK *et al.*, 1997; VAN DER BRUGGEN *et al.*, 1999). Wie bereits erwähnt, wird die p38 MAPK in Makrophagen durch LPS phosphoryliert und demzufolge aktiviert (HAN *et al.*, 1994). Ferner kann die durch LPS ausgelöste Cytokinsynthese mit dem p38-spezifischen Inhibitor SB203580 gehemmt werden (LEE *et al.*, 1994). Auch die JNK nimmt in der LPS-induzierten Stimulierung von Makrophagen und Monocyten eine Schlüsselposition ein (HAMBLETON *et al.*, 1995; SANGHERA *et al.*, 1996). So wurde z. B. nachgewiesen, dass die JNK und ihre Aktivatorinasen SEK1 sowie MEKK1 durch LPS aktiviert werden (SANGHERA *et al.*, 1996). Außerdem scheint diese SAPK auch an der Stabilisierung (CHEN *et al.*, 1998; MING *et al.*, 1998) und Translation (SWANTEK *et al.*, 1997) von Cytokin-mRNAs beteiligt zu sein. Welche molekularen Mechanismen die SAPK-Signalwege nach LPS-Bindung an CD14 stimulieren, konnte noch nicht geklärt werden. Sicherer dagegen sind die Annahmen, auf welche Weise die LPS-aktivierten SAPKs eine Cytokinsynthese induzieren. In diesem Zusammenhang wird über eine Beteiligung von SAPK-stimulierten Transkriptionsfaktoren spekuliert. LPS aktiviert beispielsweise die Expression der Jun-Familienmitglieder JunB und JunD auf einem JNK-abhängigen Signalweg (SWEET und HUME, 1996). Zudem wurde demonstriert, dass dieses Endotoxin in Monocyten die Aktivität von MEF-2C über die p38 MAPK stimuliert. Infolgedessen wird ebenfalls c-Jun verstärkt exprimiert (s. Kap. 1.5.2.2). Dieser Transkriptionsfaktor kann daraufhin mit anderen Mitgliedern der bZIP-Familie heterodimerisieren und an AP-1 Stellen von Promotoren binden (s. Kap. 1.5.1.2). Diese regulatorischen Elemente sind in den Enhancer Regionen vieler Cytokingene präsent (SWEET und HUME, 1996; HAN *et al.*, 1997).

Auch Schwämme besitzen Komponenten des Immunsystems (MÜLLER *et al.*, 1999). So konnten als Bestandteile des angeborenen Immunsystems „Scavenger Rezeptor Cysteinreiche Domänen“ und Cytokin-ähnliche Moleküle gefunden werden. Zusätzlich existiert das (2'-5')Oligoadenylat-Synthetase-System in den Schwämmen. Nach Self/Nonsel-Experimenten mit Gewebestücken von *S. domuncula* erfolgte die Expression eines Säuger-ähnlichen Cytokins. Schwämme besitzen außerdem Vorläufermoleküle des adaptiven Immunsystems. So wurden aus *G. cydonium* 2 Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren isoliert (MÜLLER *et al.*, 1999). Des weiteren wurde nachgewiesen, dass Schwammzellen als Reaktion auf bakterielle

Infektion Apoptose eingehen (WAGNER *et al.*, 1998). Diese Beobachtungen ließen in Kombination mit der Klonierung der beiden SAPKs aus *S. domuncula* annehmen, dass auch Schwammzellen spezifisch auf LPS reagieren und dass an dieser Signaltransduktion die JNK und p38 MAPK beteiligt sind.

Um dies zu überprüfen, wurde Schwammgewebe in Gegenwart von LPS inkubiert (s. Kap. 3.18.2). Die Ergebnisse zeigten, dass beide SAPKs durch das Endotoxin aktiviert werden (s. Kap. 4.5 und Abb. 4.12). Bereits nach einer einstündigen Inkubation war unter Verwendung von phosphospezifischen Antikörpern in Western Blots eine Phosphorylierung der JNK und p38 MAPK nachzuweisen (E1 und F1). Die maximale Aktivierung wurde in beiden Fällen nach 12-48 h erreicht (E1 und F1). In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Experimenten (osmotischer Schock) konnte ein stabiler Gehalt an gesamtem JNK- und p38-Protein ermittelt werden (E2 und F2).

Die Ergebnisse beweisen, dass auch Schwammzellen durch LPS auf SAPK-abhängige Weise stimuliert werden. Analog zu diesen Daten wurde in einer Makrophagenzelllinie der Maus eine LPS-induzierte Phosphorylierung der JNK und p38 MAPK beobachtet (ST-DENIS *et al.*, 1998). Darüber hinaus war auch eine konstitutive Expression dieser SAPKs während der Versuchsphase feststellbar. Ähnliche Beobachtungen wurden durch andere Arbeitsgruppen gemacht (HALE *et al.*, 1999; VITTIMBERGA *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2000). Dass Schwämme spezifisch auf das Endotoxin reagieren, wurde ferner durch Messung der Proteinsyntheserate demonstriert (BÖHM *et al.*, 2001a).

Diese Daten belegen, dass die generellen bakteriellen Abwehrmechanismen der Zellen evolutionär konserviert wurden und dass beide SAPK-Pfade an der LPS-induzierten Signaltransduktion in Schwammzellen beteiligt sind. Perspektivisch gesehen wäre es interessant herauszufinden, ob Schwämme einen CD14-ähnlichen Rezeptor sowie einen TLR besitzen und welche Cytokine in Folge einer LPS-Stimulierung von Schwammzellen synthetisiert werden.

### 5.4.3 OA-induzierter Stress

Die OA gehört chemisch gesehen zur Klasse der Polyetherverbindungen. Sie besteht u. a. aus einer C<sub>18</sub>-Fettsäurekomponente. Die Synthese dieser Substanz erfolgt durch einige Dinoflagellatenarten. Aufgrund der Filtrieraktivität von marinen Schwämmen und Schalentieren wird OA in diesen Organismen akkumuliert (COHEN *et al.*, 1990). Die Isolierung dieser toxischen Verbindung aus Schwämmen der Gattung *Halichondria* gelang als erstes TACHIBANA *et al.* (1981). Wie sich später herausstellte, ist OA ein sehr effektiver und äußerst selektiver Inhibitor der Ser/Thr-PPs PP1, PP2A und PP3 (BIALOJAN und TAKAI, 1988; HONKANEN *et al.*, 1991). In Folge einer Bindung an die katalytische UE dieser PPs

löst das Toxin eine Hyperphosphorylierung zellulärer Proteine aus (HAYSTEAD *et al.*, 1989; SASSA *et al.*, 1989). Da Tumorsuppressorproteine ebenfalls von dieser Phosphorylierung betroffen sind, besitzt OA auch eine tumorgene Wirkung (FUJIKI *et al.*, 1994; WESTERMARCK *et al.*, 1998; ROSENBERGER *et al.*, 1999).

Ser/Thr-PPs, wie PP1 und PP2A, können die Aktivität von MAPK-Signalkaskaden negativ regulieren (s. Kap. 1.4.2). Dies erfolgt vorzugsweise über eine Dephosphorylierung von MEKs und MAPKKs (z. B. Raf). Zudem wurde eine direkte Wirkung dieser PPs auf MAPKs nachgewiesen. So belegen zahlreiche Studien, dass die PP2A Serin/Threonin-Reste der ERK1/2 und JNK dephosphoryliert (GOMEZ und COHEN, 1991; KYRIAKIS *et al.*, 1994; MORIGUCHI *et al.*, 1996b). Im Einklang mit diesen Beobachtungen wiesen andere Arbeitsgruppen eine Aktivierung der 3 MAPK-Signalwege (ERK1/2, JNK und p38 MAPK) nach OA-induzierter Inhibition der PP2A nach (CASILLAS *et al.*, 1993; CANO *et al.*, 1994; MORIGUCHI *et al.*, 1996b).

Aufgrund dieser Zusammenhänge wurde in der vorliegenden Arbeit die inhibierende Wirkung von OA auf die beiden SAPKs des Schwamms untersucht. Die Ergebnisse demonstrieren, dass sowohl die JNK als auch die p38 MAPK durch das Toxin aktiviert werden (s. Kap. 4.5 und Abb. 4.12). Durch Western Blot-Analysen konnte anhand von phosphospezifischen Antikörpern nachgewiesen werden, dass eine Phosphorylierung beider SAPKs nach 1-2 Tagen in Gegenwart von OA erfolgt (**G1** und **H1**). Wie schon zuvor, konnte eine konstitutive Expression der beiden SAPKs im Verlauf des Experiments beobachtet werden (**G2** und **H2**).

Studien mit humanen und aus Mäusen stammenden Fibroblasten ergaben ähnliche Resultate. In beiden Zellsystemen konnte durch Zugabe von OA eine Phosphorylierung der JNK und p38 MAPK induziert werden. In weiterer Übereinstimmung mit dieser Arbeit wurde ein stabiler Gehalt am gesamten JNK- und p38-Protein nachgewiesen (WESTERMARCK *et al.*, 1998). Diese Arbeitsgruppe stellte ebenfalls eine OA-induzierte, zeitlich stark verzögerte Phosphorylierung der SAPKs fest (im Vergleich zur LPS- und Hyperosmose-induzierten SAPK-Aktivierung). Die Ursache dieses Phänomens ist möglicherweise auf eine langsame Inhibition der PP2A-Aktivität durch OA zurückzuführen (FAVRE *et al.*, 1997).

Werden diese Daten zusammengefasst, so wird ersichtlich, dass *S. domuncula* mindestens eine Ser/Thr-PP besitzen muss, die vergleichbar mit PP1 und PP2A die SAPK-Signalkaskaden inhibierend reguliert. Dieser indirekte Nachweis von negativ modulierenden Komponenten der SAPK-Pfade im Schwamm macht deutlich, dass auch diese Signalelemente evolutionär konserviert sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind unter der Berücksichtigung, dass diese PPs die Aktivität der SAPKs nicht nur über eine direkte Interaktion mit ihnen regulieren, sondern diese auch durch eine Beeinflussung der Aktivität ihrer vorangeschalteten Kinasen inhibieren (s. oben), ein weiterer Beweis für die Existenz von vollständigen SAPK-Signaltransduktionswegen im Schwamm.

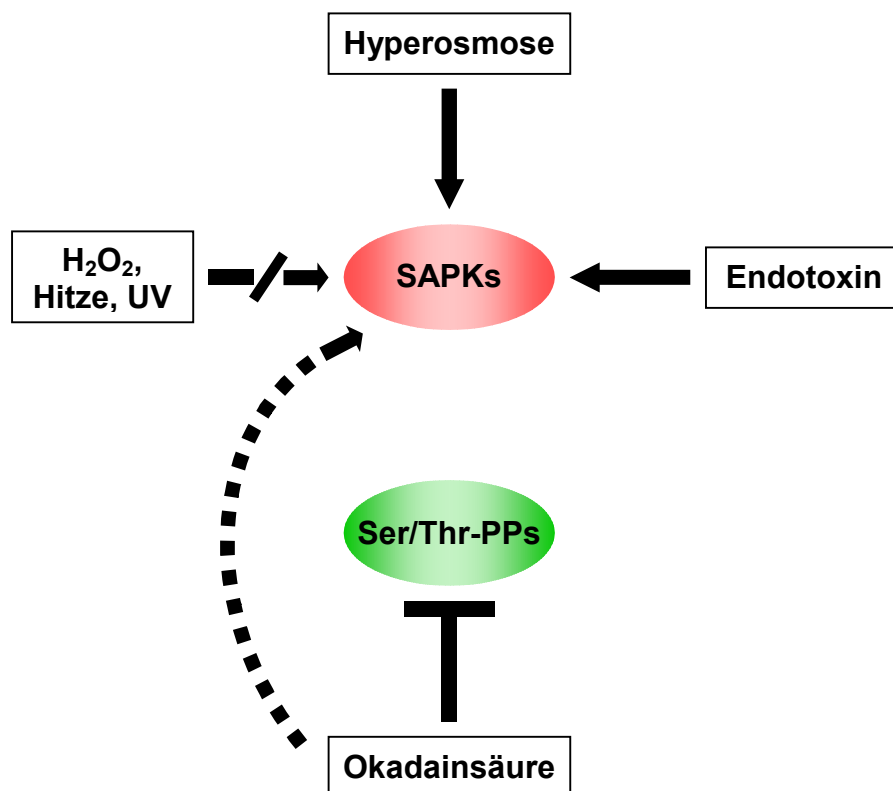
#### 5.4.4 Stress durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Hitzeschock oder UVB-Bestrahlung

Die Stressoren Hitzeschock, UV-Bestrahlung und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (oxidativer Stress) fördern die Schädigung zellulärer Makromoleküle und induzieren, abhängig vom Ausmaß des Schadens, das Apoptoseprogramm der betroffenen Zellen. An der Signaltransduktion dieser Stressauslösenden Stimuli sind neben einigen anderen PKs und NFκB vorwiegend die SAPKs beteiligt (GABAI *et al.*, 1997; HAZZALIN *et al.*, 1997; WESSELBORG *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu der durch Rezeptor-Ligand-Interaktionen ausgelösten Aktivierung der SAPKs (s. Kap. 1.5.1.4) sind über die molekularen Mechanismen, die zu einer Stimulierung von SAPK-Signalkaskaden nach Exposition der Zellen mit den erwähnten Stressoren führen, relativ wenige Details bekannt (ENGLARO *et al.*, 1998; BHAT und ZHANG, 1999). Ebenfalls noch weitgehend ungeklärt ist die Frage, welche physiologischen Vorgänge durch eine Aktivierung der SAPKs unter diesen Stressbedingungen gesteuert werden. In den Kap. 1.5.3.1/2 wurde bereits erwähnt, dass die JNKs und p38 MAPKs eine zentrale Funktion in der Regulation der Apoptose und des Zellzyklusses besitzen. Daher wäre möglich, dass die SAPKs in stark geschädigten Zellen das Suizidprogramm stimulieren, um diese aus dem Organismus zu eliminieren (GABAI *et al.*, 1997). Der Nachweis, dass oxidativer Stress (ausgelöst durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) eine Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung und Caspaseaktivierung in Muskelzellen auf einem JNK-abhängigen Signalweg induziert (TURNER *et al.*, 1998), belegt diese Hypothese. Außerdem konnte ein direkter Zusammenhang zwischen UV-induzierter Apoptose und einer Aktivierung der JNK festgestellt werden (CHEN *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen, die eine Apoptose-induzierende Funktion der SAPKs unter den erwähnten Stressbedingungen bestätigen, existieren auch Studien, die über eine SAPK-vermittelte Induktion cytoprotektiver Gene berichten. So konnte z. B. herausgefunden werden, dass in Folge einer UV-Bestrahlung der Promotor des DNA-Reparaturenzyms „Urokinase-typ Plasminogen Aktivator“ (UPA) auf JNK-abhängige Weise stimuliert wird (MIRALLES *et al.*, 1998). Zudem wird als Adaption an oxidativen Stress die p38-spezifische Substratkinase MAPKAPK2 aktiviert. Diese ist dann imstande, die kleinen Hitzeschockproteine HSP25/27 zu phosphorylieren, die daraufhin das beschädigte Cytoskelett stabilisieren (CLERK *et al.*, 1998a und 1998b). Die Entscheidung, entweder Apoptose zu induzieren oder das Überleben der Zelle zu unterstützen, hängt vermutlich vom Ausmaß des Zellschadens ab.

Um zu untersuchen, ob beide SAPKs des Schwamms durch die genannten Stressarten aktiviert werden, wurde Schwammgewebe entweder bei 26°C oder in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. In einem weiteren Experiment erfolgte zudem eine UVB-Bestrahlung von Gewebestücken (s. Kap. 3.18.2). Western Blot-Analysen mit phosphospezifischen Antikörpern zeigten, dass keiner dieser Stimuli eine Phosphorylierung der SAPKs induzierte (s. Kap. 4.5 und Abb. 4.12 I-N). Die Ergebnisse beweisen, dass diese Stressauslösenden Stimuli im

Schwamm auf SAPK-unabhängigen Signalwegen transduziert werden. Zahlreiche Studien mit Säugerzellen belegen, dass an der Vermittlung dieser Stressarten neben den SAPKs auch NFκB beteiligt ist (WESSELBORG *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 1998). Aufgrund dieser Beobachtungen wäre denkbar, dass in Schwammzellen durch diese Zellstress-induzierenden Stimuli ausschließlich der NFκB-Pfad aktiviert wird. Erst kürzlich konnte dieser Transkriptionsfaktor aus der cDNA-Bibliothek von *S. domuncula* isoliert werden (noch nicht publiziert).

Die Ergebnisse über die Aktivierung der SAPKs des Schwamms durch Zellstress-auslösende Stimuli lassen vermuten, dass sich die primäre Funktion der SAPKs in Schwämmen (und vermutlich auch in anderen einfachen Metazoen) im Unterschied zu höheren Vertebraten lediglich auf eine Vermittlung hyperosmotischer Signale und eine Beantwortung inflammatorischer Ereignisse konzentriert (s. Abb. 5.4).



**Abb. 5.4:**

Stimulierung der SAPKs des Schwamms durch extrazelluläre Stimuli. Sowohl die JNK als auch die p38 MAPK aus *S. domuncula* werden durch Hyperosmose und Endotoxin (LPS) aktiviert (symbolisiert durch Pfeile). Demgegenüber konnte nach oxidativem Stress (ausgelöst durch  $H_2O_2$ ), Hitzeschock oder UVB-Bestrahlung keine Stimulierung dieser SAPKs nachgewiesen werden (unterbrochener Pfeil). Folglich werden diese Stressarten auf SAPK-unabhängigen Signalwegen in Schwammzellen transduziert. Durch die inhibierende Wirkung der Okadainsäure auf SAPK-hemmende Ser/Thr-PPs erfolgt eine indirekte Aktivierung der SAPKs durch diese Substanz (gestrichelter Pfeil).

## 5.5 Funktionale Komplementierung eines *HOG1*-defizienten Hefestamms mit den SAPKs aus *S. domuncula*

### 5.5.1 Funktionale Komplementierung und Aktivierung durch Hyperosmose

Der HOG-Signalweg von *S. cerevisiae* wird durch hyperosmotischen Stress aktiviert und induziert daraufhin die für das Überleben der Hefezellen notwendige Synthese organischer Osmolyte (wie z. B. Glycerin). Ebenso wird die Transkription STRE-kontrollierter Gene stimuliert. Die zentrale Komponente dieser Signaltransduktionskaskade ist die YSAPK HOG1. Diese Kinase wird durch die MAPKK PBS2 phosphoryliert, deren Aktivität wiederum durch 2 unterschiedliche MAPKKs (SSK2/22 oder STE11) kontrolliert wird. Diese stehen in Verbindung mit je einem primären Osmosensor (SLN1 oder SHO1), der eine Veränderung des osmotischen Gradienten an der Zellmembran registriert und diesen Stimulus in den HOG-Signalweg integriert (s. Kap. 1.5.4.2/3 und Abb. 1.13).

Das HOG1 der Hefe sowie die JNKs und p38 MAPKs der Metazoen bilden zusammen die SAPK-Untergruppe der MAPKs (s. Kap. 1.4.1 und Abb. 1.4). Ein Vergleich der AS-Abfolge mit anderen MAPKs zeigte, dass diese 3 SAPK-Untergruppenmitglieder die zueinander höchsten Homologien aufweisen (KÜLTZ, 1998; KÜLTZ und BURG, 1998). Dabei konnten mehr als 50 % ähnliche AS zwischen HOG1 und den p38 MAPKs ermittelt werden. Im Bezug auf die JNKs besitzt die SAPK der Hefe eine etwas geringere Similarität.

Es wird angenommen, dass sämtliche *JNK*- und *p38*-Gene der noch heute existierenden vielzelligen Tiere von dem einzigen *SAPK*-Gen der Hefe (*HOG1*) abstammen. Nach dieser Evolutionstheorie der SAPKs sind die JNKs und p38 MAPKs der Metazoen durch Duplikation eines *HOG1*-verwandten Vorläufers entstanden. Demnach wären sie echte Orthologe dieser YSAPK (s. Kap. 5.1).

Da nicht nur die SAPKs der Hefen und der Metazoen sondern auch ihre jeweils vergleichbaren Aktivatorinasen in einem phylogenetischen Stammbaum miteinander clustern, muss davon ausgegangen werden, dass sich die JNK- und p38 MAPK-Signalkaskaden komplett aus dem HOG1-Pfad entwickelt haben und ihre Signalkomponenten hoch konserviert sind. Komplementierungsstudien mit HOG1-defizienten Hefestämmen bestätigen diese Annahme (GALCHEVA-GARGOVA *et al.*, 1994; HAN *et al.*, 1994; KUMAR *et al.*, 1995; HAN *et al.*, 1998; KAWASAKI *et al.*, 1999).

Um nachzuprüfen, ob auch beide SAPKs des Schwamms die Funktion von HOG1 in *S. cerevisiae* übernehmen können, wurden Zellen eines *HOG1*-defizienten Hefestamms mit diesen Kinasen komplementiert. Dafür wurde der jeweilige kodierende cDNA-Bereich dieser SAPKs in einen Expressionsvektor kloniert (s. Kap. 4.6.1).

Nachdem die Expression der rekombinanten SAPKs in der *HOG1-Δ1*-Nullmutante nachgewiesen wurde (s. Kap. 4.6.2 und Abb. 4.13), erfolgte die Ausplattierung von Zellen des Wildtyps, der nichttransformierten Nullmutante sowie der rekombinanten Klone auf einen hyperosmotischen Nährboden (YEPA-Agar + 0,6 M NaCl). Nach 3tägiger Inkubation wurde deren Wachstum verglichen (s. Kap. 4.6.3 und Abb. 4.14). Der Vergleich beweist, dass beide SAPKs des Schwamms das HOG1-Protein zu 100 % funktional ersetzen können. Nur der Wildtyp und die rekombinanten Nullmutanten, deren Vektor entweder *SDJNK*, *SDp38* oder *HOG1* in sense Orientierung enthielten, waren in der Lage, unter den hyperosmotischen Bedingungen zu wachsen.

Anschließend sollte durch Western Blots überprüft werden, ob die rekombinanten Kinasen unter hyperosmotischen Bedingungen (YEPA-Agar + 0,6 M NaCl) aktiviert werden. Studien mit phosphospezifischen Antikörpern zeigten, dass in Übereinstimmung mit der hefeeigenen SAPK auch die Kinasen des Schwamms in Folge von Hyperosmose phosphoryliert und demzufolge stimuliert werden (s. Kap. 4.6.4 und Abb. 4.15/16).

Diese Resultate befinden sich im Einklang mit analogen Studien. So konnte auch mit SAPKs aus *C. elegans* (KAWASAKI *et al.*, 1999) und *D. melanogaster* (HAN *et al.*, 1998) sowie mit aus Säugern (einschließlich des Menschen) stammenden SAPKs (GALCHEVA-GARGOVA *et al.*, 1994; HAN *et al.*, 1994; KUMAR *et al.*, 1995) eine funktionale Komplementierung von *HOG1-Δ1*-Nullmutanten erzielt werden. Diese Arbeitsgruppen stellten ebenfalls eine Aktivierung der rekombinanten SAPKs in Folge von hyperosmotischem Stress fest.

Übereinstimmend mit diesen Daten gelten die Resultate der vorliegenden Arbeit als weitere Indizien der Hypothese, dass die JNK- und p38 MAPK-Signaltransduktionswege der Metazoen durch Duplikation der HOG1-Kaskade der Hefe entstanden sind (s. Kap. 5.1). Ein Vergleich der AS-Abfolge zwischen HOG1 und den Kinasen des Schwamms verdeutlichte, dass die p38 MAPK zu 37 % und die JNK zu 32 % identisch mit der YSAPK sind (s. Kap. 4.1.3). Die erfolgreiche Komplementierung der HOG1-Funktion durch die SAPKs des Schwamms in *S. cerevisiae* beweist, dass neben dieser YSAPK auch ihre vorangeschalteten Signalkomponenten (s. oben) evolutionär konserviert sind. Nur so ist die HOG1-analoge Wirkung und Phosphorylierung der Schwamm-Kinasen in den Hefezellen zu erklären.

Wie im Kap. 1.4.3 erläutert, werden MAPK-Modulkomponenten sowohl in Hefe- als auch in Säugerzellen nach ihrer Stimulierung selektiv an Gerüstproteine (scaffolding Proteine) gebunden. Dies verhindert eine unkontrollierte Aktivierung dieser Signalelemente durch parallel verlaufende Transduktionskaskaden. Auch bezüglich der HOG1- und JNK-Signalwege konnten spezifische Assoziationen ihrer Modulkomponenten mit Gerüstproteinen nachgewiesen werden (s. Kap. 1.4.3 und Abb. 1.6/7). Unter Berücksichtigung dieser Zusammenhänge und der vorangestellten Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass auch diese scaffolding Proteine (zumindest ihre mit den Modulkomponenten interagierenden Domänen) evolutionär erhalten wurden.

### 5.5.2 Intrazelluläre Lokalisation der aktivierten SAPKs

Wie schon erläutert, werden SAPKs nach ihrer Aktivierung und der darauffolgenden Homodimerisierung in den Zellkern transportiert. Dort phosphorylieren sie induzierbare Transkriptionsfaktoren oder PKs (s. Kap. 1.5.1.2, 1.5.2.2 und 1.5.4.2). Auch im Fall der Hefe wurde eine durch Hyperosmose induzierte Akkumulierung von HOG1 im Nukleus festgestellt (REISER *et al.*, 1999).

Um zu überprüfen, ob beide SAPKs des Schwamms ebenfalls durch hyperosmotischen Stress im Zellkern der Hefemutanten akkumuliert werden, wurden mit den rekombinanten Klonen unter Verwendung phosphospezifischer Antikörper Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt (s. Kap. 3.17.7). Die Ergebnisse beweisen, dass sich beide Schwamm-Kinasen bezüglich der intrazellulären Lokalisation analog zu HOG1 verhalten (s. Kap. 4.6.5 und Abb. 4.17). Folglich müssen die SAPKs der Hefen und der Metazoen über gleiche oder verwandte Mechanismen in den Kern gelangen. Da den MAPKs allgemein eine Kerntransportsequenz fehlt, sind eher unkonventionelle oder indirekte Mechanismen für den Transport verantwortlich (REISER *et al.*, 1999). Unter der Annahme, dass die SAPKs in Abwesenheit eines aktivierenden Stimulus zyklisch zwischen Cytoplasma und Nukleus diffundieren, kann eine durch Phosphorylierung initiierte Kernakkumulierung dieser Kinasen nur durch eine erhöhte Import- oder reduzierte Exporteffizienz erklärt werden. KHOKLATCHEV *et al.* (1998) wies nach, dass durch Dualphosphorylierung dimerisierte MAPKs eine wesentlich höhere Importrate aufweisen als nichtphosphorylierte. Wahrscheinlich können sie in Folge einer über ihre Dimerisierung induzierten Konformationsänderung auf einem noch unbekanntem Transportweg in den Kern gelangen. Im Unterschied dazu wurde von anderen Autoren vorgeschlagen, dass die Akkumulierung im Kern auf einem Retentionsmechanismus von im Nukleus lokalisierten und verankernd wirkenden Molekülen basiert (GAITS *et al.*, 1998; WILKINSON und MILLAR, 1998). Ein weitere Studie, die ebenfalls eine Ansammlung aktivierter MAPKs im Kern beschreibt, jedoch nicht von einer periodischen Diffusion dieser Kinasen zwischen den Zellkompartimenten ausgeht, stammt von FUKADA *et al.* (1996). In dieser Studie konnte belegt werden, dass die MEK im unstimulierten Zustand durch ein Kernexportsignal aktiv aus dem Nukleus transportiert wird. In Funktion eines cytoplasmatischen Ankers für inaktivierte ERKs wäre dann diese MAPKK in der Lage, deren Kernakkumulation zu verhindern.

Auch über den Exportmechanismus der MAPKs sind relativ wenige Details bekannt. Es konnte jedoch demonstriert werden, dass die Exportrate vom Phosphorylierungsstatus der MAPKs abhängig ist. Aufgrund der Lokalisation dualspezifischer PPs (wie die MKP-1) im Zellkern kann eine Beteiligung dieser MAPK-spezifischen dephosphorylierenden Enzyme an dem Export ihrer Substrate zumindest nicht ausgeschlossen werden (ALESSI *et al.*, 1993; LENORMAND *et al.*, 1993; SUN *et al.*, 1993; ZHENG und GUAN, 1993; WASKIEWICZ und COOPER, 1995). Auch die im Nukleus befindliche und nach der Aktivierung von p38

MAPKs in das Cytoplasma diffundierende MAPKAPK2 könnte möglicherweise an dem Export ihrer aktivierenden Kinase beteiligt sein (BEN-LEVY *et al.*, 1998; ENGEL *et al.*, 1998). Diese PK assoziiert mit inaktivierter p38 MAPK im Nukleus, wodurch sie ihre Aktivator kinase wahrscheinlich schnell und effektiv in das Cytoplasma zurück transportiert (BEN-LEVY *et al.*, 1998). Zudem wird noch die Anwesenheit eines im Zellkern befindlichen Anker moleküls diskutiert, das der Regulation des Exports der MAPKs dienen könnte (LENORMAND *et al.*, 1998).

### 5.5.3 Osmoregulation in Metazoen durch SAPKs

Im Gegensatz zum einzigen SAPK-kodierenden Gen der Hefe (*HOG1*) existieren im Genom der Metazoen mindestens 2 Mitglieder der *SAPKs* (*JNK* und *p38 MAPK*). Durch erneute Genduplikationen entstanden weitere Varianten dieser Gene, so dass höhere Vertebraten über mindestens 7 *SAPK*-Gene verfügen (s. Kap. 5.1). Neben ihrer Bedeutung in der Vermittlung der Cytokinsynthese (s. Kap. 1.5.3.4/5) und der Kontrolle des Apoptoseprogramms (s. Kap. 1.5.3.1) werden die JNK- und p38 MAPK-Signalwege besonders durch Hyperosmose aktiviert. Die durch JNKs und p38 MAPKs nach hyperosmotischem Stress stimulierten Transkriptionsfaktoren sind c-Jun, ATF-2, Elk-1 und MEF-2C. Da jedoch über diese Transkriptionsfaktoren nicht alle hyperosmotisch aktivierten Gene induziert werden, liegt die Vermutung nahe, dass in den Zellen der Metazoen ein ergänzender Austausch zwischen SAPK-Pfaden und anderen Signalkaskaden existieren muss, um hyperosmotische Signale und Stressor-spezifische Adaptionen zu vermitteln (KÜLTZ und BURG, 1998).

Wie schon erwähnt, sind die SAPKs gleichermaßen wichtig, um den Zellzyklus (s. Kap. 1.5.3.2), die Regulation der zellulären Reparaturmechanismen (s. Kap. 1.5.4.2) oder die Induktion des programmierten Zelltods (s. Kap. 1.5.3.1) zu kontrollieren. In diesem Zusammenhang konnte demonstriert werden, dass der p38 MAPK-Signalweg für die hyperosmotische Induktion der Expression von GADD45 und GADD153 in Nierenzellen von Mäusen verantwortlich ist (KÜLTZ *et al.*, 1998). Beide Proteine sind an der Erkennung und/oder Reparatur der DNA beteiligt und werden durch Unterbrechung des Zellwachstums oder in Folge einer DNA-Schädigung aktiviert (KÜLTZ *et al.*, 1998). Diese Beobachtungen werden gestützt durch den Hyperosmose-induzierten Verbleib dieser Zellen in der G2 Phase (KÜLTZ *et al.*, 1998). Die Stagnation des Zellwachstums ist vermutlich für eine Minimalisierung der für die Zelle schädlichen Auswirkungen von Stress, wie z. B. die Schädigung der Proteine und DNA, von entscheidender Bedeutung. Die Zellen können nur dann proliferieren und differenzieren, wenn die durch den externen Stress ausgelösten makromolekularen Schäden vom Reparatursystem behoben wurden. Wird dagegen das Ausmaß der geschädigten Proteine und/oder DNA zu hoch, können die Zellen ein Programm aktivieren, mit dessen Hilfe sie sich

aus dem Organismus eliminieren (KÜLTZ *et al.*, 1998). Der adaptive Vorteil des gesamten Organismus liegt dabei im Eliminieren und Ersetzen von nicht oder falsch funktionierenden Zellen mit defekten Makromolekülen, die potentiell malignant oder tumorigenisch sind (KÜLTZ *et al.*, 1998). Hypermotabilität und stabile Veränderungen im Phänotyp und Karyotyp als Folge von hyperosmotischem Stress sind beispielsweise in kultivierten Nierenzellen aus Säugern beobachtet worden (UCHIDA *et al.*, 1987).

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Schwämme sind die ältesten mehrzelligen Tiere. Aufgrund ihrer einfachen Organisation eignen sie sich gut zur Erforschung von Signaltransduktionsprozessen. Die Mitglieder der SAPK-Untergruppe der MAPKs stellen von der Hefe bis zum Mensch hoch konservierte zentrale Signalmoleküle dar, die durch eine Vielzahl von Zellstress-auslösenden Stimuli aktiviert werden und in zahlreichen biologischen Prozessen involviert sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels *SAPK1/JNK*- und *SAPK2/p38 MAPK*-spezifischer degenerierter Primer 2 unterschiedliche Klone aus der cDNA-Bibliothek des marinen Schwamms *S. domuncula* isoliert. Northern Blots zeigten, dass ihre Isolierung vollständig erfolgte. Nach der Sequenzierung wurden sie eindeutig als Mitglieder der *SAPK1/JNK*- und *SAPK2/p38 MAPK*-Subfamilie der *MAPKs* identifiziert. In einem Vergleich mit SAPKs aus anderen Metazoen wiesen die abgeleiteten AS-Abfolgen beider Schwamm-Kinasen die höchsten Homologien zu ihren jeweiligen Subfamilienmitgliedern auf. Die geringste Übereinstimmung existierte gegenüber der ebenfalls alignten YSAPK HOG1 aus *S. cerevisiae*. Unter Berücksichtigung der Entstehungstheorie der SAPKs der Metazoen, nach der sich die JNKs und p38 MAPKs aus der einzigen SAPK der Hefe (HOG1) entwickelt haben, dokumentieren diese Ergebnisse, dass die evolutionäre Trennung beider Subfamilien deutlich vor der Entstehung des Stamms Porifera stattgefunden hat. Aufgrund des Alters der Schwämme muss dieser Vorgang mehr als 1 Mrd. Jahre zurückliegen. Dass es sich bei beiden SAPKs des Schwamms um Vorläuferformen der heutzutage in Säugern existierenden SAPK-Isoformen handelt, wurde auch durch den Vergleich mit sämtlichen JNK- und p38-Varianten aus *H. sapiens* deutlich. Studien mit dem p38-spezifischen Inhibitor SB203580 belegten, dass sich die p38 MAPK aus *S. domuncula*, in Analogie zu den humanen Isoformen p38 $\gamma$  und p38 $\delta$ , nicht durch diese Pyridinylimidazolkomponente hemmen lässt. Die bemerkenswert hohe Übereinstimmung hinsichtlich der Intronpositionen in beiden *SAPK*-Genen des Schwamms unterstützt die Hypothese, dass die *JNKs* und *p38 MAPKs* durch Duplikation eines gemeinsamen *HOG1*-verwandten Vorläufergens (*PräSAPK*) entstanden sind. Der Vergleich der Exon/Intron-Struktur mit *SAPK*-Genen aus *D. melanogaster*, *C. elegans* und *H. sapiens* demonstrierte, dass die Intronpositionen dieser Gene während der Evolution hoch konserviert wurden. Eine besonders hohe Übereinstimmung konnte vor allem hinsichtlich der Struktur der humanen *SAPK*-Gene gefunden werden. Die Deuterostomia bevorzugten demgegenüber eher eine Eliminierung der konservierten Intronpositionen. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass das *PräSAPK*-Gen vor seiner Duplikation schon mindestens 10 Introns enthielt. Da das *HOG1*-Gen der Hefe über keine nichtkodierenden Bereiche verfügt, muss die Etablierung dieser Introns im Zeitraum zwischen der Abspaltung der Pilze und der Entstehung der

Schwämme angesiedelt werden. Die Ergebnisse über die Aktivierung der SAPKs durch verschiedene Stressarten belegen, dass sich die primäre Funktion der SAPKs der Schwämme wohl auf eine Vermittlung hyperosmotischer Signale und eine Beantwortung inflammatorischer Ereignisse konzentriert. Versuche mit rekombinanten *HOG1-Δ1*-Nullmutanten demonstrierten, dass beide Schwamm-Kinasen die Funktion des HOG1-Proteins in *S. cerevisiae* vollständig übernehmen können. Dies ist ein weiterer Beweis, dass die JNK- und p38 MAPK-Signaltransduktionswege der Metazoen von der HOG1-Kaskade der Hefe abstammen. Durch Immunfluoreszenzmikroskopie wurde gezeigt, dass die aktivierten SAPKs des Schwamms in Analogie mit HOG1 im Nukleus der Hefezellen akkumuliert werden. Da sich die phosphorylierten Schwamm-Kinasen bezüglich der intrazellulären Lokalisation wie diese YSAPK verhalten, muss der Kerntransport der SAPKs in Hefen und in Metazoen über gleiche oder verwandte Mechanismen erfolgen.

## 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### 7.1 Abkürzungen und Summenformeln des Textes

#### A

Abb.	Abbildung
Acc. Nr.	Zugangsnummer (Accession Number)
ADH	Alkohol Dehydrogenase
AIF	Allograft Inflammationsfaktor
Amp	Ampicillin
AP-1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumperoxidsulfat
<i>Aqua bidest.</i>	zweifach destilliertes Wasser
<i>Aqua dest.</i>	einfach destilliertes Wasser
AR	Aldolase Reduktase
AS	Aminosäure
ASK	Apoptose-Signal-regulierte Kinase
ATF-2	aktivierender Transkriptionsfaktor 2
ATP	Adenosin-5'-triphosphat

#### B

BEM1	Bud Emergence 1
BGT1	Betain/ $\gamma$ -Aminobuttersäure Transporter
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
bZIP	Basic Leucine Zipper Region Protein
bzw.	beziehungsweise

#### C

°C	Grad Celsius
ca.	circa
CBP	CREB-bindendes Protein
<i>C. carpio</i>	<i>Cyprinus Carpio</i>
CD	Cluster of Differentiation
Cdc	Cell division cycle
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
C/EBP	CCAAT Enhancer Binding Protein
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CHOP	C/EBP-homologes Protein
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
cm	Zentimeter
Cot	Colonial temperature-sensitive
CRE	cAMP Responsive Element
CREB	CRE Binding Protein
CRIB	Cdc42/Rac-interaction-binding
CSAID	Cytokin-suppressive antiinflammatorische Wirkstoffe
CSBP	CSAID-bindendes Protein
CTLA-4	cytotoxisches T-Lymphocyten Antigen 4
CTT1	cytosolische Katalase T 1
Cy3	Indocarbocyanin

#### D

DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]Oktan
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol

dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
Daxx	Fas Death Domain assoziiertes Protein
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
ddNTP	Didesoxynucleosid-5'-triphosphat
DDR2	DNA-Damage-Responsive 2
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DIG	Digoxygenin
DJNK	<i>D. melanogaster</i> JNK-Homolog
DJUN	<i>D. melanogaster</i> c-Jun-Homolog
DLK	Dual Leucine Zipper-bearing Kinase
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMF	Dimethylformamid
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic Acid)
dNTP	Desoynucleosid-5'-triphosphat
DPC4	Deleted in Pancreatic Carcinoma, locus 4
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
<b>E</b>	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
eIF4e	eukaryotischer Initiationsfaktor 4e
ERK	Extrazellulär-Signal regulierte Kinase
Ets	E-twenty-six-specific
<b>F</b>	
FADD	Fas-assoziierte Death Domain
Fas	Free alpha-subunit
fl.	flüssig
FPS1	Farnesyl-Diphosphat Synthase 1
<b>G</b>	
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
g	Gramm
GADD	Growth Arrest and DNA Damage Transcription Factor
GCK	Germinal Center Kinase
GCKR	GCK Related
<i>G. gallus</i>	<i>Gallus gallus</i>
GLK	GCK-like Kinase
GPD1	Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase 1
GPP2	Glycerin-3-Phosphatase 2
GPX	Glutathion-Peroxidase
Grb2	Growth factor receptor binding protein 2
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
<b>H</b>	
h	Stunde (hour)
H3	Histonprotein 3
HEP	Human Hepatoblastoma
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His-tag	Histidin gekoppelt (tagged)
HMG-14	Hohe Mobilitätsgruppe 14
HOG	High Osmolarity Glycerol
HPK1	Haematopoietic Progenitor Kinase-1
HRPO	Horse Raddish Peroxidase

<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HSP	Hitzeschockprotein
<b>I</b>	
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
<b>J</b>	
J	Joule
Jak	Janus Kinase
JIP	JNK-Interaktionsprotein
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
<b>K</b>	
Kap.	Kapitel
kB	Kilobasen
kD	Kilodalton
KP	Kaliumphosphat
Krs	Kinase responsive to stress
<b>L</b>	
l	Liter
LB	Luria Bertani-Medium
LBP	LPS-bindendes Protein
LOK	Lymphocyte-oriented Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
LTA4	Leukotrien-A4 Hydrolase
<b>M</b>	
M	Molar
m	Meter
mA	Milliampere
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MAPKAPK	MAPK-aktivierte Protein Kinase
MAPKK (MKK)	MAPK Kinase
MAPKKK (MKKK)	MAPKK Kinase
MAPKKKK	MAPKKK Kinase
MBP	Myelin Basic Protein
MCS	Multiple Klonierungsstelle (Multiple Cloning Site)
MEF-2C	Myocyte-specific Enhancer Binding Factor 2C
MEK	MAPK und ERK Kinase
MEKK	MEK Kinase
mg	Milligramm
min	Minute
Mio.	Millionen
MKP	MAPK Phosphatase
ml	Milliliter
MLK	Mixed Lineages Kinase
mM	Millimolar
mm	Millimeter
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
MNK	MAPK-Signal-Integrations Kinase
MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
MP1	MEK Partner 1
Mrd.	Milliarden
mRNA	messenger RNA
MSK	Mitogen- und Stress-aktivierte PK
MSN	Multicopy suppressors of the snf1 defect

MST	Mammalian Sterile Twenty-like-1
MTK1	MAP Three Kinase 1
MUK	MAPK Upstream Kinase
Mw	Molekulargewicht (Molecular weight)
<i>M. xanthus</i>	<i>Myxococcus xanthus</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
<b>N</b>	
NF-AT4	Nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen 4
NFκB	Nuklearer Faktor κB
ng	Nanogramm
NGF	Nerve Growth Factor
NIK	Nck-interacting Kinase
nm	Nanomolar
Nonidet P40	(Oktylphenoxy)polyethoxyethanol
<b>O</b>	
OA	Okadainsäure (Ocadaic Acid)
OD	Optische Dichte
OLR	Offener Leserahmen
ORE	Osmotic Response Element
Osm <sup>s</sup>	Osmoregulations-defekte Hefemutante
<b>P</b>	
PAC1	Phosphatase of activated T-cells 1
PAK	p21-aktivierte Kinase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PC12	Pheochroma Cytoma 12
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PEG	Polyethylenglycol
PERK	Pflanzen ERK
pg	Picogramm
PH	Plechstrin Homolog
pI	Isoelektrischer Punkt
PK	Protein Kinase
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
pmol	Picomol
PP	Protein Phosphatase
PRAK	p38-regulierte aktivierte Kinase
PTC	Phosphatase two C
PTK	Protein Tyrosin Kinase
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
PVDF	Polyvenyldifluorid
<b>R</b>	
RIP	Rezeptor-Interaktionsprotein
RK	Reactivating Kinase
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
RNase	Ribonuklease
<i>R. norvegicus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
rRNA	Ribosomale RNA
RSK	Ribosomale S6 Kinase
RT	Raumtemperatur
<i>RT</i>	Reverse Transkriptase

**S**

s.	siehe
SAP	SRF-assoziiertes Protein
SAPK	Stress-aktivierte Protein Kinase
SAPKK (SKK)	SAPK Kinase
SB203580	4-(Fluorphenyl)-2-(4-Methylsulfinylphenyl)-5-(4-Pyridyl) Imidazol
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCR	Short Consensus Repeats
<i>S. domuncula</i>	<i>Suberites domuncula</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunden
SEK	SAPK und ERK Kinase
Sgk	Serum- und Glucocorticoid-induzierbare PK
SH	Src-homolog
SHO1	SH3-containing Osmosensor 1
SK	Synthetisches Komplettmedium
SLN1	Synthetic lethal of N-end rule 1
SM	Synthetisches Minimalmedium
SMIT	Na <sup>+</sup> -abhängiger Myo-Inositol Transporter
sog.	sogenannt
SOK1	Ste20-like Oxidant-stress-activated Kinase-1
Sos	Son of sevenless
SPRK1	SH3 domain-containing Proline-Rich Kinase 1
SPS1	Sporulation Specific Protein 1
Src	Cellular homolog of Rous sarcoma virus oncoprotein
SRCR	Scavenger Receptor Cysteine-rich Domain
SRE	Serum Response Element
SRF	Serum Response Factor
SSC	Saline-Sodium-Citrate
SSPE	Saline-Sodium-Phosphate-EDTA
STAT	(JAK)-Signal Transducer and Acitvator of Transcription
STE	Sterile-20
STRE	Stress Response Element

**T**

TAK1	TGFβ-aktivierte Kinase 1
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris-Buffered-Saline)
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
Tm	Schmelz- oder Hybridisierungstemperatur (melting Temperature)
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	TNF Rezeptor
Tpl-2	Tumor progression locus 2
TPS2	Trehalose-Phosphat Phosphatase 2
<i>T. pyriformis</i>	<i>Tetrahymena pyriformis</i>
TRADD	TNFR-assoziierte Death Domain
TRAF	TNFR-assoziiertes Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X 100	T-Oktylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	Poly(oxyethylen)20-sorbitan-monolaurat
TZR	T-Zell-Rezeptor

**U**

U	Einheiten (Units)
u. a.	unter anderem
UE	Untereinheit
UPA	Urokinase-typ Plasminogen Aktivator
upm	Umdrehungen pro Minute
Ura	Uracil
UV	Ultraviolett

**V**

V	Volt
v/v	Volumen per Volumen

**W**

w/v	Gewicht per Volumen (Weight per Volume)
-----	---

**X**

X-Gal	5-Brom-4-chlor-indolyl- $\beta$ -D-galactosid
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>

**Y**

YE <sub>p</sub>	Yeast Episomal plasmids
YEPD	Yeast Extract, Peptone, Dextrose
YERK	Yeast ERK
YPD1	Yeast Phosphorelay Protein 1
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
YSAPK	Yeast SAPK

**Z**

z. B.	zum Beispiel
ZPK	Leucine Zipper PK

## 7.2 Abkürzungskodes für Aminosäuren und Basen

Aminosäure	3er-Code	1er-Code
Alanin	Ala	A
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Arginin	Arg	R
Cystein	Cys	C
Glutamat	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I

Aminosäure	3er-Code	1er-Code
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Base	Buchstabe
Adenin	A
Cytosin	G
Guanin	C
Thymin	T
Uracil	U

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abo, A., Qu, J., Cammarrano, M.S., Dan, C., Fritsch, A., Baud, V., Belisle, B. und Minden, A. (1998).** PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *EMBO J.* **17**: 6527-6540.
- Adler, V., Franklin, C.C. und Kraft, A.S. (1992).** Phorbol esters stimulate the phosphorylation of c-Jun, but not v-Jun: Regulation by the N-terminal delta domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5341-5345.
- Afti, A., Buisine, M., Mazars, A. und Gespach, C. (1997).** Induction of apoptosis by DPC4, a transcriptional factor regulated by transforming growth factor- $\beta$  through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) signalling pathway. *J. Biol. Chem.* **272**: 24731-24734.
- Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J.M. und Prior, B.A. (1994).** GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae* and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 4135-4144.
- Alessi, D.R., Smythe, C. und Keyse, S.M. (1993).** The human CL100 gene encodes a Tyr/Thr phosphatase which potently and specifically inactivates MAP kinase and suppresses its activation by oncogenic Ras in *Xenopus* oocyte extracts. *Oncogene* **8**: 2015-2020.
- Alessi, D.R., Gomez, N., Moorhead, G., Lewis, T., Keyse, S.M. und Cohen, P. (1995).** Inactivation of p42 MAP kinase by protein Phosphatase 2A and a protein tyrosine Phosphatase, but not C1100, in various cell lines. *Curr. Biol.* **5**: 283-295.
- Alex, L.A. und Simon, M.J. (1994).** Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet.* **10**: 133-136.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Alwine, J.C., Kemp, D.J. und Stark, G.R. (1977).** Method for detection of specific RNA's in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5350-5354.
- Angel, P. und Karin, M. (1991).** The role of Jun, Fos, and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochem. Biophys. Acta* **1072**: 129-157.
- Ausubel, F.M., Brent, R. et al. (Eds.) (1987-2000).** Current protocols in molecular biology Vol. 1-3. *Wiley & Sons, Inc., New York.*
- Bairoch, A. (1992).** Prosite: A dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucl. Acids Res.* **20**: 2013-2018.

- Bell, L.M., Leong, M.-L., Kim, B., Wang, E., Park, J., Hemmings, B.A. und Firestone G.L. (2000).** Hyperosmotic stress stimulates promotor activity and regulates cellular utilization of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) by a p38 MAPK-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **275**: 25262-25272.
- Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H.F. und Marshall, C.J. (1998).** Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr. Biol.* **8**: 1049-1057.
- Benson, D.A., Boguski, M.S., Lipman, D.J., Ostell, J., Ouellette, B.F., Rapp, B.A. und Wheeler, D.L. (1999).** GenBank. *Nucl. Acids Res.* **27**: 12-17.
- Berberich, I., Shu, G., Siebelt, F., Woodgett, J.R., Kyriakis, J.M. und Clark, E.A. (1996).** Cross-linking CD40 on B cells preferentially induces stress-activated protein kinases rather than mitogen-activated protein kinases. *EMBO J.* **15**: 92-101.
- Bhat, N. R. und Zhang, P. (1999).** Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen-activated protein kinases in an oligodendrocyte cell line: Role of extracellular signal-regulated kinase in hydrogen peroxide-induced cell death. *J. Neurochem.* **72**: 112-119.
- Bialojan, C. und Takai, A. (1988).** Inhibitory effects of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem. J.* **256**: 283-290.
- Blenis, J. (1993).** Signal transduction via the MAP kinases: Proceed at your own RSK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5889-5892.
- Blumbach, B., Diehl-Seifert, B., Seack, J., Steffen, R., Müller, I.M. und Müller, W.E.G. (1999).** Cloning and expression of new receptors belonging to the immunoglobulin superfamily from the sponge *Geodia cydonium*. *Immunogenetics* **49**: 751-763.
- Bode, J.G., Gatsios, P., Ludwig, S., Rapp, U.R., Häussinger, D., Heinrich, P.C. und Graeve, L. (1999).** The Mitogen-activated protein (MAP) kinase p38 and its upstream activator MAP kinase kinase 6 are involved in the activation of signal transducer and activator of transcription by hyperosmolarity. *J. Biol. Chem.* **274**: 30222-30227.
- Böger, H. (1988).** Versuch über das phylogenetische System der Porifera. *Meyniana* **40**: 143-154.
- Böhm, M., Schröder, H.C., Müller, I.M., Müller, W.-G. und Gamulin, V. (2000).** The mitogen-activated protein kinase p38 pathway is conserved in metazoans: Cloning and activation of p38 of the SAPK2 subfamily from the sponge *Suberites domuncula*. *Biology of the Cell.* **92**: 95-104.
- Böhm, M., Hentschel, U., Friedrich, A., Fieseler, L., Steffen, R., Gamulin, V., Müller, I. und Müller, W.-G. (2001a).** Molecular response of the sponge *Suberites domuncula* to bacterial infection. *Marine Biology* (im Druck).
- Böhm, M., Gamulin, V. und Müller, W.-G. (2001b).** Position of introns in metazoan p38 and JNK genes are highly conserved from sponges to human. (Eingereicht).
- Bohmann, D., Ellis, M.C., Staszewski, L.M. und Mlodzik, M. (1994).** *Drosophila* Jun mediates Ras-dependent photoreceptor determination. *Cell* **78**: 973-986.
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

- Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E. und Gustin, M.C. (1993).** A osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**: 1760-1763.
- Bucher, P., Karplus, K., Moeri, N., und Hofmann, K. (1996).** A flexible motif search technique based on generalized profiles. *Comput. Chem.* **20**: 3-24.
- Buckle, R.S., Barratt, M.J. und Mahadevan, L.C. (1995).** Transcription factor and chromatin protein phosphorylation associated with immediate-early gene induction. In: Protein Phosphorylation in Cell Growth Regulation (Ed.: Clemens, M.J.). *Harwood Academic Publishers*: 135-161.
- Caffrey, D.R., O'Neil, L.-J. und Shields, D.C. (1999).** The evolution of the MAP kinase pathways: Coduplication of interacting proteins leads to new signalling pathways. *J. Mol. Evol.* **49**: 567-582.
- Cahill, M.A., Peter, M.E., Kischkel, F.C., Chinnaiyan, A.M., Dixit, V.M., Krammer, P.H. und Nordheim, A. (1996).** CD95(APO-1/Fas) induces activation of SAP kinases downstream of ICE-like proteases. *Oncogene* **13**: 2087-2096.
- Calvo, C.R., Amsen, D. und Kruisbeek, A.M. (1997).** Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) interferes with extracellular-signal regulated kinase (ERK) and Jun-NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) activation, but does not effect phosphorylation of T cell receptor zeta and ZAP70. *J. Exp. Med.* **186**: 1645-1653.
- Canagarajah, B.J., Khoklatchev, A., Cobb, M.H. und Goldsmith, E.J. (1997).** Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**: 859-869.
- Cano, E., Hazzalin, C.A. und Mahadevan, L.C. (1994).** Anisomycin-activated protein kinases p45 and p55, but not mitogen-activated protein kinases ERK-1 and -2, are implicated in the induction of *c-fos* and *c-jun*. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 7352-7362.
- Casillas, A.M., Amaral, K., Farahani, S. und Nel, A.E. (1993).** Okadaic acid activates p42 mitogen-activated protein kinase (MAP kinase; ERK-2) in B-lymphocytes, but inhibits rather than augments cellular proliferation: Contrast with phorbol 12-myristate 13-acetate. *Biochem. J.* **290**: 545-550.
- Cavalier-Smith, T., Allsopp, M.-P., Chao, E.E., Boury-Esnault, N. und Vacelet, J. (1996).** Sponge phylogeny, animal monophyly, and the origin of the nervous system: 18S rRNA evidence. *Can. J. Zool.* **74**: 2031-2045.
- Cavigelli, M., Dolfi, F., Claret, F.-X. und Karin, M. (1995).** Induction of *c-fos* expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO J.* **14**: 5957-5964.
- Chen, C.Y., Del Gatto-Konczak, F., Wu, Z. und Karin, M. (1998).** Stabilization of interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase pathway. *Science* **280**: 1945-1949.
- Chen, D.-C., Yang, B.-C. und Kuo, T.-T. (1992).** One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr. Genet.* **21**: 83-84.
- Chen, Y.R., Wang, X., Templeton, D., Davis, R.J., Tan, T.H. (1996).** The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J. Biol. Chem.* **271**: 31929-31936.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.

- Chow, C.W., Rincon, M., Cavanagh, J., Dickens, M. und Davis, R.J. (1997).** Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* **278**: 1638-1641.
- Chu, Y.F., Solski, P.A., Khosravifar, R., Der, C.J. und Kelly, K. (1996).** The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificity and reduced activity *in vivo* toward the ERK2 sevenmaker mutation. *J. Biol. Chem.* **271**: 6497-6501.
- Clark, J.M. (1988).** Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucl. Acids Res.* **16**: 9677-9686.
- Clark-Lewis, I., Sanghera, J.S. und Pelech, S.L. (1991).** Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44-mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase. *J. Biol. Chem.* **266**: 15180-15184.
- Clerk, A., Fuller, S.J., Michael, A. und Sugden, P.H. (1998a).** Stimulation of "stress-regulated" mitogen-activated protein kinases (stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases) in perfused rat hearts by oxidative and other stresses. *J. Biol. Chem.* **273**: 7228-7234.
- Clerk, A., Michael, A. und Sugden, P.H. (1998b).** Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes. *Biochem. J.* **333**: 581-589.
- Clifton, A.D., Young, P.R. und Cohen, P. (1996).** A comparison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAP kinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress. *FEBS Letters* **392**: 209-214.
- Cobb, M.H. (1999).** MAP kinase pathways. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **71**: 479-500.
- Cobb, M.H. und Goldsmith, E.J. (1995).** How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* **270**: 14843-14846.
- Cohen, P. (1997).** The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends. Cell. Biol.* **7**: 353-361.
- Cohen, P., Holmes, C.-B. und Tsukitani, Y. (1990).** Okadaic acid: A new probe for the study of cellular regulation. *TIBS* **15**: 98-102.
- Coso, O.A., Chiariello, M., Yu, J.-C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T. und Gutkind, J.S. (1995).** The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signalling pathway. *Cell* **81**: 1137-1146.
- Cozzone, A.J. (1993).** ATP-dependent protein kinases in bacteria. *J. Cell. Biochem.* **51**: 7-13.
- Crawley, J.B., Rawlinson, L., Lali, F.V., Page, T.H., Saklatvala, J. und Foxwell, B.M. (1997).** T cell proliferation in response to interleukin 2 and 7 requires p38 MAP kinase activation. *J. Biol. Chem.* **272**: 15023-15027.
- Creasy, C.L. und Chernoff, J. (1995).** Cloning and characterization of a human protein kinase with homology to Ste20. *J. Biol. Chem.* **270**: 21695-21700.
- Cuenda, A., Alonso, G., Morrice, N., Jones, M., Meier, R., Cohen, P. und Nebreda, A.R. (1996).** Purification and cDNA cloning of SAPKK3, the major activator of RK/p38 in stress and cytokine-stimulated monocytes and epithelial cells. *EMBO J.* **15**: 4156-4164.

- Cuenda, A., Cohen, P., Bueé-Scherrer, V. und Goedert, M. (1997).** Activation of stress-activated protein kinase 3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6): Comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *EMBO J.* **16:** 295-305.
- Dalby, K.N., Morrice, N., Caudwell, F.B., Avruch, J. und Cohen, P. (1998).** Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90(rsk) that are inducible by MAPK. *J. Biol. Chem.* **273:** 1496-1505.
- Da Silva, J., Pierrat, B., Mary, J.L., und Lesslauer, W. (1997).** Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes. *J. Biol. Chem.* **272:** 28373-28380.
- Davenport, K.R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D.E. und Gustin, M.C. (1995).** A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. *J. Biol. Chem.* **270:** 30157-30161.
- Davis, R.J. (1993).** The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **268:** 14553-14556.
- Davis, R.J. (1994).** MAP kinases: New JNK expands the group. *Trends Biochem. Sci.* **19:** 470-473.
- Davis, R.J. (1999).** Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochem. Soc. Symp.* **64:** 1-12.
- Deak, M., Clifton, A.D., Lucocq, J.M. und Alessi, D.R. (1998).** Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38 and may itself mediate activation of CREB. *EMBO J.* **17:** 4426-4441.
- Dérillard, B., Hibi, M., Wu, I.-H., Barret, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. und 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.
- Dérillard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J., Ulevitch, R.J. und Davis, R.J. (1995).** Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* **267:** 682-685.
- Dickens, M., Rogers, J.S., Cavanagh, J. (1997).** A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science* **277:** 693-696.
- Elion, E.A. (1995).** Ste5: A meeting place for MAP Kinases and their associates. *Trends Cell. Biol.* **5:** 322-327.
- Elion, E.A. (1998).** Routing MAP kinase cascades. *Science* **281:** 1625-1626.
- Engel, K., Ahlers, A., Brach, M.A., Herrmann, F und Gaestel, M. (1995a).** MAPKAP kinase 2 is activated by heat shock and TNF-alpha: *In vivo* phosphorylation of small heat shock protein results from stimulation of the MAP kinase cascade. *J. Biol. Chem.* **270:** 321-330.
- Engel, K., Schultz, H., Martin, F., Kotlyarov, A., Plath, K., Hahn, M., Heinenmann, U. und Gaestel, M. (1995b).** Constitutive activation of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 by mutation of phosphorylation sites and an A-helix motif. *J. Biol. Chem.* **270:** 27213-27221.
- Engel, K., Kotlyarov, A. und Gaestel, M. (1998).** Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation. *EMBO J.* **17:** 3363-3371.

- Englaro, W., Dérillard, B., Ortonne, J.P. und Ballotti, R. (1998).** Solar ultraviolet light activates extracellular signal-regulated kinases and the ternary complex factor in human normal keratinocytes. *Oncogene* **16**: 661-664.
- Engler, M.J. und Zimmermann, S.B. (1982).** DNA ligases. In: The Enzymes Vol 15B (Ed.: Boyer, P.D.). *Academic Press, NewYork*: 3-30.
- Erikson, E. und Maller, J.L. (1986).** Purification and characterization of a protein-kinase from *Xenopus* eggs highly specific for ribosomal-protein S6. *J. Biol. Chem.* **261**: 350-355.
- Eyers, P.A., Craxton, M., Morrice, N., Cohen, P. und Goedert, M. (1998).** Conversion of SB203580-insensitive MAP kinase family members to drug-sensitive forms by a single amino-acid substitution. *Chem. Biol.* **5**: 321-328.
- Fanger, G.R., Gerwins, P., Widmann, C., Jarpe, M.B. und Johnson, G.L. (1997a).** MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and Tpls: Upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**: 67-74.
- Fanger, G.R., Johnson, N.L. und Johnson, G.L. (1997b).** MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42. *EMBO J.* **16**: 4961-4972.
- Faris, M., Kokot, N., Lee, L. und Nel, A.E. (1996).** Regulation of interleukin-2 transcription by inducible stable expression of dominant negative and dominant active mitogen-activated protein kinase kinase kinase in jurkat T cells. Evidence for the importance of Ras in a pathway that is controlled by dual receptor stimulation. *J. Biol. Chem.* **271**: 27366-27373.
- Feng, Y., Song, L.Y., Kincaid, E., Hahanty, S.K. und Elion, E.A. (1998).** Functional binding between Gbeta and the LIm domain of Ste5 is required to activate the MEKK Ste11. *Curr. Biol.* **8**: 267-278.
- Fenton, M.J. und Golenbock, D.T. (1998).** LPS-binding proteins and receptors. *J. Leuk. Biol.* **64**: 25-32.
- Freshney, N.W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J. und Saklatvala, J. (1994).** Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* **78**: 1039-1049.
- Friesen, H., Lunz, R., Doyle, S. und Segall, J. (1994).** Mutation of the SPS1-encoded protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to defects in transcription and morphology during spore formation. *Genes Dev.* **8**: 2162-2175.
- Fuchs, S.Y., Dolan, L., Davis, R.J. und Ronai, Z. (1996).** Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N-kinase. *Oncogene* **13**: 1531-1535.
- Fujiki, H., Suganuma, M., Komori, A., Yatsunami, J., Okabe, S., Ohta, T. und Sueoka, E. (1994).** A new tumor promotion pathway and its inhibitors. *Cancer Detection and Prevention* **18**: 1-7.
- Fukada, M., Goth, I., Gotoh, Y. und Nishida, E. (1996).** Cytoplasmic localisation of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH<sub>2</sub>-terminal, Leucin-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear transport signal. *J. Biol. Chem.* **271**: 20024-20028.
- Fukunaga, R. und Hunter, T. (1997).** MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J.* **16**: 1921-1933.

- Gabai, V.L., Merini, A.B., Mosser, D.D., Caron, A.W., Rits, S., Shifrin, V.I. und Sherman, M.Y. (1997).** Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J. Biol. Chem.* **272**: 18033-18037.
- Gaits, F., Degols, D., Shiozaki, K. und Russel, P. (1998).** Phosphorylation and association with the transcription factor Atf1 regulate localization of Spc1/Sty1 stress-activated kinase in fission yeast. *Genes Dev.* **12**: 1464-1473.
- Galcheva-Gargova, Z., Dérijard, B., Wu, I.-H. und Davis, R.J. (1994).** An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science* **265**: 806-808.
- Galyov, E.E., Hakansson, S., Forsberg, A. und Wolf-Watz, H. (1993).** A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* **361**: 730-732.
- Gamulin, V., Skorokhod, A., Kavsan, V., Müller, I.M. und Müller, W.-G. (1997).** Experimental indication against blockwise evolution of metazoan protein molecules: Example, receptor tyrosine kinase gene from the sponge *Geodia cydonium*. *J. Mol. Evol.* **44**: 242-252.
- Gamulin, V., Müller, I.M. und Müller, W.-G. (2000).** Sponge proteins are more similar to those of *Homo sapiens* than to *Caenorhabditis elegans*. *Biol. J. Linnean Soc.* (im Druck).
- Ganiatsas, S., Kwee, L., Fujiwara, Y., Perkins, A., Ikeda, T., Labow, M.A. und Zon, L.I. (1998).** SEK1 deficiency reveals mitogen-activated protein kinase cascade crossregulation and leads to abnormal hepatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6881-6886.
- Garrington, T.P. und Johnson, G.L. (1999).** Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signalling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 211-218.
- Gerwins, P., Blank, J.L. und Johnson, G.L. (1997).** Cloning of a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MEKK4, that selectively regulates the c-Jun amino terminal kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **272**: 8288-8295.
- Gille, H., Strahl, T. und Shaw, P.E. (1995).** Activation of ternary complex factor Elk-1 by stress-activated protein kinases. *Curr. Biol.* **5**: 1191-1200.
- Glise, B., Bourbon, H. und Noselli, S. (1995).** Hemipterous encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell* **83**: 451-461.
- Goedert, M., Cuenda, A., Craxton, M., Jakes, R. und Cohen, P. (1997).** Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stress is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *EMBO J.* **16**: 3563-3571.
- Goillot, E., Raingeaud, J., Ranger, A., Tepper, R.I., Davis, R.J., Harlow, E. und Sanchez, I. (1997).** Mitogen-activated protein kinase-mediated Fas apoptotic signalling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 3302-3307.
- Gomez, N. und Cohen, P. (1991).** Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. *Nature* **353**: 170-173.
- Gorner, W., Durschlag, E., Martinez-Pastor, M.T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H. und Schüller, C. (1998).** Nuclear localisation of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.* **12**: 586-597.

- Gragg, G.M., Newman, D.J. und Snader, K.M. (1997).** Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.* **60**: 52-60.
- Guan, K.L. und Dixon, J.E. (1993).** Bacterial and viral protein tyrosine phosphatases. *Seminars Cell Biol.* **4**: 389-396.
- Guan, K.L., Deschenes, R.J. und Dixon, J.E. (1992).** Isolation and characterization of a second protein tyrosine phosphatase gene, *PTP2*, from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **267**: 10024-10030.
- Guay, J., Lambert, H., Gingras-Breton, G., Lavoie, J.N., Huot, J. und Landry, J. (1997).** Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J. Cell. Sci.* **110**: 357-368.
- Gum, R.J., McLaughlin, M.M., Kumar, S., Wang, Z., Bower, M.J. und Lee, J.C. (1998).** Acquisition of sensitivity of stress-activated protein kinases to the p38 inhibitor, SB203580, by alteration of one and more amino acids within the ATP binding pocket. *J. Biol. Chem.* **273**: 15605-15610.
- Gupta, S., Campbell, D., Dérillard, B. und Davis, R.J. (1995).** Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* **267**: 389-393.
- Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Sluss, H.K., Dérillard, B. und Davis, R.J. (1996).** Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* **15**: 2760-2770.
- Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M. und Davenport, K. (1998).** MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. and Molecular Biol. Rev.* **62**: 1264-1300.
- Guthrie, C. und Fink, G.R. (Eds.) (1991).** Guide to yeast genetics and molecular biology. In: Methods in Enzymology Vol. 194 (Eds.: Abelson, J.N. und Simon, M.I.). *Academic Press, San Diego*.
- Hale, K.K., Trollinger, D., Rihaneck, M. und Manthey, C.L. (1999).** Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$  in inflammatory cell lineages. *J. Immunol.* **162**: 4246-4252.
- Hambleton, J., Weinstein, S.L., Lem, L. und DeFranco, A.L. (1996).** Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 2774-2778.
- Hamuguchi, K. und Geiduschek, E.P. (1962).** The effect of electrolytes on the stability of desoxyribonucleate helix. *JACS* **84**: 1329-1337.
- Han, J., Lee, J.-D., Bibbs, L. und Ulevitch, R.J. (1994).** A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**: 808-811.
- Han, J., Lee, J.-D., Jiang, Y., Li, Z., Feng, L. und Ulevitch, R.J. (1996).** Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J. Biol. Chem.* **271**: 2886-2891.
- Han, J., Jiang, Y., Li, Z., Kravchenko, V.V. und Ulevitch, R.J. (1997).** Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* **386**: 296-299.
- Han, S.-J., Choi, K.-Y., Brey, P.T. und Lee, W.-J. (1998).** Molecular cloning and characterization of a *Drosophila* p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273**: 369-374.

- Han, Z.S., Enslin, H., Hu, X., Meng, X., Wu, I.H., Barrett, T., Davis, R.J. und Ip, Y.T. (1998).** A conserved p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulates *Drosophila* immunity gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 3527-3539.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hanks, S.K. und Hunter, T. (1995).** The eukaryotic protein kinase superfamily. In: The protein kinase Factsbook (Eds.: Hardie, G. und Hanks, S.K.). *Academic Press, London*: 7-48.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. und Hunter, T. (1988).** The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**: 42-52.
- Hardie, D.G. (1995).** Cellular functions of protein kinases. In: The protein kinase Factsbook (Eds.: Hardie, G. und Hanks, S.K.). *Academic Press, London*: 48-58.
- Hartig, A. und Ruis, H. (1986).** Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene and deduced amino-acid sequence of yeast *catalase T*. *Eur. J. Biochem.* **160**: 487-490.
- Haystead, T.-J., Sim, A.-R., Carling, D., Honnor, R.C., Tsukitani, Y., Cohen, P. und Hardie, D.G. (1989).** Effects of the tumor promotor okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature* **337**: 78-81.
- Hazzalin, C.A., Cuenda, A., Cano, E., Cohen, P. und Mahadevan, L.C. (1997).** Effects of the inhibition of p38/RK MAP kinase on induction of five *fos* and *jun* genes by diverse stimuli. *Oncogene* **15**: 2321-2331.
- Herlaar, E. und Brown, Z. (1999).** p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol. Med. Today* **5**: 439-447.
- Herskowitz, I. (1995).** MAP kinase pathways in yeast: For mating and more. *Cell* **80**: 187-197.
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. und Karin, M. (1993).** Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that bind and potentiate the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* **7**: 2135-2148.
- Hinnen, A., Hicks, J.B. und Fink, G.R. (1978).** Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 1929-1933.
- Hirsch, D.D. und Storck, P.J. (1997).** Mitogen-activated protein kinases phosphatases inactivate stress-activated protein kinase pathway *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **272**: 4568-4575.
- Hoffmeyer, A., Avots, A., Flory, E., Weber, C.K., Serfting, E. und Rapp, U.R. (1998).** The GABP-responsive element of the interleukin-2 enhancer is regulated by JNK/SAPK-activating pathways in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **273**: 10112-10119.
- Honkanen, R.E., Zwiller, J., Daily, S.L., Khatra, B.S., Dukelow, M. und Boynton, A.L., (1991).** Identification, purification, and characterization of a novel serine/threonine protein phosphatase from bovine brain. *J. Biol. Chem.* **266**: 6614-6619.
- Hu, H.M., O'Rourke, K., Boguski, M.S. und Dixi, V.M. (1994).** A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40. *J. Biol. Chem.* **269**: 30069-30072.

- Hu, M.-T., Qiu, W.R., Wang, X., Meyer, C.F. und Tan, T.-S. (1996).** Human HPK1, a novel human hematopoietic progenitor kinase that activates the JNK/SAPK kinase cascade. *Genes Dev.* **10**: 2251-2264.
- Hu, M.-T., Qiu, W.R. und Yang, Y.P. (1997).** JNK1, JNK2, and JNK3 are p53 N-terminal serine 34 kinases. *Oncogene* **15**: 2277-2287.
- Hunter, T. (1987).** A thousand and one protein kinases. *Cell* **50**: 823-829.
- Ichijo, H. (1999).** From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* **18**: 6087-6093.
- Ip, Y.T. und Davis, R.J., (1998).** Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) – from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **10**: 205-219.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. und Kimura, A. (1983).** Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology* **153**: 163-168.
- Jacoby, T., Flanagan, H., Faykin, A., Seto, A.G., Mattison, C. und Ota, I. (1997).** Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1. *J. Biol. Chem.* **272**: 17749-17755.
- James, P., Hall, B.D., Whelen, S. und Craig, E.A. (1992).** Multiple protein tyrosine phosphatase-encoding genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **122**: 101-110.
- Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, A., Lin, S. und Han, J. (1996).** Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38 $\beta$ ). *J. Biol. Chem.* **271**: 17920-17926.
- Johnson, L.N., Noble, M.-M. und Owen, D.J. (1996).** Active and inactive protein kinases: Structural basis for regulation. *Cell* **85**: 149-158.
- Juo, P., Kuo, C.J., Reynolds, S.E., Konz, R.F., Raingeaud, J., Davis, R.J., Biemann, H.P. und Blenis, J. (1997).** Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 24-35.
- Kallunki, T., Su, B., Tsigelny, I., Sluss, H.K., Dérjard, B., Moore, G., Davis, R.J. und Karin, M. (1994).** JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev.* **8**: 2996-3007.
- Kästner, A. (1993).** Lehrbuch der speziellen Zoologie. Band I: Wirbellose Tiere (Hrsg.: Gruner, H.-E.): 1. Teil: Einführung Protozoa, Placozoa, Porifera. *Gustav Fischer Verlag, Jena*, 5. Aufl., 251-297.
- Kawasaki, H., Morooka, T., Shimohama, S., Kimura, J., Hirano, T., Gotoh, Y. und Nishida, E. (1997).** Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 18518-18521.
- Kawasaki, M., Hisamoto, N., Iino, Y., Yamamoto, M., Ninomiya-Tsuji, J. und Matsumoto, K. (1999).** A *Caenorhabditis elegans* JNK signal transduction pathway regulates coordinated movement via type-D GABAergic motor neurons. *EMBO J.* **18**: 3604-3615.
- Khokhlatchev, A.V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E. und Cobb, M.H. (1998).** Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its heterodimerization and nuclear translocation. *Cell* **93**: 605-615.

- Kiefer, F., Tibbles, L.A., Anafi, M., Janssen, A., Zanke, B.W., Lassam, N., Pawson, T., Woodgett, J.R. und Iscove, N.N. (1996).** HPK1, a hematopoietic protein kinase activating the SAPK/JNK pathway. *EMBO J.* **15**: 7013-7025.
- Kim, R.D., Darling, C.E., Cerwenka, H. und Chari, R.S. (2000).** Hypoosmotic stress activates p38, ERK1 and 2, and SAPK/JNK in rat hepatocytes. *J. Surg. Res.* **90**: 58-66.
- Knaus, U.G., Morris, S., Dong, H.J., Chernoff, J. und Bokoch, G.M. (1995).** Regulation of human leukocyte p21-activated kinases through G protein-coupled receptors. *Science* **269**: 221-223.
- Kobayashi, N. und McEntee, K. (1990).** Evidence for a heat shock transcription factor-independent mechanism for heat shock induction of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6550-6554.
- Kockel, L., Zeitlinger, J., Staszewski, L.M., Mlodzik, M. und Bohmann, D. (1997).** Jun in *Drosophila* development: Redundant and nonredundant functions and regulation by two MAPK signal transduction pathways. *Genes Dev.* **11**: 1748-1758.
- Kozak, M. (1991).** Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* **266**: 19867-19870.
- Kramer, R.M., Roberts, E.F., Um, S.L., Borsch-Haubold, A.G., Watson, S.P., Fisher, M.J. und Jakubowski, J.A. (1996).** p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *J. Biol. Chem.* **271**: 27723-27729.
- Kruse, M., Gamulin, V., Cetkovic, H., Pancer, Z., Müller, I.M. und Müller, W.-G. (1996).** Molecular evolution of the metazoan protein kinase C multigene family. *J. Mol. Evol.* **43**: 374-383.
- Kruse, M., Müller, I.M. und Müller, W.-G. (1997).** Early evolution of metazoan serine/threonine and tyrosine kinases: Identification of selected kinases in marine sponges. *Mol. Biol. Evol.* **14**: 1326-1334.
- Kruse, M., Leys, S.P., Müller, I.M. und Müller, W.-G. (1998).** Phylogenetic position of the Hexactinellida within the phylum Porifera based on amino acid sequence of the protein kinase C from *Rhabdocalytus dawsoni*. *J. Mol. Evol.* **46**: 721-728.
- Kruse, M., Steffen, R., Batel, R., Müller, I.M. und Müller, W.-G. (1999).** Differential expression of allograft inflammatory factor 1 and of glutathione peroxidase during auto- and allograft response in marine sponges. *J. Cell. Sci.* **112**: 4305-4313.
- Kültz, D. (1998).** Phylogenetic and functional classification of mitogen- and stress-activated protein kinases. *J. Mol. Evol.* **46**: 571-588.
- Kültz, D. und Burg, M. (1998).** Evolution of osmotic stress signalling via MAP kinase cascades. *J. Exp. Biol.* **201**: 3015-3021.
- Kültz, D., Garcia-Perez, A., Ferraris, J.D. und Burg, M. (1997).** Distinct regulation of osmoprotective genes in yeast and mammals. *J. Biol. Chem.* **272**: 13165-13170.
- Kültz, D., Madhany, S. und Burg, M. (1998).** Hyperosmolarity causes growth arrest of murine kidney cells: induction of GADD45 and GADD153 by osmosensing via stress-activated protein kinase 2. *J. Biol. Chem.* **273**: 13645-13651.

- Kumar, S. und Rzhetsky, A. (1996).** Evolutionary relationships of eukaryotic kingdoms. *J. Mol. Evol.* **42**: 183-193
- Kumar, S., McLaughlin, M.M., McDonnell, P.C., Lee, J.C., Livi, G.P. und Young, P.R. (1995).** Human mitogen-activated protein kinase CSBP1, but not CSBP2, complements a *hog1* deletion in yeast. *J. Biol. Chem.* **270**: 29043-29046.
- Kumar, S., McDonnell, P.C., Gum, R.J., Hand, A.T., Lee, J.C. und Young, P.R. (1997).** Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: Activation, substrate specificity, and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**: 533-538.
- Kyriakis, J.M. (1999).** Making the connection: Coupling of stress-activated ERK/MAPK (extracellular-signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase) core signalling modules to extracellular stimuli and biological response. *Biochem. Soc. Symp.* **64**: 29-48.
- Kyriakis, J.M. und Avruch, J. (1996).** Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays* **18**: 567-577.
- Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J. und Woodgett, J.R. (1994).** The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**: 156-160.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lavoie, J.N., Lambert, H., Hickey, E., Weber, L.A. und Landry, J. (1995).** Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 505-516.
- Lechner, C., Zahalka, M.A., Giot, J.-F., Moller, N.P. und Ullrich, A. (1996).** ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 4355-4359.
- Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., Strickler, J.E., McLaughlin, M.M., Siemens, I.R., Fisher, S.M., Livi, G.P., White, J.R., Adams, J.L. und Young, P.R. (1994).** A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **372**: 739-746.
- Leeuw, T., Fourest-Lieuvin, A., Wu, C., Chenevert, J., Clark, K., Whiteaway, M. und Thomas, D.Y. (1995).** Pheromone response in yeast: Association of Bem1p with proteins of the MAP kinase cascade and actin. *Science* **270**: 1210-1213.
- Leeuw, T., Wu, C., Schrag, J.D., Whiteaway, M., Thomas, D.Y. und Leberer, E. (1998).** Interaction of a G-protein beta-subunit with a conserved sequence in Ste20/PAK family protein kinases. *Nature* **391**: 191-195.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. und Boedtke, H. (1977).** RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions: A critical reexamination. *Biochemistry* **16**: 4743-4751.
- Lenormand, P., Sardet, C., Pages, G., L'Allemain, G., Brunet, A. und Pouyssegur, J. (1993).** Growth factor induce nuclear translocation of MAP kinase (p42mapk), but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk), in fibroblasts. *J. Cell. Biol.* **122**: 1079-1088.

- Lenormand, P., Brondello, J.M., Brunet, A. und Pouyssegur, J. (1998).** Growth factor-induced p42/p44 MAPK nuclear translocation and retention requires both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins. *J. Cell. Biol.* **142**: 625-633.
- Leonard, N.J., McDonald, J.J. und Reichmann, M.E. (1970).** Reaction of diethyl pyrocarbonate with nucleic acid components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **67**: 93.
- Leppä, S. und Bohmann, D. (1999).** Diverse functions of JNK signalling and c-Jun in stress response and apoptosis. *Oncogene* **18**: 6158-6162.
- Lewis, T.S., Sharpio, P.S. und Ahn, N.G. (1998).** Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* **74**: 49-139.
- Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R.J. und Han, J. (1996).** The primary structure of p38 gamma: A new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228**: 334-340.
- Lin, A., Minden, A., Martinetto, H., Claret, F.X., Lange-Carter, C., Mercurio, F., Johnson, G.L. und Karin, M. (1995).** Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* **268**: 286-290.
- Livingstone, C., Patel, G. und Jones, N. (1995).** ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J.* **14**: 1785-1797.
- Lu, J., Park, H., Liu, A.-C. und Chen, K.Y. (2000).** Activation of heat shock factor 1 by hyperosmotic or hypoosmotic stress is drastically attenuated in normal human fibroblasts during senescence. *J. Cell. Physiol.* **184**: 183-190.
- Ludwig, S., Engel, K., Hoffmeyer, A., Sithandandam, G., Neufeld, B., Palm, D., Gaestel, M. und Rapp, U.R. (1996).** 3pK, a novel mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase, is targeted by three MAP kinase pathways. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 6687-6697.
- Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W.F., Prior, B.A., Ramos, J., Theyelein, J.M. und Hohmann, S. (1995).** Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J.* **14**: 1360-1371.
- Lyons, D.M., Mahanty, S.K., Choi, K.Y., Manandhar, M. und Elion, E.A. (1996).** The SH3-domain protein Bem1 coordinates mitogen-activated protein kinase cascade activation with cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 4095-4106.
- Madhani, H.D. und Fink, G.R. (1997).** Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signalling. *Science*. **275**: 1314-1317.
- Maeda, T., Tsai, A.Y. und Saito, H. (1993).** Mutations in a protein tyrosine phosphatase gene (*PTP2*) and a protein serine/threonine phosphatase gene (*PTCI*) cause a synthetic growth defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 5408-5417.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M. und Saito, H. (1994).** A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**: 242-243.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M. und Saito, H. (1995).** Activation of yeast *PBS2P* MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* **269**: 554-556.
- Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z.S. und Lim, L. (1994).** A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* **367**: 40-46.

- Martell, K.J., Seasholtz, A.F., Kwak, S.P., Clemens, K.K. und Dixon, J.E. (1995).** HVH-5: A protein tyrosine Phosphatase abundant in brain that inactivates mitogen-activated protein kinase. *J. Neurochem.* **65**: 1823-1833.
- Martinez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. und Estruch, F. (1996).** The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* **15**: 2227-2235.
- Matsuda, S., Moriguchi, T., Koyasu, S. und Nishida, E. (1998).** T lymphocyte activation signals for interleukin-2 production involve activation of MKK6-p38 and MKK7-SAPK/JNK signalling pathways sensitive to cyclosporin A. *J. Biol. Chem.* **273**: 12378-12382.
- McDonnell, M.W. und Studier, F.W. (1977).** Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J. Mol. Biol.* **110**: 119-146.
- McLaughlin, M.M., Kumar, S., McDonnell, P.C., VanHorn, S., Lee, J.C., Livi, G.P. und Young, P.R. (1996).** Identification of a mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* **271**: 8488-8492.
- Mehl, D. und Reiswig, H.M. (1991).** The presence of flagellar vanes in choanomers of Porifera and their possible phylogenetic implications. *Z. zool. Syst. Evolut.-forsch.* **29**: 312-319.
- Mehl, D., Müller, I.M. und Müller, W.-G. (1998).** Molecular biological and palaeontological evidence that Eumetazoa including Porifera (sponges) are of monophyletic origin. In: Watanabe, Y. Fusetani, N. (Eds.), *Sponge Science - Multidisciplinary Perspectives*. Springer, Tokyo: 152-165.
- Meikle, A.J., Reed, R.H., Gadd, G.M. (1988).** Osmotic adjustment and the accumulation of organic solutes in whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 3049-3060.
- Meilhoc, E., Masson, J.-M. und Teissié, J. (1990).** High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses. *Biotechnology, New York* **8**: 223-227.
- Milne, D.M., Campbell, L.E., Campbell, D.G. und Meek, D.W. (1995).** p53 is phosphorylated *in vitro* and *in vivo* by an ultraviolet radiation-induced protein kinase characteristic of the c-Jun kinase, JNK1. *J. Biol. Chem.* **270**: 5511-5518.
- Minden, A., Lin, A., Claret, F.-X., Abo, A., und Karin, M. (1995).** Selective activation of the JNK signalling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* **81**: 1147-1157.
- Ming, X.F., Kaiser, M. und 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.
- Miralles, F., Parra, M., Caelles, C., Nagamine, Y., Felez, J. und Munoz-Canoves, P. (1998).** UV irradiation induces the murine urokinase-type plasminogen activator gene via the c-Jun N-terminal kinase signalling pathway: Requirement of an AP1 enhancer element. *Mol. Cell Biol.* **18**: 4537-4547.
- Moore, K.J., Andersson, L.P., Ingalls, R.R., Monks, B.G., Li, R., Arnaout, M.A., Golenbock, D.T. und Freeman, M.W. (2000).** Divergent responses to LPS and bacteria in CD14-deficient murine macrophages. *J. Immunol.* **165**: 4272-4280.

- Moriguchi, T., Kuroyanagi, N., Yamaguchi, K., Gotoh, Y., Irie, K., Kano, T., Shirakabe, K., Muro, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., Nishida, E. und Hagiwara, M. (1996a).** A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J. Biol. Chem.* **271**: 13675-13679.
- Moriguchi, T., Toyoshima, F., Gotoh, Y., Iwamatsu, A., Irie, K., Mori, E., Kuroyanagi, N., Hagiwara, M., Matsumoto, K. und Nishida, E. (1996b).** Purification and identification of a major activator for p38 from osmotically shocked cells. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase 6 by osmotic shock, tumor necrosis factor-alpha, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* **271**: 26981-26988.
- Moriguchi, T., Toyoshima, F., Masayuma, N., Hanafusa, H., Gotoh, Y. und Nishida, E. (1997).** A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNFalpha and cellular stresses. *EMBO J.* **16**: 7045-7053.
- Muda, M., Theodosiou, A., Rodrigues, N., Boschert, U., Camps, M., Gillieron, C., Davies, K., Asworth, A. und Arkinstall, S. (1996).** The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **271**: 27205-27208.
- Muda, M., Boschert, U., Smith, A., Antonsson, B., Gillieron, C., Chabert, C., Camps, M., Martinou, I., Asworth, A. und Arkinstall, S. (1997).** Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4. *J. Biol. Chem.* **272**: 5141-5151.
- Müller, W.-G. (1995).** Molecular phylogeny of Metazoa (Animals): Monophyletic origin. *Naturwissenschaften* **82**: 321-329.
- Müller, W.-G. (1998).** Origin of Metazoa: Sponges as living fossils. *Naturwissenschaften* **85**: 11-25.
- Müller, W.-G. und Schäcke, H. (1996).** Characterization of the receptor protein-tyrosine kinase gene from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Prog. Molec. Subcell. Biol.* **17**: 183-208.
- Müller, W.-G., Blumbach, B. und Müller, I.M. (1999).** Evolution of the innate and adaptive immune system: Relationships between potential immune molecules in the lowest metazoan phylum (Porifera) and those in vertebrates. *Transplantation* **68**: 1215-1227.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G.T. und Ehrlich, H.A. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- Munoz-Dorado, J., Inouye, S., und Inouye, M. (1991).** A gene encoding a proteine serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell* **67**: 995-1006.
- Munoz-Dorado, J., Inouye, S., und Inouye, M. (1993).** Eukaryotic-like protein serine/threonine kinases in *Myxococcus xanthus*, a developmental bacterium exhibiting social behaviour. *J. Cell. Biochem.* **51**: 29-33.
- Musti, A.M., Treier, M. und Bohmann, D. (1997).** Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science* **275**: 400-402.
- Nadkarni, V., Gabbay, K.H., Bohren, K.M. und Sheikh-Hamad, D. (1999).** Osmotic response element enhancer activity. *J. Biol. Chem.* **274**: 20185-20190.

- Nagata, K., Puls, A., Futter, C., Aspenstrom, P., Schaefer, E., Nakata, T., Hirokawa, N. und Hall, A. (1998).** The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor KIF3. *EMBO J.* **17**: 149-158.
- Nakajima, T., Fukamizu, A., Takahashi, J., Gage, F.H., Fisher, T., Blenis, J. und Montminy, M.R. (1996).** The signal-dependent coactivator CBP is a nuclear target for pp90RSK. *Cell* **86**: 465-474.
- Nakashima, S., Wang, S., Hisamoto, N., Sakai, H., Andoh, M., Matsumoto, K. und Nozawa, Y. (1999).** Molecular cloning and expression of a stress-responsive Mitogen-activated protein kinase from *Tetrahymena* cells. *J. Biol. Chem.* **274**: 9976-9983.
- New, L., Jiang, Y., Zhao, M., Liu, K., Zhu, W., Flood, L.J., Kato, Y., Parry, G.-N. und Han, J.H. (1998).** PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *EMBO J.* **17**: 3372-3384.
- Ni, M., Tepperman, J.M. und Quail, P.H. (1998).** PIF3, a phytochrome interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* **95**: 657-667.
- Nicholas, K.B., Nicholas H.B. und Deerfield, D.W. II. (1997).** GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW.NEWS* **4**: 14.
- Nishida, E. und Gotoh, Y. (1993).** The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *TIBS* **18**: 128-131.
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y. und Sugino, Y. (1990).** A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucl. Acids Res.* **18**: 6169.
- Nishina, H., Fischer, K.D., Radvanyi, L., Shahinian, A., Hakem, R., Rubie, E.A., Bernstein, A., Mak, T.W., Woodgett, J.R. und Penninger, J.M. (1997).** Stress-signalling kinase Sek1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3. *Nature* **385**: 350-353.
- Norbeck, J., Pahlman, A.K., Akhtar, N., Blomberg, A. und Adler, L. (1996).** Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the corresponding *GPPI* and *GPP2* genes and evidence for osmotic regulation of Gpp2p expression by the osmosensing mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **271**: 13875-13881.
- Ono, K. und Han, J. (2000).** The p38 signal transduction pathway: Activation and function. *Cell. Signalling* **12**: 1-13.
- Ota, I.M. und Varshavsky, A. (1992).** A gene encoding a putative tyrosine phosphatase suppresses lethality of an N-end rule-dependent mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2355-2359.
- Pahler, S., Blumbach, B., Müller, I.M. und Müller, W.-G. (1998).** A putative multiadhesive basal lamina protein from the marine sponge *Geodia cydonium*: Cloning of the cDNA encoding a fibronectin-, an SRCR- as well as a complement control protein module. *J. Exp. Zool.* **282**: 332-343.
- Pancer, Z., Kruse, M., Müller, I.M. und Müller, W.-G. (1997a).** On the origin of the adhesion receptors of metazoa: Cloning of the integrin  $\alpha$  subunit cDNA from the sponge *Geodia cydonium*. *Mol. Biol. Evol.* **14**: 391-398.

- Pancer, Z., Münkner, J., Müller, I.M. und Müller, W.-G. (1997b).** A novel member of an ancient superfamily: Sponge (*Geodia cydonium*, Porifera) putative protein that features scavenger receptor cysteine-rich repeats. *Gene* **193**: 211-218.
- Parrott, L.A. und Templeton, D.J. (1999).** Osmotic stress inhibits p70/85 S6 kinase through activation of a protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* **274**: 24731-24736.
- Pearson, W.R. und Lipman, D.J. (1988).** Improved Tools for Biological Sequence Analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2444-2448.
- Pelech, S.L. und Sanghera, J.S. (1992).** Mitogen-activated protein kinases: Versatile transducers for cell signalling. *TIBS* **17**: 233-238.
- Petko, L. und Lindquist, S. (1986).** Hsp26 is not required for growth at high temperatures, nor for thermotolerance, spore development, or germination. *Cell* **45**: 885-894.
- Peverali, F.A., Isaksson, A., Papavassiliou, A.G., Staszewski, L.M., Mlodzik, M. und Bohmann, D. (1996).** Phosphorylation of *Drosophila* Jun by the MAP kinase rolled regulates photoreceptor differentiation. *EMBO J.* **15**: 3943-3950.
- Pfeifer, K., Haasemann, M., Gamulin, V., Bretting, H., Fahrenholz, F. und Müller, W.-G. (1993).** S-type lectins occur also in invertebrates: High conservation of the carbohydrate recognition domain in the lectin genes from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Glycobiol.* **3**: 179-184.
- Pierrat, B., Correia, J.D., Mary, J.L., Tomas-Zuber, M. und Lesslauer, W. (1998).** RSK-B, a novel ribosomal S6 kinase family member, is a CREB kinase under dominant control of p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase (p38 $\alpha$ <sup>MAPK</sup>). *J. Biol. Chem.* **273**: 29661-29671.
- Pombo, C.M., Bonventre, J.V., Molnár, A., Kyriakis, J. und Force, T. (1996).** Activation of a human Ste20-like kinase by oxidant stress defines a novel stress response pathway. *EMBO J.* **15**: 4537-4546.
- Posas, F. und Saito, H. (1997).** Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: Scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**: 1702-1705.
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C. und Saito, H. (1996).** Yeast *HOG1* MAPK cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the *SLN1-YPD1-SSK1* "two-component" osmosensor. *Cell* **86**: 865-875.
- Praekelt, U.M. und Meacock, P.A. (1990).** *HSP12*, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Analysis of structure, regulation, and function. *Mol. Gen. Genet.* **223**: 97-106.
- Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Nikolakaki, E. und Woodgett, J.R. (1991).** Phosphorylation of c-Jun mediated by MAP kinases. *Nature* **354**: 494-496.
- Raingeaud, J., Whitmarsh, A.J., Barret, T., Dérjard, B. und Davis, R.J. (1996).** MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 1247-1255.
- Ray, L.B. und Sturgill, T.W. (1987).** Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 1502-1506.
- Reed, R.H., Chudek, J.A., Foster, R. und Gadd, G.M. (1987).** Osmotic significance of glycerol accumulation in exponentially growing yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2119-2123.

- Reiser, V., Ruis, H. und Ammerer, G. (1999).** Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **10**: 1147-1161.
- Reitner, J. und Mehl, D. (1995).** Early Paleozoic diversification of sponges: New data and evidences. *Geol. Paläont. Mitt. Innsbruck* **20**: 335-347.
- Reunanen, N., Westermarck, J., Hakkinen, L., Holmstrom, T.H., Elo, I., Eriksson, J.E. und Kahari, V.M. (1998).** Enhancement of fibroblast collagenase (matrix metalloproteinase-1) gene expression by ceramide is mediated by extracellular-signal-regulated kinase and stress-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.* **273**: 5137-5145.
- Riesgo-Escovar, J.R. und Hafen, E. (1997).** *Drosophila* Jun kinase regulates expression of decapentaplegic via the ETS-domain protein Aop and the AP-1 transcription factor DJun during dorsal closure. *Genes Dev.* **11**: 1717-1727.
- Robinson, M.J. und Cobb, M.H. (1997).** Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin. Cell. Biol.* **9**: 180-186.
- Rosenberger, S.F., Finch, J.S., Gupta, A. und Bowden, T. (1999).** Extracellular Signal-regulated kinase 1/2-mediated phosphorylation of JunD and FosB is required for okadaic acid-induced activator protein 1 activation. *J. Biol. Chem.* **274**: 1124-1130.
- Roth, H.J., Kronquist, K.E., Kerlero deRosbo, N., Crandall, B.F. und Campagnoni, A.T. (1987).** Evidence for the expression of four myelin basic protein variants in the developing human spinal cord through cDNA cloning. *J. Neurosci. Res.* **17**: 321-328.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Liamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T. und Nebreda, A.R. (1994).** A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **78**: 1027-1037.
- Ruis, H. und Schüller, C. (1995).** Stress signalling in yeast. *BioEssays* **17**: 959-965.
- Sadoshima, J., Qiu, Z., Morgan, J.P. und Izumo, S. (1996).** Tyrosine kinase activation is an immediate and essential step in hypotonic cell swelling-induced ERK activation and c-fos gene expression in cardiac myocytes. *EMBO-J.* **15**: 5535-5546.
- Saier, M.H. (1993).** Introduction: Protein phosphorylation and signal transduction in bacteria. *J. Cell. Biochem.* **51**: 1-6.
- Saiki, R.K., Scharf, S.J., Falloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N. (1985).** Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sakata, N., Patel, H.R., Terada, N., Aruffo, A., Johnson, G.L. und Gelfand, E.W. (1995).** Selective activation of c-Jun kinase mitogen-activated protein kinase by CD40 on human B cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 30823-30828.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (Eds.) (1989).** Molecular Cloning I-III. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.*

- Sanchez, I., Hughes, R.T., Mayer, B.J., Yee, K., Woodgett, J.R., Avruch, J., Kyriakis, J. und Zon, L.I. (1994).** Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature*. **372**: 794-798.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Sanghera, J.S., Weinstein, S.L., Aluwalia, M., Girn, J. und Pelech, S.L. (1996).** Activation of multiple proline-directed kinases by bacterial lipopolysaccharide in murine macrophages. *J. Immunol.* **156**: 4457-465.
- Sassa, T., Richter, W.W., Uda, N., Suganuma, M., Suguri, H., Yoshizawa, S., Hiroto, M. und Fujiki, H. (1989).** Apparent "activation" of protein kinases by okadaic acid class tumor promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**: 939-944.
- Schäcke, H., Schröder, H.C., Gamulin, V., Rinkevich, B., Müller, I.M. und Müller, W.-G. (1994).** Molecular cloning of a receptor tyrosine kinase from the marine sponge *Geodia cydonium*: A new member of the receptor tyrosine kinase class II family in invertebrates. *Mol. Membrane Biol.* **11**: 101-107.
- Schaeffer, H.J. und Weber, M.J. (1999).** Mitogen-activated protein kinases: Specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell Biol.* **19**: 2435-2444.
- Schaeffer, H.J., Catling, A.D., Eblen, S.T., Collier, L.S., Krauss, A. und Weber, M.J. (1998).** MP1: A MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade [see comments]. *Science* **281**: 1668-1671.
- Scheffer, U., Krasko, A., Pancer, Z. und Müller, W.-G. (1997).** High conservation of the serum response factor within metazoa: cDNA from the sponge *Geodia cydonium*. *Biol. J. Linnean. Soc.* **61**: 127-137.
- Schletter, J., Heine, H., Ulmer, A.J. und Rietschel, E.T. (1995).** Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch. Microbiol.* **164**: 383-389.
- Schmitt, A.P. und McEntee, K. (1996).** Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5777-5782.
- Schüller, C., Brewster, J.L., Alexander, M.R., Gustin, M.C. und Ruis, H. (1994).** The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTTI* gene. *EMBO J.* **13**: 4382-4389.
- Schütze, J., Reis-Custodio, M., Efremova, S.M., Müller, I.M. und Müller, W.-G. (1999).** Evolutionary relationship of Metazoa within the eukaryotes based on molecular data from Porifera. *Proc. Royal Society Lond. B* **266**: 63-73.
- Seack, J., Kruse, M. und Müller, W.-G. (1998).** Evolutionary analysis of G-proteins in early metazoans: Cloning of  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits from the sponge *Geodia cydonium*. *Biochim. Biophys. Acta* **1401**: 93-103.
- Sluss, H.K., Barrett, T., Dérijard, B. und 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., Davis, R.J. und Ip, Y.T. (1996).** A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes Dev.* **10**: 2745-2758.
- Smith, A., Ramos-Morales, F., Ashworth, A. und Collins, M. (1997).** A role for JNK/SAPK in proliferation, but not apoptosis, of IL-3-dependent cells. *Curr. Biol.* **7**: 893-896.
- Smith, H.O. und Wilcox, K.W. (1970).** A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*. *J. Mol. Biol.* **51**: 379-391.
- St-Denis, A., Chano, F., Tremblay, P., St-Pierre, Y. und Descoteaux, A. (1998).** Protein kinase C- $\alpha$  modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* **273**: 32787-32792.
- Stein, B., Brady, H., Yang, M.X., Young, D.B. und Barbosa, M.S. (1996).** Cloning and characterization of MEK6, a novel member of the mitogen-activated protein kinase cascade. *J. Biol. Chem.* **271**: 11427-11433.
- Stein, B., Yang, M.X., Young, D.B., Janknecht, R., Hunter, T., Murray, B.W. und Barbosa, M.S. (1997).** p38-2, a novel mitogen-activated protein kinase with distinct properties. *J. Biol. Chem.* **272**: 19509-19517.
- Stein, W.D. (1990).** Channels, Carriers, and Pumps: An introduction to Membrane Transport, *Academic Press, San Diego*.
- Stock, J.B., Ninfa, A.J. und Stock, A.M. (1989).** Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**: 450-490.
- Stokoe, D., Campbell, D.G., Nakielny, S., Hidaka, H., Leever, S.J., Marshall, C. und Cohen, P. (1992a).** MAPKAP kinase-2 - a novel protein-kinase activated by mitogen-activated protein kinase. *EMBO J.* **11**: 3985-3994.
- Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D.G., Cohen, P. und Gaestel, M. (1992b).** Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Letters* **313**: 307-313.
- Su, B., Jacinto, E., Hibi, M., Kallunki, T., Karin, M. und Ben-Neriah, Y. (1994).** JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* **77**: 727-736.
- Su, Y.-C., Han, J., Xu, S., Cobb, M.H. und Skolnik, E.Y. (1997).** NIK is a new Ste20-related kinase that binds NCK and MEKK1 and activates the SAPK/JNK cascade via a conserved regulatory domain. *EMBO J.* **16**: 1279-1290.
- Sun, H., Charles, C.H., Lau, L.F. und Tonks, N.K. (1993).** MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase *in vivo*. *Cell* **75**: 487-493.
- Sutherland, C.L., Heath, A.W., Pelech, S.L., Young, P.R. und Gold, M.R. (1996).** Differential activation of the ERK, JNK, and p38 mitogen-activated protein kinase by CD40 on B cell antigen receptor. *J. Immunol.* **157**: 3381-3390.
- Sutherland, F.C., Lages, F., Lucas, C., Luyten, K., Albertyn, J., Hohmann, S., Prior, B.A. und Kilian, S.G. (1997).** Characteristics of Fps-1-dependent and -independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**: 7790-7795.

- Swantek, J.L., Cobb, M.H. und Geppert, T.D. (1997).** Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) translation: Glucocorticoids inhibit TNF- $\alpha$  translation by blocking JNK/SAPK. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 6274-6282.
- Swat, W., Fujikawa, K., Ganiatsas, S., Yang, D., Xavier, R.J., Harris, N.L., Davidson, L., Ferrini, R., Davis, R.J., Labow, M.A., Flavell, R.A., Zon, L.I. und Alt, F.W. (1998).** SEK1/MKK4 is required for maintenance of a normal peripheral lymphoid compartment, but not for lymphocyte development. *Immunity* **8**: 625-634.
- Sweet, M.J. und Hume, D.A. (1996).** Endotoxin signal transduction in macrophages. *J. Leuk. Biol.* **60**: 8-26.
- Tachibana, K., Scheuer, P.J., Tsukitani, Y., Kikuchi, H., Van Enden, D., Clardy, J., Gopichand, Y. und Schmitz, F.J. (1981).** Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *J. Am. Chem. Soc.* **103**: 2469-2471.
- Takekawa, M. und Saito, H. (1998).** A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell* **95**: 521-530.
- Tan, Y., Rouse, J., Zhang, A.H., Cariati, S., Cohen, P. und Comb, M.J.(1996).** FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *EMBO J.* **15**: 4629-4642.
- Taylor, L.K., Wang, H.-R. und Erikson, R.L. (1996).** Newly identified stress-responsive protein kinases, Krs-1 and Krs-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 10099-10104.
- Taylor, S.S. und Radzio-Andzelm, E. (1994).** Three protein kinase structures define a common motif. *Structure* **2**: 345-355.
- Taylor, S.S., Zheng, J., Radzio-Andzelm, E., Knighton, D.R., Ten Eyck, L.F., Sowadski, J.M., Herberg, F.W. und Yonemoto, W. (1993).** cAMP-dependent protein kinase defines a family of enzymes. *Phil. Trans. R. Soc. London B* **340**: 315-324.
- Thein, S.L. und Wallace, R.B. (1986).** The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. In: Human genetic diseases: A practical approach (Ed.: Davis, K.E.), *IRL Press, Herndon, Virginia*: 33-50.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J. (1994).** CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positive specific gap penalties, and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Thomson, S., Mahadevan, L.C. und Clayton, A.L. (1999).** MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Cell. Devel. Biol.* **10**: 205-214.
- Tibbles, L.A. und Woodgett, J.R. (1999).** The stress-activated protein kinase pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**: 1230-1254.
- Tournier, C., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Barret, T. und Davis, R.J. (1997).** Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 7337-7342.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.

- Toyoshima, F., Moriguchi, T. und Nishida, E. (1997).** Fas induces cytoplasmic apoptotic responses and activation of the MKK7-JNK/SAPK and MKK6-p38 pathways independent of CPP32-like proteases. *J. Cell. Biol.* **139**: 1005-1015.
- Treisman, R. (1996).** Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **8**: 205-215.
- Turner, N.A., Xia, F., Azhar, G., Zhang, X., Liu, L. und Wei, J.Y. (1998).** Oxidative stress induces DNA fragmentation and caspase activation via the c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase pathway in H9c2 cardiac muscle cells. *J. Mol. cell Cardiol.* **30**: 1789-1801.
- Uchida, S., Green, N., Coon, H., Triche, T., Mims, S. und Burg, M. (1987).** High NaCl induces stable changes in phenotype and karyotype of renal cells in culture. *Am. J. Physiol.* **253**: C230-C242.
- Ulevitch, R.J. und Tobias, P.S. (1994).** Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signalling. *Curr. Opin. Immunol.* **6**: 125-130.
- Vacelet, J. und Boury-Esnault, N. (1995).** Carnivorous sponges. *Nature* **373**: 333-334.
- Van der Bruggen, T., Nijenhuis, S., van Raaj, E., Verhoef, J. und van Asbeck, B.S. (1999).** Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the Raf-1/MEK1-MEK-2/ERK1-ERK2 pathway. *Infect. and Immun.* **67**: 3824-3829.
- Vandenabeele, P., Declercq, W., Bayert, R. und Fiers, W. (1995).** Two tumour necrosis factor receptors: Structure and function. *Trends. Cell Biol.* **5**: 392-399.
- Vernet, T., Dignard, D. und Thomas, D.Y. (1987).** A family of yeast expression vectors containing the phage fl intergenic region. *Gene* **52**: 225-233.
- Vik, T.A. und Ryder, J.W. (1997).** Identification of serine 380 as the major site of autophosphorylation of *Xenopus* pp90rsk. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **235**: 398-402.
- Vita, N., Lefort, S., Sozzani, P., Reeb, R., Richards, S., Borysiewicz, L.K, Ferrara, P. und Labeta, M.O. (1997).** Detection and biochemical characteristics of the receptor for complexes of soluble CD14 and bacterial lipopolysaccharides. *J. Immunol.* **158**: 3457-3462.
- Vittimberga, F.J., Theodore, M.D., McDade, P., Richard, M.D., Perugini, A. und Callery, M.P. (1999).** Sodium salicylate inhibits macrophage TNF- $\alpha$  production and alters MAPK activation. *J. Surg. Res.* **84**: 143-149.
- Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979).** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 615-619.
- Wagner, C., Steffen, R., Koziol, C., Batel, R., Lacorn, M., Steinhart, H., Simat, T. und Müller, W.-G. (1998).** Apoptosis in marine sponges: A biomarker for environmental stress (cadmium and bacteria). *Marine Biol.* **131**: 411-421.
- Wagner-Hülsmann, C., Bachinski, N., Diehl-Seifert, B., Blumbach, B., Steffen, R., Pancer, Z. und Müller, W.-G. (1996).** A galectin links the aggregation factor to cells in the sponge [*Geodia cydonium*] system. *Glycobiol.* **6**: 785-793.
- Wainwright, P.O., Hinkle, G., Songin, M.L. und Stickel, S.K. (1993).** Monophyletic origins of Metazoa: An evolutionary link to fungi. *Science* **260**: 340-342.

- Wang, S.X. und Ron, D. (1996).** Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP kinase. *Science* **272**: 1347-1349.
- Wang, S.X., Diener, K., Manthey, C.L., Wang, S.-W., Rosenzweig, B., Bray, J., Delaney, J., Cole, C.N., Chan-Hui, P.-Y., Mantlo, N., Lichenstein, H.S., Zukowski, M. und Yao, Z. (1997).** Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated Protein kinase. *J. Biol. Chem.* **272**: 23668-23674.
- Wang, X., Martindale, J.L., Liu, Y. und Holbrook, N.J. (1998).** The cellular response to oxidative stress: Influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem. J.* **333**: 291-300.
- Ward, Y., Gupta, S., Jensen, P., Wartmann, M., Davis, R.J. und Kelly, K. (1994).** Control of MAP kinase activation by the mitogen-induced threonine/tyrosine phosphatase PAC1. *Nature* **367**: 651-657.
- Waskiewicz, A.J. und Cooper, J.A. (1995).** Mitogen and stress-response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **7**: 798-805.
- Waskiewicz, A.J., Flynn, A., Proud, C.G. und Cooper, J.A. (1997).** Mitogen-activated protein kinase activate the serine/threonine kinases MNK1 and MNK2. *EMBO J.* **16**: 1909-1920.
- Wesselborg, S., Bauer, M.-A., Vogt, M., Schmitz, M.L. und Schulze-Osthoff, K. (1997).** Activation of transcription factor NF- $\kappa$ B and p38 mitogen-activated protein kinase is mediated by distinct and separate stress effector pathways. *J. Biol. Chem.* **272**: 12422-12429.
- Westermarck, J., Holmström, T., Ahonen, M., Eriksson, J.E. und Kähäri, V.-M. (1998).** Enhancement of fibroblast collagenase-1 (MMP-1) gene expression by tumor promoter okadaic acid is mediated by stress-activated protein kinases: Jun N-terminal kinase and p38. *Matrix Biol.* **17**: 547-557.
- Westheide, W. und Rieger, R. (Hrsg.) (1996).** Spezielle Zoologie. Erster Teil: Einzeller und Wirbellose Tiere. *Gustav Fischer, Stuttgart*, 75-119.
- Whiteaway, M.S., Wu, C. und Leeuw, T. (1995).** Association of the yeast pheromone response G protein  $\beta$  subunits with the MAP kinase scaffold Ste5p. *Science* **269**: 1572-1575.
- Whitmarsh, A.J., und Davis, R.J. (1996).** Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.* **74**: 589-607.
- Whitmarsh, A.J. und Davis, R.J. (1998).** Structural organization of MAP kinase signalling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *TIBS* **23**: 481-485.
- Whitmarsh, A.J., Shore, P., Sharrocks, A.D. und Davis, R.J. (1995).** Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* **269**: 403-407.
- Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J. und Davis, R.J. (1998).** A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* **281**: 1671-1677.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B. und Johnson, G.L. (1999).** Mitogen-activated protein kinase: Conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Reviews* **79**: 143-181.
- Wiens M., Koziol C., Hassanein H.-A., Batel, R. und Müller W.-G. (1998).** Expression of the chaperones 14-3-3 and HSP70 induced by PCB 118 (2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl) in the marine sponge *Geodia cydonium*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **165**: 247-257.

- Wiens, M., Kuusksalu, A., Kelve, M. und Müller, W.-G. (1999).** Origin of the interferon-inducible (2'-5')oligoadenylate synthetases: Cloning of the (2'-5')oligoadenylate synthetase from the marine sponge *Geodia cydonium*. *FEBS Letters* **462**: 12-18.
- Wilkinson, M.G. und Millar, J.B. (1998).** SAPKs and transcription factors do the nucleoplasmic tango. *Genes Dev.* **12**: 1391-1397.
- Wisdom, R., Johnson, R.S und Moore, C. (1999).** c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J.* **18**: 188-197.
- Woodgett, J.R., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Zon, L.I., Zanke, B. und Templeton, D.J. (1996).** Reconstitution of novel signalling cascades responding to cellular stresses. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. [B.]* **351**: 135-141.
- Wright, S.D. und Kolesnick, R.N. (1995).** Does endotoxin stimulate cells by mimicking ceramide? *Immunol. Today* **16**: 297-302.
- Wu, Z., Wu, J., Jacinto, E. und Karin, M. (1997).** Molecular cloning and characterization of human JNKK2, a novel Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase-specific kinase. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 7407-7416.
- Wurgler-Murphy, S.M. und Saito, H. (1997).** Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 172-176.
- Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A. und Saito, H. (1997).** Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 1289-1297.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J. und Greenberg, M.E. (1995).** Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**: 1326-1331.
- Xie, W. und Herschmann, H.R. (1995).** V-src induces prostaglandin synthase 2 gene expression by activation of the c-Jun N-terminal kinase and the c-Jun transcription factor. *J. Biol. Chem.* **270**: 27622-27628.
- Xie, W. und Herschmann, H.R. (1996).** Transcriptional regulation of prostaglandin synthase 2 expression by platelet-derived growth factor and serum. *J. Biol. Chem.* **271**: 31742-31748.
- Xing, J., Ginty, D.D. und Greenberg, D.E. (1996).** Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* **273**: 959-963.
- Xing, J., Kornhauser, J.M., Xia, Z.G., Thiele, E.A. und Greenberg, M.E. (1998).** Nerve growth factor activates extracellular-signal regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 1946-1955.
- Xu, S. und Cobb, M.H. (1997).** MEKK1 binds directly to the c-Jun N-terminal kinases stress-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **272**: 32056-32060.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. und Somero, G.N. (1982).** Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222.
- Yang, D.D., Kuan, C.Y., Whitmarsh, A.J., Rincon, M., Zheng, T.S., Davis, R.J., Rakic, P. und Flavell, R.A. (1997).** Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the *Jnk3* gene. *Nature* **389**: 865-870.

- Yang, H., Young, D.W., Gusovsky, F. und Chow, J.C. (2000).** Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* **275**: 20861-20866.
- Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H.Y. und Baltimore, D. (1997).** Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* **89**: 1067-1076.
- Zarkower, D., Stephenson, P., Sheets, M. und Wickens, M. (1986).** The AAUAAA sequence is required both for cleavage and for polyadenylation of simian virus pre-mRNA *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 2317-2323.
- Zervos, A.S., Faccio, L., Gatto, J.P., Kyriakis, J.M. und Brent, P. (1995).** Mxi2, a mitogen-activated protein kinase that recognizes and phosphorylates Max protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 10531-10534.
- Zhang, S., Han, J., Sells, M.A., Chernoff, J., Knaus, U.G., Ulevitch, R.J. und Bokoch, G.M. (1995).** Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J. Biol. Chem.* **270**: 23934-23936.
- Zhang, X.F., Settleman, J., Kyriakis, M., Takeuchi-Suzuki, E., Elledge, S.J., Marshall, M.S., Bruder, J.T., Rapp, R. und Avruch, J. (1993).** Normal and oncogenic p21 ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* **364**: 308-313.
- Zhang, Z., Yang, X.-Y. und Cohen, D.M. (1998).** Hypotonicity activates transcription through ERK-dependent and -independent pathways in renal cells. *Am. J. Physiol.* **275**: C1104-C1112.
- Zheng, C.-F. und Guan, K.-L. (1993).** Dephosphorylation and inactivation of the mitogen-activated protein kinase by a mitogen-induced Thr/Tyr protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* **268**: 16116-16119.
- Zinck, R., Cahill, M.A., Kracht, M., Sachsenmaier, C., Hipskind, R.A. und Nordheim, A. (1995).** Protein synthesis inhibitors reveal differential regulation of mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase pathways that converge on Elk-1. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 4930-4938.

# PUBLIKATIONSLISTE

- Böhm, M., Schröder, H.C., Müller, I.M., Müller, W.-G. und Gamulin, V. (2000).** The mitogen-activated protein kinase p38 pathway is conserved in metazoans: Cloning and activation of p38 of the SAPK2 subfamily from the sponge *Suberites domuncula*. *Biol. Cell* **92**: 95-104.
- Böhm, M., Gamulin, V. und Müller, W.-G. (2001).** Conservation of the positions of metazoan introns from the sponges to humans: Evolutionary implications. (Eingereicht).
- Böhm, M., Gamulin, V., Schröder, H.C. und Müller, W.-G. (2001).** Evolution of osmosensing signal transduction in metazoa: Stress-activated protein kinases p38 and JNK. (Eingereicht).
- Böhm, M., Hentschel, U., Friedrich, A., Fieseler, L., Steffen, R., Gamulin, V., Müller, I.M. und Müller, W.-G. (2001).** Molecular response of the sponge *Suberites domuncula* to bacterial infection. *Marine Biology* (im Druck).
- Müller, W.-G., Böhm, M., Batel, R., de Rosa, S., Tommonaro, G., Müller, I.M. und Schröder, H.C. (2000).** Application of cell culture for the production of bioactive compounds from sponges: Synthesis of Avarol by Primmorphs from *Dysidea avara*. *J. Nat. Prod.* **63**: 1077-1081.
- Müller, W.-G., Schatton, W., Wimmer, W., Böhm, M., Batel, R. und Filic, Z. (1999).** Initiation of an aquaculture of sponges for their sustainable production of bioactive metabolites in open systems: Example *Geodia cydonium*. *Mol. Marine Biotechnol.* **1**: 569-579.
- Perovic, S., Böhm, M., Meesters, E., Meinhardt, A., Pergande, G. und Müller, W.-G. (1998).** Pharmacological intervention in age-associated brain disorders by Flupirtine: Alzheimer's and Prion diseases. *Mech. of Ageing and Dev.* **101**: 1-19.

# ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation „Klonierung, Charakterisierung und Funktion der beiden SAPK-Mitglieder JNK und p38 MAPK des marinen Schwamms *S. domuncula*“ selbstständig angefertigt zu haben. Ich habe keine weiteren Hilfsmittel oder Quellen, als die angegebenen verwendet. Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Mainz, den 31.08.2001