

Induktion der Peroxiredoxin I Genexpression über einen p38 Mitogen-aktivierte
Proteinkinase Signaltransduktionsweg

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Alexander Heß
aus Berlin

Gießen 2005

Aus dem Medizinischen Zentrum für Klinische Chemie, Klinische Immunologie und Humangenetik

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie

Leiter: Prof. Dr. Dr. N. Katz

des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: PD Dr. med. Stephan Immenschuh

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. E. Beck

Tag der Disputation: 08.11.2005

Erklärung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
2	Material und Methoden	12
3	Ergebnisse	19
3.1	TPA-abhängige Induktion der Prx I Genexpression in der murinen Monozytenzelllinie RAW264.7	19
3.2	Klonierung des Promotors des Prx I Gens der Ratte und Identifikation möglicher regulatorischer Elemente (RE)	21
3.3	Funktionelle Rolle der proximalen AP-1 Sequenzen für die TPA-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität	24
3.4	Induktion der Prx I Promotoraktivität durch Überexpression von c-Jun	28
3.5	Spezifische Bindung von c-Jun an die AP-1-A Stelle des Prx I Promotors	32
3.6	TPA-abhängige Induktion der Prx I Genexpression über den Proteinkinase C-Signalweg	35
3.7	Rolle von Ras und MEKK1 für die TPA-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität	37
3.8	Aktivierung von MAPKs durch TPA in RAW264.7 Zellen	40
3.9	Rolle von p38 für die Regulation der TPA-abhängigen Induktion der Prx I Promotoraktivität	42
3.10	Rolle des NF- κ B-Signalweges für die Regulation der Prx I Promotoraktivität durch TPA	46

4	Diskussion	49
4.1	Transkriptionale Induktion der Prx I Genexpression durch TPA	49
4.2	Signalwege der TPA-abhängigen Induktion der Prx I Genexpression	52
4.3	Physiologische Funktionen von Prx I	59
5	Literaturverzeichnis	64
6	Veröffentlichungen	70
7	Zusammenfassung	71
8	Summary	72
9	Danksagung	73
10	Lebenslauf	74

Abkürzungen

AD	Actinomycin D
AP-1	Aktivator Protein-1
ARE	Antioxidant Response Element
BIM	Bisindolylmaleimid
bp	Basenpaare
CAPE	Caffeic Acid Phenethylester
cpm	counts per minute
Cys	Cystein
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
HBP23	Hämbindendes Protein 23
HO-1	Hämoxygenase-1
I κ B	Inhibitor von NF- κ B
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Luc	Luciferase
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAP3K	MAPK Kinase Kinase
MEK	MAPK/ERK Kinase
MEKK1	MAPK/ERK Kinase Kinase 1
MKK	MAPK Kinase
MSP23	Maus Stressprotein 23
NE	Nukleäres Extrakt
NF- κ B	Nukleärer Faktor- κ B
Nrf2	Nukleärer Faktor Erythroid-related factor 2
pag	proliferation associated gene
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
Prx(s)	Peroxiredoxin(e)
RE	regulatorisches Element

ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Stauro	Staurosporin
TBE	Trisborat/EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
TRE	TPA responsives Element
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

Peroxiredoxin (Prx) I besitzt Thioredoxin-abhängige Peroxidaseaktivität und zählt zu der Gruppe der antioxidativ wirksamen Prxs. Die multifunktionalen Prxs kommen in unterschiedlichen Spezies wie Mammaliern, Bakterien, Pflanzen und Hefen vor und spielen eine wichtige physiologische Rolle beim enzymatischen Abbau von Peroxiden, welche in hohen Konzentrationen zellschädigend wirken können. Für diese antioxidative Schutzfunktion der Prxs und ihre Struktur spielen intramolekulare, hochkonservierte Cysteinreste eine entscheidende Rolle, nach deren Anzahl und Lokalisation die Prxs in 3 Klassen unterteilt werden. Es werden typische 2-Cystein-Prxs (Prx I-IV), atypische 2-Cystein-Prxs (Prx V) und 1-Cystein-Prxs (Prx VI) unterschieden (Hofmann et al., 2002; Wood et al., 2003) (Tabelle 1).

Alle Prxs besitzen in ihrem katalytisch aktiven Zentrum ein Cystein, das als sogenanntes peroxidatisches Cystein ($\text{Cys-S}_\text{P}\text{H}$) durch Peroxid zu Sulfensäure ($\text{Cys-S}_\text{P}\text{OH}$) oxidiert wird. Der weitere Reaktionsmechanismus mit nachfolgender Regeneration des $\text{Cys-S}_\text{P}\text{H}$ verläuft jedoch innerhalb der verschiedenen Klassen von Prxs unterschiedlich. Die typischen 2-Cystein-Prxs sind Homodimere und besitzen wie die monomerisch aufgebauten atypischen 2-Cystein-Prxs neben dem $\text{Cys-S}_\text{P}\text{H}$ einen weiteren an der Peroxidasereaktion beteiligten C-terminalen Cysteinrest. Bei den typischen 2-Cystein-Prxs kommt es zur Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke zwischen dem $\text{Cys-S}_\text{P}\text{OH}$ und dem C-terminalen Cysteinrest der anderen Untereinheit, während sich bei den atypischen 2-Cystein-Prxs eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbildet. Die Reduktion der Disulfidbrücke und die Regenerierung des $\text{Cys-S}_\text{P}\text{H}$ erfolgt bei den 2-Cystein-Prxs durch Thioredoxin. Die 1-Cystein-Prxs sind Homodimere und haben nur das $\text{Cys-S}_\text{P}\text{H}$ als aktives Zentrum. Bei den 1-Cystein-Prxs erfolgt die Regeneration des $\text{Cys-S}_\text{P}\text{H}$ über bisher nicht identifizierte schwefelhaltige Oxidantien.

Prx I ist das am ersten beschriebene und am besten charakterisierte Mitglied der Peroxiredoxinfamilie und konnte in fast allen menschlichen Organen und Geweben nachgewiesen werden (Immenschuh und Baumgart-Vogt, 2005). Prx I wurde in humanen Hela Zellen als *proliferation associated gene* (pag) (Prosperi et al., 1993), in Peritonealmakrophagen der Maus als *Maus Stressprotein 23* (MSP23) (Ishii et al.,

1993) und in Rattenleber als *Hämbindendes Protein 23* (HBP23) (Iwahara et al., 1995) identifiziert. Bei Mammaliern wird Prx I hauptsächlich in der Leber und in geringerem Ausmaß auch in anderen Organen exprimiert. Für die Regulation der biologischen Aktivität von Prx I sind verschiedene posttranslationale Mechanismen beschrieben worden. Hierzu zählen Phosphorylierung, C-terminale Proteolyse, Ligandenbindung und die reversible Überoxidation von Cysteinresten im Prx I Molekül (Lee et al., 2001; Chang et al., 2002; Wood et al., 2003).

Prxs und andere antioxidative Enzyme wie Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase schützen die Zelle vor Schädigung durch oxidativen Stress, der durch die zelluläre Überproduktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gekennzeichnet ist. Zu den ROS werden H_2O_2 , organische Peroxide sowie Hydroxyl- und Sauerstoffradikale gezählt, welche in der Zelle als Nebenprodukt der Zellatmung gebildet werden, aber auch durch extrazelluläre Faktoren wie UV-Licht, ionisierende Strahlung und oxidative Stresstimuli entstehen können (Rabilloud et al., 2002). Oxidativer Streß führt zur Zellschädigung durch DNA-Modifikationen, Protein Cross-Linking und Lipidperoxidation (Halliwell, 1994) und spielt eine ursächliche Rolle bei Entzündungen, arteriosklerotischen und neurodegenerativen Erkrankungen (Weitzman und Gordon, 1990; Jenner, 1994; Witztum, 1994). Prxs könnten ähnlich wie andere antioxidativ wirksame Proteine eine protektive Rolle bei diesen Erkrankungen spielen. So konnte vor kurzem demonstriert werden, daß das Ausschalten des Prx I Gens bei Mäusen zur Entwicklung einer hämolytischen Anämie als Folge einer vermehrten ROS-induzierten Erythrozytenschädigung führt (Neumann et al., 2003). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß die Genexpression von Prx I durch oxidative Stresstimuli wie Häm, Schwermetallsalze und Low-Density Lipoproteine induziert wird (Siow et al., 1995; Immenschuh et al., 1995 und 1997; Li et al., 2002), und daß der Transkriptionsfaktor (TF) Nukleärer Faktor Erythroid-related factor 2 (Nrf2) bei der durch oxidativen Streß induzierbaren Prx I Genexpression eine wichtige regulatorische Rolle spielt (Ishii et al., 2000).

Es konnte auch gezeigt werden, daß Peroxide und weitere ROS als physiologische second messenger an rezeptorvermittelten intrazellulären Signaltransduktionswegen beteiligt sind (Finkel, 1998; Thannikal et al., 2000) und Prxs hierbei durch enzymatischen Abbau von ROS eine regulatorische Rolle zu spielen scheinen (Rhee

et al., 2003). ROS sind über die Interaktion mit verschiedenen Signaltransduktionswegen der Zellproliferation und -differenzierung an der malignen Transformation von Zellen beteiligt (Cerutti, 1994), so daß die antioxidativ wirksamen Prxs bei der Karzinogenese eine protektive Funktion besitzen könnten. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte gezeigt werden, daß Prx I durch direkte Interaktion die Aktivität der Onkogene c-Abl und c-Myc inhibierte (Wen und Van Etten, 1997; Mu et al., 2002) und anhand eines Prx I Knock-out Maus Modells konnte demonstriert werden, daß Prx I-defiziente Tiere deutlich häufiger an Tumoren erkrankten als normale Tiere (Neumann et al., 2003).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Regulation der Prx I Genexpression durch den Tumorpromotor 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) in der murinen Monozytenzelllinie RAW264.7 aufzuklären. Es konnte gezeigt werden, daß TPA in RAW264.7 Zellen die Prx I mRNA und Proteinexpression transkriptional induzierte. Mittels transienter Transfektion von Luciferasereportergenkonstrukten mit DNA-Sequenzen des Prx I Promotors der Ratte konnte gezeigt werden, daß in RAW264.7 Zellen die TPA-abhängige, transkriptionale Induktion des Prx I Gens hauptsächlich über zwei Aktivator Protein-1 (AP-1)-Stellen des Prx I Promotors vermittelt wurde. Die funktionelle AP-1-A-Stelle konnte als spezifische Bindungsstelle für den TF c-Jun in Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) identifiziert werden. Mittels Northern Blot Analyse und Transfektionsexperimenten mit spezifischen pharmakologischen Inhibitoren der Proteinkinase C (PKC) konnte eine Beteiligung der PKC an der Induktion der Prx I Genexpression durch TPA demonstriert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)/Extrazellulär regulierte Kinase (ERK) Kinase Kinase (MEKK)-1 und die p38 MAPK eine regulatorische Rolle bei der TPA-abhängigen Aktivierung des Prx I Gens spielen.

Tabelle 1: Die sechs Peroxiredoxinklassen bei Mammaliern

Prx-Klasse	Prx I (2-Cystein)	Prx II (2-Cystein)	Prx III (2-Cystein)	Prx IV (2-Cystein)	Prx V (atypisches 2-Cystein)	Prx VI (1-Cystein)
ehemalige Nomenklatur	TPx-A NKEF A MSP23 OSF-3 HBP23 PAG	TPx-B NKEF B PRP Calpromotin Torin Band-8 TSA	AOP-1 SP22 MER5	AOE372 TRANK	AOEB166 PMP20 AOPP	ORF06 LTW4 AOP2
Polypeptidlänge	199 AS	198 AS	256 AS (Schnittstelle zw. AS 63-64) ^a	271 AS (Schnittstelle zw. AS 36-37) ^a	214 AS (Schnittstelle zw. AS 52-53) ^a	224 AS
chromosomale Lokalisation (Mensch)	1q34.1	13q12	10q25-q26	10q22.13	11q13	1q23.3
zelluläre Lokalisation	Zytosol, Zellkern	Zytosol, Zellmembran	Mitochondrien	Zytosol, Golgi- apparat, wird sezerniert	Mitochondrien, Per- oxisomen, Zytosol	Zytosol
Genbankdaten SwissProt	AAA50464 tdx2.human P35703	AAA50465 tdx1.human P32119	BAA08389 tdxm.human P30048	AAB95175 tdxn.human Q13162	AAF03750 aopp.human P30044	BAA03496 aop2.human P30041
Interaktion mit Proteinen und anderen Liganden	c-Abl c-Myc Häm Presenilin-1 Cyclophilin MMIF ^b	Protein 7.2b (Stomatin) Presenilin-1 Erythrozyten- membran Cyclophilin	Cyclophilin Abrin (A-Kette)	Heparin Cyclophilin	DNA Cyclophilin	Cyclophilin

Abkürzungen : AS, Aminosäuren; ^a diese Proteine werden posttranslational modifiziert; ^b Makrophagenmigrationinhibitorfaktor (Tabelle modifiziert aus Wood et al., 2003)

2 Material und Methoden

Materialien - Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) war von Gibco BRL/ Invitrogen (Karlsruhe), Nitrozellulosefilter von Schleicher und Schuell (Dassel), verschiedene Radioisotope und das Detektionssystem für Western Blots wurden von Pharmacia (Freiburg) erworben. Der Nukleotidextraktionskit war von Qiagen (Düsseldorf), der Multiprime DNA Labeling Kit, die Restriktionsendonukleasen und die terminale Deoxynukleotidtransferase von New England Biolabs (Heidelberg). Die Gewebekulturschalen stammten von Becton Dickinson (Heidelberg). Alle anderen Chemikalien waren von Sigma (Deisenhofen) und Roche Molecular Biochemicals (Basel), soweit keine anderen Angaben gemacht wurden.

Zellkultur - RAW264.7 Zellen waren von der American Type Tissue Collection (Manassas, VA, USA) und wurden in DMEM kultiviert, welches mit 10% fetalem Kälberserum, 100 U Penicillin/ml und 100 µg Streptomycin/ml angereichert war. Die Zellen wurden bei 100% Luftfeuchtigkeit in einem Luft/CO₂-Gemisch (19:1) gehalten. Die Behandlung der Zellen mit TPA erfolgte in serumfreiem Medium.

Western Blot Analyse - Nach zweimaligem Waschen der Zellkulturen mit 0.9% NaCl-Lösung wurde das Gesamtprotein wie von Immenschuh et al. (1999) beschrieben isoliert. Hierfür wurden die Zellen mit 1 ml Lysepuffer (0.1% SDS, 10 mM Tris, pH 7.4) behandelt, anschließend für 5 min erwärmt und homogenisiert, indem sie durch eine 25G Nadel gedrückt wurden. Das Homogenat wurde für 5 min bei 4°C zentrifugiert und der Proteingehalt im erhaltenen Überstand nach der Lowry-Methode (Lowry et al., 1951) bestimmt. 50 µg Gesamtprotein wurde auf ein 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und nach elektrophoretischer Auftrennung auf eine Nitrozellulosemembran mittels Elektroblothing transferiert. Die Membran wurde danach mittels einer mit Tris gepufferten Salzlösung, die 1% bovines Serumalbumin, 10 mM Tris/ HCL (pH 7.5) und 0.1% Tween enthielt, für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Der primäre, polyklonale Antikörper gegen Prx I (Iwahara et al., 1995) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 angewendet und die Membran danach für 12

h bei 4°C inkubiert. Der Zweitantikörper war ein anti-Kaninchen IgG-Antikörper und wurde in einer Verdünnung von 1:8000 angewendet und anschließend mittels eines Chemilumineszenzdetektionssystems gemäß den Vorschriften des Herstellers detektiert. Die primären Antikörper zur Detektion phosphorylierter und gesamter MAPK waren von New England Biolabs (Heidelberg) und wurden in den vom Hersteller empfohlenen Verdünnungen verwendet.

RNA-Isolation, Northern Blot Analyse und Hybridisierung - Die Isolation der Gesamt-RNA für die Northern Blot Analyse erfolgte wie von Immenschuh et al. beschrieben (Immenschuh et al., 1999). Gleiche RNA-Mengen wurden auf Gele die 1.2% Agarose und 2.2 M Formaldehyd enthielten aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Transfer der RNA auf eine Nitrozellulosemembran mittels Elektroblothing wurde diese für 4 h bei 80°C gebacken. Nach 4 h Prähybridisierung bei 42°C wurden die Blots über 18-24 h mit radioaktiv markierten α [³²P]-dCTP cDNA-Proben bei 42°C hybridisiert. Die Hybridisierungslösung enthielt 6x SSC, 5x Denhardt-Lösung (0.2% Ficoll 400, 0.2% Polyvinylpyrrolidon und 0.2% Rinderalbumin), 0.5% SDS, 50% Formamid und 100 µg/ml denaturierte DNA aus Lachsspermien. Die Blots wurden anschließend bei 65°C ein Mal mit 2x SSC/0.1% SDS und zweimal mit 0.1x SSC/0.1% SDS gewaschen. Die Autoradiographie der hybridisierten Filter wurde danach bei -70°C über 48 h mittels Röntgenfilm (X-OMAT RP, Kodak; Rochester, NY, USA) detektiert oder die Filter wurden über 4-8 h auf einem Phosphorimagerschirm exponiert und die Radioaktivität mittels einer Imagequantsoftware (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) gemessen. Im Falle einer mehrmaligen Hybridisierung der Nitrozellulosefilter mit unterschiedlichen Proben wurde die ³²P-markierte cDNA nach der Autoradiographie durch zwei Waschschrte mit auf 95°C erwärmte 0.05x SSC/0.1% SDS-Lösung entfernt.

cDNA Probe - Für die Hybridisierung wurde die cDNA von Prx I der Ratte verwendet (Immenschuh et al., 1995). Das cDNA-Fragment wurde mittels der Oligomermethode mit α [³²P]-dCTP radioaktiv markiert. Hierzu wurde der Multiprime DNA Labeling Kit gemäß den Vorschriften des Herstellers verwendet. Um die unterschiedliche RNA-

Beladung zu erkennen wurden die Nitrozellulosefilter mit einem Oligonukleotid aus 28S rRNA nochmals hybridisiert, das mittels der T4-Polynukleotidkinase am 5'-terminalen Ende mit γ [³²P]-dATP radioaktiv markiert worden war.

Klonierung der 5'-flankierenden Region des Prx I Promotors - Die proximale 5'-flankierende Region des Prx I Promotors der Ratte wurde mittels des Genome Walker™ Kit von Clontech (Palo Alto, CA, USA) isoliert. Dieser Kit enthielt verschiedene Pools genomischer DNA, die mit *EcoRV*, *Scal*, *DraI*, *PvuII* oder *SspI* vorverdaut und an einen sogenannten Oligonukleotidanker (AdapterPrimer 1) kloniert waren. Anschließend wurde ein erster PCR-Ansatz durchgeführt. Für diese PCR wurde der AdapterPrimer 1, wie im Testansatz beschrieben, und ein 25 bp umfassender Primer der Positionen 55 bis 31 der Prx I cDNA (Iwahara et al., 1995) (5'-CTTGCTATCAGCAGAGTCGAGCTAC-3') verwendet. Auf dem DNA-Cycler wurde folgendes Programm benutzt: 94°C x 25 s, 72°C x 3 min für 7 Zyklen, 94°C x 25 s, 67°C x 3 min für 32 Zyklen und 67°C x 4 min für 1 Zyklus. Nach Analyse einer Probe der PCR auf einem 1% Agarosegel wurden die Reaktionsprodukte in einem Verhältnis von 1:50 mit sterilem, destilliertem Wasser verdünnt und ein zweites Mal mittels PCR amplifiziert. Bei diesem Ansatz wurden der AdapterPrimer 2 und ein die Positionen 31 bis 9 der cDNA des Prx I Gens (5'-CAGGTCTCACAAACAGAACCAACCGT-3') umfassender 26 bp Primer benutzt. Das verwendete Programm beinhaltete 94°C x 25 s, 72°C x 3 min für 5 Zyklen, 94°C x 25 s, 67°C x 3 min für 20 Zyklen und 67°C x 4 min für 1 Zyklus. Die vermehrten PCR-Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und in den pCR2.1™ Vektor (Invitrogen; San Diego, CA, USA) kloniert. Das dabei erhaltene Plasmid pCRPrxProm wurde anschließend in 5'-3'- sowie 3'-5'-Richtung sequenziert.

Plasmide - Um das Plasmid pPrx1750 zu erhalten, wurde das *MluI*/*XhoI* Fragment des pCRPrxProm-Plasmids in den Vektor pGL3-Basic kloniert. Die Deletionsmutanten pPrx1209, pPrx897, pPrx558, pPrx283 und pPrx127 wurden mittels PCR hergestellt, wobei die Oligonukleotide Prx1209 (5'-CATAGCAAAAAGCAAACCTTTC-3'), Prx897 (5'-GTTCTGTCTCACTTCCTCG-3'), Prx558 (5'-AAGAGACTTTTGGGGGACATC-3'), Prx283 (5'-

GCAGGGCCAGGAGAC-3') und Prx127 (5'-GACCAGTGAAGCTCTTTTC-3') als Vorwärtsprimer und das Oligonukleotid Prxbasic (5'-TCTGGCACCTGCACTTG-3') als reverser Primer benutzt wurden. Die Ligation der PCR-Produkte erfolgte mittels Standardklonierungsmethoden. Um die Plasmide pPrx897/668 und pPrx668/897 herzustellen wurden Primer mit benachbarten Restriktionsstellen für die Endonukleasen *SacI* oder *BglII* verwendet. Für das Plasmid pPrx897/668 wurde als Vorwärtsprimer für die PCR das Prx987*SacI*F (5'-AATCGGAGCTCGTTCTGTCTCACTTCCCTCGC-3') mit einer *SacI* Restriktionsstelle und als reverser Primer das Prx668*BglII*R (5'-GACTGAGAATCTTGTGGCTGAACACCATGAC-3') mit einer Restriktionsstelle für *BglII* benutzt, wobei das pPrx1750 als Ausgangsplasmid diente. Nach Verdauung mit *SacI* und *BglII* wurde das erhaltene PCR-Fragment in die *SacI/BglII* Stellen des pGL3-Prom Plasmids kloniert. Ebenso wurde das Plasmid pPrx668/897 hergestellt, bei welchem Prx897*BglII*F (5'-GACTGAGATCTGTTCTGTCTCACTTCCCTCGC-3') als Vorwärtsprimer und Prx668*SacI*R (5'-AATCGGAGCTCTGTTTGCTGAACACCATGAC-3') als reverser Primer verwendet wurden. In ähnlicher Weise wurden die Plasmide pPrx667/283 und pPrx283/667 generiert, indem die Primerpaare Prx667*SacI*F (5'-AATCGGAGCTCCCATGGGGTCGGGTCCCAG-3') und Prx283*BglII*R (5'-GACTGAGATCTCCATGTCATCAACAACCAAAG-3') oder Prx667*BglII*F (5'-GACTGAGATCTCCATGGGGTCGGGTCCCAG-3') und Prx283*SacI*R (5'-AATCGGACCTCCCACTGTCATCAACAACCAAAG-3') benutzt wurden. Die Plasmide pPrx282/108 und pPrx108/282 wurden hergestellt, indem die Primerpaare Prx282*SacI*F (5'-AATCGGAGCTCCAGGGCCAGGAGACCTAATG-3') und Prx108*BglII*R (5'-GACTGAGATCTCAGGGCCAGGAGACCTAATG-3') oder Prx282*BglII*F (5'-GACTGAGATCTCAGGGCCAGGAGACCTAATG-3') und Prx108*SacI*R (5'-AATCGGAGCTCGGAAAAGAGCTTCACTGGTC-3') für die Hybridisierung verwendet wurden. Zur Herstellung des Plasmids pPrx558mutA diente das pPrx558 als Ausgangssequenz und die Oligonukleotide MutAfor (5'-GTCAGACAGAGGAAGACTGTGTGTATGGGC-3') als Vorwärtsprimer und MutArev (5'-AACCCCTGTCTCTGTCATCTCTGTTCC-3') als reverser Primer. Das Plasmid pPrx558mutB wurde mit den Oligonukleotiden MutB2for (5'-

AGTCAAAGCTTATTCTAAAGTGCAGGGTC-3') als Vorwärts-, dem MutB2rev (5'-ACGGAGTCATAGTCTCTGTGCTACAGC-3') als reverser Primer und dem pPrx558 als Ausgangssequenz hergestellt. Um das Plasmid pPrx558mutAB herzustellen, wurden die Oligonukleotide MutAfor und MutArev als Primer und das pPrx558mutB als Ausgangssequenz in der PCR verwendet. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels Standardmethoden ligiert und die DNA-Sequenzen in 5'-3'- sowie 3'-5'-Richtung sequenziert.

Das Luciferasereportergenkonstrukt pAP-1luc wurde von Dr. A. Brent Carter (University of Iowa College of Medicine, Iowa City, IA, USA) (Carter et al., 2001) zur Verfügung gestellt, und das Konstrukt pNF- κ Bluc wurde von Stratagene (La Jolla, CA, USA) erworben. Die Expressionsvektoren für konstitutiv-aktives H-Ras (Q61L Mutante), dominant-negatives H-Ras (S17N Mutante), konstitutiv-aktives Raf-1 (Y340D Mutante) und dominant-negatives Raf-1 (K375M Mutante) wurden in früheren Arbeiten beschrieben (Kietzmann et al., 2003). Die Expressionsvektoren für Komponenten der MAPK-Signalwege wurden uns von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt: MEKK1 und MEKK1 dominant-negativ von Dr. Melanie Cobb (Southwestern Medical Center, Houston, TX, USA), MKK3 dominant-negativ von Dr. Roger Davies (University of Massachusetts, Worcester, MA, USA), MKK6 dominant-negativ von Dr. Sylvio Gutkind (National Institut of Health, Bethesda, MD, USA), MKK4 dominant-negativ von Dr. Ulf Rapp (Universität Würzburg, Deutschland) und MKK7 dominant-negativ von Dr. Eisuke Nishida (University of Kyoto, Japan). Die Expressionsvektoren für die verschiedenen Wildtyp- und dominant-negativen p38-Isoformen p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ waren von Dr. J. Han (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) und der Expressionsvektor für die dominant-negative Mutante von I κ B stammte von Dr. Richard Gaynor (Southwestern Medical Center, Houston, TX, USA). Die Expressionsvektoren für c-Jun, c-Jun dominant-negativ, Nrf2 und Nrf2 dominant-negativ und für das Reporterplasmid p3xSTREluc mit drei Kopien des HO-1 Antioxidant Response Element (ARE) wurden von Dr. Jawed Alam (Alton Ochsner Foundation, New Orleans, LS, USA) zur Verfügung gestellt.

Transfektionen und Bestimmung der Luciferaseaktivität - Die Transfektion von RAW264.7 Zellen mittels Liposomen-Technik erfolgte ca. 16 h nach dem

Ausplattieren. Hierzu wurde Fugene[®] (Roche Molecular Biochemicals, Basel) gemäß den Vorschriften des Herstellers verwendet. Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Zellen mit 1 µg Reporterplasmid und 0.1 - 0.5 µg Expressionsvektor transfiziert, wobei identische Mengen transfizierter DNA durch Auffüllen mit dem entsprechenden Leervektor erreicht wurden. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Luciferaseaktivität mit einem kommerziellen Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Die Zellen wurden entweder 24 h nach der Transfektion geerntet oder für weitere 18 h mit TPA behandelt. Die Relative Light Units (RLU) Werte der Luciferaseaktivität wurden mit dem Zellprotein der Proben korreliert.

Präparation nukleärer Extrakte und Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)

- Die nukleären Extrakte (NE) wurden nach einem Standardprotokoll hergestellt (Kietzmann et al., 2003). Die für die EMSA verwendeten Oligonukleotide besaßen folgende Basensequenzen: Prx I AP-1-A, 5'-GACAGGGTGACTAAGACAGGA-3' (beinhaltet die AP-1-A Stelle des Prx I Promotors, Abb. 2), Prx I AP-1-B, 5'-TGACTCCTGACTCAAAGCTT-3' (beinhaltet die AP-1-B Stelle des Prx I Promotors, Abb. 2) und Prx I AP-1-Amut, 5'-GACAGGGGTTCTCAGACAGGA-3'. Das Oligonukleotid mit der AP-1-Konsensussequenz 5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3' war von Promega (Madison, WI, USA). Gleiche Mengen komplementärer Oligonukleotide wurden unter Verwendung von γ [³²P]-dATP mit T4-Polynukleotidkinase radioaktiv markiert. Die Bindungsreaktionen wurden in 20 µl Gesamtvolumen durchgeführt, welches 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5% Glycerol, 10 µg NE, 250 ng Poly (d(I-C)) und 5 mM Dithioerythritol enthielt. Für die Konkurrenzexperimente wurde ein Überschuß von unmarkiertem Oligonukleotid hinzugegeben. Nach einer Präinkubationsphase von 5 min bei Raumtemperatur wurde dem Reaktionsansatz 1 µl der radioaktiv markierten Probe (10⁴ cpm) zugefügt und nochmals 10 min inkubiert. Bei den 'supershift'-Assays wurde jeweils 1 µl eines Antikörpers gegen c-JunD (Epitop der DNA-bindenden Domäne), c-JunN (Epitop der N-terminalen Domäne), c-AMP RE bindendes Protein-1 (24H4B) oder SP-1 (PEP2-G) (alle Antikörper von Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) oder Präimmunserum vom Kaninchen

hinzugegeben. Der gesamte Reaktionsansatz wurde dann bei 4°C für 2 h inkubiert, und die DNA-Protein Komplexe anschließend auf einem 4.5% Polyacrylamidgel in TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 5 mM EDTA) bei 200 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden danach getrocknet und bei –80°C autoradiographiert.

3 Ergebnisse

3.1 TPA-abhängige Induktion der Prx I Genexpression in der murinen Monozytenzelllinie RAW264.7

Die Regulation der Prx I Genexpression durch TPA wurde in der murinen Monozytenzelllinie RAW264.7 untersucht. Mittels Northern und Western Blot Analyse konnte eine Induktion der Prx I mRNA (Abb. 1A) und Proteinexpression (Abb. 1B) durch TPA gezeigt werden. Die Induktion der Prx I mRNA durch TPA zeigte in RAW264.7 Zellen einen zeitabhängigen Verlauf mit einem Maximum bei 6 h (Abb. 1C). Weiterhin konnte für die durch TPA vermittelte Induktion der Prx I mRNA in RAW264.7 Zellen eine Dosisabhängigkeit beobachtet werden (Abb. 1D). Die TPA-abhängige Induktion der Prx I mRNA Expression wurde durch Vorbehandlung mit dem Transkriptioninhibitor Actinomycin D (AD) deutlich abgeschwächt (Abb. 1E). Die Ergebnisse zeigen, daß die Behandlung mit TPA die Prx I Genexpression in kultivierten Monozytenzellen transkriptional induziert.

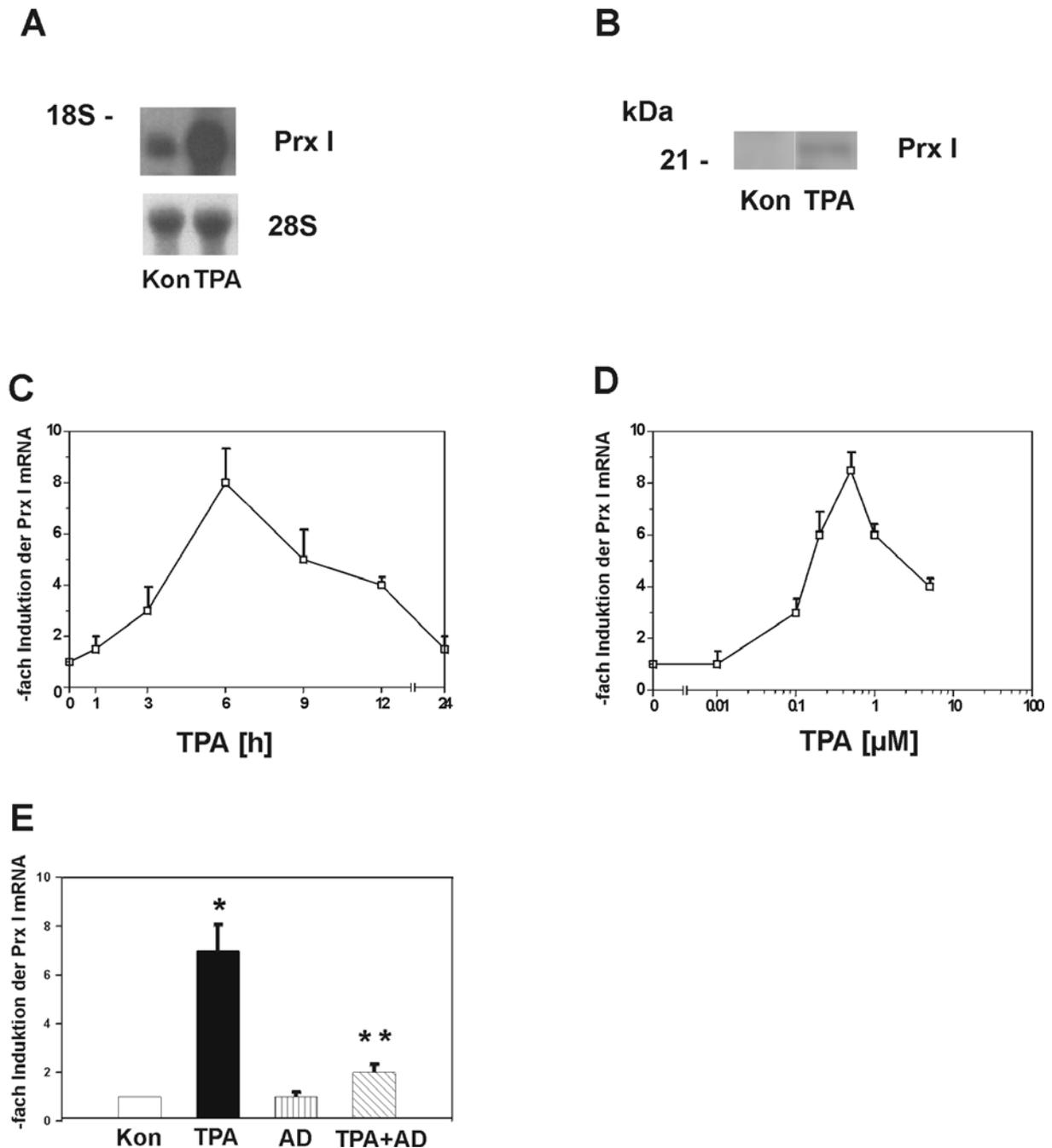


Abb. 1: Induktion der Prx I Genexpression durch TPA in kultivierten RAW264.7 Zellen

Die Kultivierung der RAW264.7 Zellen erfolgte wie unter Material und Methoden beschrieben. Vor Behandlung mit TPA wurden die Zellen für 18 h in serumfreiem Medium kultiviert. **(A)** RAW264.7 Zellen wurden 6 h unter Kontrollbedingungen (Kon) oder in Gegenwart von TPA (0.5 μM) (TPA) kultiviert. Gesamt-RNA (15 μg) wurde mittels Northern Blot Analyse untersucht. Die Blots wurden mit einer ³²P-markierten cDNA für Prx I und einem 28S rRNA Oligonukleotid hybridisiert. Als Größenmarker diente die 18S rRNA Bande. **(B)** RAW264.7 Zellen wurden 16 h unter Kontrollbedingungen (Kon) oder mit TPA (0.5 μM) inkubiert. Es wurden jeweils 50 μg

Protein mittels Western Blot Analyse untersucht. (A) und (B) zeigen Autoradiogramme repräsentativer Experimente. (C-E) RAW264.7 Zellen wurden (C) über verschiedene Zeitintervalle mit TPA (0.5 μ M), (D) für 6 h mit ansteigenden TPA-Konzentrationen behandelt oder (E) vor 6 h TPA-Behandlung (0.5 μ M) für 30 min mit AD (1 μ g/ml) vorbehandelt. Gesamt-RNA (15 μ g) wurde mittels Northern Blot Analyse wie unter (A) beschrieben untersucht. Die Autoradiogramme wurden mittels eines Phosphorimager quantifiziert, wobei das Signal der 28S rRNA Bande zur Normalisierung verwendet wurde. Die Werte \pm SEM repräsentieren die Mittelwerte der relativen Induktion der Prx I mRNA, die mit dem 28S rRNA Signal normalisiert wurden, von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student t-Test für gepaarte Werte: *, signifikanter Unterschied zwischen TPA und Kontrolle; **, signifikanter Unterschied zwischen AD+TPA und TPA, $p \leq 0.05$. AD, Actinomycin D; Kon, Kontrolle.

3.2 Klonierung des Promotors des Prx I Gens der Ratte und Identifikation möglicher regulatorischer Elemente (RE)

Um die molekularen Mechanismen der transkriptionalen Induktion der Prx I Genexpression durch TPA aufzuklären, wurden der Promotor und die proximale 5'-flankierende Region (1.75 kB) des Prx I Gens der Ratte kloniert und sequenziert (Abb. 2). Unter Verwendung der Gesamt-RNA von kultivierten RAW264.7 Zellen und Rattenhepatozyten konnte mittels Primer Extensions Analyse die Transkriptionsinitiationsstelle 48 bp upstream der Translationsinitiationsstelle des Prx I Gens lokalisiert werden (Daten nicht gezeigt).

Ein computergestützter Sequenzvergleich des klonierten Prx I Promotors der Ratte mit der Promotorregion des humanen Prx I pag Gens (Prosperi et al., 1993) zeigte keine Sequenzhomologien. Eine TATA-Box konnte an Position -62 relativ zur Transkriptionsinitiationsstelle lokalisiert werden (Abb. 2). Putative REs des Prx I Promotors, welche die TPA-abhängige Induktion der Prx I Genexpression vermitteln könnten, wurden mittels Sequenzvergleich der 5'-flankierenden Promotorregion des Prx I Gens mit DNA-Konsensussequenzen bekannter TFs identifiziert. Es konnten drei potentielle AP-1 Bindungsstellen und eine Konsensussequenz für den Nukleären Faktor- κ B (NF- κ B) innerhalb der klonierten Promotorregion identifiziert werden (Abb. 2), deren regulatorische Rolle für die TPA-abhängige Induktion der Prx I Genexpression untersucht wurde. Weiterhin zeigte sich, daß die erweiterte DNA-Sequenz der AP-1-A Stelle hohe Sequenzhomologie (10 von 12 Nukleotiden) mit der

Konsensussequenz des Antioxidant Response Element (ARE) hatte, welche eine nukleäre Bindungsstelle für den TF Nrf2 darstellt (Abb. 3). Es konnte vor kurzem gezeigt werden, daß Nrf2 bei der Induktion der Prx I Genexpression durch oxidativen Stress eine wichtige regulatorische Rolle spielt (Ishii et al., 2000).

AP-1

-1750 CTGTG**TTAGT** CAGTGTGGGA GCCGAGCGCG CTGGCTCTAT TGTTACACTG AGGTAATTAA

-1690 TTATACGTCG TCGTCGCTGC TCTCCCCTG CTCCGCGTAC TTCCTAGGT TGATGTGGAG

-1630 ATCAGCGAGA TAATGAACGT TCTCTTCCAA GACCCAGACA ACTGCAAATT ACATTATCAT

-1570 TAACGGTATC AGCAGAAGCA ATGAAATAAA GAAAAACGCA GCTAATATTT TTCTCACACC

-1510 CACTGCTGTG TGT**TTGTCAA** AGGCAATAAC AGTTTATCCT GTTGAGTGGG GAGAAGAGGA

AP-1

-1450 AGTCAACCAT TGTGATGTCC CAGGAACTGT **GATTCATGGC** TGTCACCCAG TGCTGCCCGG

-1390 TCCAGGGAAG AGGAGAGAAA ATGACCCTGA ATTTTCATTC TTCCTGCACC CATCTATGG

-1330 CTGTGTGGTT TTTATGCCCT CACCTTTTTT CAGTTGTGTC CAGTCTCCGC CAGAACGCCT

-1270 CTAATCCTTG AGCTTTTCGG TCGTATGTT TGTGCTTTT GAGGTTTGGG ACAGTTTGGT

-1210 ACATAGCAAA AAGCAAACCT TCACAAACGT CTAAGGACTC TTCCAACAAT ATCCAGGTCT

-1150 GTAAACGATG CTACCATCAC TTGGATCCAC GAATCCAGTG AGACCCGGGA CAGCCGTTC

-1090 CTTGAGCATC CAAAGGGACT TGAAAGAATG GTCACATGAG TGACATCTAA TGA**CTGCGAG**

NF-κB

-1030 ACCCT**TGGGA** **CTCTCT**GGGT CTGGTTTTCA TCTGTAAAAT GGGACTAAGA ATATGATTGG

AP-1

-970 AGG**TTACTCA** CCCGCTAGTC TCATCTGAAG GAAAAAGGGA TGTGAGACTT TAGAGTGT**TT**

-910 CTGGGCTCCC TTTGTTCTGT CTCACTTCTT CGCTCCTTCT CCAAGTTGCT AGCCTTCTGT

AP-1-C

-850 TGCTGTAACA CAGCACCTTG **GTGAGTCA**GT GTATAAAAAG GAAAGGTTTA TTTTGGCTCG

-790 CAGCTTTTGC AGGCTTCAGT CTATGATGGG TTAGCCTGCT GTTTGGGTGG TGTGGTGAAA

-730 AGGTACACTG TGGAGAAGGC ACGTAGCAGG GGAAACTGTT CATGTCATGG TGTTCAGCAA

-670 ACACCATGGG GTCGGGTCCC AGTATTCCTT TCAAGAACAA ACCCCAGTG ACCTAACTTC

-610 TTCCAGTAG GAACCTTTAA AGGTTCCCTT GTCCGCAAGG TAACTAAACT GAAAGAGACT

AP-1-B

-550 TTTGGGGGAC ATCTATGCAA GCTGTAGCAC AGAGACTATG ACTCCT**TGACT** CAAAAGCTTA

-490 TTCTAAAGTG CAGGGTCCTA GAAGAAAAAG CAGAAATGGA GGATGACTCT AAGACTTCCG

-430 CTCTCCCATG TCCTTACCAC GCTCCAGGTA TCGGGCTAAG CTTTGGCATT CTGCACTTTA

-370 TCTTACAAAT GGGGAAACCA ATACTCTCTC CATGCAGTTG TAAGGGAAGA GGAGGGAAGA

-310 TGCCCGCTTT GGTGTTGAT GACAGTGGCA GGGCCAGGAG ACCTAATGGA TGAGGGTTAG

AP-1-A

-250 GAGGCAAGAG GGGTGGGAAC AGAGATGACA GAGACAGGGT **GACTAAGACA** GGAAGACTGT

-190 GTGTATGGGC CCCAAGAGCT CATCGATGAG CAGTCGGAAC CCCTAGTGGG ATTCTGCAGC

-130 CAAGACCAGT GAAGCTCTTT TCCTTGTCGA GCTCCCGAGA CCTTCCTTTA GGTACAGTA

TATA-Box

-70 GTGGCTATTA **TAAAT**TATTA AATAGCTTTA AAAGGTAACA ATGCAGAAGC ACGTCTTCCC

→

-10 GCGTTCTCAC GGTGGTTCT GTTTGTGAGA CCTGTAGCTC GACTCTGCTG ATAGCAAG**ATG**

+1

Abb. 2: Darstellung der Nukleotidsequenz des Promotors des Prx I Gens der Ratte und potentieller Erkennungssequenzen für die TFs AP-1 und NF-κB

Die Nukleotide sind relativ zur Transkriptionsinitiationsstelle (+1), die durch einen Pfeil gekennzeichnet ist, nummeriert. Die Initiationsstelle für die Translation ist durch die fett hervorgehobene Sequenz ATG dargestellt. Die TATA-Box und Nukleotidsequenzen mit hoher Homologie zu DNA Konsensussequenzen der TFs AP-1 und NF-κB sind ebenfalls fett hervorgehoben. Zusätzlich sind die drei genauer untersuchten AP-1 Stellen AP-1-A, AP-1-B und AP-1-C unterstrichen. AP-1, Aktivator Protein-1; NF-κB, nukleärer Faktor-κB.

AP-1 Konsensus	TGACTCA
	: : : : :
PrxI AP-1-A	5`-GG TGACTAA GAC-3`
	: : : : : :
ARE Konsensus	5`-GG TGACNNN GCA-3`

Abb. 3: Sequenzvergleich der AP-1-A Stelle des Prx I Promotors mit den Konsensussequenzen von AP-1 und ARE

Die DNA-Sequenz der AP-1-A Stelle des Prx I Promotors ist vergleichend zu den bekannten Konsensussequenzen von AP-1 und des ARE gezeigt. Homologe Basen der AP-1-A Stelle und der AP-1 Konsensussequenz sind in Fettdruck markiert. Homologe Basen der AP-1-A Stelle und des ARE sind markiert. N = G, A, T, C; AP-1, Aktivator Protein-1; ARE, Antioxidant Response Element.

3.3 Funktionelle Rolle der proximalen AP-1 Sequenzen für die TPA-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität

Um die funktionelle Relevanz putativer REs für die TPA-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität festzustellen, wurden das Reporter-genkonstrukt pPrx1750 und weitere 5`-seriell deletierte Prx I Reporter-genkonstrukte transient in RAW264.7 Zellen transfiziert und die TPA-abhängige Induktion der Reporter-genaktivität im Vergleich zu der von pGL3-Basic gemessen (Abb. 4A). Hierbei wurde die Reporter-genaktivität von pPrx1750 durch TPA 9-fach induziert und die stärkste TPA-abhängige Hochregulation der Luciferaseaktivität wurde für das Reporter-genkonstrukt pPrx558 mit den AP-1-A und AP-1-B Stellen festgestellt (15-fach) (Abb. 4A). Die Deletion der AP-1-A Stelle zwischen pPrx283 und pPrx127

fürte zu einer deutlichen Reduktion der TPA-abhängigen Heraufregulation der Reporterogenaktivität (Abb. 4A).

Um die funktionelle Bedeutung der drei AP-1 Sequenzen für die TPA-abhängige Induktion der Prx I Gentranskription aufzuklären, wurden Reportergenplasmide verwendet, in denen die DNA-Sequenzen der AP-1 Stellen des Prx I Promotors in das Reporterplasmid pGL3-Prom vor einen heterologen SV40 Promotor kloniert wurden. Die DNA-Sequenzen wurden in 5`-3`- bzw. 3`-5`-Richtung in den Vektor pGL3-Prom kloniert und die TPA-abhängige Induktion dieser pGL3-Prom-Reporterkonstrukte wurde mit dem Reportergenplasmid pPrx887 verglichen, welches den Prx I Wildtyp-Promotor mit allen drei AP-1 Sequenzen (AP-1-A bis C) enthielt (Abb. 4B). Die stärkste Induktion der Luciferaseaktivität wurde für das Konstrukt pPrx282/108 mit der AP-1-A Sequenz beobachtet, während die Luciferaseaktivität von pPrx897/668 mit der AP-1-C Sequenz durch TPA nicht verändert wurde (Abb. 4B).

A

Prx I Promotorkonstrukt	Luciferaseaktivität [-fach Induktion]	
	Kon	TPA
		
pPrx1750 -1750 // ● ● ● +24 Luc	1	9 ± 1.5 *
pPrx1209 -1209 // ● ● ● +24 Luc	1	8 ± 1.2 *
pPrx897 -897 // ● ● ● +24 Luc	1	7 ± 1.0 *
pPrx558 -558 ● ● ● +24 Luc	1	14 ± 1.5 *
pPrx283 -283 ● ● ● +24 Luc	1	8 ± 0.5 *
pPrx127 -127 ● ● ● +24 Luc	1	1.5 ± 0.2
pGL3-Basic +24 Luc	1	1.5 ± 0.2

B

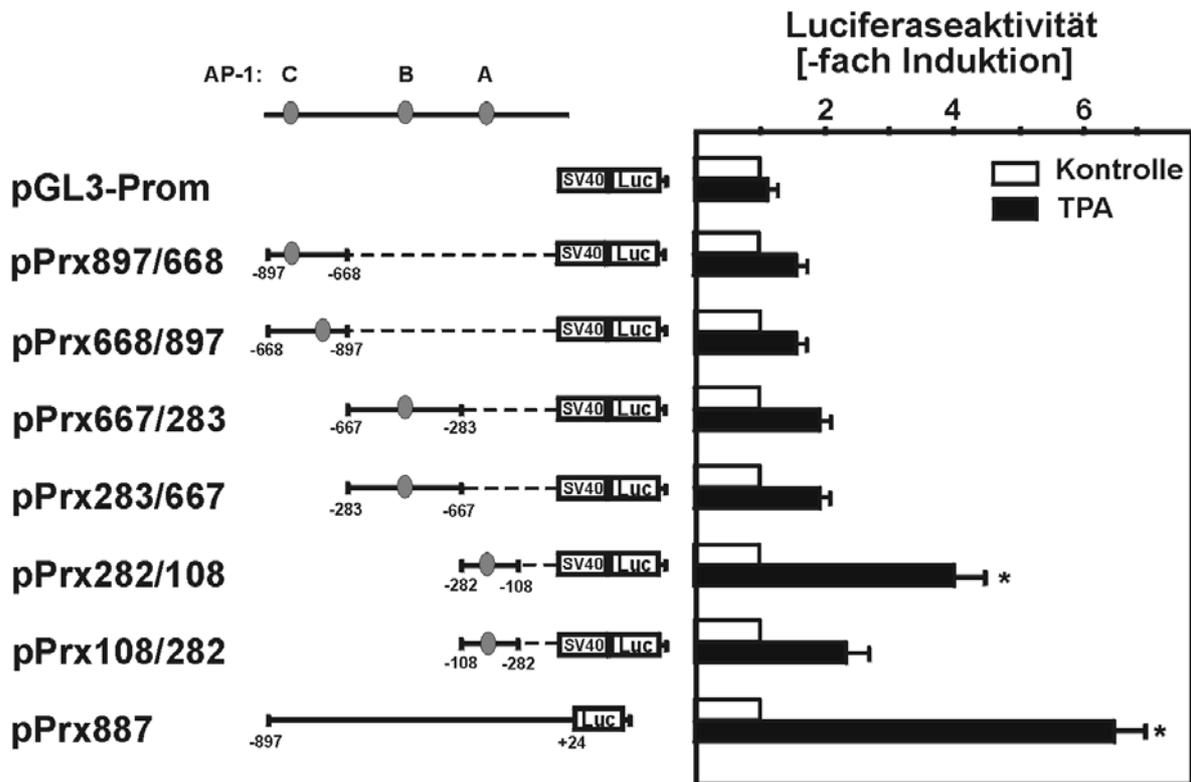


Abb. 4: Identifizierung von TPA-regulierten AP-1 Sequenzen innerhalb der proximalen Promotorregion des Prx I Gens

Die dargestellten Prx I Promotorsequenzen wurden (A) in das Plasmid pGL3-Basic mit dem Luciferasereporter gen oder (B) in 5'-3'- bzw. in 3'-5'-Richtung in das Reporterplasmid pGL3-Prom vor einen heterologen SV40 Promotor kloniert. Die Lokalisation der AP-1 Sequenzen AP-1-A, AP-1-B und AP-1-C im Prx I Promotor ist hervorgehoben. Diese Reporter genkonstrukte wurden transient in kultivierte RAW264.7 Zellen transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 16 h in Kontrollmedium oder in mit TPA (0.5 μ M) versetztem Medium kultiviert. Es ist die relative Induktion der Luciferaseaktivität der Reporter genkonstrukte durch TPA im Vergleich zur Kontrolle gezeigt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student t-Test für gepaarte Werte: *, signifikanter Unterschied zwischen TPA und Kontrolle, $p \leq 0.05$. Luc, Luciferasereporter gen; SV40, Simian Virus Promotor.

Die funktionelle Rolle der AP-1-A und AP-1-B Sequenzen für die TPA-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität wurde auch mittels Mutationsanalysen untersucht. Hierfür wurden gezielte Punktmutationen innerhalb der AP-1-A und AP-1-B Sequenzen des Reporter genplasmids pPrx558 generiert. Es zeigte sich, daß die TPA-abhängige Induktion der Promotoraktivität der Mutante pPrx558mutB im Vergleich zu dem Wildtyp pPrx558 leicht reduziert wurde (Abb. 5). Eine noch

stärkere Reduktion der TPA-abhängigen Induktion im Vergleich zu pPrx558 ließ sich für die beiden Mutanten pPrx558mutA und pPrx558mutAB beobachten (Abb. 5). Die TPA-abhängige Induktion der Promotoraktivität von pPrx558 wurde auch mit dem Luciferasereportergenplasmid pAP-1luc (Carter et al., 2001) verglichen, das sechs Kopien der AP-1 Konsensussequenz enthielt (Abb. 5). Hierbei konnte eine deutlich stärkere Induktion von pPrx558 durch TPA im Vergleich zu pAP-1luc beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen, daß die AP-1-A Stelle des Prx I Promotors von entscheidender funktioneller Bedeutung für die Induktion der Prx I Promotoraktivität durch TPA ist.

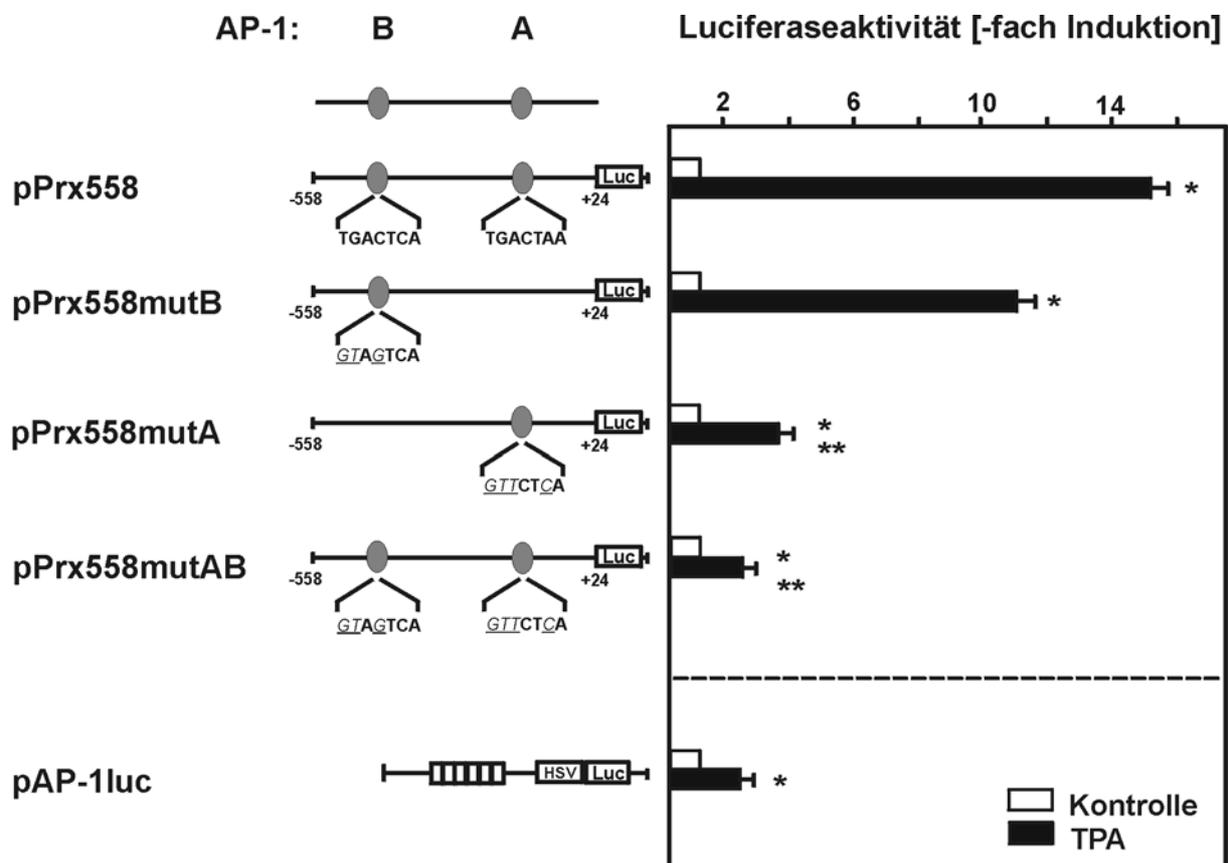


Abb. 5 : TPA-abhängige Regulation der AP-1-A und AP-1-B Sequenzen des Prx I Promotors

Durch Einführung gezielter Punktmutationen innerhalb der AP-1-A und AP-1-B Sequenzen des Prx I Promotorkonstrukts pPrx558 wurden verschiedene pPrx558-Mutanten hergestellt. Die Punktmutationen innerhalb der AP-1-A und AP-1-B Sequenzen sind unterstrichen und kursiv dargestellt. Diese pPrx558

Reportergergenkonstrukte und ein Luciferasereportergergenplasmid mit sechs Kopien des AP-1-Konsensusmotivs (pAP-1luc, Carter et al., 2001) wurden jeweils transient in kultivierte RAW264.7 Zellen transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 16 h in Kontrollmedium oder in mit TPA (0.5 μ M) versetztem Medium kultiviert. Es ist die relative Induktion der Luciferaseaktivität durch TPA im Vergleich zur Kontrolle gezeigt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten. Statistik: Student t-Test für gepaarte Werte: *, signifikanter Unterschied zwischen pPrx558+TPA und pPrx558, pPrx558mutB+TPA und pPrx558mutB, pPrx558mutA+TPA und pPrx558mutA, pPrx558mutAB+TPA und pPrx558mutAB, pAP-1luc+TPA und pAP-1luc; **, signifikanter Unterschied zwischen pPrx558mutA+TPA und pPrx558+TPA, pPrx558mutAB+TPA und pPrx558+TPA, $p \leq 0.05$. HSV, Herpes Simplex Virus Promotor; Luc, Luciferasereportergergen.

3.4 Induktion der Prx I Promotoraktivität durch Überexpression von c-Jun

AP-1 besteht aus Homodimeren von Jun oder aus Heterodimeren von Jun und Proteinen der Fos- und ATF2-Familie und gehört zur Gruppe der Basic Leucine Zipper TFs (Karin et al., 1997). Um die mögliche Regulation der Prx I Promotoraktivität durch c-Jun zu untersuchen, wurden RAW264.7 Zellen mit verschiedenen Prx I Reportergergenkonstrukten und einem Expressionsvektor für eine dominant-negative Mutante von c-Jun kotransfiziert. Dabei zeigte sich, daß die TPA-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität durch Überexpression der dominant-negativen c-Jun-Mutante herabreguliert wurde (Abb. 6A). Im Gegensatz dazu verstärkte die Überexpression von Wildtyp c-Jun die TPA-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität (Abb. 6B). Die Promotoraktivität des Reportergergenkonstrukts pPrx558mutAB mit Punktmutationen in dem AP-1-A und dem AP-1-B Element wurde durch Überexpression von Wildtyp c-Jun kaum verändert (Abb. 6C).

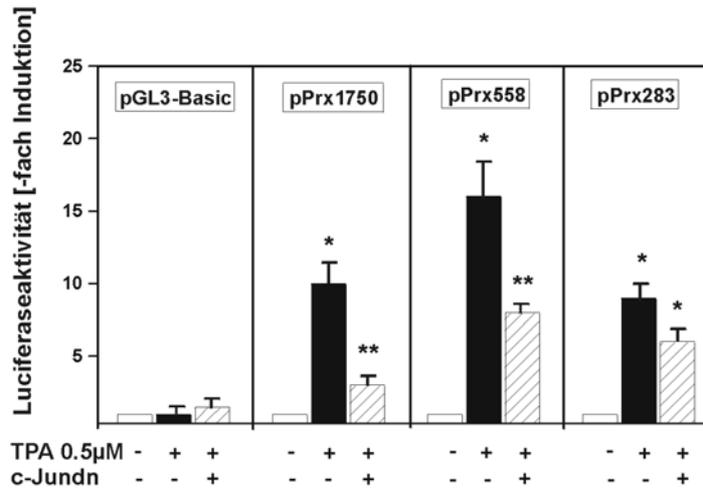
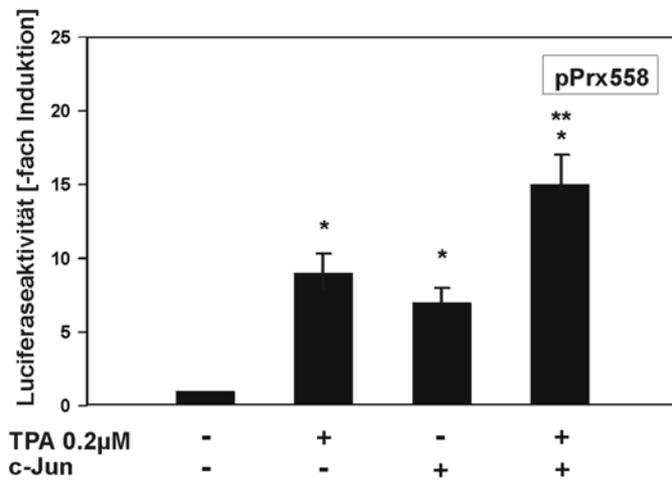
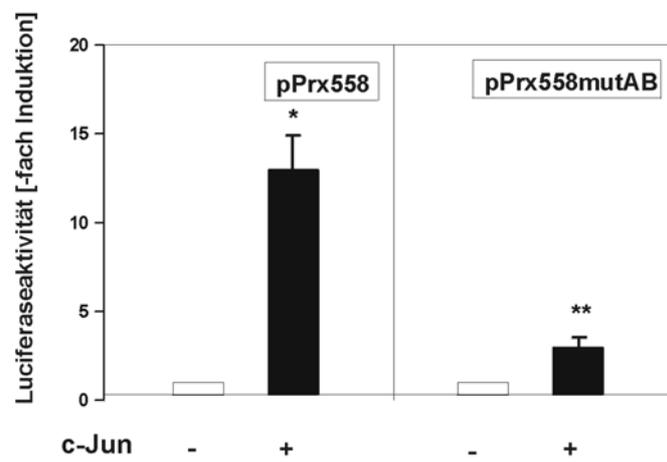
A**B****C**

Abb. 6: Effekt von c-Jun auf die TPA-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität

(A) RAW264.7 Zellen wurden mit verschiedenen Prx I Promotorkonstrukten oder pGL3-Basic und einem Leervektor oder einem Expressionsvektor für eine dominant-negative Form von c-Jun kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 16 h in Kontrollmedium oder in mit TPA (0.5 μ M) versetztem Medium kultiviert. Es ist die relative Induktion der Luciferaseaktivität durch TPA im Vergleich zur Kontrolle gezeigt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student t-Test für gepaarte Werte: *, signifikanter Unterschied zwischen TPA und Kontrolle; **, signifikanter Unterschied zwischen TPA+c-Jun und TPA, $p \leq 0.05$. **(B)** RAW264.7 Zellen wurden mit dem Reportergenkonstrukt pPrx558 und einem Leervektor oder einem Expressionsvektor für c-Jun kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 16 h in Kontrollmedium oder in mit TPA (0.2 μ M) versetztem Medium kultiviert. Es ist die relative Induktion der Luciferaseaktivität durch TPA im Vergleich zur Kontrolle gezeigt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student t-Test für gepaarte Werte: *, signifikanter Unterschied zwischen TPA und Kontrolle, c-Jun und Kontrolle, TPA+c-Jun und Kontrolle; **, signifikanter Unterschied zwischen TPA+c-Jun und c-Jun, $p \leq 0.05$. **(C)** RAW264.7 Zellen wurden mit den Prx I Reportergenkonstrukten pPrx558 oder pPrx558mutAB und einem Leervektor oder einem Expressionsvektor für c-Jun kotransfiziert. 24 h nach der Kotransfektion wurde die Luciferaseaktivität gemessen und es ist die relative Induktion der Luciferaseaktivität durch c-Jun im Vergleich zur Kontrolle gezeigt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student t-Test für gepaarte Werte: *, signifikanter Unterschied zwischen pPrx558+c-Jun und pPrx558; **, signifikanter Unterschied zwischen pPrx558mutAB+c-Jun und pPrx558+c-Jun, $p \leq 0.05$. c-Jun^{dn}, dominant-negative Form von c-Jun.

Das erweiterte AP-1-A Element hat hohe Sequenzhomologie mit dem Konsensusmotiv des ARE (Abb. 3), das als nukleäre Bindungsstelle für den TF Nrf2 dient (Alam et al., 1999; Nguyen et al., 2003). Um den möglichen Effekt von Nrf2 auf die Prx I Promotoraktivität zu untersuchen, wurden RAW264.7 Zellen mit Prx I Reportergenkonstrukten und Expressionsvektoren für Nrf2 oder einer dominant-negativen Form von Nrf2 kotransfiziert. Die Überexpression von Nrf2 hatte keinen Einfluß auf die basale oder die TPA-abhängige Promotoraktivität der Reportergenkonstrukte pPrx1750 und pPrx558 (Abb. 7A). Weiterhin wurde die TPA-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität durch Überexpression einer dominant-negativen Form von Nrf2 nicht beeinflusst (Abb. 7B). Diese Ergebnisse zeigen, daß c-Jun im Gegensatz zu Nrf2 an der TPA-abhängigen Induktion der Prx I Promotoraktivität beteiligt ist.

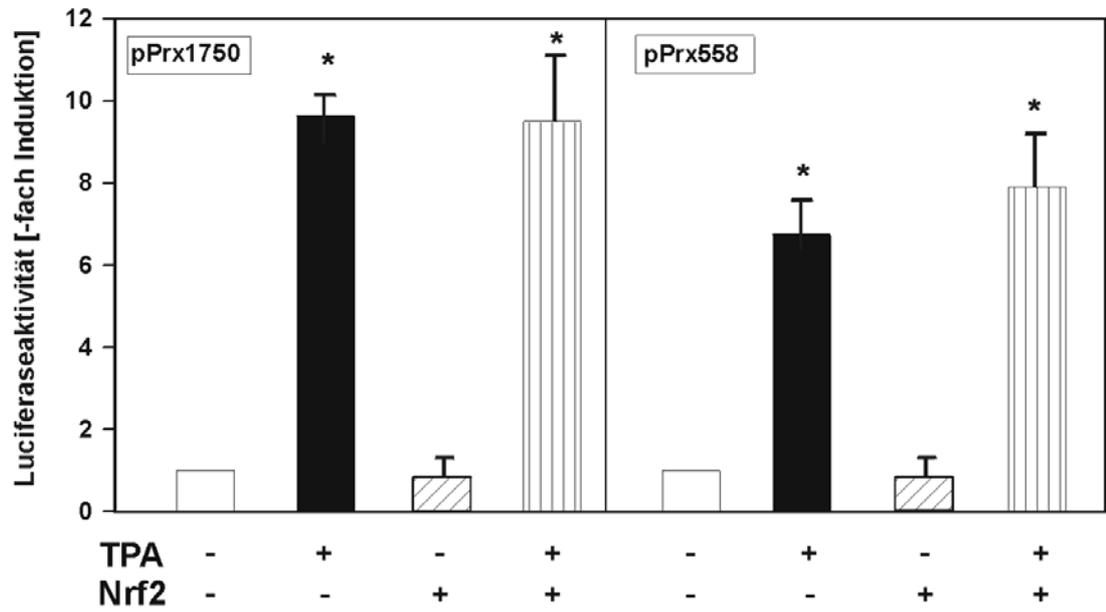
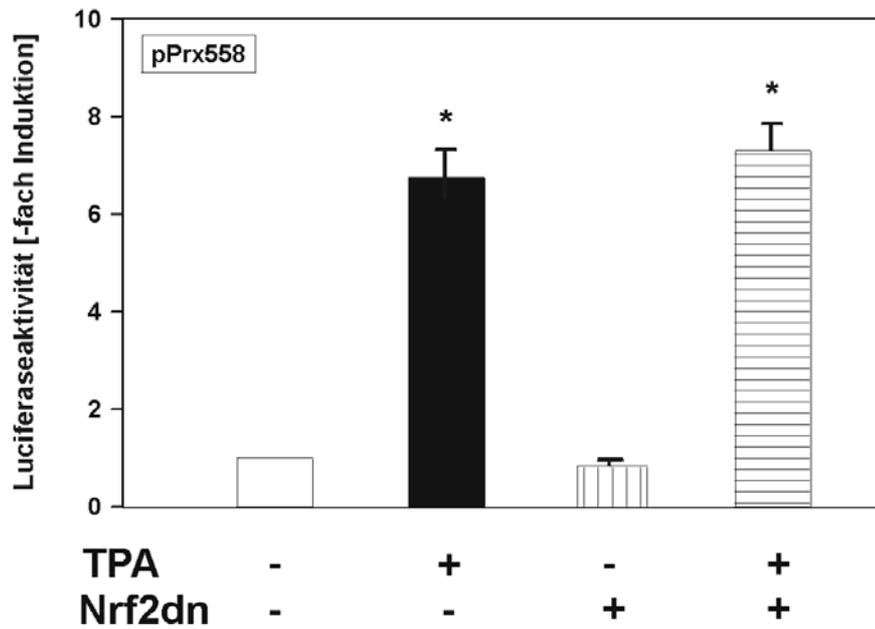
A**B**

Abb.7: Effekt der Überexpression von Nrf2 auf die TPA-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität

(A) RAW264.7 Zellen wurden mit den gezeigten Prx I Promotorkonstrukten und einem Leervektor oder einem Expressionsvektor für Nrf2 kotransfiziert. 24 h nach der

Transfektion wurden die Zellen für 16 h in Kontrollmedium oder in mit TPA (0.5 μ M) versetztem Medium kultiviert. Es ist die relative Induktion der Luciferaseaktivität durch TPA im Vergleich zur Kontrolle gezeigt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student t-Test für gepaarte Werte: *, signifikanter Unterschied zwischen TPA und Kontrolle, $p \leq 0.05$. (B) RAW264.7 Zellen wurden mit dem pPrx558 Promotorkonstrukt und einem Leervektor oder einem Expressionsvektor für eine dominant-negative Form von Nrf2 kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 16 h in Kontrollmedium oder in mit TPA (0.5 μ M) versetztem Medium kultiviert. Es ist die relative Induktion der Luciferaseaktivität durch TPA im Vergleich zur Kontrolle gezeigt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student t-Test für gepaarte Werte: *, signifikanter Unterschied zwischen TPA und Kontrolle, $p \leq 0.05$. Nrf2dn, dominant-negative Form von Nrf2.

3.5 Spezifische Bindung von c-Jun an die AP-1-A Stelle des Prx I Promotors

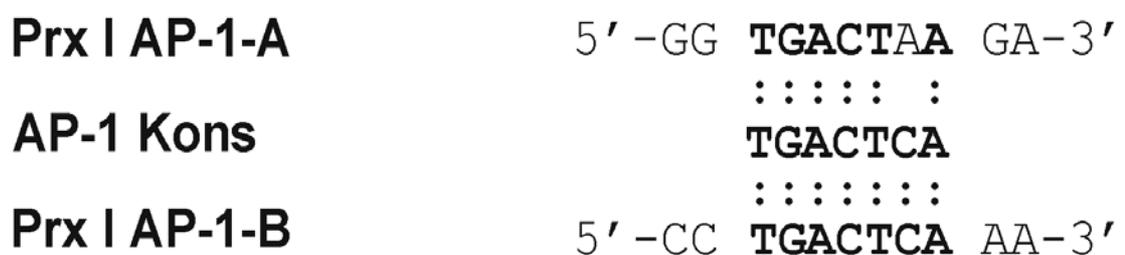
Mittels EMSA wurde die Bindung radioaktiv markierter Oligonukleotide mit der AP-1-A Sequenz oder der AP-1 Konsensussequenz (Abb. 8A) zu nukleären Proteinen von TPA-behandelten oder unbehandelten RAW264.7 Zellen verglichen (Abb. 8B). Das AP-1-A Oligonukleotid zeigte hierbei keine unterschiedliche Bindungsaffinität für nukleäre Extrakte (NE) von TPA-behandelten oder unbehandelten Zellen. Im Gegensatz dazu bildeten Oligonukleotide, die die AP-1 Konsensussequenz enthielten, mit NE TPA-behandelter Zellen einen stärkeren DNA-Protein-Komplex, als mit NE unbehandelter Zellen (Abb. 8B). Ein 20-facher Überschuss von nicht radioaktiv markiertem AP-1-A Oligonukleotid führte zu einem Verschwinden der DNA-Protein-Bande des radioaktiv-markierten AP-1-A Oligonukleotids. Dagegen wurde die Intensität dieser Bande durch Zugabe eines 20-fachen Überschusses von nicht radioaktiv-markiertem Oligonukleotid mit einer gezielten Mutation innerhalb der AP-1-A Stelle (AP-1-Amut) nicht beeinflusst (Abb. 8C).

Die Zugabe eines Antikörpers gegen die N-terminale Domäne von c-Jun führte zur Ausbildung einer `Supershift`-Bande. Weiterhin bewirkte die Präinkubation mit einem Antikörper gegen die DNA-bindende Domäne von c-Jun eine Abschwächung der DNA-Protein-Bande (Abb. 8C). Keine Änderung der Signalintensität des AP-1-A DNA-Proteinkomplexes konnte hingegen durch Inkubation mit Antikörpern gegen die TFs cAMP RE-bindendes Protein oder SP-1 festgestellt werden (Daten nicht

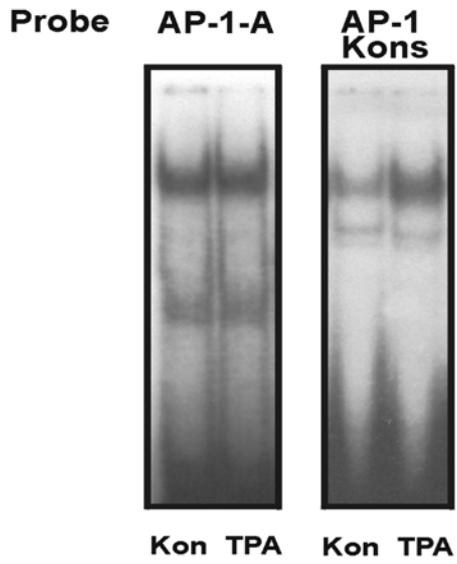
gezeigt). Die AP-1-A Stelle innerhalb des Prx I Promotors schien daher eine spezifische nukleäre Zielsequenz für c-Jun zu sein.

In den vorangegangenen Transfektionsstudien konnte gezeigt werden, daß die AP-1-B Stelle im Vergleich zur AP-1-A Stelle eine geringere funktionelle Relevanz für die TPA-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität aufwies (Abb. 4 u. 5). Um die Bindungsaffinitäten dieser beiden Prx I Promotorelemente für nukleäre Proteine zu vergleichen, wurden gleiche Mengen NE von RAW264.7 Zellen mit radioaktiv markierten AP-1-A oder AP-1-B Oligonukleotiden inkubiert. Hierbei bildete das AP-1-A Oligonukleotid mit den NE eine deutlich stärkere DNA-Protein-Bande als das AP-1-B Oligonukleotid, und ein 10-facher Überschuß von unmarkiertem AP-1-A führte zu einem Verschwinden des radioaktiv markierten AP-1-B DNA-Protein-Komplexes. Im Gegensatz dazu führte ein 10-facher Überschuß von unmarkiertem AP-1-B Oligonukleotid lediglich zu einer Signalabschwächung, nicht jedoch zu einem Verschwinden des radioaktiv-markierten AP-1-A DNA-Protein-Komplexes (Abb. 8D). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, daß das AP-1-A Element des Prx I Promotors offensichtlich eine höhere Bindungsaffinität für nukleäre Proteine von RAW264.7 Zellen aufweist, als das AP-1-B Element.

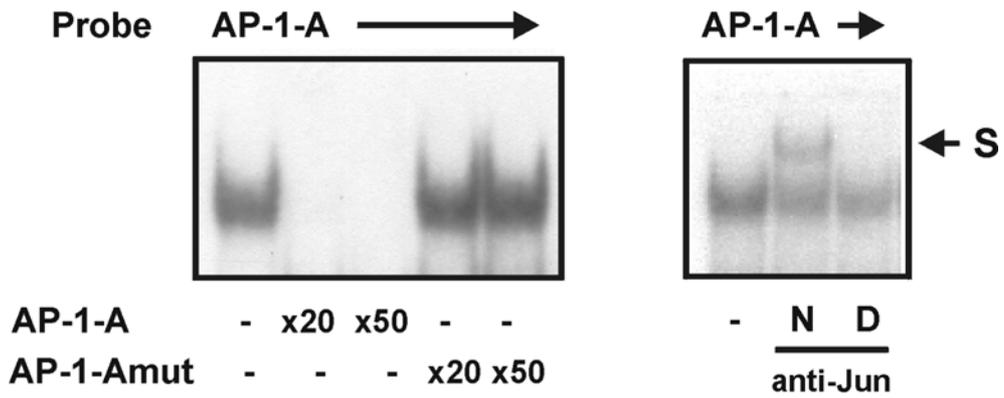
A



B



C



D

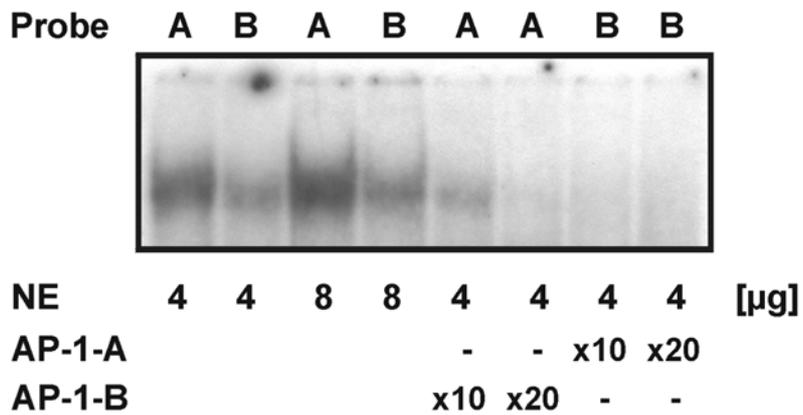


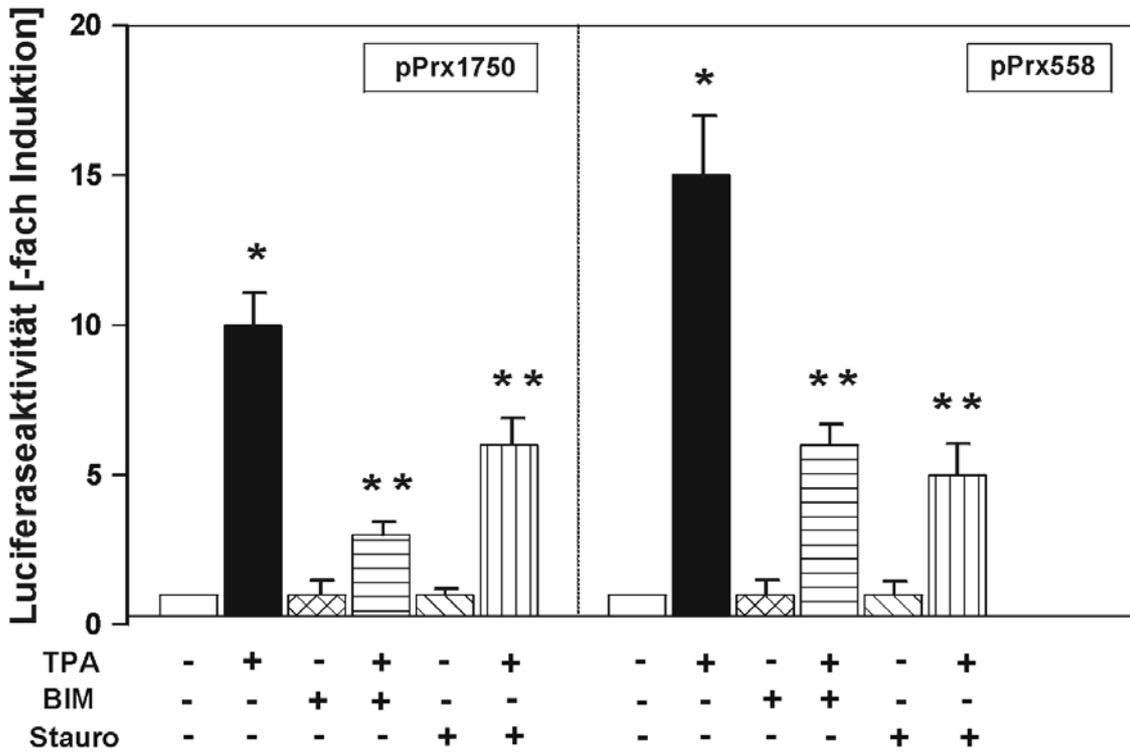
Abb. 8: Bindung nukleärer Proteine an die AP-1-A und AP-1-B Sequenzen des Prx I Promotors

(A) Die AP-1 Konsensussequenz und die Basensequenzen der AP-1-A und AP-1-B Stelle des Prx I Promotors sind dargestellt. Mit der AP-1 Konsensussequenz übereinstimmende Basen der AP-1-A und AP-1-B Stelle sind in Fettdruck markiert. (B) EMSA: ³²P-markierte Oligonukleotide der AP-1-A und AP-1 Konsensussequenz wurden mit 4 µg NE von TPA-behandelten (TPA) oder unbehandelten (Kon) RAW264.7 Zellen inkubiert. (C) Für Kompetitionsstudien wurde das radioaktiv markierte AP-1-A Oligonukleotid mit 4 µg NE von RAW264.7 Zellen und einem 20- oder 50-fachen Überschuß von nicht radioaktiv markiertem AP-1-A oder AP-1-Amut Oligonukleotid inkubiert (links). Zusätzlich wurden nukleäre Extrakte von RAW264.7 Zellen für 1 h bei 4 °C jeweils mit 1 µl eines Antikörpers gegen die N-terminale Domäne von c-Jun oder gegen die DNA-bindende Domäne von c-Jun präinkubiert, bevor das radioaktiv markierte AP-1-A Oligonukleotid hinzugegeben wurde (rechts). (D) Radioaktiv markierte AP-1-A bzw. AP-1-B Oligonukleotide wurden mit 4 oder 8 µg NE von RAW264.7 Zellen und einem 10- oder 20-fachen Überschuß von nicht radioaktiv markiertem AP-1-B bzw. AP-1-A Oligonukleotid inkubiert. Die DNA-Protein-Komplexe wurden elektrophoretisch auf 4.5% Polyacrylamidgelen aufgetrennt. AP-1 Kons, AP-1 Konsensussequenz; Kon, Kontrolle; D, Antikörper gegen die DNA-bindende Domäne von c-Jun; N, Antikörper gegen die N-terminale Domäne von c-Jun; NE, nukleäres Extrakt; S, Supershift.

3.6 TPA-abhängige Induktion der Prx I Genexpression über den Proteinkinase C-Signalweg

TPA aktiviert die PKC durch Interaktion mit der regulatorischen PKC-Domäne (Gopalakrishna et al., 2000). Um die Signalwege aufzuklären die an der TPA-abhängigen Induktion der Prx I Promotoraktivität beteiligt sind, wurde der Effekt der PKC-Inhibitoren Bisindolylmaleimid (BIM) und Staurosporin (Stauro) auf die TPA-abhängige Induktion der Prx I Genexpression untersucht. Beide Substanzen führten zu einer deutlichen Reduktion der TPA-abhängigen Induktion der Luciferaseaktivität der Reportergenplasmide pPrx1750 und pPrx558 (Abb. 9A). Weiterhin wurde der Einfluß von BIM und Stauro auf die TPA-abhängige Induktion der endogenen Prx I Genexpression mittels Northern Blot Analyse untersucht. Die Vorbehandlung mit BIM und Stauro hemmte die Induktion der Prx I mRNA durch TPA (Abb. 9B). Diese Ergebnisse zeigen, daß ein PKC-abhängiger Signalweg an der Induktion der Prx I Genexpression durch TPA beteiligt sein könnte.

A



B

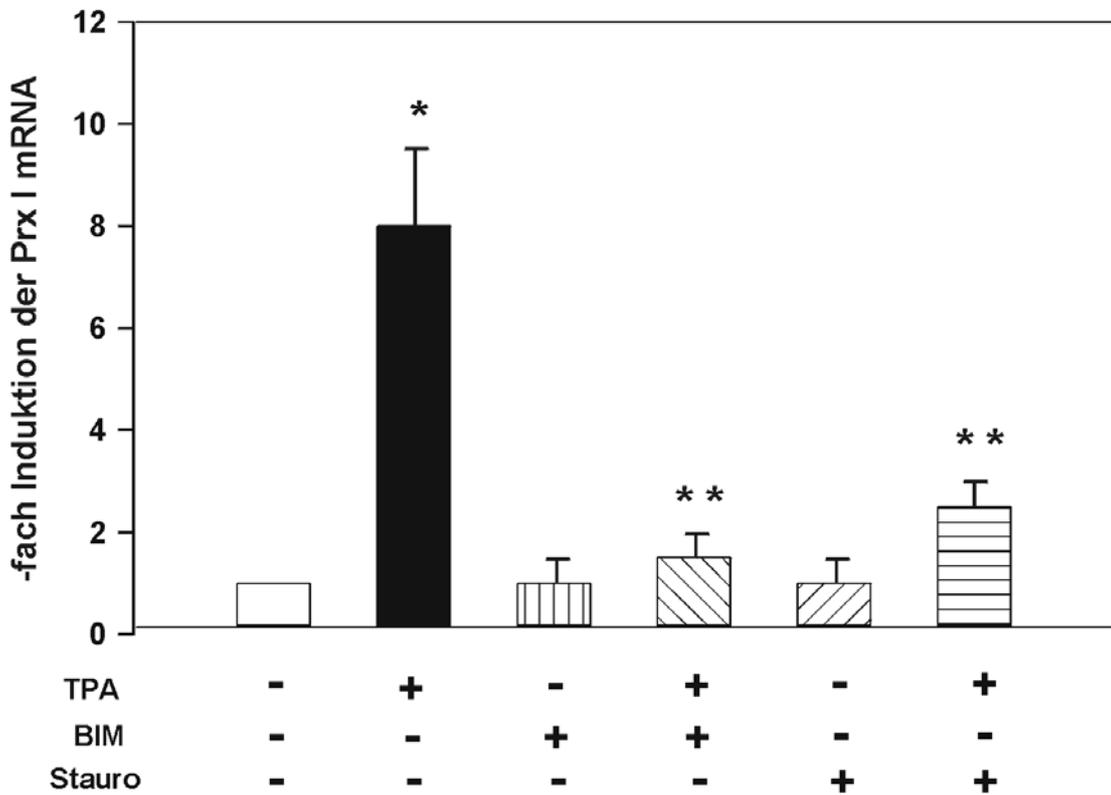


Abb. 9: Hemmung der TPA-abhängigen Induktion der Prx I Genexpression durch die PKC-Inhibitoren BIM und Stauro

(A) Die gezeigten Prx I Reportergenkonstrukte wurden transient in RAW264.7 Zellen transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 16 h in Kontrollmedium oder in mit TPA (0.5 μ M), BIM (0.5 μ M), Stauro (0.02 μ M), TPA + BIM oder TPA + Stauro versetztem Medium kultiviert. Die relative Induktion der Luciferaseaktivität unter den verschiedenen Bedingungen ist im Vergleich zur Kontrolle gezeigt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student t-Test für gepaarte Werte: *, signifikanter Unterschied zwischen pPrx1750+TPA und pPrx1750, pPrx558+TPA und pPrx558; **, signifikanter Unterschied zwischen pPrx1750+TPA+BIM und pPrx1750+TPA; pPrx1750+TPA+Stauro und pPrx1750+TPA; pPrx558+TPA+BIM und pPrx558+TPA; pPrx558+TPA+Stauro und pPrx558+TPA, $p \leq 0.05$. (B) RAW264.7 Zellen wurden für 18 h in serumfreiem Medium kultiviert und danach für 6 h in Kontrollmedium oder in mit TPA (0.5 μ M), BIM (0.5 μ M), Stauro (0.02 μ M), TPA+BIM oder TPA+Stauro versetztem Medium kultiviert. Die Gesamt-RNA wurde mittels Northern Blot Analyse untersucht. Die Blots wurden hierfür mit einer 32 P-markierten cDNA für Prx I und einem 28S rRNA Oligonukleotid hybridisiert. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM für die relative Induktion der Prx I mRNA, die mit dem 28S rRNA Signal normalisiert wurden, von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student t-Test für gepaarte Werte: *, signifikanter Unterschied zwischen TPA und Kontrolle; **, signifikanter Unterschied zwischen TPA+BIM und TPA, TPA+Stauro und TPA, $p \leq 0.05$. BIM, Bisindolylmaleimid; Stauro, Staurosporin.

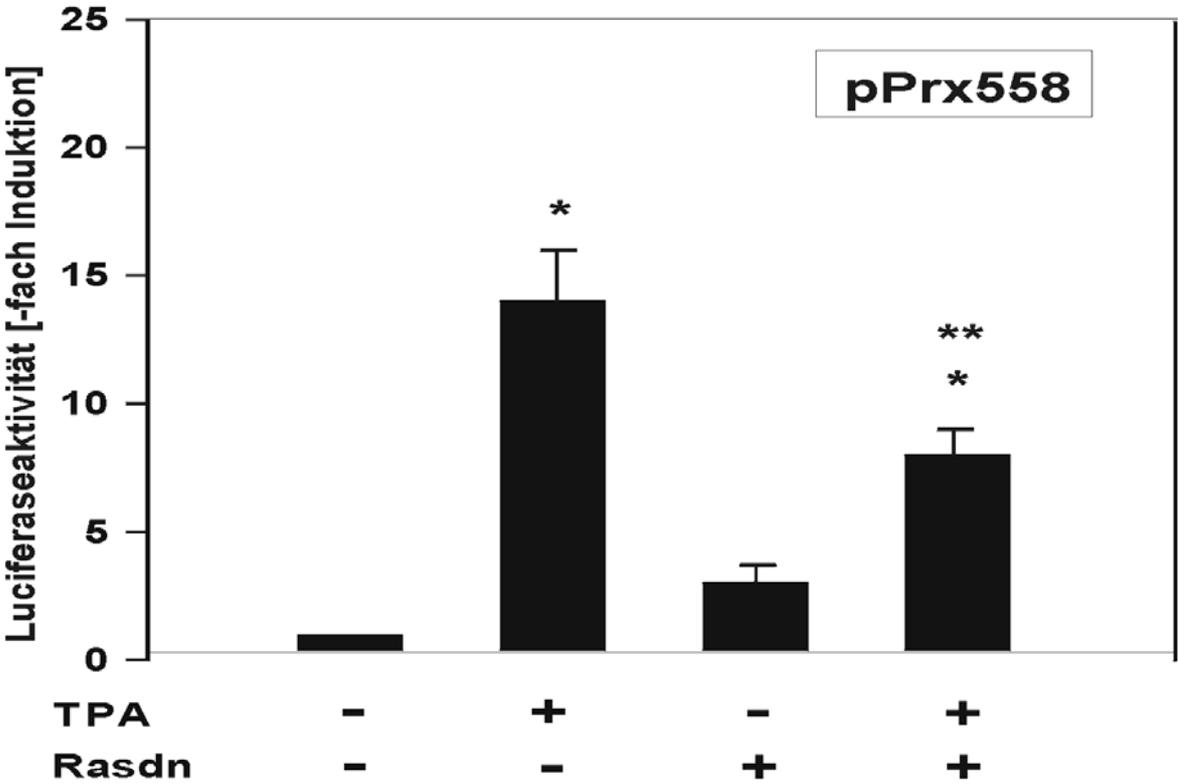
3.7 Rolle von Ras und MEKK1 für die TPA-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität

Ein regulatorisches Ziel der PKC stellt das niedermolekulare GTP-bindende Protein Ras dar (Rebollo et al., 1999). Zur Aufklärung einer möglichen Beteiligung von Ras an der Induktion der Prx I Genexpression durch TPA wurde in RAW264.7 Zellen der Einfluß von kotransfizierten Expressionsvektoren für dominant-negative und konstitutiv-aktive Isoformen von Ras auf die Induktion der Prx I Promotoraktivität durch TPA untersucht. Die TPA-abhängige Induktion der pPrx558 Promotoraktivität wurde durch überexprimiertes dominant-negatives Ras gehemmt (Abb. 10A). Die Überexpression einer konstitutiv-aktiven Isoform von Ras verstärkte die Luciferaseaktivität von pPrx558 (Abb. 10B).

Weiterhin wurde der Effekt der Ras-Effektormoleküle Raf-1 und MEKK1 auf die Prx I Promotoraktivität in RAW264.7 Zellen untersucht. Die Überexpression einer dominant-negativen Isoform von Raf-1 hatte keinen Einfluß auf die Ras-abhängige Heraufregulation der Prx I Genexpression (Abb. 10B), während die Überexpression

einer dominant-negativen Form von MEKK1 die Ras-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität herabregulierte (Abb. 10B). Im Folgenden wurde der Effekt von MEKK1 auf die basale Prx I Promotoraktivität untersucht. Kotransfektion eines Expressionsvektors für MEKK1 führte zu einer deutlichen Zunahme der Promotoraktivität von pPrx558 (Abb. 10C). Im Gegensatz dazu hatte die Überexpression einer konstitutiv-aktiven Isoform von Raf-1 keinen Effekt auf die Promotoraktivität von pPrx558 (Abb. 10C). Diese Ergebnisse zeigen, daß Ras und MEKK1 an der TPA-abhängigen Induktion der Prx I Promotoraktivität beteiligt sind.

A



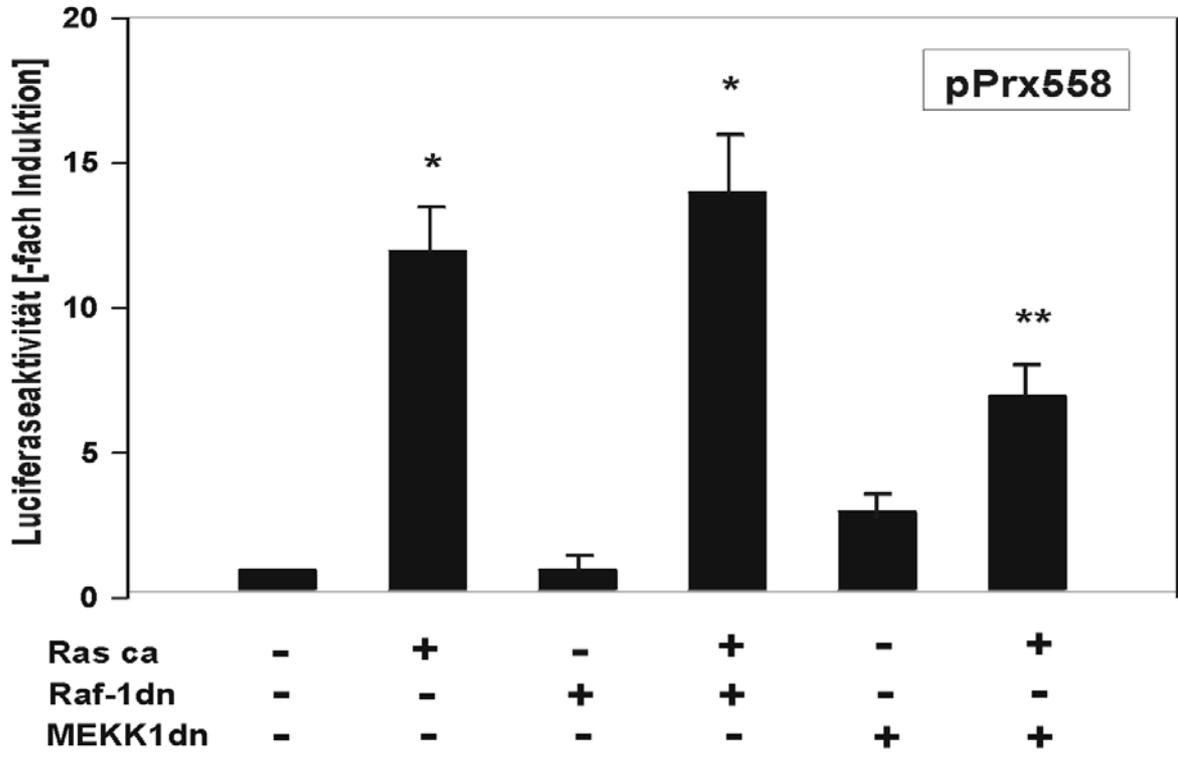
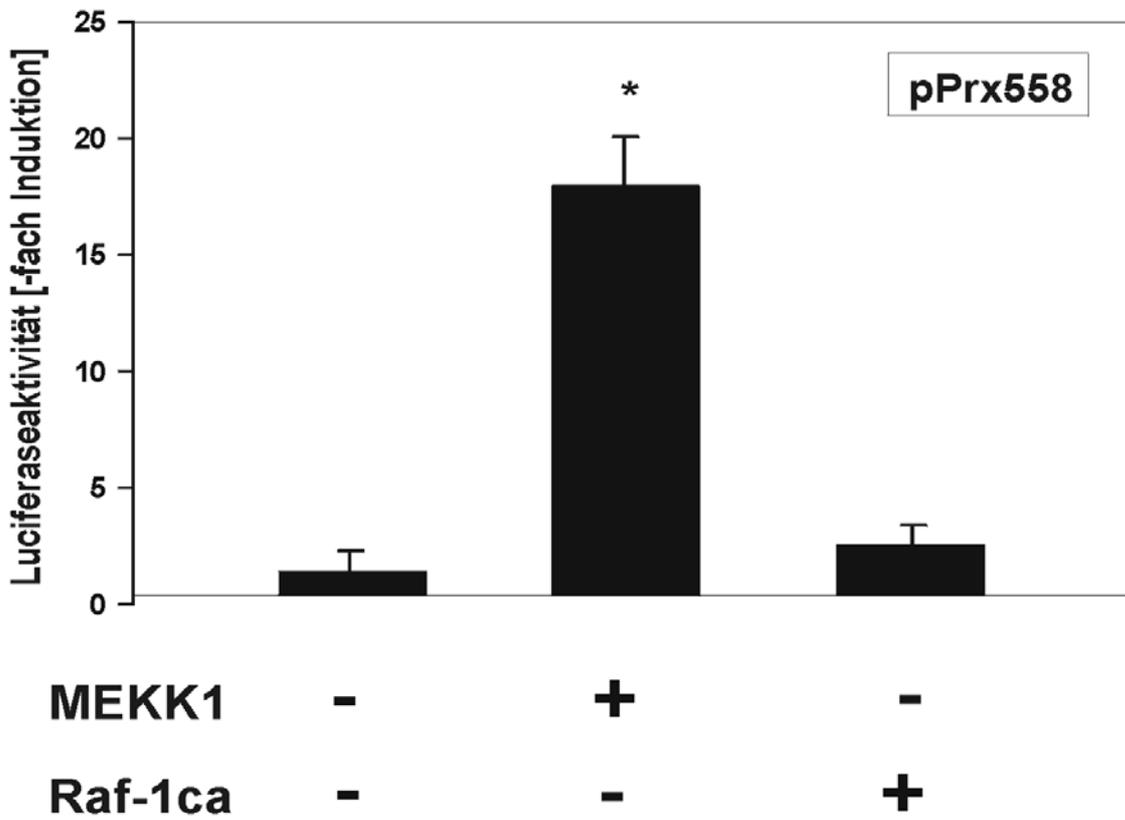
B**C**

Abb. 10: Regulation der Prx I Promotoraktivität durch Überexpression von Ras, Raf-1 und MEKK1

(A) RAW264.7 Zellen wurden mit pPrx558 und einem Expressionsvektor für eine dominant-negative Form von Ras oder einem entsprechenden Leervektor kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 16 h in Kontrollmedium oder in mit TPA (0.5 μ M) versetztem Medium kultiviert. Es ist jeweils die relative Induktion der Luciferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle gezeigt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student t-Test für gepaarte Werte: *, signifikanter Unterschied zwischen TPA und Kontrolle, TPA+Rasdn und Kontrolle; **, signifikanter Unterschied zwischen TPA+Rasdn und TPA, $p \leq 0.05$. **(B)** RAW264.7 Zellen wurden mit pPrx558 und einem Expressionsvektor für eine konstitutiv-aktive Form von Ras oder einem entsprechenden Leervektor und einem Expressionsvektor für eine dominant-negative Form von Raf-1 oder MEKK1 kotransfiziert. Es ist die relative Induktion der Luciferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle gezeigt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student t-Test für gepaarte Werte: *, signifikanter Unterschied zwischen Ras ca und Kontrolle, Ras ca+Raf-1dn und Raf-1dn; **, signifikanter Unterschied zwischen Ras ca+MEKK1dn und Ras ca, $p \leq 0.05$. **(C)** RAW264.7 Zellen wurden mit pPrx558 und Expressionsvektoren für MEKK1 oder einer konstitutiv-aktiven Form von Raf-1 oder entsprechenden Leervektoren kotransfiziert. Es ist die relative Induktion der Luciferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle gezeigt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student t-Test für gepaarte Werte: *, signifikanter Unterschied zwischen MEKK1 und Kontrolle, $p \leq 0.05$. MEKK1dn, dominant-negative Form von MEKK1; Raf-1ca, konstitutiv-aktive Form von Raf-1; Raf-1dn, dominant-negative Form von Raf-1; Ras ca, konstitutiv-aktive Form von Ras; Rasdn, dominant-negative Form von Ras.

3.8 Aktivierung von MAPKs durch TPA in RAW264.7 Zellen

Es ist bekannt, daß die MEKK1 die MAPKs c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und p38 aktiviert (Kyriakis und Avruch, 2001). Um eine mögliche Beteiligung dieser MAPKs an der TPA-abhängigen Induktion der Prx I Genexpression festzustellen, wurden RAW264.7 Zellen unterschiedlich lange mit TPA (0.5 μ M) behandelt. Mittels Western Blot Analyse wurde die Menge von Gesamt MAPK und von phosphorylierter MAPK untersucht (Abb. 11). Dabei konnte eine Phosphorylierung von JNK und p38 aber auch von ERK durch TPA-Behandlung festgestellt werden. Eine maximale Induktion von phosphorylierter ERK und JNK wurde bereits nach 0.25 h TPA-Behandlung beobachtet, während ein Anstieg von phosphorylierter p38 MAPK bis 4 h nach TPA-Behandlung gemessen werden konnte (Abb. 11). Diese Ergebnisse zeigen, daß die drei MAPKs ERK, JNK und p38 durch TPA in RAW264.7 Zellen aktiviert werden.

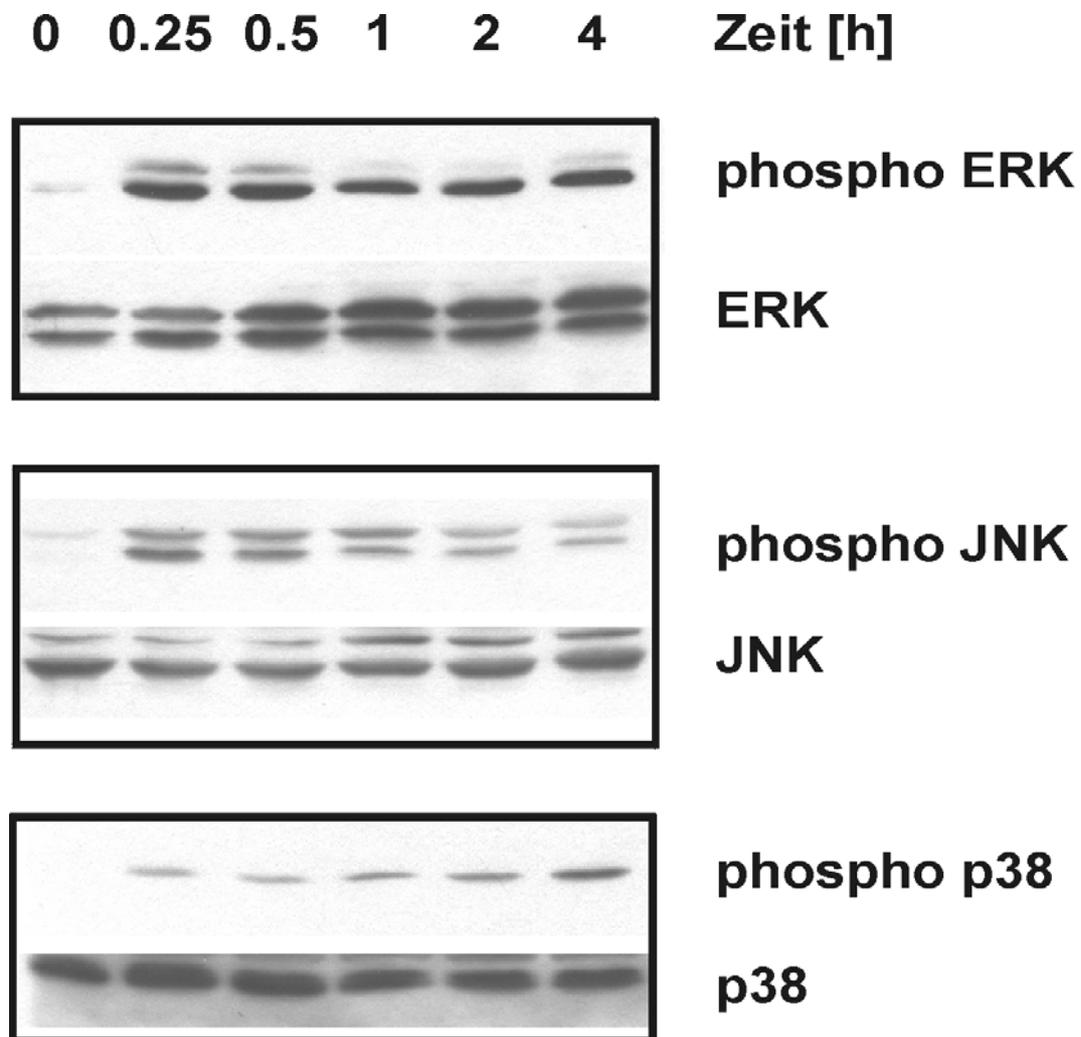


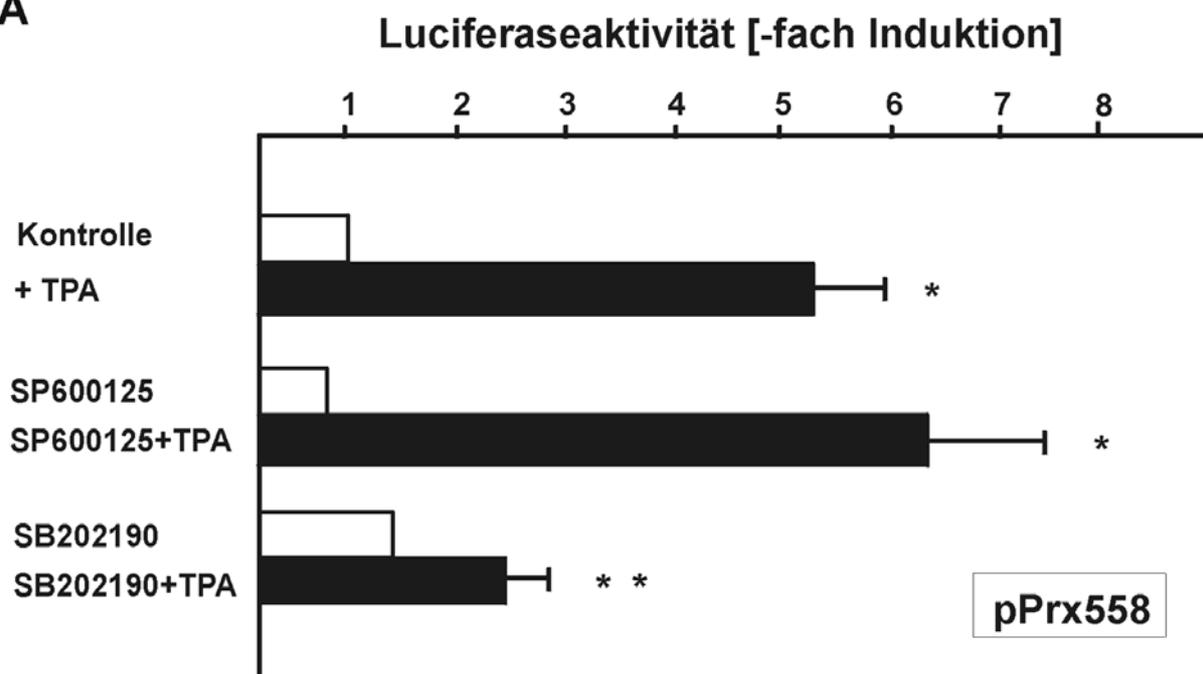
Abb. 11: Aktivierung von MAPKs durch TPA in RAW264.7 Zellen

RAW264.7 Zellen wurden für 18 h in serumfreiem Medium kultiviert und anschließend für 0.25, 0.5, 1, 2 und 4 h mit TPA (0.5 μ M) behandelt. Die Zellen wurden lysiert und 50 μ g Gesamtprotein mittels Western Blot Analyse untersucht. Die Filtermembranen wurden zunächst mit spezifischen Antikörpern gegen phosphorylierte (phospho) MAPK und anschließend mit Antikörpern gegen Gesamt-MAPK detektiert. Die Autoradiogramme eines repräsentativen Experiments sind dargestellt. ERK, Extrazellulär regulierte Kinase; JNK, c-Jun N-terminale Kinase.

3.9 Rolle von p38 für die Regulation der TPA-abhängigen Induktion der Prx I Promotoraktivität

Die MEKK1 aktiviert die MAPK JNK über die MAPK Kinase (MKK) 4 und MKK7 und kann daneben die MAPK p38 über MKK3 und MKK6 stimulieren (Kyriakis und Avruch, 2001). Es ist weiterhin bekannt, daß die MKK4 auch p38 phosphorylieren und aktivieren kann (Kyriakis und Avruch, 2001). Um die an der Prx I Promotorregulation beteiligten Signalwege weiter aufzuklären, wurde der Einfluß von spezifischen pharmakologischen Inhibitoren von MAPKs und von Expressionsvektoren für dominant-negative Formen der MKKs auf die TPA-abhängige Prx I Promotorinduktion untersucht. Die TPA-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität wurde durch Vorbehandlung mit dem p38-Inhibitor SB202190, aber nicht durch den JNK-Inhibitor SP600125 gehemmt (Abb. 12A). Überexprimierte dominant-negative Formen der MKK4 und MKK6 inhibierten die TPA-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität. Im Gegensatz dazu hatte die Überexpression einer dominant-negativen Form der MKK7 keinen Effekt auf die Induktion der Prx I Promotoraktivität durch TPA (Abb. 12B).

A



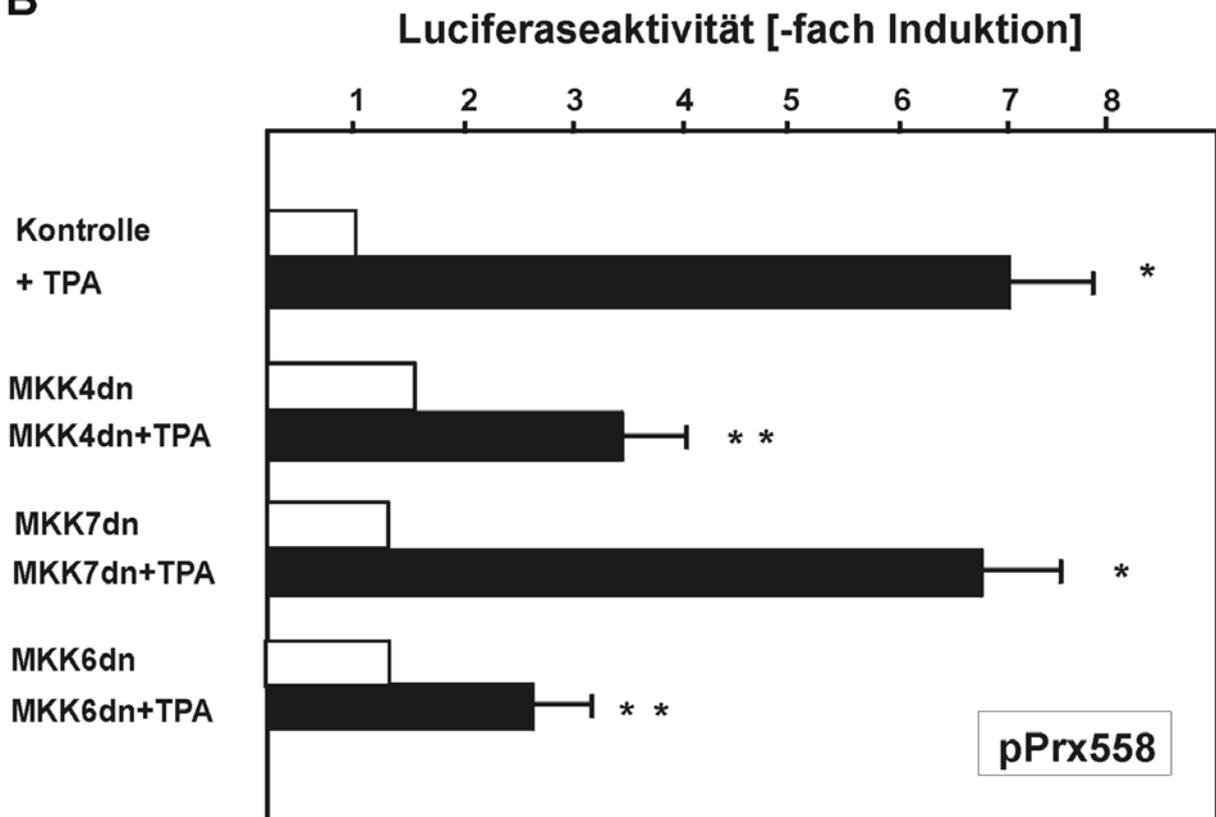
B

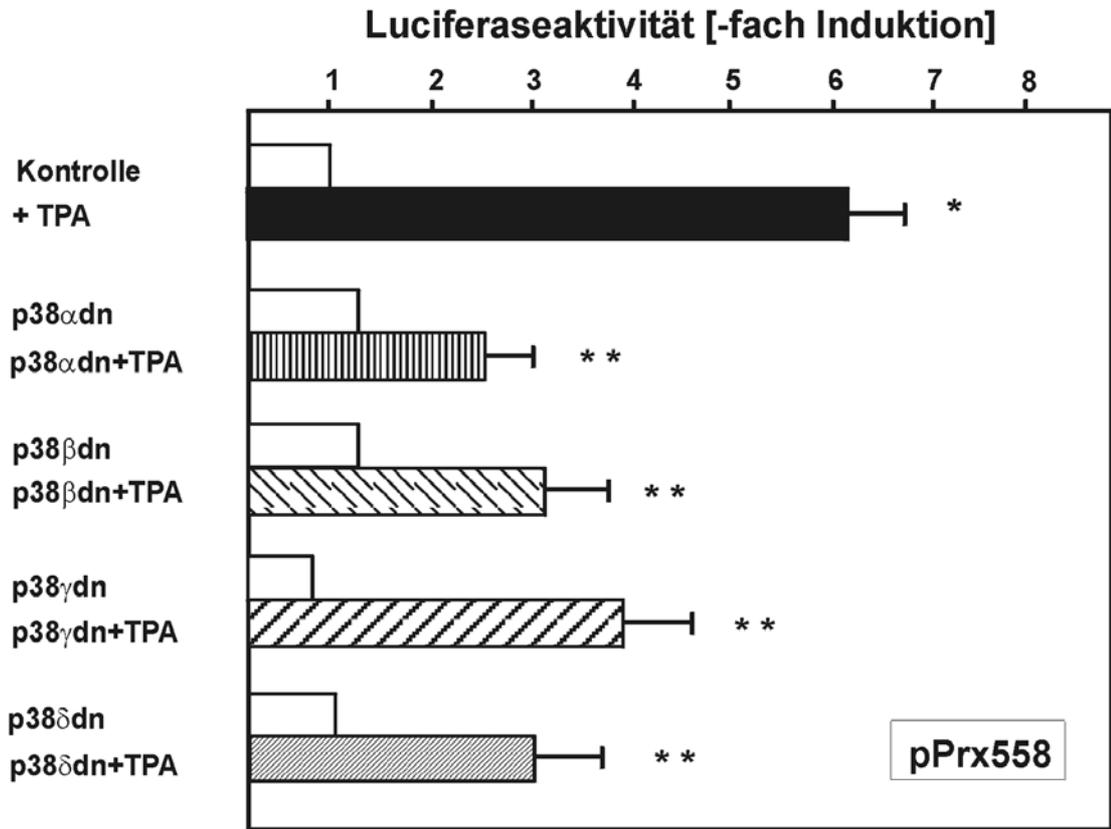
Abb. 12: Effekt von pharmakologischen MAPK-Inhibitoren und der Überexpression dominant-negativer Mutanten verschiedener MKKs auf die TPA-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität

(A) RAW264.7 Zellen wurden transient mit dem Reportergenkonstrukt pPrx558 transfiziert. 24 h später wurden die Zellen für 30 min in mit SP600125 (10 μ M) oder SB202190 (5 μ M) versetztem Medium oder in Kontrollmedium kultiviert. Anschließend wurde TPA (0.5 μ M) für 16 h hinzugegeben. Die relative Induktion der Luciferaseaktivität unter den verschiedenen Bedingungen ist im Vergleich zu der von pPrx558 gezeigt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student t-Test für gepaarte Werte: *, signifikanter Unterschied zwischen TPA und Kontrolle, TPA+SP600125 und Kontrolle; **, signifikanter Unterschied zwischen TPA+SB202190 und TPA, $p \leq 0.05$.

(B) RAW264.7 Zellen wurden mit dem Prx I Reportergenkonstrukt pPrx558 und einem Expressionsvektor für eine dominant-negative Mutante der gezeigten MKKs oder einem entsprechenden Leervektor kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 16 h in Kontrollmedium oder in mit TPA (0.5 μ M) versetztem Medium kultiviert. Es ist die relative Induktion der Luciferaseaktivität durch TPA im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle gezeigt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student t-Test für gepaarte Werte: *, signifikanter Unterschied zwischen TPA und Kontrolle, MKK7dn+TPA und MKK7dn; **, signifikanter Unterschied zwischen MKK4dn+TPA und TPA, MKK6dn+TPA und TPA, $p \leq 0.05$. MKK4dn, dominant-negative Form von MKK4; MKK7dn, dominant-negative Form von MKK7; MKK6dn, dominant-negative Form von MKK6.

Ein potentielles Effektormolekül der MKK4 und MKK6 stellt die p38 MAPK dar. Um die Rolle von p38 an der Regulation der Prx I Promotoraktivität aufzuklären, wurde der Effekt überexprimierter dominant-negativer Isoformen von p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ auf die TPA- und MEKK1-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität in RAW264.7 Zellen untersucht. Die TPA-abhängige Induktion der Promotoraktivität des Prx I Promotorkonstrukts pPrx558 wurde durch die Überexpression der verschiedenen dominant-negativen p38-Isoformen herabreguliert (Abb. 13A). Auch die MEKK1-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität wurde durch die überexprimierten dominant-negativen p38-Isoformen gehemmt (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde der Einfluß von kotransfizierten Wildtyp p38-Isoformen auf die Promotoraktivität von pPrx558 in RAW264.7 Zellen untersucht. Hierbei führte die Überexpression von p38 α und p38 β im Gegensatz zu p38 γ und p38 δ zu einer Hochregulation der basalen Prx I Promotoraktivität (Abb. 13B). Im Gegensatz dazu konnte keine Induktion der Promotoraktivität des Reporterogenplasmids pPrx558mutAB mit gezielten Mutationen innerhalb der AP-1-A und AP-1-B Stelle durch die Wildtyp p38-Isoformen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß in RAW264.7 Zellen der p38 MAPK-Signalweg an der Regulation der Prx I Promotoraktivität durch TPA beteiligt ist.

A



B

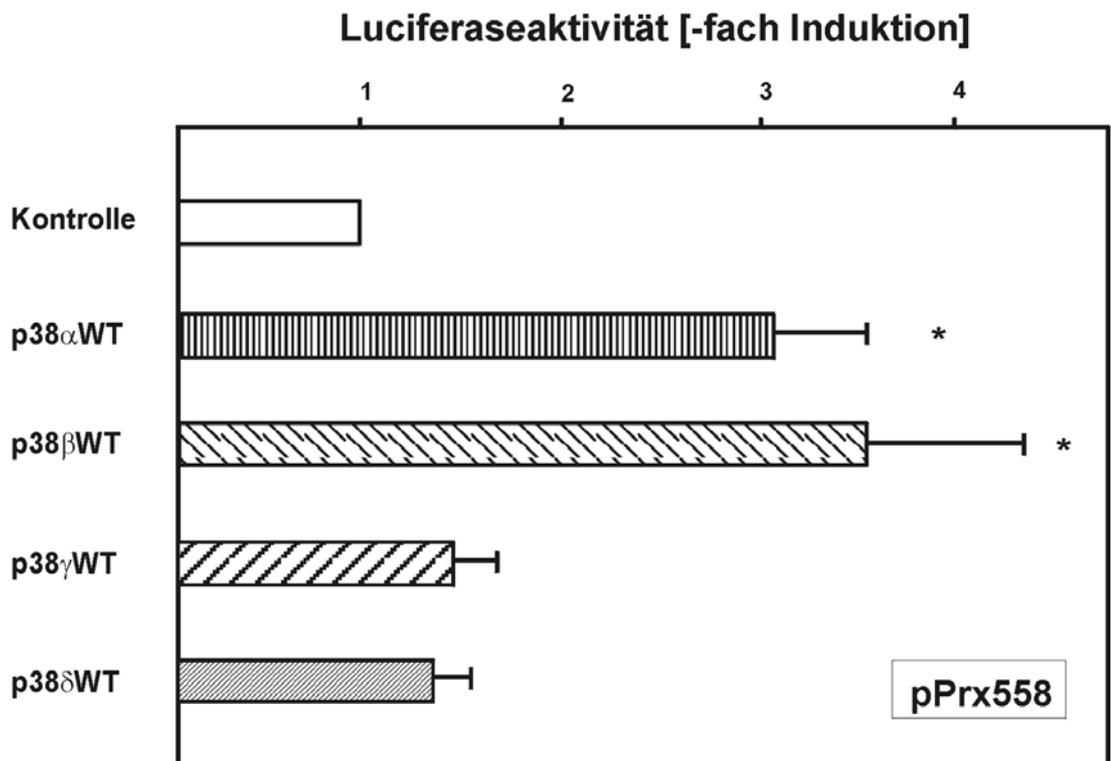


Abb. 13: Regulation der Prx I Promotoraktivität durch überexprimierte p38-Isoformen

(A) RAW264.7 Zellen wurden mit dem Prx I Reportergenkonstrukt pPrx558 und Expressionsvektoren für dominant-negative Mutanten der p38 MAPK-Isoformen p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ kotransfiziert. In Kontrollexperimenten wurde pPrx558 zusammen mit einem p38-Leervektor in RAW264.7 Zellen kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 16 h in Kontrollmedium oder in mit TPA (0.5 μ M) versetztem Medium kultiviert. Es ist jeweils die relative Induktion der Luciferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle gezeigt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student t-Test für gepaarte Werte: *, signifikanter Unterschied zwischen TPA und Kontrolle; **, signifikanter Unterschied zwischen p38 α dn+TPA und TPA+Kontrolle, p38 β dn+TPA und TPA+Kontrolle, p38 γ dn+TPA und TPA+Kontrolle, p38 δ dn+TPA und TPA+Kontrolle, $p \leq 0.05$. **(B)** RAW264.7 Zellen wurden mit dem Prx I Reportergenkonstrukt pPrx558 und Expressionsvektoren für Wildtyp p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ oder einem p38-Leervektor als Kontrolle kotransfiziert. Es ist die relative Induktion der Luciferaseaktivität durch die p38 Wildtypformen im Vergleich zur Kontrolle gezeigt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student t-Test für gepaarte Werte: *, signifikanter Unterschied zwischen p38 α WT und Kontrolle, p38 β WT und Kontrolle, $p \leq 0.05$. p38 dn, dominant-negative Form von p38, p38WT, Wildtyp p38.

3.10 Rolle des NF- κ B Signalweges für die Regulation der Prx I Promotoraktivität durch TPA

Die TPA-abhängige Induktion verschiedener Gene, wie dem MUC2 Gen (Lee, et al., 2002), erfolgt über die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges. Da innerhalb der Prx I Promotorregion an Position -1024 bis -1016 relativ zur Transkriptionsinitiationsstelle eine potentielle NF- κ B-Konsensussequenz lokalisiert ist (Abb. 2), wurde der Effekt des NF- κ B-Inhibitors Caffeic Acid Phenethylster (CAPE) und eines Expressionsvektors für eine dominant-negative Isoform des Inhibitor von NF- κ B (I κ B) auf die TPA-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität untersucht. Die Vorbehandlung von RAW264.7 Zellen mit CAPE zeigte keinen Effekt auf die TPA-abhängige Induktion des Prx I Promotorkonstrukts pPrx1750. Ebenso bewirkte die Überexpression der dominant-negativen I κ B-Mutante keine Hemmung, sondern führte zu einer Steigerung der TPA-abhängigen Induktion dieses Prx I Reportergens (Abb. 14). Dagegen führte die Behandlung mit CAPE oder die Überexpression der dominant-negativen Form von I κ B zu einer Herabregulation der TPA-abhängigen

Induktion des Kontrollreportergens pNF- κ B luc mit fünf Kopien des NF- κ B Konsensusmotivs (Abb. 14).

Die Daten zeigen, daß der NF- κ B-Signalweg in RAW264.7 Zellen nicht an der TPA-abhängigen Regulation der Prx I Promotoraktivität beteiligt ist.

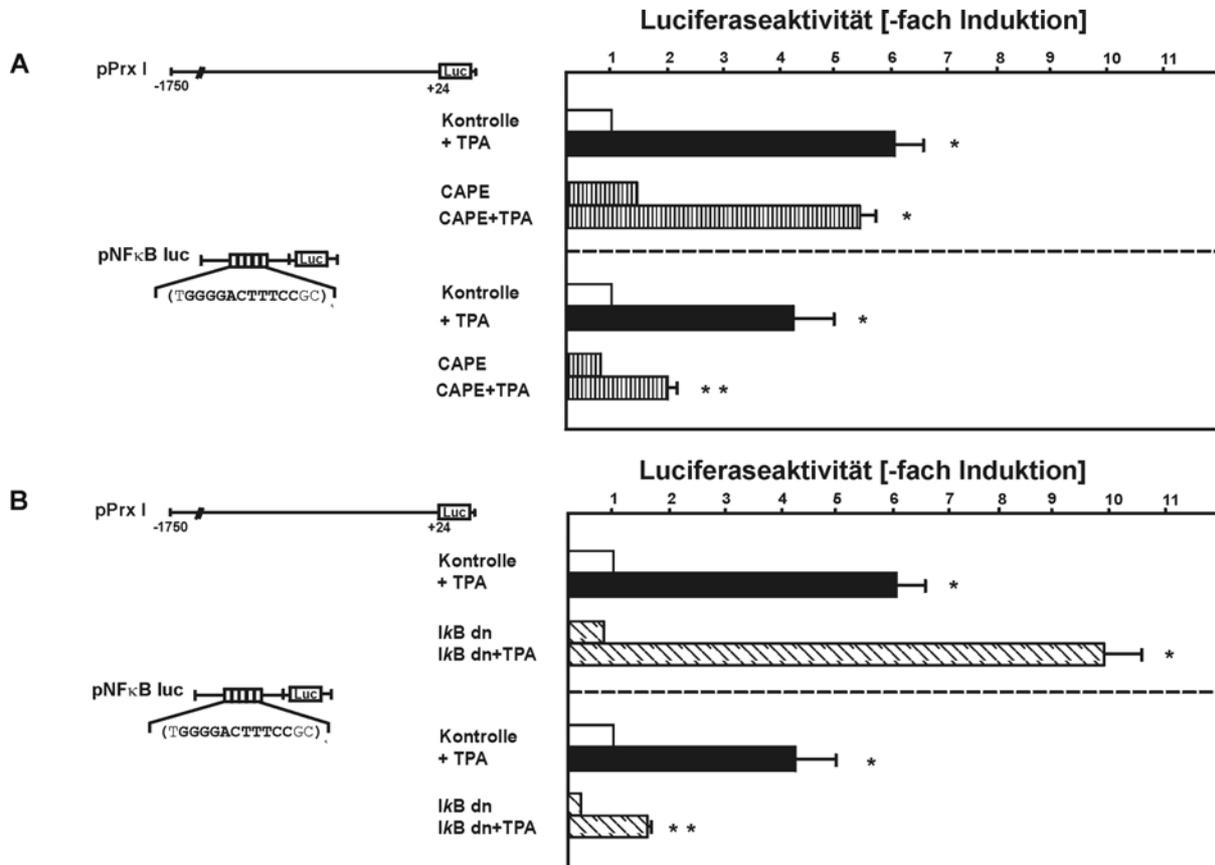


Abb. 14: Effekte von CAPE und der Überexpression von dominant-negativem κ B auf die TPA-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität

(A) RAW264.7 Zellen wurden mit Luciferasereportergerkonstrukten transfiziert, die entweder die proximalen 1750 bp des Prx I Promotors der Ratte (pPrx1750) oder fünf Kopien der NF- κ B-Konsensussequenz (pNF- κ B luc) enthielten. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 30 min in mit CAPE (4 μ g/ml) versetztem Medium oder in Kontrollmedium kultiviert. Anschließend wurde TPA (0.5 μ M) für weitere 16 h hinzugegeben. Es ist die relative Induktion der Luciferaseaktivität unter den verschiedenen Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle gezeigt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student t-Test für gepaarte Werte: *, signifikanter Unterschied zwischen pPrx1750+TPA und pPrx1750, pPrx1750+CAPE+TPA und pPrx1750+CAPE, pNF- κ B luc+TPA und pNF- κ B luc; **, signifikanter Unterschied zwischen pNF- κ B luc+CAPE+TPA und pNF- κ B luc+TPA, $p \leq 0.05$. (B) RAW264.7 Zellen wurden mit den Luciferasereportergerkonstrukten pPrx1750 oder pNF- κ B luc und einem

Expressionsvektor für eine dominant-negative Form von I κ B oder einem entsprechenden Leervektor kotransfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 16 h in Kontrollmedium oder in mit TPA (0.5 μ M) versetztem Medium kultiviert. Es ist die relative Induktion der Luciferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle gezeigt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student t-Test für gepaarte Werte: *, signifikanter Unterschied zwischen pPrx1750+TPA und pPrx1750, pPrx1750+I κ B dn+TPA und pPrx1750+I κ B dn, pNF- κ B luc+TPA und pNF- κ B luc; **, signifikanter Unterschied zwischen pNF- κ B luc+I κ B dn+TPA und pNF- κ B luc+TPA, $p \leq 0.05$. CAPE, Caffeic Acid Phenethylster; I κ B dn, dominant-negative Form von I κ B.

4 Diskussion

Prx I gehört in die Proteinfamilie der Prxs und spielt aufgrund seiner Thioredoxin-abhängigen Peroxidaseaktivität eine bedeutende Rolle beim Schutz der Zelle vor oxidativem Stress. Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit waren: 1) der Tumorpromotor TPA induzierte die Prx I Genexpression in der murinen Monozytenzelllinie RAW264.7; 2) die TPA-abhängige Induktion der Prx I Genexpression wurde im wesentlichen über zwei AP-1-Stellen in der proximalen 5'-flankierenden Promotorregion des Prx I Gens vermittelt; 3) die identifizierten AP-1-Stellen waren nukleäre Zielsequenzen von c-Jun; 4) die TPA-abhängige Induktion der Prx I Genexpression wurde über einen PKC/Ras/MEKK1/p38 MAPK Signalweg vermittelt.

4.1 Transkriptionale Induktion der Prx I Genexpression durch TPA

Die Aktivität von Prxs wird durch verschiedene Mechanismen posttranslational modifiziert. Zu diesen posttranslationalen Regulationsmechanismen werden Phosphorylierung, C-terminale Proteolyse, Ligandenbindung und Veränderungen des Oxidationszustandes von Cysteinresten von Prxs gezählt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß unterschiedliche Oligomerisierungszustände von Prx I und weiterer typischer 2-Cystein-Prxs eine wichtige Rolle bei der Modulation der enzymatischen Aktivität spielen (Lee et al., 2001; Woo et al., 2003; Wood et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Northern und Western Blot Analyse gezeigt werden, daß TPA die Prx I Genexpression in der murinen Monozytenzelllinie RAW264.7 auf der transkriptionalen Ebene induzierte (Abb. 1). Diese Beobachtung konnte in kultivierten Lebergewebemakrophagen der Ratte bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Um die molekularen Mechanismen der beschriebenen TPA-abhängigen transkriptionalen Induktion der Prx I Genexpression aufzuklären, wurden der Promotor und die proximalen 1750 bp der 5'-flankierenden Promotorregion des Prx I Gens der Ratte kloniert und sequenziert (Abb. 2). Durch computergestützten Sequenzvergleich konnten innerhalb dieser Promotorsequenz putative REs einschließlich verschiedener AP-1 Konsensussequenzen identifiziert werden, die an

der Induktion der Prx I Genexpression durch TPA beteiligt sein könnten (Abb. 2). Mittels transienter Transfektionsstudien mit Reportergenkonstrukten des Prx I Promotors in RAW264.7 Zellen konnte gezeigt werden, daß die beiden proximalen AP-1 Stellen AP-1-A und AP-1-B für die TPA-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität von wichtiger funktioneller Bedeutung waren (Abb. 4). In weiteren Transfektionsstudien mit Prx I Reportergenkonstrukten, die gezielte Mutationen innerhalb dieser beiden proximalen AP-1 Stellen enthielten, konnte demonstriert werden, daß die AP-1-A Stelle für die Induktion der Prx I Promotoraktivität durch TPA offensichtlich von größerer Bedeutung als die AP-1-B Stelle war (Abb. 5). Bemerkenswert erscheint dabei, daß die AP-1-A Stelle, im Gegensatz zur AP-1-B Stelle, nur in 6 von 7 bp homolog zur AP-1 Konsensussequenz 5`-TGA(C/G)TCA-3` ist (Abb. 3 u. 8A). Zur Klärung der Frage, ob die in Promotorstudien festgestellte größere funktionelle Relevanz der AP-1-A Stelle mit einer möglichen unterschiedlichen Bindungsaffinität für nukleäre Proteine einhergehen könnte, wurden EMSA-Experimente mit Oligonukleotiden der beiden Prx I AP-1 Elemente AP-1-A und AP-1-B durchgeführt. Hierbei zeigte sich, daß AP-1-A eine höhere Bindungsfähigkeit für nukleäre Proteine aus RAW264.7 Zellen aufwies (Abb. 8D). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß Nukleotide in der unmittelbaren Umgebung dieser beiden AP-1 Sequenzen des Prx I Promotors an der Regulation der TPA-abhängigen Induktion der Prx I Promotoraktivität beteiligt sein könnten. In Übereinstimmung hiermit konnte demonstriert werden, daß TPA die Aktivität eines Prx I Wildtyp-Promotorkonstruktes mit der AP-1-A und AP-1-B Stelle deutlich stärker induzierte, als die Promotoraktivität eines Reportergenkonstruktes mit sechs Kopien des prototypischen AP-1 Konsensusmotivs (pAP-1luc) (Abb. 5), für das in einer früheren Studie in RAW264.7 Zellen eine prominente Induktion durch TPA demonstriert werden konnte (Carter et al., 2001).

AP-1 ist ein TF, der aus Homo- oder Heterodimeren von Proteinen der Jun-, Fos- oder ATF-Familie gebildet wird. AP-1 Dimere regulieren die Genexpression durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzmotive, welche als AP-1 Stellen oder auch als TPA-responsive Elemente (TREs) bezeichnet werden. Die Aktivität von AP-1 wird durch eine Vielzahl von Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Neurotransmitter, oxidativen Stress und UV-Strahlung reguliert (Karin, 1995). Die gesteigerte

Expression von Zielgenen durch AP-1 erfolgt dabei entweder durch eine gesteigerte Synthese von AP-1 oder auch posttranslational über die gezielte Phosphorylierung von spezifischen Aminosäureresten innerhalb von regulatorischen AP-1 Domänen (Karin et al., 1997). Überexpression einer dominant-negativen Mutante von c-Jun führte zur Hemmung der TPA-abhängigen Induktion der Prx I Promotoraktivität, während Überexpression von Wildtyp c-Jun sowohl die basale als auch die TPA-abhängige Prx I Promotoraktivität verstärkte (Abb. 6). Weiterhin wurde ein Prx I Promotorkonstrukt mit Mutationen innerhalb der beiden AP-1 Stellen durch Wildtyp c-Jun weniger stark induziert als das korrespondierende Prx I Promotorkonstrukt mit der Wildtyp-Sequenz (Abb. 6). In Übereinstimmung hiermit zeigten EMSA-Studien, daß die AP-1-A Stelle eine spezifische Bindungsstelle für c-Jun darstellte (Abb. 8C). Diese Daten lassen vermuten, daß c-Jun über die Wechselwirkung mit der AP-1-A Sequenz des Prx I Promotors an der Prx I Genregulation beteiligt ist. Ähnliche Beobachtungen konnten für das Gen der Monoaminoxidase B in HepG2 Hepatomazellen (Wong et al., 2002) und für das Involucrin A- und das Cystatin A-Gen in humanen Keratinozyten (Efimova et al., 1998; Takahashi et al., 1998) gemacht werden. In diesen Studien konnte gezeigt werden, daß Jun-Proteine über Interaktion mit AP-1 Promotorelementen an der Regulation der Expression der jeweiligen Gene beteiligt waren.

Die Genexpression von antioxidativ wirksamen Enzymen und Phase II Entgiftungsenzymen wie der Glutathion-S-transferase und der NAD(P)H-Quinonoxidoreduktase wird durch oxidativen Stress und elektrophile Substanzen induziert. Die transkriptionale Induktion dieser Enzyme wird durch das ARE reguliert, das als Zielsequenz für den TF Nrf2 die durch oxidativen Stress induzierbare Genregulation vermittelt (Nguyen et al., 2003). Es konnte auch gezeigt werden, daß Nrf2 für die Prx I Genregulation eine funktionelle Rolle spielt, da sich in kultivierten Peritonealmakrophagen von Nrf2-defizienten Mäusen die Prx I Genexpression durch verschiedene oxidative Stressstimuli nicht mehr induzieren ließ (Ishii et al., 2000). Da die erweiterte Basensequenz der AP-1-A Stelle des Prx I Promotors in 10 von 12 Basenpaaren mit dem ARE Konsensusmotiv (5`-GGTGACNNNGCA-3`) übereinstimmt (Abb. 3), wurde auch eine potentielle regulatorische Funktion des TF Nrf2 für die TPA-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität in RAW264.7 Zellen

untersucht. Transfektionsstudien mit Expressionsvektoren für Wildtyp Nrf2 und einer dominant-negativen Nrf2-Mutante zeigten, daß Nrf2 in RAW264.7 Zellen offensichtlich keine Rolle für die Regulation der Prx I Promotoraktivität durch TPA spielte (Abb. 7). Es ist jedoch denkbar, daß ein für die Regulation durch Nrf2 notwendiges ARE außerhalb der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Prx I Promotorregion lokalisiert ist.

In den Promotorregionen verschiedener Gene konnten innerhalb von einem ARE lokalisierte TRE Konsensusmotive identifiziert werden, welche über die Wechselwirkung mit AP-1 an der Regulation der Genaktivität beteiligt sein könnten. So konnte vor kurzem gezeigt werden, daß der Transforming Growth Factor- β_1 in A549 Typ II Alveolarepithelzellen über eine Aktivierung der spezifischen Wechselwirkung zwischen einem c-Jun/Fra1-Heterodimer und einer innerhalb von einem ARE lokalisierten AP-1-Konsensussequenz des γ -Glutamylcysteinsynthetase-Promotors zur Herabregulation der Genexpression der γ -Glutamylcysteinsynthetase führte (Jardine et al., 2002).

4.2 Signalwege der TPA-abhängigen Induktion der Prx I Genexpression

Der Phorbolester TPA ist ein spezifischer Aktivator der PKC (Gopalakrishna et al., 2000). Die Familie der PKC umfasst mindestens 11 phospholipidabhängige Serin/Threonin Kinasen, die zelluläre Schlüsselvorgänge der Karzinogenese wie den Zellzyklus, Zelladhäsion und Apoptose regulieren (Gopalakrishna et al., 2000). Um die an der Genregulation von Prx I durch TPA beteiligten Signalwege aufzuklären, wurde der Einfluß von PKC-Inhibitoren auf die TPA-abhängige Induktion des Prx I Gens untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß die beiden PKC-Inhibitoren BIM und Stauro zu einer Herabregulation der Prx I Genexpression und Prx I Promotoraktivität führten (Abb. 9), was auf eine Beteiligung der PKC an der TPA-abhängigen Prx I Genregulation deutete. Diese Beobachtungen korrelieren mit Ergebnissen einer Studie in der gezeigt wurde, daß in der Osteoblastenzelllinie MC3T3-E1 die Induktion der Prx I Genexpression durch Arsenit über einen PKC-abhängigen Signalweg erfolgt (Li et al., 2002). TPA aktiviert die PKC durch Bindung

an die regulatorische PKC-Domäne, wodurch es zu einer Konformationsänderung und Aktivierung dieses Enzyms kommt (Gopalakrishna et al., 2000). Weiterhin kann TPA die PKC auch indirekt über eine NADPH-Oxidase-abhängige Produktion von ROS aktivieren. Ein solcher indirekter Mechanismus der TPA-abhängigen Regulation der Genexpression wurde für das Gen der humanen Mangan-Superoxiddismutase in A549 Lungenkarzinomzellen beschrieben (Kim et al, 1999).

Ein wichtiges regulatorisches Ziel der PKC stellt das niedermolekulare GTP-bindende Protein Ras dar (Rebollo et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Transfektionsstudien in RAW264.7 Zellen gezeigt werden, daß Ras an der TPA-abhängigen Induktion der Prx I Promotoraktivität beteiligt war (Abb. 10). Es zeigte sich, daß die Überexpression einer dominant-negativen Mutante von Ras zur Herabregulation der TPA-abhängigen Induktion der Prx I Promotoraktivität und die Kotransfektion eines Expressionsvektors mit einer konstitutiv-aktiven Isoform von Ras zu einer Heraufregulation der Promotoraktivität von Prx I führte (Abb. 10). Ras kann die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase (MAP3K) Raf-1 und MEKK1 aktivieren, welche wiederum zur Aktivierung der drei wesentlichen MAPK-abhängigen Signalwege ERK, JNK und p38 führen können. MAPK-Signalwege sind kaskadenartig angeordnete Kinasen und vermitteln die Signaltransduktion von der Zellmembran zum Zellkern oder anderen intrazellulären Zielstrukturen (Abb. 15). MAPKs, die eine Gruppe von Serin/Threonin Kinasen darstellen, kontrollieren mittels Phosphorylierung von Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren die intrazelluläre Homöostase über die Regulation der Genexpression, Proteinsynthese und Apoptose (Karin, 1995). Darüber hinaus können MAPKs als indirekte Effektoren von Ras auch an der Regulation der Zellproliferation und –differenzierung beteiligt sein (Finco et al., 1997).

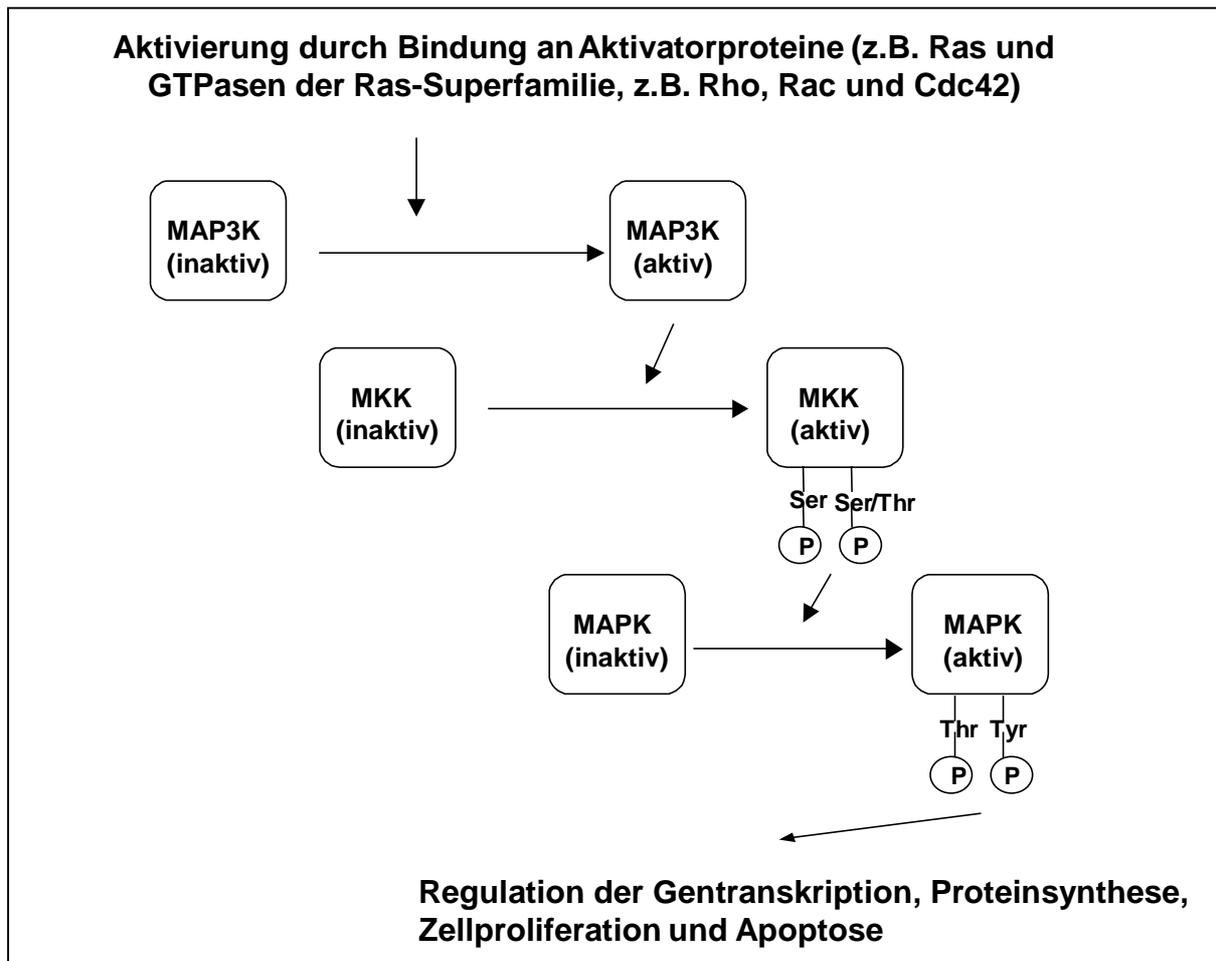


Abb. 15: Schema der MAPK-Signalwege

Die Aktivierung einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase Kinase Kinase (MAP3K) führt durch die Phosphorylierung einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase Kinase (MKK) zur Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) über Phosphorylierung eines konservierten Threonin (Thr)-Tyrosin (Tyr)-Motivs. Ser, Serin.

Für die Induktion der Prx I Genexpression durch den Tumorpromotor TPA spielt der TF AP-1 über die Interaktion mit dem AP-1-A Element des Prx I Promotors offensichtlich eine entscheidende regulatorische Rolle. TPA führte in RAW264.7 Zellen zur Phosphorylierung der MAPKs ERK, JNK und p38 (Abb. 11). MAPKs können über gezielte Phosphorylierung Jun-, Fos- und ATF-Proteine aktivieren und hierdurch die Genexpression von AP-1-abhängigen Genen regulieren. Es ist bekannt, daß Wachstumsfaktoren über eine Stimulation des ERK-Signalweges zu verstärkter Expression von c-Fos führen, da ERK über Phosphorylierung des TF Elk-1 die c-Fos Expression induziert (Kyriakis, 2001). Im Gegensatz dazu führen ROS

und inflammatorische Zytokine über die Stimulation der MAPKs JNK und p38 sowohl zu einer direkten Aktivierung als auch zu einer verstärkten Genexpression von AP-1-Proteinen (Kyriakis und Avruch, 2001). JNK und p38 induzieren die Expression von c-Fos indirekt über Phosphorylierung von Elk-1 und der c-Jun-Promotor wird durch p38 indirekt über Aktivierung der TFs Myocyte Enhancing Faktor-2 A und C induziert (Kyriakis und Avruch, 2001). Es ist weiterhin bekannt, daß die c-Jun Genexpression durch AP-1 heraufreguliert wird und einer positiven feedback Autoregulation unterliegt (Kyriakis und Avruch, 2001).

Um die an der TPA-abhängigen Induktion der Prx I Genexpression beteiligten MAPK-Signalwege aufzuklären, wurden Transfektionsstudien in RAW264.7 Zellen durchgeführt, in denen einerseits spezifische pharmakologische MAPK-Inhibitoren verwendet wurden und andererseits Expressionsvektoren mit konstitutiv-aktiven oder dominant-negativen Formen von MAPKs kotransfiziert wurden. Es konnte festgestellt werden, daß die Induktion der Prx I Genexpression durch TPA über den p38 MAPK-Signalweg erfolgte und die ERK- und JNK-Signalwege hieran nicht beteiligt waren. Die Überexpression einer dominant-negativen Raf-1-Mutante hatte keinen Effekt auf die Ras-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität (Abb. 10B). Ebenso führte auch die Überexpression einer konstitutiv-aktiven Isoform von Raf-1 zu keiner Zunahme der Prx I Promotoraktivität (Abb. 10C). In Transfektionsexperimenten mit dem spezifischen ERK-Inhibitor AG126 zeigte sich keine signifikante Herabregulation der TPA-abhängigen Induktion der Prx I Promotoraktivität und auch die Überexpression von Wildtypformen der MAPK/ERK Kinase (MEK)-1 und der ERK2 bewirkte keine Induktion des Prx I Promotors (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß in RAW264.7 Zellen der Raf-1/MEK/ERK-Signalweg nicht an der Prx I Genregulation durch TPA beteiligt ist.

Die Ras-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität wurde durch Kotransfektion eines Expressionsvektors für dominant-negative MEKK1 herabreguliert (Abb. 10B), und die Überexpression der Wildtypform der MEKK1 führte zu einer deutlichen Induktion der Prx I Promotoraktivität (Abb. 10C). MEKK1 aktiviert den JNK-Signalweg über Phosphorylierung von MKK4 und MKK7, während der p38-Signalweg durch die MEKK1 via Aktivierung der MKK3 und MKK6 heraufreguliert wird. MKK4 und MKK7 wiederum phosphorylieren mit unterschiedlicher Präferenz die MAPKs JNK und p38.

Die MKK7 aktiviert spezifisch die JNK, während die MKK4 neben der JNK auch die p38 MAPK stimulieren kann. Die stärksten Aktivatoren der p38 MAPK sind jedoch die MKK3, welche vornehmlich p38 α und p38 β phosphoryliert, und die MKK6, die die verschiedenen p38-Isoformen heraufregulieren kann (Kyriakis und Avruch, 2001).

In Studien, in denen spezifische pharmakologische Inhibitoren der JNK und p38 sowie Expressionsvektoren für dominant-negative Formen verschiedener MKKs eingesetzt wurden, konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung von p38 MAPK in RAW264.7 Zellen an der Induktion der Prx I Promotoraktivität durch TPA beteiligt war. So bewirkte SB202190 als ein spezifischer Hemmstoff der p38 MAPK und kotransfizierte Expressionsvektoren mit dominant-negativen Formen der MKK4 und MKK6 eine signifikante Herabregulation der TPA-abhängigen Induktion der Prx I Promotoraktivität (Abb. 12). Weiterhin wurde die TPA-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität durch Überexpression dominant-negativer Mutanten der verschiedenen p38-Isoformen abgeschwächt (Abb. 13A).

In der vorliegenden Arbeit konnte auch gezeigt werden, daß die basale Prx I Promotoraktivität in RAW264.7 Zellen durch die spezifische Überexpression von p38 α und p38 β transkriptional induziert wurde (Abb. 13B). Im Gegensatz dazu konnte in Osteoblasten demonstriert werden, daß p38 MAPK die Induktion der endogenen Prx I Genexpression durch Arsenit über einen posttranskriptionalen Mechanismus vermittelte (Li et al., 2002). Ein ähnliches Regulationsmuster wie in der vorliegenden Arbeit konnte auch für die unterschiedliche Modulation der durch AP-1 vermittelten Genexpression über verschiedene p38-Isoformen in humanen und murinen Brustkrebszelllinien gezeigt werden (Pramanik et al., 2002). Es konnte in dieser Studie unter anderem demonstriert werden, daß die AP-1 abhängige Promotoraktivität des Vitamin D Rezeptors in den jeweiligen Zelllinien vom unterschiedlichen Expressionsmuster der einzelnen p38 Isoformen abhängig war (Pramanik et al., 2002). Die beschriebene Regulation der Prx I Gentranskription über spezielle p38-Isoformen in RAW264.7 Zellen stimmt auch mit den Beobachtungen einer Arbeit von Dashti et al. überein, in der die Expression des humanen Involucrin Gens in Keratinozyten von der intrazellulären Balance zwischen aktivierter p38 α - und p38 δ -Isoform abhängig war (Dashti et al., 2001). Die differentielle Aktivierung einzelner p38 MAPK-Isoformen in Abhängigkeit vom jeweiligen Stimulus sowie

Unterschiede im Expressionsmuster und Substratspezifität von p38 MAPKs in verschiedenen Zellarten könnte eine genau abgestimmte Regulation der Aktivität bestimmter TFs ermöglichen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß die p38 MAPK die AP-1-abhängige Gentranskription in Makrophagen durch Modulation der Interaktion zwischen c-Jun und dem TF TATA-bindendes Protein regulierte (Carter et al., 2001). Es bedarf weiterer Untersuchungen um zu klären, ob TATA-bindendes Protein auch an der AP-1-abhängigen Regulation der Prx I Promotoraktivität beteiligt ist.

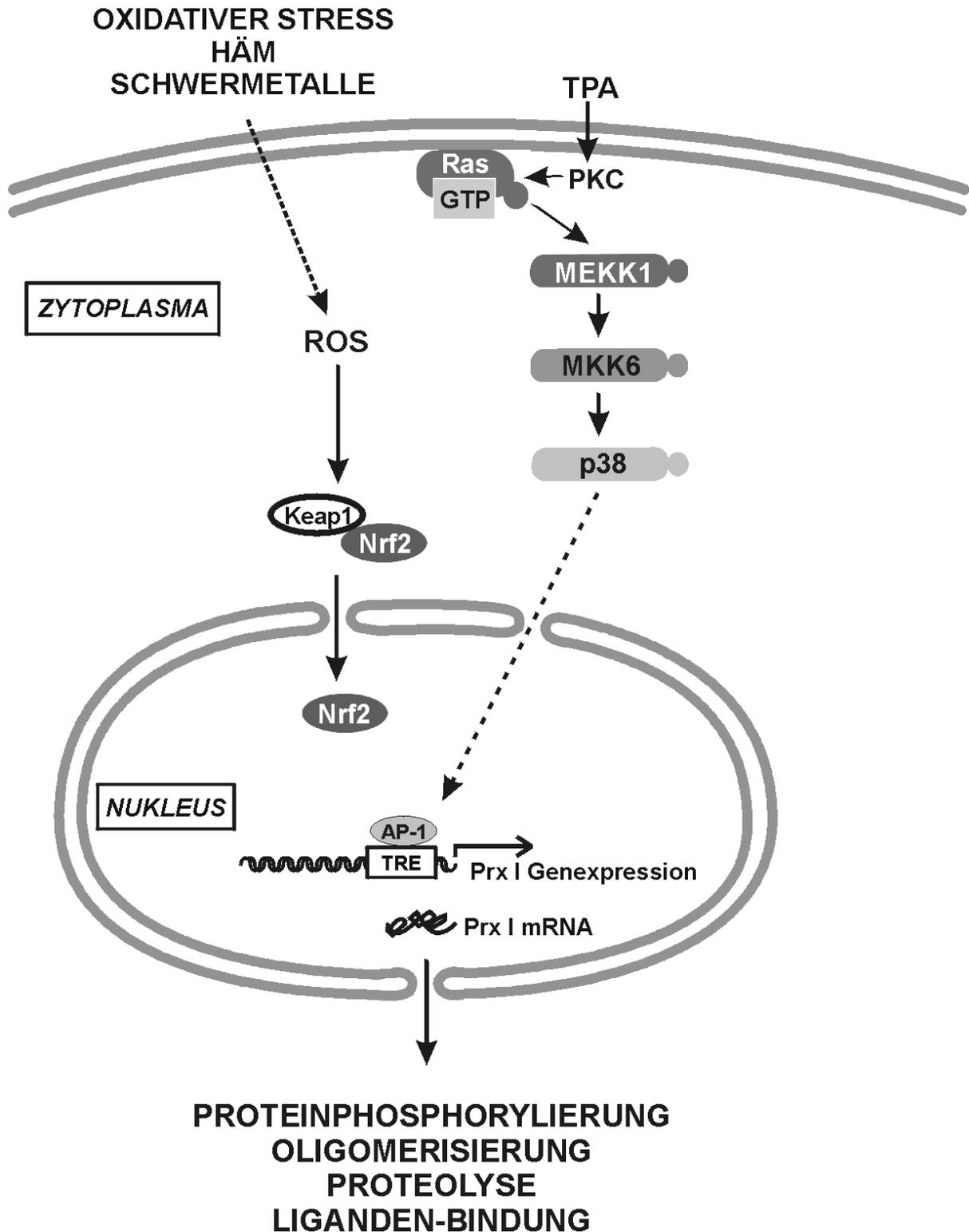


Abb. 16: Schematische Darstellung der TPA-abhängigen Induktion der Prx I Gentranskription über einen PKC/ Ras/ MEKK1/ p38 MAPK-vermittelten Signalweg

In früheren Arbeiten konnte eine Beteiligung des NF- κ B-Signalweges an der TPA- und Ras-abhängigen Signalübertragung gezeigt werden (Finco et al., 1997; Mayo et al., 2001; Majumdar et al., 2002). Da eine NF- κ B-Konsensussequenz innerhalb des Prx I Promotors lokalisiert werden konnte (Abb. 2), wurde auch die potentielle Rolle des NF- κ B-Signalweges für die TPA-abhängige Prx I Genregulation untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß der NF- κ B-Signalweg für die Induktion der Prx I Gentranskription durch TPA in RAW264.7 Zellen offensichtlich keine entscheidende Bedeutung hat, da weder die Überexpression einer dominant-negativen I κ B-Mutante noch der NF- κ B-Inhibitor CAPE eine hemmende Wirkung auf die TPA-abhängige Induktion der Prx I Promotoraktivität hatten (Abb. 14). NF- κ B ist ein aus Rel Proteinen bestehender dimerer TF, dessen Aktivierung durch Interaktion mit I κ B reguliert wird. I κ B ist eine Familie von Inhibitorproteinen, die den TF NF- κ B im Zytoplasma binden und somit inaktivieren. Die Phosphorylierung von I κ B durch I κ B-Kinasen bewirkt die Ubiquitination und anschließende proteolytische Degradation von I κ B und führt zur Freisetzung aktiver NF- κ B-Dimere mit nachfolgender Translokation in den Zellkern (Karin und Ben-Neriah, 2000). Die Proteine der NF- κ B-Familie spielen in der Regulation von Immun- und Entzündungsvorgängen infolge Zellstimulation durch inflammatorische Zytokine, T-Zell-Signalmoleküle und Lipopolysaccharid eine wichtige Rolle (Barnes und Karin, 1997). Darüber hinaus konnte eine Beteiligung von NF- κ B an der Kontrolle der zellulären Transformation als Mediator Ras-aktivierter Signalkaskaden wahrscheinlich gemacht werden (Finco et al., 1997).

4.3 Physiologische Funktionen von Prx I

Prx I gehört zu den Prxs, welche ubiquitär vorkommen und unterschiedliche physiologische Funktionen erfüllen. Prxs wurden in Bakterien, *Saccharomyces cerevisiae* und Pflanzen, aber auch in Zellen von Mammaliern nachgewiesen. In Mammalierzellen konnten bisher sechs verschiedene Klassen von Prxs (Prx I-VI) identifiziert werden (Tabelle 1). Prx I wurde von unabhängigen Gruppen in humanen Hela Zellen als *proliferation associated gene* (pag) (Prosperi et al., 1993), in Peritonealmakrophagen der Maus als *Maus Stress Protein 23* (MSP23) (Ishii et al.,

1993) und in Rattenleber als *Hämbindendes Protein 23* (HBP 23) (Iwahara et al. 1995) identifiziert. Eine homologe Aminosäuresequenz zu Prx I hatten auch der *Natural Killer Cell Enhancing Factor A* (NKEF A) (Shau und Kim, 1994) und der mit MSP23 identische Osteoblastenfaktor *OSF3* (Kawai et al., 1994).

Prxs besitzen Thioredoxin-abhängige Peroxidaseaktivität und werden wie Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase zu den antioxidativ wirksamen Enzymen gezählt. Diese Enzyme schützen vor oxidativem Streß der durch zelluläre Überproduktion von ROS hervorgerufen wird. Zu den ROS werden H_2O_2 , organische Peroxide sowie Hydroxyl- und Sauerstoffradikale gezählt, die in der Zelle als Nebenprodukte der Zellatmung gebildet werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß extrazelluläre Faktoren und Stimuli wie UV-Licht, ionisierende Strahlung, Entzündungs- und Phagozytosevorgänge (Sies, 1991), Schwermetalle wie Eisen und Kupfer (Oberley, 2002) und der Tumorpromotor TPA (Gieche et al., 2001) zur Entstehung von ROS in der Zelle führen.

Oxidativer Streß kann sämtliche Zellbestandteile durch DNA-Doppelstrangbrüche, Lipidperoxidation und Protein Cross-Linking schädigen (Halliwell, 1994; Scandalios, 1997) und spielt eine ursächliche Rolle bei Entzündungen, arteriosklerotischen und neurodegenerativen Erkrankungen (Weitzman und Gordon, 1990; Halliwell, 1994; Jenner, 1994; Witztum, 1994), so daß den Prxs hierbei eine protektive Rolle zugeschrieben wird. Prxs sind aufgrund ihrer Peroxidaseaktivität in der Lage Substanzen wie H_2O_2 und organische Wasserstoffperoxide enzymatisch abzubauen und dadurch den prooxidativen Status der Zelle herabzusetzen. So konnte gezeigt werden, daß Prostatakarzinomzellen nach Suppression von Prx I sensitiver gegenüber Zellschädigungen durch H_2O_2 und organische Wasserstoffperoxide waren (Shen et al., 2002), und eine Überexpression von Prx I in FRTL-5 Thyreozyten führte zu einer gesteigerten Elimination von H_2O_2 nach Thyrotropin-Stimulation (Kim et al., 2000). Die bedeutsame physiologische Funktion von Prx I konnte vor kurzem auch in einem Prx I Knock-out Maus Modell gezeigt werden. Hierbei führte die Inaktivierung des Prx I Gens zu einem Anstieg der Konzentration von ROS im Erythrozyten und zur Entwicklung einer hämolytischen Anämie. Weiterhin waren embryonale Fibroblasten von Prx I-defizienten Tieren sensitiver für ROS-induzierte Zellschäden (Neumann et al., 2003).

ROS führen nicht nur zu strukturellen Schäden in der Zelle, sondern sind als physiologische second messenger durch das Eingreifen in rezeptorgekoppelte intrazelluläre Signaltransduktionswege auch an der Modulation zellulärer Schlüsselvorgänge der Zellproliferation und –differenzierung beteiligt (Finkel 1998; Shackelford et al., 2000; Thannikal et al., 2000; Sauer et al., 2001). Prxs scheinen hierbei durch den enzymatischen Abbau von ROS eine regulatorische Rolle zu spielen (Rhee et al., 2003). Eine regulatorische Rolle von Prx I für die Zellproliferation und den Zellzyklus konnte in verschiedenen Arbeiten demonstriert werden. So konnte gezeigt werden, daß Prx I in NIH3T3 und A431 Zellen die über H₂O₂-vermittelte Signaltransduktion nach Stimulation mit Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und den Wachstumsfaktoren Epidermal Growth Factor und Platelet-derived Growth Factor regulierte (Kang et al., 1998). Prosperi et al. konnten zeigen, daß in einer Ras-transformierten humanen Epithelzelllinie die Prx I Genexpression deutlich höher war als in nicht-transformierten Kontrollzellen (Prosperi et al., 1993). Darüber hinaus konnte in HL60 Promyelozyten nach Inhibition der Zellproliferation eine zeitabhängige Reduktion der Prx I mRNA Expression demonstriert werden (Prosperi et al., 1993) und in mittels Prolaktinstimulation synchronisierten Nb2 Lymphomzellen der Ratte konnte eine maximale Induktion der Prx I Genexpression während der S-Phase des Zellzyklus beobachtet werden (Prosperi et al., 1998). Chang et al. konnten zeigen, daß die Phosphorylierung von Prx I durch Cyclin-abhängige Kinase-2 an Thr⁹⁰ zu einer deutlichen Herabregulation der Peroxidaseaktivität führte und hauptsächlich während der Mitosephase erfolgte. Die durch Cyclin-abhängige Kinase-2 vermittelte Hemmung von Prx I mit konsekutiver Zunahme von ROS in der Zelle könnte somit eine regulatorische Rolle bei der Steuerung des Zellzyklus besitzen (Chang et al., 2002).

ROS können durch die beschriebenen Wechselwirkungen mit Signaltransduktionswegen der zellulären Proliferation und Differenzierung auch an der malignen Transformation von Zellen beteiligt sein (Weitzman und Gordon, 1990; Cerutti, 1994; Ames et al., 1995; Oberley, 2002). Pathophysiologische Grundlage hierfür sind durch ROS verursachte DNA-Schäden wie Basenmutationen, Deletionen, Insertionen und Rearrangements (Imlay et al., 1988). Prxs könnten daher aufgrund ihrer antioxidativen Schutzfunktion eine regulatorische Funktion bei der

Karzinogenese besitzen. Eine wichtige Rolle scheint hierbei die direkte Interaktion von Prx I mit Onkogenen zu spielen. Es konnte gezeigt werden, daß Prx I die Tyrosinkinaseaktivität des Protoonkogens c-Abl durch direkte Bindung an die c-Abl SH3-Domäne inhibierte. Hierdurch wurde die durch Überexpression von c-Abl bedingte Zellzyklusblockade und der daraus resultierende zytostatische Effekt aufgehoben (Wen und Van Etten, 1997). Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, daß Prx I ein physiologischer Inhibitor von c-Abl ist. Weiterhin konnte eine direkte Interaktion zwischen Prx I und dem c-Myc Protoonkogen demonstriert werden. c-Myc spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus, der zellulären Proliferation und Differenzierung sowie der Apoptose. Für die Regulation von c-Myc Zielgenen hat die hochkonservierte Myc Box II Domäne von c-Myc eine entscheidende Funktion. Es konnte gezeigt werden, daß Prx I durch direkte Interaktion mit der Myc Box II Domäne die Tumorgenese in einer c-Myc überexprimierenden Fibroblastenzelllinie der Ratte hemmte. Die gleichzeitige Überexpression von c-Myc und Prx I in dieser Fibroblastenzelllinie führte zur Verminderung der Zellkoloniezahl und Zellgröße. Darüber hinaus bewirkte die Überexpression von Prx I in dieser Zelllinie *in vivo* eine Abnahme der Tumorgöße und eine langsamere Tumorprogression. Zusätzlich regulierte Prx I über direkte Interaktion mit der Myc Box II Domäne die Aktivität von c-Myc-Zielgenen herab (Mu et al., 2002). Prx I könnte daher als ein Tumorsuppressor funktionieren. Diese Hypothese konnte kürzlich durch eine Untersuchung der physiologischen Funktion von Prx I im Gesamtorganismus unterstützt werden. In einem Prx I Knock-out Maus Modell konnte gezeigt werden, daß Prx I-defiziente Tiere signifikant häufiger an verschiedenen malignen Tumoren wie Lymphomen, Sarkomen und Karzinomen erkrankten, als normale Tiere (Neumann et al., 2003).

Die vorliegende Arbeit beschreibt die molekularen Mechanismen und Signalwege, die die TPA-abhängige Regulation der Prx I Genexpression in der murinen Monozytenzelllinie RAW264.7 vermitteln. Es konnte gezeigt werden, daß die Prx I Genexpression in RAW264.7 Zellen durch den Tumorpromotor TPA transkriptional induziert wurde. Weiterhin wurde ein PKC/ Ras/ MEKK1/ p38 MAPK-abhängiger Signalweg beschrieben, der an der Regulation der TPA-abhängigen Induktion der Prx I Gentranskription beteiligt war. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um das

Zusammenspiel von oxidativem Stress und Karzinogenese und den möglichen protektiven und regulatorischen Funktionen von Prx I aufzuklären.

5 Literaturverzeichnis

- Ames B. N., Swirsky Gold L. und Willett W. C. (1995). *The causes and prevention of cancer*. Proc Natl Acad Sci USA **92**, 5258-5265.
- Alam J., Wicks C., Stewart D., Gong P., Touchard C., Otterbein S., Choi A. M. K. und Cook J. L. (1999). *Nrf2, a cap'n`collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene*. J Biol Chem **274**, 26071-26078.
- Barnes P. J. und Karin M. (1997). *Nuclear factor- κ B- a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases*. NEJM **336**, 1066-1071.
- Carter A. B., Tephly L. A. und Hunninghake G. W. (2001). *The absence of activator protein 1-dependent gene expression in THP-1 macrophages stimulated with phorbol esters is due to lack of p38 mitogen-activated protein kinase activation*. J Biol Chem **276**, 33826-33832.
- Cerutti P. A. (1994). *Oxy-radicals and cancer*. Lancet **344**, 862-863.
- Chang T. S., Jeong W., Choi S. Y., Yu S., Kang S. W. und Rhee S. G. (2002). *Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation*. J Biol Chem **277**, 25370-25376.
- Dashti S. R., Efimova T. und Eckert R. L. (2001). *MEK6 regulates human involucrin gene expression via a p38 α - and p38 δ -dependent mechanism*. J Biol Chem **276**, 27214-27220.
- Efimova T., LaCelle P., Welter J. F. und Eckert R. L. (1998). *Regulation of human involucrin promotor activity by a protein kinase C, Ras, MEKK1, MEK3, p38/RK, AP-1 signal transduction pathway*. J Biol Chem **273**, 24387-24395.
- Finco T. S., Westwick J. K., Norris J. L., Beg A. A., Der C. J. und Baldwin Jr. A. S. (1997). *Oncogenic Ha-Ras-induced signaling activates NF- κ B transcriptional activity, which is required for cellular transformation*. J Biol Chem **272**, 24113-24116.
- Finkel T. (1998). *Oxygen radicals and signaling*. Curr Opin Cell Biol **10**, 248-253.
- Gieche J., Mehlhase J., Licht A., Zacke T., Sitte N. und Grune T. (2001). *Protein oxidation and proteolysis in RAW264.7 macrophages: effects of PMA activation*. Biochimica et Biophysica Acta **1538**, 321-328.

- Gopalakrishna R. und Jaken S. (2000). *Protein kinase C signaling and oxidative stress*. Free Radic Biol Med **28**, 1349-1361.
- Haliwell B. (1994). *Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence?* Lancet **344**, 721-724.
- Hofmann B., Hecht H.-J., Flohe L. (2002). *Peroxiredoxins*. Biol. Chem. **383**, 347-364.
- Imlay J. A. und Linn S. (1988). *DNA damage and oxygen radical toxicity*. Science **240**, 1302-1309
- Immenschuh S., Iwahara S.-I., Satoh H., Nell C., Katz N. und Muller-Eberhard U. (1995). *Expression of the mRNA of heme-binding protein 23 is coordinated with that of heme oxygenase-1 by heme and heavy metals in primary rat hepatocytes and hepatoma cells*. Biochemistry **34**, 13407-13411.
- Immenschuh S., Nell C., Iwahara S.-I., Katz N. und Muller-Eberhard U. (1997). *Gene regulation of HBP23 by metalloporphyrins and protoporphyrin IX in liver and hepatocyte cultures*. Biochem Biophys Res Comm **231**, 667-670.
- Immenschuh S., Stritzke J., Iwahara S.-I. und Ramadori G. (1999). *Up-regulation of heme-binding protein 23 (HBP23) gene expression by lipopolysaccharide is mediated via a nitric oxide-dependent signaling pathway in rat Kupffer cells*. Hepatology **30**, 118-127.
- Immenschuh S. und Baumgart-Vogt E. (2005). *Peroxiredoxins, oxidative stress and cell proliferation*. Antioxid Redox Signal. **7(5-6)**, 768-77. Review
- Ishii T., Yamada M., Sato H., Matsue M., Taketani S., Nakayama K., Sugita Y. und Bannai S. (1993). *Cloning and characterization of a 23-kDa stress-induced mouse peritoneal macrophage protein*. J Biol Chem **268**, 18633-18636.
- Ishii T., Itoh K., Takahashi S., Sato H., Yanagawa T., Katoh Y., Bannai S. und Yamamoto M. (2000). *Transcription factor Nrf2 coordinatly regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages*. J Biol Chem **275**, 16023-16029.
- Iwahara S.-I., Satoh H., Song D.-X., Webb J., Burlingame A. L., Nagae Y. und Muller-Eberhard U. (1995). *Purification, characterization and cloning of a heme-binding protein (23 kDa) in rat liver cytosol*. Biochemistry **34**, 13398-13406.

- Jardine H., MacNee W., Donaldson K. und Rahman I. (2002). *Molecular mechanism of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced glutathione depletion in alveolar epithelial cells.* J Biol Chem **277**, 21158-21166.
- Jenner P. (1994). *Oxidative damage in neurodegenerative disease.* Lancet **344**, 796-798.
- Kang S. W., Chae H. Z., Seo M. S., Kim K., Baines I. C. und Rhee S. G. (1998). *Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- α .* J Biol Chem **273**, 6297-6302.
- Karin M. (1995). *The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases.* J Biol Chem **270**, 16483-16486.
- Karin M., Liu Z.-g. und Zandi E. (1997). *AP-1 function and regulation.* Curr Opin Cell Biol **9**, 240-246.
- Karin M. und Ben-Neriah Y. (2000). *Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF- κ B activity.* Ann Rev Immunol **18**, 621-663.
- Kawai S., Takeshita S., Okazaki M., Kikuno R., Kudo A. und Amann E. (1994). *Cloning and characterization of OSF-3, a new member of the MER5 family, expressed in mouse osteoblastic cells.* J Biochem **115**, 641-643.
- Kietzmann T., Samoylenko A. und Immenschuh S. (2003). *Transcriptional regulation of heme oxygenase-1 gene expression by MAP kinases of the JNK and p38 pathways in primary cultures of rat hepatocytes.* J Biol Chem **278**, 17927-17936.
- Kim H., Lee T. H., Park E. S., Suh J. M., Park S. J., Chung H. K., Kwon O. Y., Kim Y. K., Ro H. K. und Shong M. (2000). *Role of peroxiredoxins in regulating intracellular hydrogen peroxide and hydrogen peroxide-induced apoptosis in thyroid cells.* J Biol Chem **275**, 18266-18270.
- Kim H.-P., Roe J.-H., Chock P. B. und Yim M. B. (1999). *Transcriptional activation of the human manganese superoxide dismutase gene mediated by tetradecanoylphorbol acetate.* J Biol Chem **274**, 37455-37460.
- Kyriakis, J. M. und Avruch J. (2001). *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation.* Physiol Rev **81**, 807-869.

- Lee H.-W., Ahn D.-H., Crawley S. C., Li J.-D., Gum, Jr. J. R., Basbaum C. B., Fan N. Q., Szymkowski, D. E., Han S.-Y., Lee B. H., Sleisinger M. H. und Kim Y. S. (2002). *Phorbol 12-myristate 13-acetate up-regulates the transcription of MUC2 intestinal mucin via Ras, ERK, and NF- κ B*. J Biol Chem **277**, 32624-32631.
- Lee S. P., Hwang Y. S., Kim Y. J., Kwon K. S., Kim H. J., Kim K. und Chae H. Z. (2001). *Cyclophilin A binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity*. J Biol Chem **276**, 29826-29832.
- Li B., Ishii T., Tan C. P., Soh J.-W. und Goff S. P. (2002). *Pathways of induction of peroxiredoxin I expression in osteoblasts*. J Biol Chem **277**, 12418-12422.
- Lowry O. W., Rosenbrough N. J., Farr T. und Randell R. J. (1951). *Protein measurement with the Folin Phenol Reagent*. J Biol Chem **193**, 165-175.
- Majumdar S., Lamothe B. und Aggarwal B. B. (2002). *Thalidomide suppresses NF- κ B activation induced by TNF and H₂O₂, but not that activated by ceramide, lipopolysaccharides, or phorbol ester*. J Immunol **168**, 2644-2651.
- Mayo M. W., Norris J. L. und Baldwin Jr. A. S. (2001). *Ras regulation of NF- κ B and apoptosis*. Methods Enzymol **333**, 73-87.
- Mu Z. M., Yin X. Y. und Prochownik E. V. (2002). *Pag, a putative tumor suppressor, interacts with the myc box II domain of c-myc and selectively alters its biological function and target gene expression*. J Biol Chem **277**, 43175-43184.
- Neumann C. A., Krause D. S., Carman C. V., Das S., Dubey D. P., Abraham J. L., Bronson R. T., Fujiwara Y., Orkin S. H. und Van Etten R. A. (2003). *Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression*. Nature **424**, 561-565.
- Nguyen T., Sheratt P. J. und Pickett C. B. (2003). *Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element*. Annu Rev Pharmacol Toxicol **43**, 233-260.
- Oberley T. D. (2002). *Oxidative damage and cancer*. Am J Pathol **160**, 403-408.
- Pramanik R., Qi X., Borowicz S., Choubey D., Schultz R. M., Han J. und Chen G. (2002). *p38 isoforms have opposite effects on AP-1-dependent transcription through regulation of c-Jun*. J Biol Chem **278**, 4831-4839.
- Prosperi M.-T., Ferbus, D., Karczinski I. und Goubin, G. (1993). *A human cDNA corresponding to a gene overexpressed during cell proliferation encodes a product*

- sharing homology with amoebic and bacterial proteins.* J Biol Chem **268**, 11050-11056.
- Prosperi M.-T., Ferbus D., Rouillard D. und Goubin G. (1998). *The PAG gene product, a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase, is overexpressed in cells entering S phase and by contact with agents inducing oxidative stress.* FEBS Lett **423**, 39-44.
- Rabilloud T., Heller M., Gasnier F., Luche S., Rey C., Aebersold R., Benahmed M., Louisot P. und Lunardi J. (2002). *Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress.* J Biol Chem **277**, 19396-19401.
- Rebollo A. und Martinez A. C. (1999). *Ras proteins: recent advances and new functions.* Blood **94**, 2971-2980.
- Rhee S. G., Kang S. W., Netto L. E., Seo M. S. und Stadtman E. R. (2003). *Cellular regulation by hydrogen peroxide.* J Am Soc Nephrol **14**, S211-S215.
- Sauer H., Wartenberg M. und Hescheler J. (2001). *Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation.* Cell Physiol Biochem **11**, 173-186.
- Scandalios J. G. (1997). *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses.* Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Shackelford R. E., Kaufmann W. K. und Paules R. S. (2000). *Oxidative stress and cell cycle checkpoint function.* Free Radic Biol Med **28**, 1387-1404.
- Shau M. S. und Kim A. (1994). *Identification of natural killer enhancing factor as a major antioxidant in human red blood cells.* Biochem Biophys Res Commun **199**, 83-88.
- Shen C. und Nathan C. (2002). *Nonredundant antioxidant defense by multiple two-cysteine peroxiredoxins in human prostate cancer cells.* Mol Med **8**, 95-102.
- Sies H. (1991). *Oxidative stress: from basic research to clinical application.* Am J Med **30**, 91(3C):31S-38S.
- Siow R. C. M., Ishii T., Sato H., Taketani S., Leake D. S., Sweiry J. H., Pearson J.D., Bannai S. und Mann, G.E. (1995). *Induction of the antioxidant stress proteins heme oxygenase-1 and MSP23 by stress agents and oxidised LDL in cultured vascular smooth muscle cells.* FEBS Lett **368**, 239-242.

- Takahashi H., Asano K., Kinouchi M., Ishida-Yamamoto A., Wuepper K. D. und Iizuka H. (1998). *Structure and transcriptional regulation of the human cystatin A gene*. J Biol Chem **273**, 17375-17380.
- Thannickal V. J. und Fanburg B. L. (2000). *Reactive oxygen species in cell signaling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**, L1005-L1028.
- Weitzman S. A. und Gordon L. I. (1990). *Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis*. Blood **76**, 655-663.
- Wen S.-T. und Van Etten R. A. (1997). *The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity*. Genes Dev **11**, 2456-2467.
- Witztum J. L. (1994). *The oxidation hypothesis of atherosclerosis*. Lancet **344**, 793-795.
- Wong W. K., Ou X.-M., Chen K. und Shih J. C. (2002). *Activation of human monoamine oxidase B gene expression by a protein kinase C MAPK signal transduction pathway involves c-Jun and Egr-1*. J Biol Chem **277**, 22222-22230.
- Woo H. A., Chae H. Z., Hwang S. C., Yang K.-S., Kang S. W., Kim K. und Rhee S. G. (2003). *Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation*. Science **300**, 653-656
- Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J. und Poole, L. B. (2003). *Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins*. Trends Biochem Sci **28**, 32-40.

6 Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Alexander Hess, Nastiti Wijayanti, Andrea Pathe Neuschäfer-Rube, Norbert Katz, Thomas Kietzmann, Stephan Immenschuh: Phorbol ester-dependent activation of peroxiredoxin I gene expression via a protein kinase C, ras, p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway (2003). J Biol Chem 278, 45419-45434.

Abstracts

Alexander Hess, Andrea Pathe Neuschäfer-Rube, Norbert Katz, Thomas Kietzmann, Stephan Immenschuh: Induktion der Genexpression von Häm-bindendem Protein 23 (HBP23)/ Peroxiredoxin (Prx) I durch Tetradecanoylphorbol Acetat (TPA) in Makrophagen. Funktionelle Charakterisierung der 5`-flankierenden Promotorregion (2002). J. Lab. Med. 26; 517.

Alexander Hess, Andrea Pathe Neuschäfer-Rube, Norbert Katz, Thomas Kietzmann, Stephan Immenschuh: Regulation der Peroxiredoxin (Prx) I Promotoraktivität über einen Protein Kinase C, Ras, MEKK1, MKK4, JNK1, AP-1 vermittelten Signalweg in Gewebemakrophagen der Leber (2003). Z. f. Gastroenterol. 41; 110.

Poster

Alexander Hess, Andrea Pathe Neuschäfer-Rube, Norbert Katz, Thomas Kietzmann, Stephan Immenschuh: Regulation der Peroxiredoxin (Prx) I Promotoraktivität über einen Protein Kinase C, Ras, MEKK1, MKK4, JNK1, AP-1 vermittelten Signalweg in Gewebemakrophagen der Leber. GASL (2003), Berlin.

7 Zusammenfassung

Das antioxidativ wirksame Enzym Peroxiredoxin (Prx) I besitzt Thioredoxin-abhängige Peroxidaseaktivität und wird zu den Prxs gezählt. Prx I schützt die Zelle durch den katalytischen Abbau reaktiver Sauerstoffverbindungen vor oxidativem Stress und ist darüber hinaus an der Modulation zellulärer Signalwege beteiligt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Prx I Genexpression in der murinen Monozytenzelllinie RAW264.7 durch den Phorbol-ester 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) transkriptional induziert wurde. Mittels Transfektionsstudien mit Luciferasereportergenkonstrukten konnte demonstriert werden, daß für diese Induktion zwei Aktivator Protein-1 (AP-1) Elemente innerhalb der Promotorregion des Prx I Gens von entscheidender Bedeutung waren. Weiterhin konnte in Electrophoretic Mobility Shift Assays gezeigt werden, daß die funktionell identifizierten AP-1 Stellen nukleäre Zielsequenzen für c-Jun darstellten. Die TPA-abhängige Induktion der Prx I Genexpression wurde durch pharmakologische Inhibitoren der Proteinkinase C gehemmt. Überexprimierte dominant-negative Formen von Ras und MEKK1, nicht jedoch von Raf-1, führten zur Herabregulation der TPA-abhängigen Induktion der Prx I Promotoraktivität. SB202190, ein Hemmstoff der p38 Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK), und Expressionsvektoren für dominant-negative Formen der MAPK Kinase (MKK)4, MKK6 und p38 MAPK führten zu einer Verminderung der TPA-induzierten Prx I Gentranskription. Im Gegensatz dazu hatten Inhibitoren der MAPK c-Jun N-terminale Kinase und des NF- κ B-Signalweges ebenso wie die Überexpression dominant-negativer Formen der MKK7 und des Inhibitor von NF- κ B keinen Effekt auf die Induktion der Prx I Promotoraktivität durch TPA. Weiterhin führte die Überexpression von p38 α und p38 β , nicht aber von p38 γ und p38 δ , zu einer Heraufregulation der basalen Prx I Promotoraktivität. Diese Ergebnisse zeigen, daß die TPA-abhängige transkriptionale Induktion der Prx I Genexpression in RAW264.7 Zellen über einen Proteinkinase C/ Ras/ MEKK1/ p38 MAPK-vermittelten Signalweg reguliert wird.

8 Summary

The antioxidant protein peroxiredoxin (Prx) I is a thioredoxin peroxidase and belongs to the Prx protein family. The functions of Prx I comprise protection against oxidative stress by detoxification of reactive oxygen species and the modulation of signal transduction pathways. Moreover, Prx I can regulate cell proliferation and differentiation by interacting with cellular oncogenes. In this study it was shown that Prx I gene expression was transcriptionally induced in RAW264.7 monocytic cells by the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). The TPA-dependent induction of Prx I gene expression was mediated by two proximal activator protein-1 (AP-1) sites of the rat Prx I promoter region as determined by transfection studies with luciferase reporter gene constructs and electrophoretic mobility shift assays. Prx I gene induction by TPA was decreased by protein kinase C inhibitors and overexpressed dominant negative mutants of Ras and MEKK1, but not Raf-1. The p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) inhibitor SB202190 and overexpression of dominant negative mutants of MAPK kinase (MKK) 4, MKK6 and p38 MAPK inhibited the TPA-dependent induction of Prx I gene transcription. In contrast, inhibitors of the c-Jun N-terminal kinase, SP600125, and the NF- κ B signaling pathway, caffeic acid phenethyl ester, as well as overexpressed dominant negative forms of MKK7 and inhibitor- κ B had no effect on the upregulation of Prx I promoter activity by TPA. Furthermore cotransfection of wildtype p38 α and p38 β , but not that of p38 γ and p38 δ , increased Prx I promoter activity. This data indicates that in RAW264.7 cells the TPA-dependent induction of Prx I gene expression is mediated by a protein kinase C, Ras, MEKK1, p38 MAPK signaling pathway.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Stephan Immenschuh für die Überlassung des Themas, die hilfreiche und zuverlässige Betreuung bei theoretischen und praktischen Fragestellungen sowie für die kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Dr. Norbert Katz für die fortlaufende Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Evelyn Zell, Frau Nastiti Wijayanti und Herrn Dennis Brusius für die praktische und theoretische Unterstützung beim Erlernen und Durchführen der molekularbiologischen Techniken bedanken.

Mein weiterer Dank gilt darüber hinaus allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Gießen.

Außerdem möchte ich mich bei meiner gesamten Familie für die mir entgegengebrachte Unterstützung und Hilfe bedanken.

10 Lebenslauf

20.07.1973	geboren in Berlin-Schmargendorf Eltern: Dr. Wolfgang und Ingrid Heß, geboren Galke
1979-1985	Conrad Grundschule, Berlin-Wannsee
1985-1987	Dreilindengymnasium, Berlin-Zehlendorf
1987-1988	Steinbarthgymnasium, Duisburg
1988-1992	Stormarnschule, Ahrensburg
22.05.1992	Abitur
1992-2001	Medizinstudium an der medizinischen Hochschule Lübeck und der Justus-Liebig-Universität Gießen
09.05.2001	3. Staatsexamen an der Justus-Liebig-Universität Gießen
01.08.2001	Beginn der Experimente zur vorliegenden Doktorarbeit
01.04-30.09.2003	Arzt im Praktikum am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Universitätsklinik Gießen
01.12.2003-30.11.2004	Arzt im Praktikum und Assistenzarzt in der Inneren Medizin am ev. Diakoniekrankenhaus in Bremen
seit 01.02.2005	wissenschaftlicher Mitarbeiter und Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik 4 des Universitätsklinikums Erlangen

