

---

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
Technik und Umwelt

---

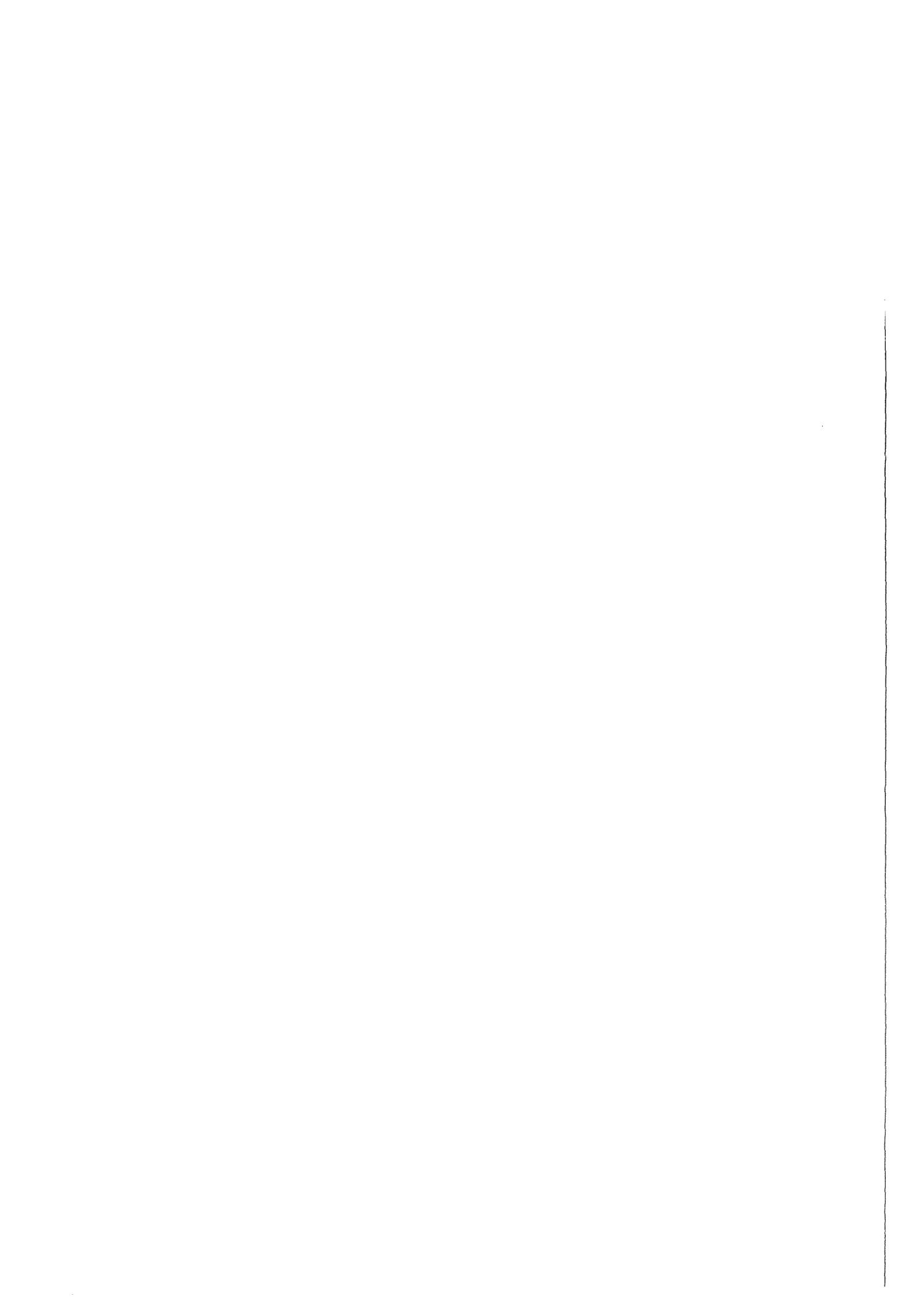
**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 6043

**Zwei Mechanismen führen zur  
UV-induzierten Aktivierung des  
Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B:  
Ein DNA-Schaden-abhängiger  
und ein -unabhängiger Prozess**

**K. J. Bender**  
Institut für Genetik

Februar 1998

---



Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6043

Zwei Mechanismen führen zur UV-induzierten  
Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B:  
Ein DNA-Schaden-abhängiger und ein  
-unabhängiger Prozess.

Klaus Josef Bender

Institut für Genetik

Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften  
der Universität Karlsruhe (TH)  
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe  
1998

**Als Manuskript gedruckt**  
**Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor**  
**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH**  
**Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**  
**Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft**  
**Deutscher Forschungszentren (HGF)**  
**ISSN 0947-8620**

## Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B spielt eine Schlüsselrolle bei der Reaktion des Organismus auf Stress und schädliche Agenzien. NF- $\kappa$ B wird nicht nur durch physiologische, sondern auch durch nicht-physiologische Induktoren, wie Tumorpromotoren (z.B. den Phorbol-ester TPA) oder UV-Strahlung aktiviert. Neben zellulären Genen, die vor allem die Immun- und Entzündungsreaktion des Organismus vermitteln, können durch NF- $\kappa$ B auch Proviren aktiviert werden. Hierzu zählen das HIV-1 (der Erreger der menschlichen Immunschwäche „AIDS“) und das HSV (der Erreger von Lippenherpes). In der vorliegenden Arbeit wird der Mechanismus identifiziert, der der UV-induzierten Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors zugrunde liegt. Es konnten zwei unterschiedliche Vorgänge der Aktivierung definiert werden, die in zwei überlappenden Wellen zur UV-induzierten Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen. Bei beiden Mechanismen erfolgt die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch den induzierten Abbau des Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$ .

Ein früher Mechanismus führt innerhalb von 30 Minuten bis sechs Stunden zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Die Gegenüberstellung zweier Zelltypen, von denen der eine UV-induzierte DNA-Schäden reparieren kann und der andere zu dieser Reparatur nicht fähig ist, zeigte, daß die frühe Aktivierung nicht von einem DNA-Schaden abhängt, der durch die UV-Strahlung verursacht wird. Die UV-induzierte Aktivierung von Zelloberflächen-Rezeptoren, die für die Aktivierung anderer UV-induzierbarer Transkriptionsfaktoren (cFos, cJun, ATF-2) wichtig ist, ist offensichtlich auch nicht beteiligt, da die frühe UV-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung nicht durch Suramin gehemmt werden kann und die Zellen durch Vorbehandlung mit Zytokinen/Wachstumsfaktoren nicht refraktär gegenüber der UV-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung werden. Der frühe I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau wird, im Gegensatz zur Situation mit vielen anderen Induktoren, nicht über die Phosphorylierung des Proteins an den Serinen in den Positionen 32 und 36 vermittelt und hängt auch nicht von einer Tyrosin-Phosphorylierung des Proteins ab. Für den Abbau ist jedoch eine zehn Aminosäuren lange Sequenz notwendig, die zwischen den Positionen 277 und 287 des C-terminus lokalisiert ist.

Ein zweiter Mechanismus führt verzögert zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Diese Aktivierung ist von der Dichte der UV-induzierten DNA-Schäden abhängig und wird über die autokrine/parakrine Wirkung des Zytokins IL-1 $\alpha$  vermittelt. Dies wurde durch Hemmung der späten Aktivierung in primären Fibroblasten mittels neutralisierender Antikörper, die gegen

IL-1 $\alpha$  gerichtet sind und nach der UV-Bestrahlung ins Medium gegeben wurden, bewiesen. Die Freisetzung von IL-1 $\alpha$  wird in diesen Zellen über die Spaltung der Vorläuferform des IL-1 $\alpha$  reguliert. Für diese Spaltung ist die induzierte Aktivität von Caspasen oder dem Enzym Calpain verantwortlich, denn Inhibitoren dieser Proteasen unterdrücken sowohl die Spaltung von IL-1 $\alpha$ -Vorläufern als auch die späte Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Diese Zytokin-Ausschüttung könnte für einen Teil der systemischen Wirkung von UV-Strahlung auf den Organismus verantwortlich sein.

## **Activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B in response to UV irradiation by two mechanisms: a DNA damage dependent and an independent process.**

**Abstract.** The transcription factor NF- $\kappa$ B plays a key role in the response of organisms to stress and harmful agents. NF- $\kappa$ B is not only activated by physiological inducers but also by non-physiological inducers, such as tumor promoters (e.g. the phorbol ester TPA) or UV irradiation. In addition to genes involved in immune and inflammatory reactions of the organism, proviruses can also be activated by NF- $\kappa$ B. Among these viruses are HIV-1 (human immunodeficiency virus 1, which causes the acquired immunodeficiency syndrome „AIDS“) and the herpes simplex virus (which causes herpes). In this work the mechanism of UV-induced activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B was identified. Two different mechanisms could be defined, which lead to NF- $\kappa$ B activation in two overlapping waves. In both cases NF- $\kappa$ B activation is caused by induced degradation of the NF- $\kappa$ B inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$ .

An early mechanism activates NF- $\kappa$ B within 30 min to six hours after irradiation. The comparison of two cell types, from which one is able to repair UV-induced DNA damages and the other is not, showed that this early activation is independent of DNA damages caused by UV irradiation. The UV-induced activation of cell surface-receptors, which is responsible for the activation of other UV-inducible transcription factors (e.g. cFos, cJun, ATF-2) is not involved in the activation of NF- $\kappa$ B: the early UV-induced activation of NF- $\kappa$ B was not inhibited by the growth factor receptor inhibitor suramin and the pretreatment of cells with cytokines or growth factors did not inhibit UV-induced NF- $\kappa$ B activation. Also, in contrast to other inducers, the early UV-induced I $\kappa$ B $\alpha$  degradation does neither depend on the phosphorylation of serines 32 and 36 nor on tyrosine phosphorylation of the protein. However a sequence of ten amino acids in the C-terminal part of the protein between positions 277 and 287 is essential for degradation.

A second mechanism leads to a delayed activation of NF- $\kappa$ B. As shown by the comparison of the dose dependence in repair proficient and deficient cells, thus activation depends on the density of UV-induced DNA damage. It is mediated through the autocrine/paracrine action of the cytokine IL-1 $\alpha$ , as demonstrated by the inhibition of the late NF- $\kappa$ B activation in repair

deficient fibroblasts by neutralizing antibodies directed against this cytokine given into the culture medium immediately after UV irradiation. In these cells the release of IL-1 $\alpha$  is enhanced through the UV-induced cleavage of the IL-1 $\alpha$  precursor. The UV-induced activation of caspases or of the enzyme calpain is responsible for this cleavage, because inhibitors of such proteases abolished the cleavage of the IL-1 $\alpha$  precursor as well as the late activation of NF- $\kappa$ B. Thus the secretion of cytokines in response to UV irradiation could mediate at least a part of the systemic action of UV on the organism.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	1
<b>Einleitung</b> .....	5
<b>Material</b> .....	25
<b>Methoden</b> .....	33
<b>1. Behandlung von Nukleinsäuren</b> .....	33
Extraktion von Nukleinsäuren mit Phenol/Chloroform	
Fällung von Nukleinsäuren	
Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	
<b>2. DNA-Methoden</b> .....	34
<u>2.1 DNA-Präparation</u> .....	34
Plasmid-DNA Mixi-Präparation	
Plasmid-DNA Mini-Präparation	
<u>2.2 Klonierungstechniken</u> .....	35
Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	
Auffüllen von 5'-Überhängen	
Ligation von DNA-Fragmenten	
Punktgerichtete Mutagenisierung	
Sequenzierung von DNA	
Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	
Transformation kompetenter Bakterien	
<u>2.3 DNA-Gelelektrophorese</u> .....	38
Agarose-Gelelektrophorese	
Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	
Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gele	
Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden mit T4-Polynukleotidkinase	

### 3. RNA-Methoden .....40

Präparation von Poly (A)<sup>+</sup>mRNA (Aviv und Leder, 1972)  
Auftrennung von mRNA im Agarosegel  
Übertragung von mRNA auf eine Membran ("*Northern blot*")  
Nachweis von spezifischer mRNA mit <sup>32</sup>P-markierten cDNA-Sonden  
(Denhardt, 1966; Alwine *et al.*, 1977)  
Nachweis von spezifischer mRNA mit einer <sup>32</sup>P-markierten Ribsonde  
Markierung von cDNA-Fragmenten mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP für  
Northern-Blot-Analysen  
<sup>32</sup>P-Markierung von RNA-Sonden für Northern-Blot-Analysen  
(Melton *et al.*, 1984)

### 4. Protein-Methoden .....44

Präparation von Zytoplasma- und Kernextrakten (Stein *et al.*, 1989a)  
Präparation von Zytoplasmaextrakten (modifiziert nach Koong *et al.*, 1994)  
Nachweis von DNA-bindenden Proteinen durch Gelretardationsanalyse  
(„*Bandshift Analyse*“)  
Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry *et al.* (1951)  
SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)  
Übertragung von Proteinen auf PVDF-Membran und Hybridisierung mit  
spezifischen Antikörpern ("*Western Blot*")  
Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen-Gelen  
Immunpräzipitation (IP) von Proteinen  
Nachweis von IL-1 $\alpha$  im Kulturmedium mittels Immunpräzipitation  
TCA-Fällung von Proteinen  
Herstellung der Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Stammlösung (Kypta *et al.*, 1988)  
Herstellung von Pervanadat-Lösung (Imbert *et al.* 1996)

### 5. Zellkultur .....49

Umsetzen von Zellen  
Einfrieren und Auftauen von Zellen  
Behandlung von Zellen mit Induktoren  
Transfektion von Zellen mit DEAE-Dextran-(Kawai und Nishizana, 1987)  
Transfektion von Zellen mit Lipofectamine  
*In vivo* Markierung von Proteinen mit L-[<sup>35</sup>S]-Cystein und L-[<sup>35</sup>S]-Methionin

**Ergebnisse ..... 53**

**Unterschiedliche Kinetiken bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B ..... 53**

**Zwei unterschiedliche Mechanismen der NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach UV-Bestrahlung ..... 55**

**Wie ist die frühe DNA-Schaden-unabhängige Aktivierung von NF $\kappa$ B zu erklären? ..... 59**

Die Hemmung der Transkription in UV-bestrahlten Zellen ist nicht für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B verantwortlich

Die frühe I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung bzw. NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist nicht von Membran-Rezeptoren abhängig

Die frühe UV-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung benützt nicht IL-1 $\alpha$ R- oder TNF $\alpha$ R-abhängige Signalweg

N-terminale Bereiche des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins sind für den UV-induzierbaren Abbau essentiell

Die Serine 32 und 36 des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins sind für den frühen UV-induzierten Abbau entbehrlich

UVC führt nicht zur Tyrosin-Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$

Der C-Terminus von I $\kappa$ B $\alpha$  ist für den frühen UV-vermittelten Abbau erforderlich

**Wie ist die späte DNA-Schaden-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B reguliert? ..... 83**

Die DNA-Schaden-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist verzögert

Die verzögerte Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Komplexe wird durch IL-1 $\alpha$  vermittelt

Die Menge der IL-1 $\alpha$ -mRNA ist in Fibroblasten nach UV-Bestrahlung nicht erhöht

Die UV-induzierte Spaltung von preIL-1 $\alpha$  wird durch Caspasen vermittelt

Inhibitoren von Caspasen und Calpain hemmen die späte NF- $\kappa$ B-Aktivierung

Die N-terminalen Serine des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins sind für die späte UV-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B notwendig

**Diskussion** ..... 97

**Mechanismus der frühen UV-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung**..... 98

Die UV-induzierte Hemmung der Transkription oder Translation kann die UV-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B nicht erklären

Membran-Rezeptoren tragen nicht zur UV-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung bei

Weder die N-terminalen Serine, noch eine Tyrosin-Phosphorylierung bestimmen den Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$

Im C-Terminus von I $\kappa$ B $\alpha$  befinden sich essentielle Sequenzen für den UV-vermittelten Abbau

**Mechanismus der späten UV-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung** ..... 105

Das Zytokin IL-1 $\alpha$  vermittelt die späte Aktivierung von NF- $\kappa$ B

Die UV-induzierte Spaltung von preIL-1 $\alpha$  erfolgt durch Caspasen oder durch Calpain

**Ein Modell der UV-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung**..... 110

**Literatur** ..... 114

## Abkürzungen

µg	Mikrogramm (10 <sup>-6</sup> Gramm)	ds	doppelsträngig
µl	Mikroliter (10 <sup>-6</sup> Liter)	DTT	Dithiothreitol
µM	Mikromolar (10 <sup>-6</sup> Molar)	dTTP	Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
Abb	Abbildung		
Act.D	Actinomycin D	E.coli	Escherichia coli
AP-1	Aktivator-Protein-1	ECL	„enhanced chemoluminescence“
APS	Ammoniumperoxodisulfat	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
AS	Aminosäure(n)	EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ATF	aktivierender Transkriptionsfaktor	ELISA	„Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat	Em	Emetin
bp	Basenpaar	EPiF	Extrazellulärer Proteinsynthese-induzierender Faktor
Bq	Bequerel		
BSA	Rinder Serumalbumin ("bovine serum albumine")	ERK	„extracellular signal-regulated kinase“
Bsp.	Beispiel	et al.	und andere („et alii“)
bzw.	beziehungsweise		
c	zellulär („cellular“)	f.c.	Endkonzentration („final concentration“)
°C	Grad Celcius	FCS	fötales Kälberserum
C-Terminus	Carboxyterminus	g	Gramm oder Erdbeschleunigung
CAT	Chloramphenicol-Transferase	GCK	„germinal center kinase“
cDNA	„copy“-Desoxyribonukleinsäure	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Ci	Curie	GR	„growth factor receptor“
cm	Zentimeter	h	Stunde
CMV	Cytomegalovirus	HA	Hemagglutinin
COOH-	Carboxygruppe	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
cpm	Zerfälle pro Minute	HIV	menschliches Immunschwäche Virus („human immunodeficiency virus“)
CREB	„cyclic AMP response element binding protein“	HSV	Herpes Simplex Virus
DAG	Diacylglycerin	HRP	Meerretich Peroxidase
d.h.	das heißt		
dATP	Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat	IL-1α	Interleukin-1α
dCTP	Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat	IP	Immunpräzipitation
DEAE	Diethylaminoethyl	J	Joule
DEPC	Diethylpyrocarbonat	JNK	Jun-N-terminale Kinase
dGTP	Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat		
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagles's Medium“	kb	Kilobasen (1 kb = 1.000 bp)
DMSO	Dimethylsulfoxid	kD	Kilodalton (10 <sup>3</sup> Dalton)
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
DNase	Desoxyribonuklease		
dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphate		
DRB	5,6 Dichloro-1-β-D-Ribofuranosylbenzimidazol		

l	Liter	pV	Pervanadat
LPA	„lysophosphatidic acid“	PVP	Polyvinylpyrrolidon
m	Meter	rCTP	ribo-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
M	molar	RNA	Ribonukleinsäure
mA	Milliampere	RNase	Ribonuklease
MAPK	"mitogen activated protein kinase"	rNTP	ribo-Desoxy-Nukleosidtriphosphate
MAPKK	MAP-Kinase-Kinase	RSV	Rous Sarcoma Virus
MAPKKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase	RT	Raumtemperatur
MBq	Megabequerel ( $10^6$ Bq)	s	Sekunde
MEK	MAPK/ERK-Kinase	SAPK	„stress-activated protein kinase“
MEKK	MEK-Kinase	SDS	Natriumdodecylsulfat
mg	Milligramm ( $10^{-3}$ Gramm)	SH	Src-Homologie
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex	SPRK	„SH3 domain-containing proline-rich kinase“
min	Minute	SSC	„standard saline citrat“
MKK	MAP Kinase Kinase	SV40	Simian Virus 40
MLK	„mixed lineage kinase“	TAD	Transaktivierungsdomäne
ml	Milliliter ( $10^{-3}$ Liter)	TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
mm	Millimeter ( $10^{-3}$ m)	TCA	Trichloressigsäure
mM	Millimolar ( $10^{-3}$ M)	TCF	„ternary complex factor“
MOPS	3-N-Morpholinopropan-sulfonsäure	TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
mRNA	„messenger“ RNA (Boten-RNA)	tk	Thymidinkinase
MUK	„MAPK-upstream kinase“	TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
NAC	N-Acetylcystein	TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
NaDOC	Natriumdeoxycholat	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
NFB	Normalfibroblasten	tRNA	Transfer-RNA
NF- $\kappa$ B	Nuklearer Faktor-kappa B	u.a.	unter anderen
ng	Nanogramm ( $10^{-9}$ g)	U	Enzymeinheit („unit“)
NH <sub>2</sub> -NLS	Aminogruppe Nukleäre Lokalisationssequenz („nuclear localization sequence“)	UV	ultraviolette Strahlung
nm	Nanometer ( $10^{-9}$ m)	v	viral
°C	Grad Celsius	v/v	Volumen pro Volumen
OD	optische Dichte	V	Volt
p.a.	Analyse-rein	vgl.	vergleiche
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	Vol.	Volumen
PAK	„p21-activated protein kinase“	wt	Wildtyp
PARP	Poly(ADP-ribose) Polymerase	w/v	Gewicht pro Volumen
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung	XPA	Xeroderma pigmentosum Gruppe A
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion	z.B.	zum Beispiel
PDGF	„platelet derived growth factor“	z.T.	zum Teil
pH	pH-Wert		
PKC	Proteinkinase C		
pmol	picomol ( $10^{-12}$ M)		
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid		
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid		

Abkürzungen, die im Text erläutert oder beschrieben wurden, sind hier nicht alle aufgeführt.

### Ein- und Dreibuchstabencode für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Iso	Isoleuzin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leuzin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin



# Einleitung

## UV-Strahlung

Das Leben auf der Erde hängt von der sichtbaren Strahlung der Sonne ab. Doch zugleich wird das Leben durch das Sonnenlicht bedroht. Insbesondere der ultraviolette Anteil des Sonnenlichtes führt zu schwerwiegenden Veränderungen in zellulären Strukturen, wie z.B. DNA und Proteinen. Ohne eine Schutzschicht, die diese gefährliche Strahlung abfängt, wäre das Leben auf unserer Erde in der uns bekannten Form nicht möglich. Das für das menschliche Auge unsichtbare Ultraviolett wird in drei Wellenlängenbereiche eingeteilt: UVA von 315-380 nm, UVB von 280-315 nm und UVC von 100-280 nm (nach DIN 5031, Blatt 7; Sacklowski, 1973). Der kurzwellige Anteil der solaren UV-Strahlung (<290 nm) wird durch die stratosphärische Ozonschicht absorbiert (Madronich, 1993). Die Dicke der Ozonschicht ist jahreszeitlichen Schwankungen unterzogen. Die frühsummerliche Verringerung ist an den Erdpolen besonders stark („Ozonloch“). Aus den Messungen seit 1979 ergibt sich auch, daß die Verringerung der Ozonschicht seither fast jedes Jahr stärker und langandauernder geworden ist. Parallel dazu wurde ein Anstieg der terrestrischen UVB-Strahlung gemessen (Hough und Derwent, 1990; Kerr und McElroy, 1993). Welche Auswirkung hat diese erhöhte Strahlung auf Pflanzen, Tiere und insbesondere auf den Menschen? In einigen Ländern, wie z.B. Australien, ist das Risiko an Hautkrebs zu erkranken erhöht. Die hohe Hautkrebsrate überall in den westlichen Ländern hat ihre Hauptursache im geänderten Freizeitverhalten, welches mit erhöhter Sonnen- und UV-Exposition einhergeht.

Die Bestrahlung der menschlichen Haut und von lebenden Zellen mit UV-Strahlung erzeugt eine Reihe spezifischer Reaktionen, die als „UV-Antwort“ zusammengefaßt werden. Neben äußerlich sichtbaren Entzündungsreaktionen (wie Sonnenbrand), kommt es auch zur Aktivierung von zellulären Signalwegen, die nachhaltige Veränderungen des Expressionsmusters vieler Gene bewirken. Die Anschaltung dieser Signalwege erfolgt in den meisten Fällen durch die Aktivierung von Membran-Rezeptoren (Devary *et al.*, 1992; Sachsenmaier *et al.*, 1994; Schieven *et al.*, 1994; Warmuth *et al.*, 1994; Coffey *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1996; Knebel *et al.*, 1996; Rosette und Karin, 1996). UV-induzierbare Gene kodieren u.a. für Transkriptionsfaktoren, Metalloproteasen, Wachstumsfaktoren und Zytokine (zur Übersicht siehe: Holbrook und Fornace, 1991; Herrlich *et al.*, 1992). Auch virale Promotoren, wie z.B. der Promotor des menschlichen Immunschwäche-Virus vom Typ 1 (Stein *et al.*, 1989b) oder des Herpes-Simplex-Virus (HSV), können infolge von

UV-Strahlung angeschaltet werden. UV-Strahlung führt aber auch zu chemischen Veränderungen in der DNA und in Proteinen. Die häufigsten DNA-Läsionen sind die Bildung eines Cyclobutan-Pyrimidindimers und eines Pyrimidin-Pyrimidon-(6-4)-Photoproduktes zwischen benachbart liegenden Pyrimidinen (Ananthaswamy und Pierceall, 1990). Die Wellenlängen-Abhängigkeit dieser Schäden spiegelt das Absorptionsspektrum der DNA wieder, mit einem Maximum bei 260 nm. Aber auch UVB-Licht und sogar UVA-Licht können in Säugerzellen zur Bildung von Pyrimidin-Dimeren führen (Hacham *et al.*, 1990). Die DNA-Schäden, die durch UVC und UVB verursacht werden, sind von gleicher Art (Setlow, 1974). Die Bestrahlung von Zellen mit  $30 \text{ J/m}^2$  UVC entspricht der Strahlendosis des Sonnenlichts während einer Stunde in 2300 m Höhe (Klocker *et al.*, 1984). Für Untersuchungen von UV-abhängigen zellulären Prozessen wird häufig UVC-Licht als Modellsystem eingesetzt, um die Bestrahlungszeiten möglichst kurz zu halten, obwohl diese Wellenlänge natürlicherweise nicht auf der Erde vorkommt.

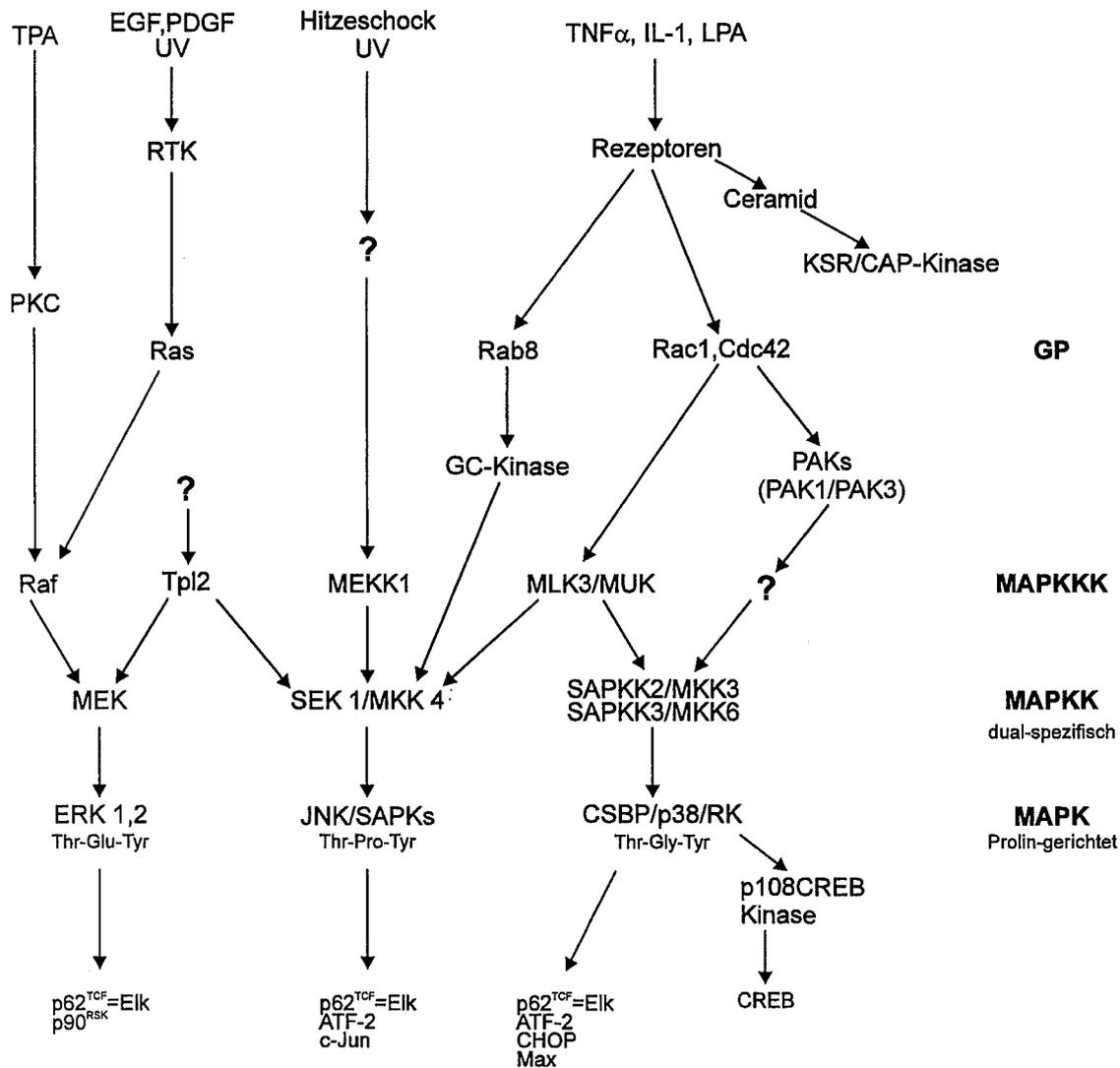
Die durch ultraviolette Strahlung verursachten Schäden können Mutationen im Erbgut der bestrahlten Zellen erzeugen, die zu einer neoplastischen Transformation der Zelle und damit zur Entstehung eines Tumors beitragen oder zum Tode der bestrahlten Zellen führen können. Krebs entsteht nicht durch eine einzige genetische Veränderung der Zelle, sondern infolge mehrerer aufeinanderfolgender Mutationen in Genen, die u.a. das Wachstum und die Differenzierung der Zelle, den Zellzyklus bzw. die Reparatur von DNA-Schäden kontrollieren. Die einzelnen Mutationen, die für die Ausbildung eines vollständigen, malignen Tumors notwendig sind, akkumulieren sich über die Jahre. Man spricht daher auch von einem Mehrschritt-Mechanismus der Tumorentstehung (Kanzerogenese). Die Häufigkeit des Auftretens von Krebs steigt daher mit zunehmendem Alter an. Der Mechanismus, über den die UV-Strahlung zur Entstehung von Krebs beiträgt, ist nicht eindeutig geklärt. UV-Strahlung führt hauptsächlich zur Bildung von Basaliomen (BCC, „basal cell carcinomas“), Plattenepithel-Karzinomen und Melanomen. Die Bedeutung der UV-Strahlung für die Induktion von Hautkrebs sei am Beispiel des Basalioms erläutert, dem häufigsten Typ von Hautkrebs in den USA. In 56 % aller Basaliome wurden Punktmutationen in dem für den Tumorsuppressor p53 kodierenden Gen gefunden. Hundert Prozent der Basenaustausche befanden sich dabei an benachbarten Pyrimidinen, was nur dann zu erwarten ist, wenn UV-Strahlung das auslösende Mutagen war (Ziegler *et al.*, 1993). UV-Strahlung verursacht jedoch nicht nur mutagene DNA-Schäden, sondern führt auch zu Genamplifikationen (Schimke, 1984; Lücke-Huhle und Herrlich, 1986; Lücke-Huhle *et al.*, 1989) und zur Unterdrückung von Immunreaktionen (Kripke *et al.*, 1992; Yarosh und Kripke, 1996).

## Signaltransduktionswege

Um auf extrazelluläre Reize reagieren zu können, müssen Zellen in der Lage sein, diese zu erkennen und in eine für die Zelle verständliche Sprache zu übersetzen. Als Empfänger für chemische Signale dienen hierfür meistens Rezeptoren, die entweder in die Plasmamembran eingebettet oder im Zytoplasma der Zelle lokalisiert sind. Die Reizübermittlung, die vom Rezeptor bis in den Zellkern reicht, wird als Signaltransduktion bezeichnet und führt zur veränderten Expression spezifischer Gene. Neben physiologischen Stimuli, wie Drüsen- und Gewebshormonen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen, reagieren Zellen auch auf eine Reihe nicht-physiologischer Reize, wie Strahlung (UV- oder Gamma-Strahlung), Hitzeschock, chemische Substanzen (z.B. alkylierende Agenzien, Phorbolster), oxidativen Stress und Hyperosmolarität. Dabei werden vorhandene zelluläre Signalwege angeschaltet, welche die Aktivität von Transkriptionsfaktoren beeinflussen. Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren kann über ihre Synthese, über Protein-Protein-Wechselwirkungen, posttranslationale Modifikationen oder eine subzelluläre Lokalisation und Abbau reguliert werden.

Die häufigste Art der posttranslationalen Regulation von Transkriptionsfaktoren ist eine Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung (Papavassiliou *et al.*, 1995), die an einem Serin, Threonin oder Tyrosin erfolgen kann. Sobald ein Rezeptor extrazellulär von einem Wachstumsfaktor besetzt wird, löst er intrazellulär die Phosphorylierung des Rezeptors aus und erzeugt ein Signal, welches seinerseits eine Kaskade nachgeschalteter Protein-Kinasen eingangsetzt. Es sind mehrere Protein-Kinase-Kaskaden bekannt, die eng miteinander verwandt sind. Diese werden nach den Kinasen, die am Ende dieser Signalketten stehen, den MAP-Kinasen („Mitogen-aktivierten Protein Kinasen“), als MAP-Kinase-Signaltransduktionswege bezeichnet. Allen drei heute bekannten MAP-Kinasen-Signalwegen ist eine stufenweise Weiterleitung der Signale gemeinsam. Die aufeinander folgenden Signalproteine werden dabei immer von ihrem Vorgänger durch Phosphorylierung aktiviert. Der ERK-Signalweg („Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase“) wird durch Mitogene und Phorbolster aktiviert; der JNK/SAPK-Signalweg („Jun-N-terminale Kinase bzw. Stress-aktiviert Protein-Kinase“) und der p38/RK-Signalweg („Reaktivierende Kinase“) werden von zellulären Stressfaktoren angeschaltet und vermitteln die Wirkung inflammatorischer Zytokine (zur Übersicht siehe: Davis, 1995; Karin, 1995; Kyriakis und Avruch, 1996; Hirai *et al.*, 1996; Tibbles *et al.*, 1996). Alle MAP-Kinasen (ERK1,2; JNK/SAPKs und p38/RK) aktivieren ihre Substrate (wie cJun, cFos, ATF-2, p62<sup>TCF</sup>, p90<sup>RSK</sup>) durch Phosphorylierung an einem Serin und/oder einem Threonin, wobei diesen Aminosäuren immer ein Prolin folgen muß. Sie werden daher auch als „Prolin-gerichtete“ Kinasen bezeichnet. Die MAP-Kinasen selbst werden durch

Phosphorylierung an einem Threonin und einem Tyrosin aktiviert, wobei das zu phosphorylierende Threonin und Tyrosin durch nur eine Aminosäure getrennt ist. Diese Aminosäure unterscheidet sich zwischen den drei MAP-Kinasen und ist für die Erkennung durch die jeweiligen darüberstehenden MAPK-Kinasen (MAPKK) notwendig. Bei der ERK1,2 handelt es sich um eine Glutaminsäure (TEY), bei der JNK/SAPK um ein Prolin (TPY) und bei der p38/RK um ein Glycin (TGY). Da die MAPK-Kinasen ihre Substrate sowohl an einem Threonin als auch an einem Tyrosin phosphorylieren, werden sie auch als „dual-spezifische“ Kinasen bezeichnet (Blumer und Johnson, 1994; Treisman, 1996). Die MAPKK sind Substrate für weitere „stromaufwärts“ gelegene Kinasen, die als MAPKK-Kinasen bezeichnet werden. Diese MAPKK-Kinasen werden über die Ras-Familie der kleinen GTP-bindenden Proteine (z.B. Ras, Rac, Cdc42) mit den entsprechenden Membran-Rezeptoren (Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, Adrenerge Rezeptoren, Zytokin-Rezeptoren usw.) verbunden. Die drei MAPK-Signalwege sind zur Übersicht in Abb. 1 vereinfacht dargestellt.



**Abb. 1: Darstellung der eukaryotischen MAP-Kinasen-Signaltransduktionswege**

ATF: aktivierender Transkriptionsfaktor; CAP-Kinase: Ceramid-aktivierte Proteinkinase; CREB: „cyclic AMP response element binding protein“; CSAID: „cytokine-suppressive, anti-inflammatory drug“; CSBP: CSAID-Bindeprotein; EGF: epidermaler Wachstumsfaktor; ERK: „extracellular signal-regulated kinase“; GC-Kinase: „germinal center-kinase“; GP: kleine GTP-bindende Proteine; IL-1: Interleukin 1; JNK: Jun-N-terminale Kinase; KSR: „kinase suppressor of Ras“; LPA: Lysophosphatidic-Säure; MAPK: „mitogen aktivated protein kinase“; MAPKK: MAP-Kinase-Kinase; MAPKKK: MAP-Kinase-Kinase-Kinase; MEK: MAPK/ERK-Kinase; MEKK: MEK-Kinase; MKK: MAP-Kinase-Kinase; MLK: „mixed lineage kinase“; MUK: „MAPK-upstream kinase“; PAK: „p21-activated protein kinase“; PDGF: „plateled-derived growth factor“; PKC: Proteinkinase C; RK: „reactivating kinase“; RTK: Rezeptor-Tyrosin-Kinase; SAPK: Stress-aktivierte Protein Kinase; SAPKK: SAPK-Kinase; SEK: SAPK/ERK-Kinase; TCF: „ternary complex factor“; TNFα: Tumornekrosefaktor α; TPA: 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-Azetat; UV: Ultraviolett-Strahlung.

## Mediatoren der UV-Antwort, die Zellmembran

In den letzten Jahren hat man sich in vielen Untersuchungen mit der Aufklärung der Mechanismen beschäftigt, die zu einer Aktivierung zellulärer Signalwege nach der UV-Bestrahlung führen. Einige „primäre Sensoren“, über die nicht-physiologische Reize von der Zelle registriert werden, sind bisher bekannt. So aktiviert z.B. der Phorbol-ester TPA die Proteinkinase C indem er mit der Ligandenbindungsdomäne des Proteins anstelle des physiologischen Liganden DAG interagiert. Für die Aktivierung von zellulären Signalwegen durch UV-Strahlung sind die „primären Sensoren“ noch nicht eindeutig charakterisiert. Ein Weg der UV-vermittelten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie etwa cJun und cFos, führt über die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs). RTKs unterliegen einer stetigen Phosphorylierung und Dephosphorylierung an Tyrosinresten, wobei die Aktivität von spezifischen Kinasen und Phosphatasen den Phosphorylierungszustand der RTKs bestimmen. Bei einer Hyper-Phosphorylierung der RTKs beginnt die Signalübermittlung in den Kern. Auslöser kann die Bindung des entsprechenden Liganden an den Rezeptor oder, wie im Falle der UV-Wirkung, die Hemmung der dephosphorylierenden Komponente, der Phosphatase sein (Sachsenmaier *et al.*, 1994; Schieven *et al.*, 1994; Warmuth *et al.*, 1994; Knebel *et al.*, 1996).

## Mediatoren der UV-Antwort, die zelluläre DNA

Folgerungen, ob zelluläre Prozesse von einer Schädigung der DNA abhängen, stammen aus Experimenten, in denen reparaturdefiziente Zellen, die keine DNA-Schäden reparieren können, mit Wildtyp-Zellen, die DNA-Schäden reparieren können, verglichen wurden.

Als reparaturdefiziente Zellen werden häufig Zellen von Spendern benutzt, die an der seltenen, rezessiven Erbkrankheit *Xeroderma Pigmentosum* (XP) leiden. Die Haut eines betroffenen Homozygoten ist extrem empfindlich gegen Sonnenlicht oder ultraviolette Strahlung. Die Patienten zeigen eine verstärkte Anfälligkeit für die Entstehung von Hautkrebs, einige Fälle von XP sind durch geistige Störungen und Entwicklungsstörungen gekennzeichnet (Cleaver und Kraemer, 1994; Chu und Myane, 1996). Die Ursache von XP ist das Fehlen von Bestandteilen des Reparatursystems, das bei Gesunden ständig Schäden, die durch ultraviolette Strahlung entstanden sind, entfernt. In Zellen, die von XP-Patienten stammen, können diese DNA-Schäden schlechter oder überhaupt nicht repariert werden. Durch Zellfusionsexperimente wurden bisher sieben Komplementationsgruppen (XPA-G) unterschieden. Alle Gene, die diese Komplementationsgruppen charakterisieren, sind kloniert

worden (zur Übersicht: Bender *et al.*, 1997). Die Gruppen unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, DNA-Schäden zu reparieren. Während XPC-Fibroblasten keine Reparatur im Gesamtgenom durchführen, aber aktiv transkribierte Gene reparieren (Transkriptionsgekoppelte Reparatur), können Fibroblasten der Gruppen XPA, XPB und XPD weder die Transkriptionsgekoppelte Reparatur noch eine Reparatur des Gesamtgenoms durchführen (Hoeijmakers, 1993; Hanawalt, 1994; Drapkin *et al.*, 1994, Van Hoffen *et al.*, 1995; Tu *et al.*, 1996).

Der Vergleich der XP-Fibroblasten mit normalen Fibroblasten zeigt, daß die Akkumulation von DNA-Schäden nach UV-Bestrahlung ein Auslöser für einen Teil der UV-Antwort und die Aktivierung bestimmter Gene ist. Weitere Befunde stützen diese Schlußfolgerungen:

Das Aktionsspektrum später UV-induzierbarer Gene, wie z.B. der Kollagenase I, dem Metallothionein IIA sowie eines transfizierten HIV-CAT-Reporters hat sein Optimum zwischen 265 und 275 nm und stimmt mit dem Aktionsspektrum überein, das zur Abtötung von Säugerzellen führt (Zölzer und Kiefer, 1984). Wie der Vergleich der Sensitivität von normalen und *Xeroderma Pigmentosum* Zellen zeigt, beruht die Aktivierung auf UV-induzierten DNA-Schäden.

Die UV-vermittelte HIV-CAT Aktivierung ist durch das Einschleusen eines DNA-Reparaturenzyms, der T4 Endonuklease 5, in die bestrahlten Zellen hemmbar (Yarosh *et al.*, 1993). Das dabei verwendete HIV-CAT-Konstrukt enthält drei Bindestellen für den konstitutiv an die DNA bindenden Transkriptionsfaktor SP1 und zwei Bindestellen für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B. Diese beiden Bindestellen werden erst nach Aktivierung von NF- $\kappa$ B, z.B. durch UV-Licht oder Phorbol ester, von diesem besetzt und regulieren dann die induzierbare Aktivierung eines entsprechenden HIV-CAT-Konstruktes (Stein *et al.*, 1989b).

In Bezug auf NF- $\kappa$ B gibt es jedoch auch widersprüchliche Hinweise, die eine Beteiligung des UV-vermittelten DNA-Schadens bei dessen Aktivierung ausschließen. So ist es möglich, in Zellen, die keinen Kern enthalten (sog. Zytoplasten), NF- $\kappa$ B durch UVC-Bestrahlung zu aktivieren (Devary *et al.*, 1993). Ebenfalls wurde eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch UVB-Bestrahlung von Zytoplasmaextrakten nachgewiesen (Simon *et al.*, 1994). Ob die mitochondriale DNA hierbei eine Rolle spielt, ist nicht untersucht worden.

## Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (Nuklärer Faktor $\kappa$ B) und seine Regulation

### Zielgene

Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B wurde als gewebespezifischer Faktor, der die Expression der Immunglobulin  $\kappa$  leichten Kette während der B-Lymphozytenentwicklung aktiviert, entdeckt (Sen und Baltimore, 1986a). NF- $\kappa$ B ist nur in reifen B-Zellen und in Plasmazellen konstitutiv aktiv. In anderen Zelltypen, wie z.B. in den meisten Zelllinien, darunter auch der Pre-B Tumor Zelllinie 70Z/3, kann NF- $\kappa$ B durch eine Reihe von unterschiedlichen Agenzien aktiviert werden (Sen und Baltimore, 1986b; Atchinson und Perry, 1987; Shirakawa *et al.*, 1989; Lenardo *et al.*, 1989). Die Funktionalität von NF- $\kappa$ B als Transkriptionsfaktor wurde nachgewiesen, indem die NF- $\kappa$ B-Bindestelle in der Verstärker-Sequenz („Enhancer“) des Gens, das für die Immunglobulin  $\kappa$  leichte Kette kodiert, mutiert wurde und damit dessen Expression verhindert werden konnte. Änderungen der Sequenz in der NF- $\kappa$ B-Bindestelle, die eine DNA-Bindung verhindern, führten sowohl zur Aufhebung der basalen als auch der induzierten Expression NF- $\kappa$ B-abhängiger Gene (Lenardo *et al.*, 1987; Pierce *et al.*, 1988; Wirth und Baltimore, 1988). In wenigen Jahren wurden Bindestellen des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in Promotoren vieler Gene gefunden, wovon die meisten nicht B-Zell-spezifisch exprimiert werden. Dazu zählen Gene, die für MHC Klasse I-Proteine und  $\beta$ 2 Mikroglobulin (Baldwin und Sharp, 1988; Israël *et al.*, 1989), MHC Klasse II-Proteine und die assoziierte invariante Kette Ii (Blanar *et al.*, 1989; Pessara und Koch, 1990; Zhu und Jones, 1990), für Proteine der Immunantwort (Immunglobulin  $\kappa$  leichte Kette, Interleukin2 und  $\alpha$ -Untereinheit des IL-2Rezeptors, IL-2R $\alpha$ ), der Entzündungs- und der Akutphasenreaktion (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  und TNF $\beta$ ), der Rel/NF- $\kappa$ B Mitglieder (c-Rel, NF- $\kappa$ B1, NF- $\kappa$ B2 und RelB), der I $\kappa$ B Mitglieder (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , p105, p100 und Bcl-3), der Wachstumskontrolle (p53, cMyc und Ras) und für Zelladhäsionsmoleküle (I-CAM, V-CAM und E-Selectin) kodieren (zur Übersicht siehe: Grilli, *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 1995; Kopp und Ghosh, 1995; Miyamoto und Verma, 1995). Weitere wichtige, durch NF- $\kappa$ B regulierte Gene, kodieren für den Peptidtransporter TAP1 ("transporter associated with antigen processing") und die LMP-2 ("low molecular mass polypeptide") Untereinheit des Proteasoms (Wright *et al.*, 1995).

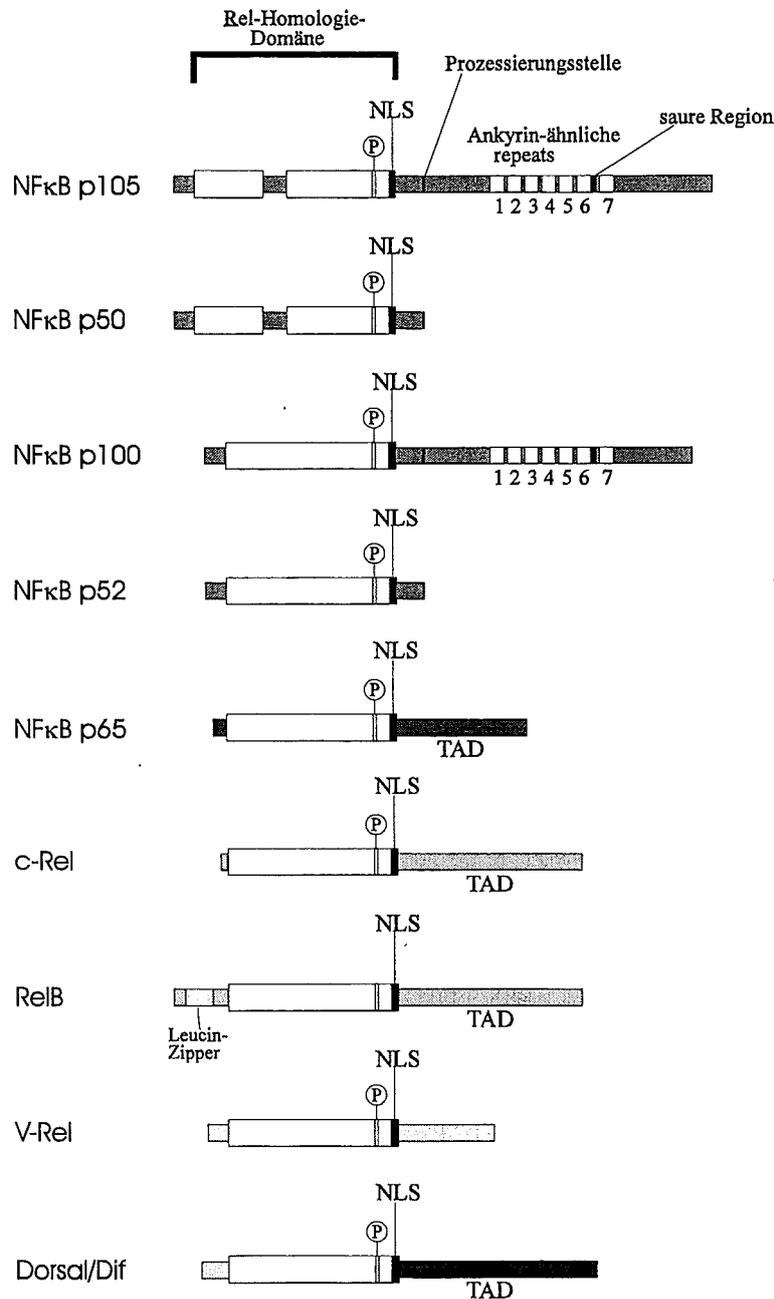
Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B benötigt keine Proteinneusynthese (Sen und Baltimore, 1986b) und erlaubt damit eine zügige und effiziente Anschaltung von Zielgenen. Nach dem Kontakt mit Pathogenen, wie Bakterien und Viren, ist eine schnelle Aktivierung von „Verteidigungsgenen“ für das Überleben des Organismus notwendig. Die Aktivierung des Wirts-Verteidigungssystems durch NF- $\kappa$ B wird kurioserweise von einigen Viren für ihre Zwecke verwendet, indem sie NF- $\kappa$ B Bindestellen in eigenen Regulatoreinheiten entwickelt haben und zusätzlich Proteine produzieren, die NF- $\kappa$ B aktivieren können. Zu diesen Viren zählen u.a. HIV-1 (Nabel und Baltimore, 1987), HTLV-1 (Hirai *et al.*, 1994), das Epstein-Barr Virus (Herrero *et al.*, 1995), SV40 (Kanno *et al.*, 1989) und die Gruppe der Adenoviren (Williams *et al.*, 1990). Neben der Immunantwort (Baeuerle und Henkel, 1994) und der viralen Replikation ist NF- $\kappa$ B auch an der Kontrolle der Zellproliferation und des programmierten Zelltods, der Apoptose, beteiligt (Beg *et al.*, 1995).

### Die Familie der Rel/NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren

NF- $\kappa$ B wurde erstmals aus dem Gewebe der menschlichen Plazenta und aus der Kaninchenlunge isoliert (Kawakami *et al.*, 1988; Baeuerle und Baltimore 1989b; Ghosh *et al.*, 1990; Zabel *et al.*, 1991). Der NF- $\kappa$ B-Komplex besteht hauptsächlich aus zwei Proteinuntereinheiten, die nach ihrem Molekulargewicht als p50 und p65 bezeichnet wurden. Nach Reinigung und Isolierung dieser beiden Untereinheiten fand man eine hohe Homologie sowohl des N-terminalen Bereiches zwischen diesen beiden Proteinen (Bours *et al.*, 1990; Ghosh *et al.*, 1990; Ruben *et al.*, 1991) als auch anderen Proteinen, wie dem Onkoprotein v-Rel des Hühner Retrovirus Rev-T (Stephens *et al.*, 1983; Wilhemsen *et al.*, 1984) und dem *Drosophila*-Protein „Dorsal“ (Steward, 1987). Alle Proteine, die diese etwa 300 Aminosäuren lange konservierte Region enthalten, werden zu der Familie der Rel/NF- $\kappa$ B-Proteine zusammengefaßt. Diese konservierte Region wird als Rel-Homologie-Domäne (RHD) bezeichnet und enthält eine Dimerisierungsfunktion, ein DNA-Bindemotiv und eine nukleäre Lokalisationssequenz („nuclear localization sequence“, NLS), die für die Translokation der Proteine in den Kern notwendig ist. Die Proteine der NF- $\kappa$ B/Rel-Familie können Homodimere und Heterodimere bilden und binden als solche mit extrem hoher Affinität (etwa  $10^{-12}$  M) an die Konsensussequenz der NF- $\kappa$ B-Bindestelle (5'-GGGPuNNPyPyCC-3') in den Verstärkerelementen vieler Gene (Baeuerle und Henkel, 1994).

Zwei Klassen von Rel/NF- $\kappa$ B-Proteinen mit insgesamt acht Mitgliedern wurden bisher gefunden und charakterisiert (Abb. 2). Die erste Klasse der Rel Proteine (p50/p105 und

p52/p100) enthält im C-terminalen Teil sieben Ankyrin-Wiederholungen und einen sauren Bereich, der zwischen den letzten zwei Ankyrin-Wiederholungen liegt. Sie werden als zytoplasmatische Vorläuferproteine (p105 und p100) synthetisiert. Nach Spaltung dieser



**Abb. 2: Die Proteine der Rel/NF-κB Familie**

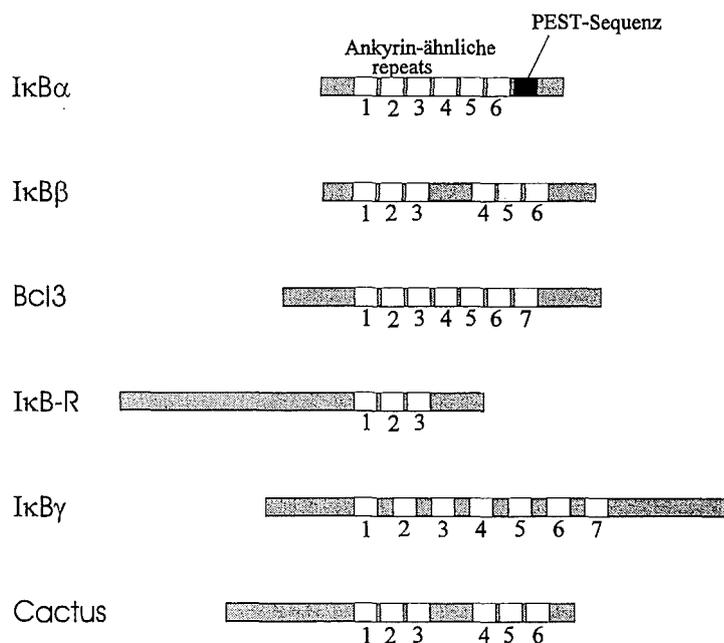
Die Wirbeltier NF-κB-Proteine p105, p50, p100, p52, p65, c-Rel, RelB und v-Rel und die *Drosophila* Proteine Dorsal und Dif besitzen einen stark konservierten N-terminalen Bereich, die „Rel-Homologie-Domäne“ (RHD), von etwa 300 Aminosäuren. In dieser RHD befinden sich die DNA-Bindedomäne, die Dimerisierungsdomäne und eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS). Das eingekreiste P steht für die potentielle PKA-Phosphorylierungsstelle. Eine Transaktivierungsdomäne (TAD) findet sich nur in den Proteinen p65, c-Rel, Dorsal und Dif. p50 und p52 werden an der glyzinreichen Prozessierungsstelle durch proteolytische Spaltung aus den Vorläuferproteinen p105 und p100 gebildet. Der carboxyterminale Bereich von p105 und p100 enthält 7 Ankyrin-Wiederholungen.

Vorläuferproteine entstehen die DNA-bindenden Untereinheiten p50 und p52 des NF- $\kappa$ B-Komplexes (Fan und Maniatis, 1991). Die proteolytische Spaltung dieser Vorläufer kann konstitutiv oder Signal-abhängig erfolgen. Sie stellt somit einen regulatorischen Schritt dar, der zur Bildung aktiver Transkriptionsfaktoren führt (Mercurio *et al.*, 1993). Die Spaltung der Vorläufer-Proteine ist ATP-abhängig (Donald *et al.*, 1995) und erfolgt durch das Proteasom (Palombella *et al.*, 1994). Die Bildung von Transkriptionfaktoren durch proteolytische Spaltung ist nicht auf die NF- $\kappa$ B -Familie beschränkt; so wird z.B. auch das SREBP-1 (sterol-response element binding protein) durch die Spaltung des an das endoplasmatische Retikulum gebundenen Vorläuferproteins zum aktiven Transkriptionsfaktor. Die Spaltung von SREBP-1 wird durch die Sterolmenge in der Umgebung der Zelle reguliert (Wang *et al.*, 1994; Brown und Goldstein, 1997).

Im Gegensatz zu p50 und p52 werden die Rel/NF- $\kappa$ B Mitglieder der zweiten Klasse der Familie (p65, c-Rel, RelB, I-Rel, Dorsal/Dif) nicht als Vorläuferproteine synthetisiert. Diese Proteine besitzen in ihrem C-Terminus, mit Ausnahme von v-Rel, eine Transaktivierungsdomäne (TAD; Perkins *et al.*, 1992; Ballard *et al.*, 1992), die den prozessierten Formen der ersten Klasse fehlt. Rel/NF- $\kappa$ B-Dimere können je nach Zusammensetzung als Aktivatoren oder als Repressoren (p50/p50 Homodimere) der Transkription wirken, abhängig davon, ob die Proteine des Dimers eine TAD besitzen oder nicht. Dabei ist z.B. die TAD des p65-Proteins im Heterodimer p50/p65 für die Transaktivierung ausreichend (Miyamoto und Verma, 1995). Die meisten Rel Proteine können, wenn sie *in vitro* translatiert werden, Homo- und Heterodimere bilden, mit Ausnahme von RelB, welches nur Dimere mit p50 und p52 bilden kann (Dobrzanski *et al.*, 1994; Ryseck *et al.*, 1992; Bours *et al.*, 1992). Die Zusammensetzung der Dimere bestimmt die unterschiedlichen Bindungspräferenzen zu bestimmten  $\kappa$ B-Motiven und bewirkt damit eine spezifische Regulierung der Genaktivierung (Perkins *et al.*, 1992). Die Wechselwirkungen zwischen NF- $\kappa$ B und anderen Transkriptionsfaktoren bei der Genaktivierung ermöglichen eine zusätzliche Selektivität für bestimmte Gene. So bewirken z.B. NF- $\kappa$ B Proteine zusammen mit dem „high mobility group protein“ HMG-I(Y), IRF-1 und dem bZip („basic-leucine zipper“) Protein ATF-2 die induzierte Aktivierung des Interferon  $\beta$  Promotors (Thanos und Maniatis, 1995), und vermutlich der Promotoren vieler Zelladhäsionsmoleküle (Whitley *et al.*, 1994).

## Die Familie der Inhibitor- $\kappa$ B-Proteine

Ursprünglich waren zwei Proteine ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  und  $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ ) aus Extrakten unterschiedlicher Zellen isoliert worden, welche die DNA-Bindung von heterodimeren NF- $\kappa$ B Komplexen (p50/p65) aber nicht die von p50 Homodimeren hemmen konnten (Baeuerle *et al.*, 1988; Baeuerle und Baltimore, 1989a; Ghosh und Baltimore, 1990). Die Behandlung von zytosolischen Extrakten mit dissoziierenden Detergentien (z.B. Natriumdeoxycholat) führte zur Freisetzung dieser Inhibitorproteine und zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Baeuerle und Baltimore, 1988). Bis heute sind acht  $\text{I}\kappa\text{B}$  Moleküle in Säugetierzellen gefunden worden, die z.T. eine unterschiedliche Spezifität bei der Hemmung verschiedener NF- $\kappa$ B-Komplexe zeigen (Abb. 3). Zu diesen  $\text{I}\kappa\text{B}$  Molekülen zählen das  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ,  $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ ,  $\text{I}\kappa\text{B}\gamma$ , Bcl-3,  $\text{I}\kappa\text{B}\text{R}$  (zur Übersicht siehe: Verma *et al.*, 1995; Baeuerle und Baltimore, 1996) und das neu entdeckte  $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$  (Whiteside *et al.*, 1997).



**Abb. 3: Die Proteine der  $\text{I}\kappa\text{B}$  Familie**

Alle  $\text{I}\kappa\text{B}$  Proteine enthalten konservierte Ankyrin-ähnliche Wiederholungen (ANK; weiße Boxen), die essentiell für die Protein-Protein-Wechselwirkungen sind. Die QL-reiche Region liegt zwischen dem sechsten ANK und der PEST-Sequenz. Die mRNA für  $\text{I}\kappa\text{B}\gamma$  wird über einen alternativen Transkriptionsstart im Gen für p105 gebildet. Cactus ist das funktionelle  $\text{I}\kappa\text{B}$ -Homolog in *Drosophila*.

Alle  $\text{I}\kappa\text{B}$  Proteine, einschließlich des *Drosophila*  $\text{I}\kappa\text{B}$  Cactus, enthalten im zentralen Bereich des Moleküls Ankyrin-Wiederholungen (ANK). Die ANKs wurden zuerst als Region eines Proteins, das eine Komponente des membranassoziierten Zytoskeletts in Erythrozyten ist, entdeckt (Bennett und Stenbuck, 1979). Viele Proteine, die ANKs enthalten, sind bekannt, wie

z.B. der Transkriptionsfaktor GABP- $\beta$  und die Zellzyklusproteine CDC10 und SW16 (Bennett, 1992; Blank *et al.*, 1992). Die ANKs der einzelnen Proteine sind stark konserviert. Sie bilden eine Konsensus-Sequenz, die jedoch von Protein zu Protein in der Aminosäure-Sequenz variiert und deren Spezifität bestimmt (Bennet *et al.*, 1993). Die ANKs bilden dabei eine Oberfläche, welche Wechselwirkungen mit Proteinen ermöglicht, die selbst keine ANKs enthalten. Sie sind notwendig für die Assoziation von I $\kappa$ B-Proteinen mit Rel/NF- $\kappa$ B Proteinen (Inoue *et al.*, 1992b). Überlappend mit dem sechsten ANK folgt ein weiterer wichtiger Bereich, der mehrere Glutamine (Q) und Leuzine (L) enthält und daher als QL-reiche Region bezeichnet wird. Dieser 13 Aminosäuren lange Teil ist sowohl für den induzierten Abbau des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins durch TNF $\alpha$  als auch für die Bindung von I $\kappa$ B $\alpha$  an das RelA-Protein essentiell (Sun *et al.*, 1996). Die einzelnen I $\kappa$ B-Proteine binden mit unterschiedlicher Affinität an die einzelnen Rel-Proteine. So interagiert Bcl-3 bevorzugt mit p50 bzw. p52 Homodimeren, während I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$  mit höchster Affinität an NF- $\kappa$ B-Dimere, die p65 oder c-Rel enthalten, binden. Dagegen zeigen die Rel-Proteine p105 und p100 eine schwache Spezifität. Sie binden an die meisten Kombinationen von Rel Homo- und Heterodimere und bilden intramolekulare Komplexe (Hatada *et al.*, 1992; Henkel *et al.*, 1992; Naumann *et al.*, 1993; zur Übersicht: Miyamoto und Verma, 1995). Die Bindung von I $\kappa$ B erfolgt in der RHD der NF- $\kappa$ B/Rel Proteine im Bereich der nukleären Lokalisationssequenz (NLS) und der DNA-Bindedomäne und verhindert damit die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Kern (Beg *et al.*, 1992; Ganchi *et al.*, 1992; Henkel *et al.*, 1992; Baeuerle und Henkel, 1994; Baldwin Jr., 1996). Im Unterschied zu I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$ , welche hauptsächlich zytoplasmatische Komplexe mit NF- $\kappa$ B bilden, bindet Bcl-3 bevorzugt im Kern an p50 oder p52 Homodimere. Dabei kann das Bcl-3 Protein, je nach Versuchsbedingungen, entweder p50 oder p52 Dimere von der DNA verdrängen oder mit ihnen einen ternären Komplex bilden, der zur Aktivierung der Transkription führt. Das Bcl-3 muß phosphoryliert sein, um seine volle Hemmwirkung zu erhalten (Bours *et al.*, 1993; Nolan *et al.*, 1993). Bcl-3 tritt dabei offensichtlich nicht in Kontakt mit der Kernsignalsequenz (NLS) des p50 Proteins (Zhang, *et al.*, 1994b).

Im C-terminalen Bereich der I $\kappa$ B-Proteine befinden sich zwei auffällige Regionen, die sich teilweise überschneiden: die PEST-Sequenz und eine Reihe von Aminosäuren, die *in vitro* und *in vivo* von der Casein-Kinase II (CKII) erkannt und phosphoryliert werden können (Barroga *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1996; McElhinny *et al.*, 1996; Schwarz *et al.*, 1996). Unter der PEST-Sequenz versteht man eine Anhäufung der Aminosäuren Prolin (P), Glutaminsäure

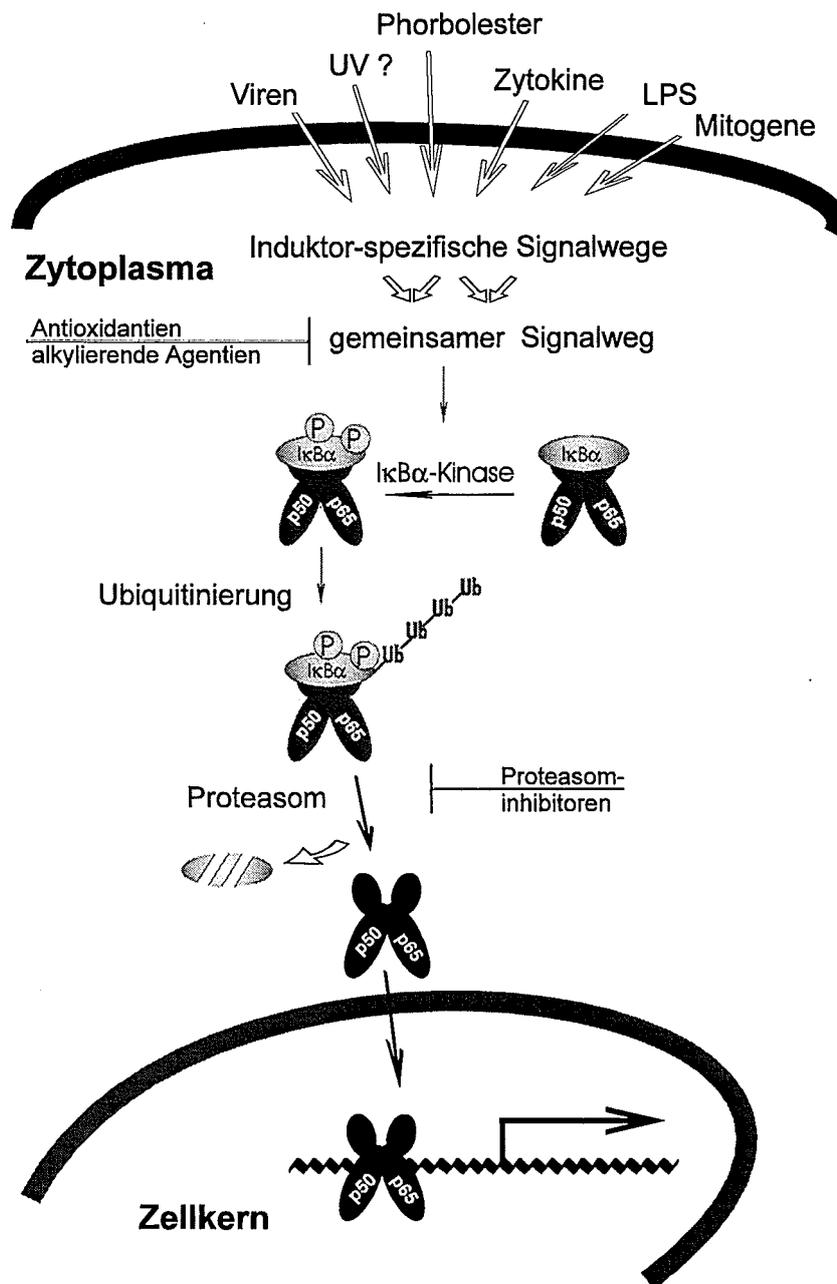
(E), Serin (S), Threonin (T) und Asparaginsäure (D). Die Proteine, die eine solche PEST-Sequenz tragen, sind häufig kurzlebig (Rogers *et al.*, 1986; Rechsteiner, 1990). Im Falle des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins werden sowohl die mRNA als auch das Protein schnell abgebaut (Haskill *et al.*, 1991; Scott *et al.*, 1993; Rice und Ernst, 1993; Miyamoto *et al.*, 1994). Die physiologische Bedeutung der Phosphorylierung durch die CKII im I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein ist noch unbekannt. Bei einem anderen Mitglied der I $\kappa$ B-Familie, dem I $\kappa$ B $\beta$  ist eine durch CKII vermittelte Phosphorylierung der PEST-Sequenz essentiell für die Hemmung der DNA-Bindung von c-Rel/NF- $\kappa$ B-Komplexen (Chu *et al.*, 1996). Die Rolle des C-terminalen Bereichs von I $\kappa$ B $\alpha$  beim basalen Proteinumsatz und dem Abbau bei der induzierten NF- $\kappa$ B Aktivierung ist strittig. Sicher ist, daß eine Mindestlänge des Proteins von etwa 277 AS erforderlich ist, um einen induzierten Abbau zu erhalten (Aoki *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1996; Van Antwerp *et al.*, 1996; Krappmann *et al.*, 1996). Auf gegensätzliche Hypothesen (Brown *et al.*, 1995; Rodriguez *et al.* 1995; Whiteside *et al.*, 1995; Beauparlant *et al.*, 1996) wird in der Diskussion genauer eingegangen. Für den Abbau des *Drosophila* I $\kappa$ B Homologs Cactus (Belvin *et al.*, 1995) ist der C-Terminus entbehrlich. Im Gegensatz dazu ist nachgewiesen, daß der N-terminale Bereich von I $\kappa$ B $\alpha$  für den induzierten Abbau des Proteins notwendig ist (siehe unten). Er enthält zwei Aminosäuren, die Serine an den Positionen 32 und 36, deren Phosphorylierung das Protein für den Abbau durch das Proteasomensystem kenntlich macht. Zwei weitere wichtige Aminosäuren, die Lysine an den Positionen 21 und 22, sind für den proteolytischen Abbau notwendig, weil sie vermutlich als Akzeptoraminosäuren für die Ubiquitinkonjugation dienen (Chen *et al.*, 1995; Scherer *et al.*, 1995; Van Antwerp und Verma, 1996; Roff *et al.*, 1996).

In Bezug auf ihre subzelluläre Lokalisation können die I $\kappa$ B-Proteine in zwei Gruppen unterteilt werden. Die Proteine der ersten Gruppe (p105, p100 und I $\kappa$ B $\gamma$ ) findet man ausschließlich im Zytoplasma (Inoue *et al.*, 1992a; Rice *et al.*, 1992; Mercurio *et al.*, 1993). Die Proteine der zweiten Gruppe (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  und Bcl-3) findet man sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern (Kerr *et al.*, 1991; Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1995).

### **Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B erfolgt durch den Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$**

Die Art und Weise der Aktivierung von NF- $\kappa$ B zeigt eine beeindruckende Komplexität. Sie beinhaltet die zytoplasmatische Retention des Transkriptionsfaktors durch das inhibitorische Protein I $\kappa$ B $\alpha$ , dessen Abbau durch extrazelluläre Stimuli von NF- $\kappa$ B induziert wird. Der freie Transkriptionsfaktor wandert in den Zellkern, bindet an spezifische DNA-Sequenzen und aktiviert häufig im Zusammenwirken mit anderen Transkriptionsfaktoren die Abschreibung spezifischer Gene.

Einer der interessantesten Aspekte des NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B Systems ist die große Anzahl und Verschiedenheit der Agenzien, die NF- $\kappa$ B in unterschiedlichen Zelltypen aktivieren können. Zu diesen NF- $\kappa$ B Induktoren zählen u.a. Zytokine, wie TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , IL-1, IL-2, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), virale und parasitäre Infektionen (HIV-1 Tat-Protein, HTLV-1 Tax-Protein, EBV LMP, Adenovirus E1A, *Theileria parva*), die Stimulierung von Antigenrezeptoren bei T- und-B Zellen (Anti IgM, Anti-CD2, Anti-CD3, Anti-CD28), Lektine (Phytohemagglutinin, Concanavalin A), Kalziumionophore, Phorbolster, Proteinsynthese-Inhibitoren (Anisomycin, Cycloheximid), UV- und Röntgenstrahlung, doppelsträngige RNA und NO (zur Übersicht siehe: Baeuerle und Henkel, 1994; Verma *et al.*, 1995; Baldwin *Jr.*, 1996; Wulczyn *et al.*, 1996). Dabei aktivieren unterschiedliche Agenzien spezifische Signalwege, die zu dem gemeinsamen Endpunkt, der Aktivierung von NF- $\kappa$ B, führen. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B nach allen bisher bekannten physiologischen Signalen, beinhaltet die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  an Serinen der Positionen 32 und 36 im N-terminalen Bereich des Proteins (siehe Abb. 4) (Brockman *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1995; Traenckner *et al.*, 1995); das phosphorylierte I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein bleibt dabei an den NF- $\kappa$ B-Komplex gebunden (Palombella *et al.*, 1994; DiDonato *et al.*, 1995; Finco und Baldwin, 1995; Lin *et al.*, 1995). Diese Phosphorylierungen sind Voraussetzung für den nachfolgenden Abbau des Proteins durch das Ubiquitin-abhängige Proteasom (Chen *et al.*, 1995; Scherer *et al.*, 1995; Alkalay *et al.*, 1995).



**Abb. 4: Schematische Darstellung der Aktivierung von NF-κB**

Der Transkriptionsfaktor NF-κB wird durch das Inhibitorprotein IκBα in einem inaktiven Zustand im Zytoplasma festgehalten. Er kann durch unterschiedliche Agenzien aktiviert werden. Dabei kommt es zunächst zu einer Aktivierung Induktor-spezifischer Signalwege, die in einen gemeinsamen redox-sensitiven Signalweg münden. Alle Induktoren bewirken eine Phosphorylierung des IκBα-Proteins an den Serinen an den Positionen 32 und 36. Diese Phosphorylierungen sind Voraussetzung für den anschließenden Ubiquitin-abhängigen Abbau von IκBα durch das 26S Proteasom. Der freie NF-κB-Komplex (meistens p50/p65) kann in den Zellkern wandern und entsprechende Zielgene aktivieren.

Für den Abbau durch das Proteasom wird ein Protein markiert, indem Ubiquitine, hochkonservierte Proteine mit einer Länge von 76 Aminosäuren, kovalent an Lysinreste des abzubauenen Proteins gebunden werden. Die Ubiquitinierung ist eine Drei-Schritt-Reaktion. Zuerst wird das Ubiquitin unter ATP-Verbrauch durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) in einen hochenergetischen Thiolester umgewandelt. Das aktivierte Ubiquitin wird dann auf das Ubiquitin-verbindende-Enzym (E2 oder UBC für „ubiquitin-conjugating enzyme“) übertragen. Solche E2-Enzyme können entweder direkt oder unter Beteiligung eines weiteren Enzyms, einer Ubiquitin-Ligase (E3), das aktivierte Ubiquitin an das zu markierende Protein binden. Dies geschieht unter Bildung einer Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins und der  $\epsilon$ -Amino-Gruppe einer Lysin-Seitenkette des Proteins. Das E3-Enzym hat eine wichtige Rolle bei der Auswahl der Zielproteine und vermittelt damit einen Teil der Selektivität der „Ubiquitinierung“. In den Fällen in denen das E2-Enzym direkt das aktivierte Ubiquitin auf ein Zielprotein überträgt, hat es offensichtlich auch alleine die Substrat-Selektivität. Das gebundene Ubiquitin wird durch Anheftung eines weiteren Ubiquitins an das Lysin der Position 48 modifiziert. So entsteht nach Anheftung weiterer Ubiquitine ein polyubiquitiniertes Protein. Dieses wird durch das 26S-Proteasom erkannt und in einer Energie-verbrauchenden Reaktion abgebaut; das Ubiquitin kann durch Isopeptidasen zur Wiederverwendung regeneriert werden (zur Übersicht: Ciechanover, 1994; Hochstrasser, 1996).

In älteren Untersuchungen hat man eine ganze Reihe unterschiedliche Kinasen gefunden, die zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B bzw. zur Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  führen sollen. Darunter fanden sich die Protein-Kinase C (PKC) und die Haem-regulierte eIF2-Kinase (HRI), die I $\kappa$ B $\alpha$  *in vitro* phosphorylierten und zur Dissoziation des NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexes führten (Ghosh und Baltimore, 1990). *In vivo* führt die Phosphorylierung der Serine 32 und 36 nicht zur Dissoziation des Komplexes, sondern markiert I $\kappa$ B $\alpha$  einzig für den Abbau durch das Proteasom (Brockman *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1995; DiDonato *et al.*, 1995; Traenckner *et al.*, 1995). Als weitere Kinasen, die I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylieren können, werden eine PKC $\zeta$  assoziierte Kinase (Diaz-Meco *et al.*, 1994), Raf-1 (Finco und Baldwin, 1993) und die durch doppelstränge RNA aktivierte Protein Kinase (PKR) (Kumar *et al.*, 1994) genannt. Ebenso gibt es Hinweise für eine spezifische Phosphorylierung des Proteins nach Lipopolysaccharid-Behandlung (Kuno *et al.*, 1995), wobei die Phosphorylierung an einer der Casein-Kinase II spezifischen Phosphorylierungsstellen erfolgt.

Über Phosphorylierungen an Tyrosinresten bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist bisher wenig bekannt. So führt z.B. die Behandlung von neutrophilen Leukozyten mit G-CSF zur Tyrosin-Phosphorylierung des c-Rel-Proteins (Druker *et al.*, 1994). Berichte, in denen eine Tyrosin-Phosphorylierung für das I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein geschildert wird, widersprechen sich z.T. in der Art der verwendeten Induktoren. So macht Koong den partiellen Sauerstoffmangel in manchen Geweben (z.B. Tumorgewebe) dafür verantwortlich (Koong *et al.*, 1994), wohingegen andere Autoren die Tyrosin-Phosphorylierung der Reoxygenierung von hypoxischen Zellen zuordnen (Imbert *et al.*, 1996). Desgleichen führt die Behandlung mit dem Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor Pervanadat zur Tyrosin-Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  (Imbert *et al.*, 1996), vermutlich weil es in Zellen eine konstitutiv aktive Kinase gibt, die normalerweise im Gleichgewicht mit einer Pervanadat-hemmbarer Phosphatase steht.

Eine Protein-Kinase, die spezifische I $\kappa$ B $\alpha$  an den Serinen der Position 32 und 36 phosphoryliert, wurde kürzlich charakterisiert (Chen *et al.*, 1996). Die Regulation dieser I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase ist ebenfalls von einer Ubiquitinierung abhängig. Bei der I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase handelt es sich um einen Multiprotein-Komplex aus etwa zehn Untereinheiten. Der inaktive I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase-Komplex wird durch eine spezifische Ubiquitin-Protein-Ligase (E3x) ubiquitiniert und damit aktiviert. Die spezifische E3x-Aktivität soll dabei im Kinase-Komplex selbst sitzen. Eine andere Ubiquitin-Protein-Ligase (E3y) bindet an die Phosphoserine der Positionen 32 und 36 und überträgt anschließend je ein Ubiquitin auf je ein Lysin an den Positionen 21 und 22 des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins. Der Abbau erfolgt, wie oben beschrieben, durch das 26S-Proteasom (Chen *et al.*, 1995). Die I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase kann jedoch auch unabhängig von einer Ubiquitinierung durch die MEKK1 aktiviert werden (Lee *et al.*, 1997). In letzter Zeit wurde eine andere I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase beschrieben, die eine starke Homologie zu einer Kinase hat, deren Substrat lange Zeit nicht bekannt war (Connelly und Marcu, 1995). Diese Kinase, die früher als CHUK (engl. „conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase“) bezeichnet wurde, ist in I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase- $\alpha$  (IKK) (DiDonato *et al.*, 1997; Régnier *et al.*, 1997) umbenannt worden.

Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch eine Vielzahl der oben aufgeführten Agenzien kann durch die Behandlung der Zellen mit Antioxidantien (z.B. NAC) gehemmt werden. Daraus könnte man ableiten, daß die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten (ROIs) eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B spielt (Baeuerle und Henkel, 1994). Tatsächlich kann durch die Behandlung von Zellen mit Wasserstoff-Peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  und die Aktivierung von NF- $\kappa$ B induziert werden, wobei diese Phosphorylierung von

I $\kappa$ B $\alpha$  durch Antioxidantien hemmbar ist (Schreck *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 1993; Naumann und Scheiderei, 1994). Es wird angenommen, daß dieser Redox-sensitive Schritt in der NF- $\kappa$ B Aktivierung unterhalb Induktor-spezifischer Signalwege, aber oberhalb einer möglichen gemeinsamen I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase liegt. Andere Untersuchungen zeigen jedoch, daß die NF- $\kappa$ B-Aktivierung, die über reaktive Sauerstoff-Intermediate abläuft, Zelltyp-spezifisch ist und damit nicht der einzige Mechanismus für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist (Brennan und O'Neill, 1995).

## Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welcher Mechanismus der UV-induzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zu Grunde liegt. Dabei war die wichtigste Frage, ob diese Aktivierung von einer Schädigung der DNA abhängt oder mit anderen Worten, ob der UV-induzierte DNA-Schaden zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt?

Um dies zu beantworten, sollten zunächst die Dosis-Wirkungsbeziehung der UV-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung zwischen XPA-Zellen und Wildtyp-Zellen verglichen und analysiert werden.

Im weiteren sollte untersucht werden, ob UV-Strahlung den selben Mechanismus der Aktivierung benützt wie andere bekannte Induktoren. Die verzögerte Kinetik der UV-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung läßt vermuten, daß sich dieser Aktivierungsmechanismus von dem der Zytokin-induzierten Aktivierung unterscheidet.

Um diesen Mechanismus zu charakterisieren sind folgende Fragen zu beantworten:

Welchen Einfluß hat UV-Strahlung auf die Transkription und Translation von I $\kappa$ B $\alpha$ ? Hierbei möchte ich überprüfen, ob eine Hemmung der Transkription oder der Proteinsynthese durch UV-Bestrahlung die Menge an inhibitorischem I $\kappa$ B $\alpha$  so stark reduzieren kann, daß dies zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B-Aktivierung führt.

Wie wird das I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein für den UV-induzierten Abbau markiert und welche Regionen des Proteins sind hierfür notwendig? Dazu möchte ich durch Mutations-Analysen des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins dessen Abbau durch UV-Bestrahlung und andere Induktoren untersuchen und vergleichen.

Welche Rolle spielen Membran-Rezeptoren für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch UV-Strahlung, und schließen sich die Aktivierungen von NF- $\kappa$ B durch UV-Strahlung und durch Zytokine gegenseitig aus?

# Material

## Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in der höchst möglichen Reinheitsstufe verwendet. Wäßrige Lösungen wurden mit Wasser, das über ein Milli-Q Reinstwasser-System der Firma Millipore entsalzt wurde, in sterilen Gefäßen angesetzt und autoklaviert.

Acetyl-Coenzym A	Sigma, Deisenhofen
Acridinorange	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0,8)	Roth, Karlsruhe
Agarose Typ II (SeaKem LE)	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumazetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	BioRad, München
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Aprotinin	Boehringer, Mannheim
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
$\beta$ -Glycerophosphat	Sigma, Deisenhofen
Bacto Agar	Difco, Detroit
Bacto Hefeextrakt	Difco, Detroit
Bacto Trypton	Difco, Detroit
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Casein-Hydrolysat	Difco, Detroit
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva, Heidelberg
DEAE-Dextran	Pharmacia, Freiburg
DEPC, Diethyl Pyrocarbonat	Fluka, Buchs Schweiz
2',3'-Dideoxynukleosid-5'-Triphosphate	Boehringer, Mannheim
2'-Deoxynukleosid-5'-Triphosphate	Boehringer, Mannheim
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Natriumkarbonat	Merck, Darmstadt
di-Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Boehringer, Mannheim
DMEM (synthetisches Kulturmedium)	Gibco, Karlsruhe
DMSO	Fluka, Buchs Schweiz
EDTA	Merck, Darmstadt
Eichproteine, vorgefärbt	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ficoll Typ 400	Pharmacia, Freiburg
Folin-Ciocalteus-Reagenz	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum	Bio Whittaker, Verviers
Glukose	Merck, Darmstadt
Glyoxal	Sigma, Deisenhofen
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Glyzin	Merck, Darmstadt

Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hering-Sperma-DNA	Sigma, Deisenhofen
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumazetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen
Leupeptin	Boehringer, Mannheim
L-Leucin	Gibco, Karlsruhe
Lipofectamine™-Reagents	Gibco, Karlsruhe
L-Lysin	Gibco, Karlsruhe
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Miobill-Plastikwolle	Migros, Basel
MOPS	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-tertramethylenethylendiamin	BioRad, München
N,N'-Dimethylformamid	Sigma, Deisenhofen
N-Azetylcystein	Sigma, Deisenhofen
N-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure	Roth, Karlsruhe
NaDOC, Natriumdeoxycholat	Sigma, Deisenhofen
Natriumazetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorit	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natrium-Kaliumtartrat	Merck, Darmstadt
Natriummolybdat	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
Natriumpyrophosphat Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Merck, Darmstadt
Natriumtartrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nonidet P40	Boehringer, Mannheim
Nukleosid-5'-Triphosphate	Boehringer, Mannheim
PMSF, Phenylmethylsulfonyl-Fluorid	Sigma, Deisenhofen
Phenol	USB, Cleveland USA
Polyvinylpyrrolidon (PVP 360)	Sigma, Deisenhofen
Poly-dI/dC	Boehringer, Mannheim
Rinderserumalbumin, Fraktion V	Serva, Heidelberg
RNase A	Sigma, Deisenhofen
RPMI-(synthetisches Kulturmedium)	Gibco, Karlsruhe
RQ1-DNase	Promega, Heidelberg
SDS, Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Spermidin	Sigma, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	BioRad, München

tRNA (aus Hefe)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Difco, Detroit
Tween20	Serva, Heidelberg
Wasserstoff-Peroxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Zinkchlorid	Sigma, Deisenhofen

Alle übrigen, nicht aufgeführten Chemikalien wurden in p.a. Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

## Induktoren und Inhibitoren

Actinomycin D	Sigma, Deisenhofen
5,6 Dichlor-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazol	Calbiochem, Bad Soden
Emetin, Dihydrochlorid	Calbiochem, Bad Soden
Epidermaler Wachstums-Faktor	Sigma, Deisenhofen
Interleukin 1α	Sigma, Deisenhofen
Tumornekrosefaktor α	Calbiochem, Bad Soden
12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat	Sigma, Deisenhofen
Z-Val-Ala-DL-fluoromethylketon (Z-VAD.fmk)	Alexis, Grünberg
Z-Asp-2,6-dichlorobenzoyloxymethylketon (Z-A.dcbmk)	Alexis, Grünberg
E64-d; EST (Loxastain)	Calbiochem, Bad Soden

Von diesen Substanzen wurden konzentrierte Stammlösungen in Wasser, DMSO (TPA), Methanol (Z-VAD.fmk und Z-A.dcbmk) oder Ethanol (E64-d) angesetzt und bei -20°C bzw. -80°C gelagert.

Suramin (Germanin)	Bayer, Leverkusen
--------------------	-------------------

Dieses Agens wurde vor der Induktion frisch angesetzt und als konzentrierte Stamm-lösungen direkt ins Zellkulturmedium gegeben.

## Geräte und Verbrauchsmaterial

Bakterien-Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Fuji Bio-Imaging Analyzer BAS1.000	raytest, Schraubenhardt
Brutschrank	Labotect, Göttingen
Crocodile II Thermocycler	Appligene, Heidelberg
DEAE-Membran NA 45	Schleicher & Schuell, Dassel
ECL-System	Amersham-Buchler, Braunschweig
Einfrierröhrchen	Wheaton Scientific, Millville USA
Elektrophorese-Apparaturen	BioRad, München
	BRL, Eggenstein
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme	Kodak, New Haven USA
Eppendorf Reaktionsgefäße	Greiner, Frickenhausen
Geltrockner	BioRad, München
Hyperfilm XR®	Amersham-Buchler, Braunschweig
Hybond N <sup>+</sup> Nylonmembran	Amersham-Buchler, Braunschweig
Kontron-Hermle Centrikon H-401 Zentrifuge	Hermle, Gosheim
Kühlzentrifuge J2-HS mit Rotoren JS-13.1 und JA-1	Beckmann, Stuttgart
Mikrotiterplatten	Greiner, Frickenhausen
Naß-Transferapparat für Western-Blot	BioRad, München

Plastikzentrifugenröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Polystyren-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Polyvinyliden-Difluorid- (PVDF-) Membran	Millipore, Bedford USA
Protein A Sepharose® CL-4B	Pharmacia, Freiburg
Oligo (dT)-Cellulose Type 7	Pharmacia, Freiburg
Quiagen-tip 500-Säulen	Diagen, Hilden
QuickChange™ Site-Directed Mutagenisierungs-Kit	Stratagene, Heidelberg
Sephadex G-25 und G-50	Pharmacia, Freiburg
Spektralphotometer (Spekol UV/VIS)	Zeiss, Jena
Szintillationsmeßgerät (BETAmatic)	Kontron, Gosheim
Tischzentrifuge Typ 5410	Eppendorf, Hamburg
Tisch-Kühlzentrifuge	Haraeus, Stuttgart
Titertek Multiscan PLUS MKII ELISA-Reader	Labsystems, Finnland
UVC-Lampe (254 nm)	Vetter, Wiesloch
UV-Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg
Whatman 3MM-Papier	Bender und Hobein, Karlsruhe
Zellkulturartikel	Greiner, Frickenhausen

## Enzyme

Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme wurden von den Firmen Amersham-Buchler (Braunschweig), Biolabs (Frankfurt), Boehringer (Mannheim), Promega (Madison), Pharmacia (Freiburg) oder United States Biochemicals (Cleveland) bezogen.

## Radiochemikalien

L-[ <sup>35</sup> S]-Cystein und L-[ <sup>35</sup> S]-Methionin	530M bq/ml, 14,3mCi/ml
[ <sup>35</sup> S]-dATP $\alpha$ S	370M bq/ml, 10mCi/ml
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-rATP	370M bq/ml, 10mCi/ml
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-dCTP	370M bq/ml, 10mCi/ml
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-rCTP	740M bq/ml, 20mCi/ml

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Buchler (Braunschweig) bezogen.

## Antikörper

anti CREB	Dr. W. Schmid, DKFZ, Heidelberg
polyklonal, IgGs aus Kaninchen, gerichtet gegen phosphoryliertes Serin 133 im CREB-Protein, erkennt kein nichtphosphoryliertes CREB	
anti FLAG (D-8)	Santa Cruz, Heidelberg
polyklonal, IgGs aus Kaninchen, gerichtet gegen die FLAG-Peptidsequenz D-Y-K-D-D-D-D-K eine artifizielle, antigene Determinante	
anti HA (Klon 12CA5)	Boehringer, Mannheim
monoklonal, IgGs aus Maus, gerichtet gegen die HA-Peptidsequenz Y-P-Y-D-V-P-D-Y-A des menschlichen Influenza-Haemagglutininproteins	
anti IL-1 $\alpha$	Bio Tech Trade, St. Leon-Rot
polyklonal, IgGs aus Kaninchen, gerichtet gegen rekombinantes humanes IL-1 $\alpha$	

anti IL-1 $\alpha$ #1190	Dainippon Pharmaceutical Co., LTD, Japan
monoklonal, IgGs aus Kaninchen, gerichtet gegen rekombinantes humanes IL-1 $\alpha$	
anti IL-1 $\alpha$ AB-200NA	R&D Systems, Wiesbaden
polyklonal, IgGs aus Kaninchen, gerichtet gegen rekombinantes humanes IL-1 $\alpha$	
anti IgG	Dianova, Hamburg
polyklonal, IgGs aus Kaninchen	
anti I $\kappa$ B $\alpha$ (C-15)	Santa Cruz, Heidelberg
polyklonal, IgGs aus Kaninchen, gerichtet gegen die Aminosäuren 6-20 im N-Terminus des humanen I $\kappa$ B $\alpha$	
anti I $\kappa$ B $\alpha$ (C-21)	Santa Cruz, Heidelberg
polyklonal, IgGs aus Kaninchen, gerichtet gegen die Aminosäuren 297-317 im C-Terminus des humanen I $\kappa$ B $\alpha$	
anti Kaninchen HRP	DAKO, Hamburg
polyklonal, IgGs aus Ziege, Peroxidase-gekoppelt, gerichtet gegen alle Kaninchen IgG Subklassen	
anti Maus HRP	DAKO, Hamburg
polyklonal, IgGs aus Kaninchen, Peroxidase-gekoppelt, gerichtet gegen alle Maus IgG Subklassen	
anti Phospho-Tyrosin (PY-20)	Transduction Labs, Exeter
monoklonal, IgG <sub>2b</sub> aus Kaninchen, gerichtet gegen phosphorylierte Tyrosinreste	
anti p50 (NLS)	Santa Cruz, Heidelberg
polyklonal, IgG <sub>2b</sub> aus Kaninchen, gerichtet gegen 11 Aminosäuren der Kern-Signal-Sequenz des humanen p50	
anti p65 (C-20)	Santa Cruz, Heidelberg
polyklonal, IgG <sub>2b</sub> aus Kaninchen, gerichtet gegen die Aminosäuren 531-550 im C-Terminus des humanen p65	
anti p53 (Ab-2)	Calbiochem, Bad Soden
monoklonal, IgG <sub>1</sub> aus Maus, gerichtet gegen die Aminosäuren 46-55 im N-Terminus des humanen p53	
anti TNF $\alpha$	Bio Tech Trade, St. Leon-Rot
polyklonal, IgG <sub>2b</sub> aus Kaninchen, gerichtet gegen rekombinantes humanes TNF $\alpha$	

## Nährmedien für die Bakterienkultur

LB-Medium:	1 % Bacto-Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl
NZY-Medium:	1 % Casein Hydrolysat; 0,5 % Hefeextrakt
SOB-Medium:	2 % Bacto-Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM MgSO <sub>4</sub>
SOC-Medium:	SOB + 20 mM Glukose

Bakterienplatten wurden durch Zugabe von 15 g Bacto-Agar/Liter Medium hergestellt und mit den entsprechenden Antibiotika (100  $\mu$ g/ml Ampicillin) versehen.

## Lösungen und Puffer

PBS:	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM CaCl <sub>2</sub> ; 0,6 mM MgCl <sub>2</sub> ; 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,6
20 x SSC:	3 M NaCl; 0,25 M Na-Zitrat; pH 6,5
TBE:	90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA
TE:	10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA

## Bakterienstämme

E. coli DH5 $\alpha$ ; Genotyp:	F <sup>-</sup> , $\Phi$ 80 $\Delta$ lacZDM15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup></i> , <i>m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169
E. coli XL1 blue; Genotyp:	F <sup>'</sup> ::Tn10 <i>proA</i> + <i>b</i> + <i>lacI<sup>q</sup></i> , <i>d(lacZ)</i> M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , ( <i>Nal<sup>r</sup></i> ), <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup></i> , <i>m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i>

## Zelllinien

HeLa tk <sup>-</sup>	Menschliche Cervix-Karzinoma-Zelllinie. Subklon mit defizientem Thymidin-kinase-Gen. Die Zellen stammten ursprünglich von Y. C. Chun, Durham, zur Verfügung gestellt.
Jurkat (Kabelitz)	Menschliche, lymphoide, CD2 <sup>+</sup> , CD3 <sup>+</sup> T-Zelllinie (Wesselborg <i>et al.</i> , 1993). Die Zellen wurden von Dr. B. Schraven (Universität Heidelberg) erhalten.
NFB	Menschliche primäre Normalfibroblasten. Die Zellen wurden von R. Eife (München) erhalten.
XPA	Menschliche primäre Fibroblasten von Patienten mit <i>Xeroderma pigmentosum</i> Komplementationsgruppe A. Die Zellen wurden von J. Cleaver (San Francisco) erhalten.

## Oligonukleotide

### Für Gelretardationsanalysen: HIV-1 Oligo

5' AGCTTGGGGACTTTCCAGCCG 3'  
3 ACCCCTGAAAGGTCGGCCTAG 5'

### Für Sequenzierung:

pMT-3	5' CCAGGAGAGGCACTGGGG 3'
T7 Primer	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
reverse CAT Primer	5' CTCGATTCCTTCGATTTTAC 3'

**Für *in vitro* Mutagenisierung:**HA-IκBα 1-317/S283A und HA-IκBα 1-287/S283A

5' GATGCTGCCAGAGGCTGAGGATGAGG 3'  
 3' CTACGACGGTCTCCGACTCCTACTCC 5'

HA-IκBα 1-283

5' GCTGCCAGAGAGTTAGGATGAGGAGAGC 3'  
 3' CGACGGTCTCTCAATCCTACTCCTCTCG 5'

HA-IκBα 1-281

5' CAGATGCTGCCATAGAGTGAGGATGAGG 3'  
 3' GTCTACGACGGTATCTCACTCCTACTCC 5'

**Plasmide****cDNA-Vektoren für die Herstellung von Northern-Sonden:**

**pGAPDH-13** enthält ein 1,3 kp Fragment der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Fort *et al.*, 1985) der Ratte. Für die Markierung wurde das Fragment nach Pst I-Verdau isoliert.

**pGEM4-IκBα** enthält 1,5 kb IκBα/MAD-3 cDNA. Von B. Stein aus pcDNA1-IκBα (Haskill *et al.*, 1991) mit Hind III und Xba I isoliert und in pGEM4 umkloniert.

**ph-cJ-1** enthält ein 1,4 kp Sma I/Hind III-Fragment des menschlichen *c-jun* Gens (Angel *et al.*, 1988a).

**Plasmid-DNAs für die Transkription von Ribo-Sonden:**

**SP65-IL-1α** enthält ein 660 bp Hind III/Hinc II-Fragment der menschlichen IL-1α cDNA (March *et al.*, 1985) in einem SP65-Vektor. Zur *in vitro* Transkription wurde SP65-IL-1α mit Hind III linierisiert. Zur Verfügung gestellt von Hans. J. Rahmsdorf, IGEN, Forschungszentrum Karlsruhe.

**Eukaryontische Expressions-Vektoren:**

**pCMV4-FLAG-IκBα wt** enthält die vollständige IκBα-cDNA als N-terminales FLAG-Fusionsprotein unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Brockman *et al.*, 1995); zur Verfügung gestellt von D. W. Ballard, Nashville, USA.

**pCMV4-FLAG-IκBα ΔN** enthält die IκBα-cDNA als N-terminales FLAG-Fusionsprotein unter der Kontrolle des CMV-Promotors mit einer Deletion der Aminosäuren 1 bis 36 (Brockman *et al.*, 1995); zur Verfügung gestellt von D. W. Ballard, Nashville, USA.

**pCMV4-FLAG-I $\kappa$ B $\alpha$  S32/36A** enthält die vollständige I $\kappa$ B $\alpha$ -cDNA als N-terminales FLAG-Fusionsprotein unter der Kontrolle des CMV-Promotors mit den Punktmutationen Serin 32 und Serin 36 zu Alanin (Scherer *et al.*, 1995); zur Verfügung gestellt von D. W. Ballard, Nashville, USA.

**pCMV4-HA-I $\kappa$ B $\alpha$  wt** enthält die vollständige I $\kappa$ B $\alpha$ -cDNA als N-terminales HA-Fusionsprotein (3 Kopien des Influenza-Virus Haemagglutinin Epitops) unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Sun *et al.*, 1996); zur Verfügung gestellt von Warner C. Greene, San Francisco, USA.

**pCMV4-HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-263** enthält die I $\kappa$ B $\alpha$ -cDNA von Aminosäure 1 bis 263 als N-terminales HA-Fusionsprotein unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Sun *et al.*, 1996); zur Verfügung gestellt von Warner C. Greene, San Francisco, USA.

**pCMV4-HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-277** enthält die I $\kappa$ B $\alpha$ -cDNA von Aminosäure 1 bis 277 als N-terminales HA-Fusionsprotein unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Sun *et al.*, 1996); zur Verfügung gestellt von Warner C. Greene, San Francisco, USA.

**pCMV4-HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-287** enthält die I $\kappa$ B $\alpha$ -cDNA von Aminosäure 1 bis 287 als N-terminales HA-Fusionsprotein unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Sun *et al.*, 1996); zur Verfügung gestellt von Warner C. Greene, San Francisco, USA.

**pCMV4-HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-297** enthält die I $\kappa$ B $\alpha$ -cDNA von Aminosäure 1 bis 297 als N-terminales HA-Fusionsprotein unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Sun *et al.*, 1996); zur Verfügung gestellt von Warner C. Greene, San Francisco, USA.

**pCMV-HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-281** enthält die I $\kappa$ B $\alpha$ -cDNA von Aminosäure 1 bis 281 als N-terminales HA-Fusionsprotein unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Das Plasmid wurde durch punktgerichtete Mutagenisierung des Expressionsvektors pCMV4-HA-I $\kappa$ B $\alpha$  wt kloniert.

**pCMV-HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-283** enthält die I $\kappa$ B $\alpha$ -cDNA von Aminosäure 1 bis 283 als N-terminales HA-Fusionsprotein unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Das Plasmid wurde durch punktgerichtete Mutagenisierung des Expressionsvektors pCMV4-HA-I $\kappa$ B $\alpha$  wt kloniert.

**pCMV-HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-317/S283A** enthält die vollständige I $\kappa$ B $\alpha$ -cDNA als N-terminales HA-Fusionsprotein unter der Kontrolle des CMV-Promotors mit der Punktmutation Serin 283 zu Alanin. Das Plasmid wurde durch punktgerichtete Mutagenisierung des Expressionsvektors pCMV4-HA-I $\kappa$ B $\alpha$  wt kloniert.

**pCMV-HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-287/S283A** enthält die I $\kappa$ B $\alpha$ -cDNA von Aminosäure 1 bis 287 als N-terminales HA-Fusionsprotein unter der Kontrolle des CMV-Promotors mit der Punktmutation Serin 283 zu Alanin. Das Plasmid wurde durch punktgerichtete Mutagenisierung des Expressionsvektors pCMV4-HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-287 kloniert.

**pRc/RSV-pIL-1 $\alpha$ FLAG** enthält die cDNA für das IL-1 $\alpha$ -Vorläuferprotein unter der Kontrolle des RSV-Promotors (Siders *et al.*, 1993); zur Verfügung gestellt von S. B. Mizel, North Carolina, USA.

# Methoden

Die aufgeführten Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, aus *Maniatis et al.* (1982) und *Current Protocols in Molecular Biology* (1989) abgeleitet.

## 1. Behandlung von Nukleinsäuren

### Extraktion von Nukleinsäuren mit Phenol/Chloroform

Zur Reinigung der Nukleinsäurelösung von Proteinen wurde mit Wasser auf mindestens 100 µl aufgefüllt. Nach Zugabe des gleichen Volumens Phenol (mit 1 x TNE gesättigte Lösung; 1 x TNE: 100 mM NaCl; 10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) wurde gut geschüttelt und nach Zugabe eines weiteren Volumens Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1) wieder gut geschüttelt. Die Phasen wurden durch eine 3minütige Zentrifugation wieder getrennt. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und nochmals mit dem gleichen Volumen an Chloroform : Isoamylalkohol auf die gleiche Weise extrahiert.

### Fällung von Nukleinsäuren

Die gelöste DNA wurde mit 3 M Natriumazetatlösung (pH 4,8) auf eine Endkonzentration von 0,3 M gebracht und mit dem 2,5fachen Volumen Ethanol gemischt. Die Fällung erfolgte für 30 min auf Eis oder für 30 min bis über Nacht bei -20°C. Das Präzipitat wurde bei 13.000 x g, 20-30 min pelletiert, zur Entfernung von Salzresten mit 70 % Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert und anschließend im Vakuum („speed vac“) getrocknet.

### Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA oder RNA in wässriger Lösung wurde spektrometrisch bestimmt. Dazu wurde die optische Dichte einer verdünnten Nukleinsäurelösung bei 260 nm im Spektralphotometer *Spekol UV/VIS (Carl Zeiss Jena)* gemessen. Bei einer Extinktion von 1 hat doppelsträngige DNA eine Konzentration von 50 µg/ml, RNA eine Konzentration von 40 µg/ml und einzelsträngige Oligonukleotide eine Konzentration von 20 µg/ml. Das Verhältnis der optischen Dichten  $OD_{260}/OD_{280}$  sollte für DNA etwa 1,8 und für RNA etwa 2,0 betragen.

## 2. DNA-Methoden

### 2.1 DNA-Präparation

#### **Plasmid-DNA Maxi-Präparation**

250 ml Selektionsmedium (LB mit 100 µg/ml Ampicillin) wurden mit dem gewünschten Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde 10 min bei 3.600 x g sedimentiert (4°C im *Beckman JA-14 Rotor*), das Pellet in 10 ml Puffer P1 (50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; 100 µg/ml RNase) resuspendiert und die Bakterien in 10 ml Puffer P2 (0,2 M NaOH; 1 % SDS) für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Das Bakterienlysat wurde mit 10 ml Puffer P3 (3 M Kaliumazetat pH 5,5) neutralisiert (5 min bei Raumtemperatur und 10 min auf Eis), bei 4°C und 7.200 x g 20 min lang zentrifugiert. Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Quiagen-tip 500-Säulen (*Quiagen Inc.*) laut Herstellerprotokoll. Nach Bindung der Plasmid-DNA an das zuvor mit 10 ml 750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15 % Ethanol, pH 7,0 equilibrierte Säulenmaterial wurden Verunreinigungen mit 30 ml 1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % Ethanol, pH 7,0 ausgewaschen. Nachfolgend wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml 1,25 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % Ethanol, pH 8,5 von der Säule eluiert, mit dem 0,8fachen Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt, abzentrifugiert (30 min mit 14.500 x g bei 4 °C, *Beckman J2-HS* mit *JS-13.1 Rotor*), mit 70 % Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und anschließend in 500 µl Wasser gelöst.

#### **Plasmid-DNA Mini-Präparation**

Die gewünschte Bakterienkolonie wurde in 3 ml Nährmedium mit dem Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml der Kultur wurden in ein Mikrozentrifugenröhrchen (*Eppendorf*) überführt und 20 s bei 13.000 x g zentrifugiert. Das Bakterien-Pellet wurde in 100 µl Lysozymlösung (2 mg/ml Lysozym; 50 mM Glukose; 10 mM EDTA pH 7,8; 25 mM Tris pH 8,0) resuspendiert, kurz geschüttelt (gevortext) und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer Lösung (0,2 M NaOH; 1 % SDS) wurde kurz geschüttelt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, 150 µl 3 M Natriumazetatlösung pH 4,8 zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Die Reste aus Proteinen, Zellwand und genomischer DNA wurden durch 10 min Zentrifugation pelletiert. 400 µl des Überstandes wurden anschließend einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen, die Plasmid-DNA wurde mit 1 ml eiskaltem Ethanol präzipitiert und durch 15 min Zentrifugation bei 13.000 x g und 4°C sedimentiert. Nach dem Waschen mit 70 % Ethanol wurde die

Plasmid-DNA im Vakuum getrocknet, in 50 µl Wasser (mit 1 ng/ml RNase A) aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert. 5 µl der Plasmid-DNA wurden zum Restriktionsverdau oder zur Sequenzierung eingesetzt.

## **2.2 Klonierungstechniken**

### **Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Wenn nicht anders angegeben, wurde die DNA in 1 x Universal-Verdaupuffer (10 mM Tris pH 7,5; 50 mM NaCl; 7 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 0,1 mg/ml BSA) mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut. Pro µg DNA wurden 2-3 U Restriktionsendonuklease zugegeben. Das Reaktionsvolumen betrug mindestens das 10fache des Volumens der zugesetzten Enzym/Glyzerin-Lösung. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte (wenn vom Hersteller nicht anders empfohlen) bei 37°C für mindestens 2 h. Beim Schneiden von Plasmid-DNA aus Minipräparationen wurden 5 µl DNA-Lösung mit 10 Enzymeinheiten und 50 ng/ml RNase A verdaut. Die Verdau-Reaktion wurde mit 5 µl 5 x Glyzerin-Probenpuffer (50 mM EDTA pH 8,0; 50 % Glyzerin; 1 % SDS; 0,2 % Bromphenolblau) abgestoppt.

### **Auffüllen von 5'-Überhängen**

Die DNA wurde mit 2 µl DTT (10 mM), 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP; dCTP; dGTP und dTTP in 10 mM Tris pH 7,5) und 1 µl *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5 U/µl) in einem Endvolumen von 20 µl 1 x Polymerase-Puffer (7 mM Tris pH 7,5; 7 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM NaCl) gemischt. Die Reaktion wurde nach 30 min RT durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion abgestoppt. Neben dem Auffüllen von 5'-Überhängen werden bei dieser Reaktion auch 3'-Überhänge abgebaut.

### **Ligation von DNA-Fragmenten**

Zur Verbindung von kohäsiven DNA-Enden wurden 500 ng DNA-Fragmente (jeweils gleiche Molaritäten freier Enden [1 µg 1.000 bp ds DNA = 3,03 pmol Enden; 1 pmol 1.000 bp ds DNA = 0,66 µg]) und 1,5 Enzymeinheiten T4-DNA-Ligase in einem Volumen von 20 µl 1 x Ligasepuffer (30 mM Tris pH 7,8; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT; 1 mM Spermidin; 1 mM rATP) auf Eis gemischt und über Nacht bei 15°C inkubiert. Als Kontrolligation diente ein Ansatz ohne Insertfragment (Kontrolle der Religationseffizienz des Vektorfragments) und ein Ansatz ohne Ligase (Kontrolle der Verunreinigung durch intaktes Plasmid). Die Hälfte der Ligrationsreaktion wurde zur Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt.

### **Punktgerichtete Mutagenisierung**

Zur Einführung von Punktmutationen wurde der "QuickChange™ Site-Directed Mutagenisierungs-Kit" der Firma *Stratagene* laut Herstellerangaben verwendet. Diese Methode erlaubt eine ortsspezifische Mutation in nahezu allen doppelsträngigen Plasmiden und macht damit eine zeitraubende Umklonierung in M13 Bakteriophagen-Vektoren und einzelsträngige DNA überflüssig. Für die Replikation der DNA wird die *Pfu* DNA-Polymerase verwendet, die beide DNA-Stränge mit hoher Genauigkeit (12mal genauer als *Taq* DNA-Polymerase) amplifiziert. Die Mutation enthaltende Oligonukleotid-Primer, die zu den entgegengesetzten Strängen der DNA komplementär sind, werden während den Replikations-Zyklen durch die *Pfu* DNA-Polymerase verlängert, so daß ein zirkuläres, mutiertes Plasmid mit versetzt angeordneten Einschnitten gebildet wird. Plasmid-DNA wird von nahezu allen *E. coli* Stämmen *dam* methyliert und ist somit von der *in vitro* synthetisierten DNA unterscheidbar. Die ursprüngliche Plasmid-DNA wird anschließend mit der Endonuklease *Dpn* I verdaut. Die *Dpn* I Endonuklease schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA. Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen in einem Thermo-Cycler (Crocodile II, *Appligene*): 10 ng Matrizen-DNA, 1/10 Volumen 10 x Reaktions-Puffer, je 125 ng Oligonukleotidprimer (5'-3' und 3'-5') und 1 µl dNTP-Mix (2,5 mM je NTP) wurden mit Wasser auf das Endvolumen von 50 µl aufgefüllt, 1 µl *Pfu* DNA-Polymerase (2,5 U/µl) zugegeben und mit 30 µl Mineralöl überschichtet. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 95°C für 30 s, die Primerhybridisierung bei 55°C für 1 min und die DNA-Synthese bei 68°C (als Faustregel gilt, 2 Minuten pro kb Plasmid-Länge). Nach Abschluß der DNA-Synthese wurde auf 37°C abgekühlt, 1 µl *Dpn* I Restriktionsenzym (10 U/µl) zugegeben und 60 min bei 37°C verdaut. Die Amplifikationsprodukte wurden durch gelelektrophoretische Auftrennung und Anfärben mit Ethidiumbromid kontrolliert und die Plasmid-DNA anschließend in superkompetente Bakterien (*Epicurian Coli* XL1-Blue) transformiert. Der Erfolg der Mutagenisierung wurde in jedem Fall durch Sequenzierung der klonierten Plasmide überprüft.

### **Sequenzierung von DNA**

Gereinigte Plasmid-DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.* (1977) mit Hilfe des „T7-Sequencing™-Kit“ der Firma *Pharmacia Biotech* sequenziert. Die Durchführung der Reaktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. 5 µg Plasmid-DNA wurden mit 0,2 M NaOH und 0,2 mM EDTA für 10 min bei RT denaturiert. Die denaturierte DNA wurde mit 3 M Natriumazetatlösung (pH 4,8) auf eine Endkonzentration

von 0,3 M gebracht, mit dem 3fachen Volumen Ethanol gemischt, durch 30 min Zentrifugation pelletiert, mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und im Vakuum („Speed vac“) für 2 min getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in Wasser resuspendiert, mit 2 pmol des entsprechenden Sequenzier-Oligonukleotids in 143 mM Tris-HCl pH 7,6, 14,3 mM MgCl<sub>2</sub> und 23 mM DTT gemischt. Zur Bindung des Oligonukleotids an die DNA wurde zunächst für 5 min auf 65°C erhitzt, danach 5 min bei 37°C gehalten und für 5 min bei RT abgekühlt. Indessen wurden jeweils 2,5 µl der ddGTP-, ddATP-, ddTTP- oder ddCTP-Terminationsmischung („short Mix“) auf Eis in eine Mikrotiterplatte (Fa. Greiner) pipettiert. Zur abgekühlten Reaktion wurden 3 µl Markierungsmix A, 1 µl [<sup>35</sup>S]-dATPαS und 2 µl T7 DNA-Polymerase (1,5 U/µl) pipettiert und genau für 5 min bei RT inkubiert. Nach einer kurzen Strangverlängerung mit [<sup>35</sup>S]-dATPαS erfolgt die Kettenabbruch-Reaktion mit den entsprechenden Didesoxy-Nukleosidtriphosphaten. Dazu wurden je 3,5 µl aus der Reaktion zu den ddNTPs gegeben, für 5 min bei 37°C inkubiert und durch 5 µl Formamid-Probenpuffer (10 mM EDTA pH 7,5; 97,5 % Formamid; 0,03 % Xylencyanol; 0,03 % Bromphenolblau) wurde die Reaktion gestoppt. Vor dem Auftrennen der Proben in einem denaturierenden 6 % Polyacrylamid / 8,3 M Harnstoff-Gel wurden diese für 5 min bei 80°C im Wärmeschrank erhitzt und sofort auf Eis abgeschreckt.

### **Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterien**

Es wurden 5 ml LB-Medium mit Bakterien einer Einzelkolonie (*E. coli* DH5α) angeimpft und bei 37°C bis zur stationären Phase geschüttelt. 2,5 ml dieser frischen Kultur wurden in 250 ml LB-Medium verdünnt. Diese Kultur wurde unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD<sub>550</sub> = 0,5 inkubiert, in einem vorgekühlten (+4°C) Zentrifugenbecher überführt und bei 4°C und 7.020 x g (*Beckman JA-10 Rotor*) für 8 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml vorgekühlter 0,1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung mit einer Plastikpipette resuspendiert, auf ein Volumen von 250 ml mit 0,1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung aufgefüllt und bei 4°C und 7.020 x g für 8 min zentrifugiert. Die Bakterien wurden anschließend in 10 ml vorgekühlter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, mit 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung auf 250 ml aufgefüllt und 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien bei 4°C und 7.020 x g abzentrifugiert, in 12 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung vorsichtig resuspendiert, in ein 15 ml *Falcon*-Röhrchen gegeben, indem 2 ml 87 % Glycerin auf Eis vorgelegt waren, und vorsichtig gemischt. Zum späteren Gebrauch wurden je 1 ml Bakterien-Suspension in vorgekühlte *Eppendorf* Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gelagert.

## **Transformation kompetenter Bakterien**

Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und vorsichtig gemischt. Für jeden Transformationsansatz wurden 100 µl Bakterien auf Eis mit 1,5 µl einer frisch zubereiteten 1,4 M β-Mercaptoethanol-Lösung versetzt und unter gelegentlichem Schütteln für 10 min inkubiert. Danach wurden die Bakterien entweder mit 5 ng „supercoil“ Plasmid-DNA oder mit 10 µl Ligationsansatz vermischt und für 30 min auf Eis gestellt. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 45 s und Inkubation für 2 min auf Eis, wurden 900 µl SOC-Medium (SOB-Medium plus 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 20 mM Glukose) zugegeben und die Kultur für 60 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 200 µl des Ansatzes auf eine Agarplatte mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und bis zum Erscheinen makroskopischer Kolonien bei 37°C inkubiert.

## **2.3 DNA-Gelelektrophorese**

### **Agarose-Gelelektrophorese**

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0,8-1,5 % Agarose-Minigele mit einem Gelvolumen von 50 ml, Puffervolumen von 100 ml und Taschenvolumen von 25 µl verwendet. Die entsprechende Menge Agarose Typ II wurde in 50 ml 1 x TBE (90 mM Tris pH 8,3; 90 mM krist. Borsäure; 2,5 mM EDTA pH 8,0) gegeben und im Mikrowellenherd aufgeköcht bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde das Gel in die Kammer gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach Abkühlen und Erstarren der Agarose wurde das Gel vollständig mit Laufpuffer (1 x TBE) überschichtet, der Kamm entfernt und die mit Glycerin-Probenpuffer (10 mM EDTA; 10 % Glycerin; 0,1 % SDS; 0,02 % Bromphenolblau) versetzten Proben aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in der Regel bei 100 V. Die DNA-Banden wurden im UV-Durchlicht (302 nm) sichtbar gemacht und zur Dokumentation photographiert.

### **Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Zur Isolierung großer DNA-Fragmente (über 1.000 bp) wurde die DNA in einem Agarosegel entsprechender Konzentration aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mindestens 10 min lang in deionisiertes Wasser gelegt. Die gewünschte Bande wurde im UV-Durchlicht sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Das Gelstückchen, das das entsprechende DNA-Fragment enthielt, wurde in ein zur Hälfte mit Plastikwolle (*Miobill*) gefülltes, unten durchbohrtes 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gestellt. Durch Zentrifugation (13.000 x g, 10 min) gelangte die zu isolierende

DNA aus dem Gelstückchen in das untere Reaktionsgefäß, während die Agarose durch die Plastikwolle zurückgehalten wurde. Die auf diese Weise isolierte DNA wurde anschließend einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen.

Zur Isolierung kleiner DNA-Fragmente (unter 1.000 bp) wurde die DNA-Lösung in einem Agarosegel entsprechender Konzentration aufgetrennt. Das Gel wurde im UV-Durchlicht unterhalb des zu isolierenden DNA-Fragments mit dem Skalpell horizontal eingeschnitten, in den Schlitz ein Stück DEAE-Membran (NA 45; 0,45 µm; *Schleicher & Schuell*) gesteckt und die Elektrophorese fortgesetzt, bis das Fragment vollständig an die Membran gebunden war. Zur Elution des DNA-Fragments wurde die DEAE-Membran in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 400 µl 1,5 M NaCl, 1 mM EDTA pH 8,0 und 10 mM Tris pH 7,5 für 20 min bei 65°C inkubiert, durch zweimaliges Ausschütteln mit Phenol/Chloroform gereinigt und mit 1 ml Ethanol gefällt.

### **Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gele**

Denaturierende Bedingungen bei der Auftrennung von DNA-Molekülen wurden hauptsächlich zur Analyse von DNA-Fragmenten verwendet die bei der DNA-Sequenzierung entstehen.

Für die Sequenzgele wurden die Glasplatten (40 x 20 cm) mit Ethanol fettfrei gemacht und so zusammengesetzt, daß sie durch einen 0,2 mm dicken „spacer“ voneinander getrennt wurden. Für das Polyacrylamid-Harnstoff-Gel wurden 30 ml Gellösung (100 ml deionisiertes Acrylamid : Bisacrylamid [30 : 0,8], 50 ml 10 x TBE, 250 g Harnstoff [8 M f.c.] auf 500 ml mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und filtriert) mit 30 µl TEMED und 300 µl 10 % APS (w/v) versetzt, gemischt, zwischen die Glasplatten gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach der Polymerisation wurde das Gel in eine Vertikal-Elektrophorese-Kammer eingespannt und die Kammern mit 1 x TBE gefüllt. Für eine optimal denaturierende Wirkung des Harnstoffs ist eine Temperatur von ca. 60°C notwendig. Daher wurde ein halbstündiger Vorlauf des Gels bei 1.500 V durchgeführt bevor die Proben aufgetragen wurden. Die Auftrennung erfolgte ebenfalls bei 1.500 V und 15 mA. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel auf *Whatman 3MM*-Papier der entsprechenden Größe transferiert, bei 80°C getrocknet und über Nacht bei RT gegen einen Röntgenfilm exponiert.

### **Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden mit T4-Polynukleotidkinase**

Zur Herstellung von Oligonukleotidproben für Gelretardationsanalysen wurden 2 pmol doppelsträngiges Oligonukleotid mit 5 µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-rATP (10 mCi/ml) und 10 U T4-

Polynukleotidkinase (*Promega*) in einer 15  $\mu$ l Reaktion mit 10 mM  $MgCl_2$ , 5 mM DTT, 0,1 mM Spermidin, 0,1 mM EDTA und 50 mM Tris pH 7,5 gemischt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 1  $\mu$ l 0,5 M EDTA gestoppt, auf 100  $\mu$ l aufgefüllt und durch Gelfiltration (*Sephadex G-25 Matrix*) wurden die markierten Oligonukleotiden von den freien Nukleotiden abgetrennt.

### 3. RNA-Methoden

#### Präparation von Poly (A)<sup>+</sup>mRNA (Aviv und Leder, 1972)

Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Behandlung zweimal mit eiskaltem PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM  $CaCl_2$ ; 0,6 mM  $MgCl_2$ ; 6,5 mM  $Na_2HPO_4$ ; 1,5 mM  $KH_2PO_4$  pH 7,6) gewaschen und in der Kulturschale mit 10 ml STE-Puffer (100 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0,5 % SDS; 20 mM Tris-HCl pH 7,4) mit 300  $\mu$ g/ml Proteinase K lysiert. Die Lysate wurden mit einem Gummischaber abgeschabt, in ein 50 ml Plastik-Zentrifugenröhrchen überführt, mit einem *Ultraturrax*-Messerhomogenisator zerkleinert und zum Proteinase K-Verdau für 30 min bei 37°C inkubiert. Der Lösung wurde NaCl bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugesetzt und etwa 50 mg Oligo (dT)-Zellulose in HSB-Puffer (300 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,1 % SDS; 10 mM Tris-HCl pH 7,4) zugegeben. Durch Rotieren über Nacht wurde die Poly (A)<sup>+</sup>mRNA an die Oligo (dT)-Zellulose absorbiert. Die an die Oligo (dT)-Zellulose gebundene mRNA wurde durch 2 min Zentrifugation bei 400 x g im Schwingbecherrotor (*Heraeus Omnifuge 2.0 RS*) pelletiert und dreimal mit je 10 ml HSB-Puffer gewaschen. Zum Eluieren der mRNA wurde die Oligo (dT)-Zellulose einmal mit 500  $\mu$ l und viermal mit 950  $\mu$ l DEPC behandeltem Wasser gewaschen. Der erste Waschschrift wurde verworfen, die restlichen (insgesamt 3,8 ml) in einem Glasröhrchen auf Eis gesammelt und anschließend nochmals bei 1.600 x g zentrifugiert, um die Oligo (dT)-Zellulose vollständig abzutrennen. 300  $\mu$ l davon wurden zur Bestimmung der mRNA Konzentration im Spektralphotometer gemessen. Zu den restlichen 3,5 ml RNA-Eluat wurden in einem 15 ml *Greiner*-Röhrchen 20  $\mu$ g Hefe-tRNA gegeben, mit 3 M Natriumazetat-Lösung auf eine Endkonzentration von 0,2 M eingestellt und mit einem 2,5fachen Volumen Ethanol für 16 h bei -20°C oder für 30 min bei -80°C gefällt. Die RNA wurde durch 30 min Zentrifugation (*Beckman J2-HS* mit *Rotor JS-13.1*) bei 14.500 x g und 4°C pelletiert, einmal mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut für 15 min pelletiert und im Exsikkator getrocknet. Die getrocknete mRNA wurde zu einer Konzentration von 0,5-1  $\mu$ g/ $\mu$ l in DEPC behandeltem Wasser aufgenommen. Zur Wiederverwendung der Oligo (dT)-Zellulose wurde diese wie

folgt regeneriert: je zweimal waschen mit 0,1 M NaOH, 5 mM EDTA, fünfmal mit Wasser und zweimal mit HSB-Puffer. Zur Aufbewahrung bei 4°C wurde die Oligo (dT)-Zellulose als eine 50 %igen Suspension (v/v) in HSB-Puffer aufgenommen.

### **Auftrennung von mRNA im Agarosegel**

Zur Auftrennung der RNA wurde ein 1 %iges Agarosegel zwischen zwei 14 x 15 cm große Glasplatten mit 5 mm dicken Kunststoff-Abstandhaltern gegossen. Zur Stabilisierung des Agarosegels wurde zuerst ein dünnes Acrylamid-Kissen (4 ml deionisiertes Acrylamid : Bisacrylamid [30 : 0,8] wurde mit 20 µl TEMED und 50 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfat-Lösung versetzt) gegossen. Für das Agarosegel wurde 1 g Agarose Typ II in 100 ml 1 x RNA-Laufpuffer (1 x PB: 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6,85) im Mikrowellenherd geschmolzen. Die auf etwa 70-80°C abgekühlte Agarose wurde zwischen die vertikal gestellten Glasplatten gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach Erkalten der Agarose wurde der Kamm vorsichtig entfernt, das Gel in eine Vertikal-Gelkammer eingebaut und diese mit 1 x RNA-Laufpuffer aufgefüllt. Die Gelelektrophorese erfolgte im Kühlraum für 2-3 h bei 100-150 V. Die einzusetzende RNA-Mengen wurde zunächst in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß im Vakuum („speed vac“) eingetrocknet und anschließend in 20 µl Denaturierungs-Puffer (1 x PB; 50 % DMSO; 5,85 % deionisiertes Glyoxal) gelöst. Nach 10 min Erhitzen auf 55°C und Abschrecken auf Eis wurden 5 µl 5 x RNA-Ladepuffer (1 x PB; 50 % Glycerin; 0,1 % Bromphenolblau) zugegeben und die RNA-Proben wurden vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Nach Ende des Laufs (die Bromphenolblaubande des Ladepuffers hatte etwa 8 cm zurückgelegt) wurde das Gel von den Glasplatten entfernt und 15 min in 500 ml 1 x PB mit 30 µg/ml Acridinorange gefärbt. Nach dreimaligem Entfärben mit je 500 ml 1 x PB wurde das Gel unter UV-Durchlicht (302 nm) photographiert.

### **Übertragung von mRNA auf eine Nylonmembran („Northern blot“)**

Die größengetrennte mRNA wurde nach der Elektrophorese mittels Kapillarkräften auf eine positiv geladene *Hybond*<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup> Nylonmembran übertragen. Dazu wurde das Gel auf einen Filterpapierstreifen aus *Whatman 3MM*-Papier gelegt, der mit beiden Enden in ein Reservoir mit 20 x SSC-Puffer (3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat pH 6,5) tauchte. Über dem Gel wurden, in der selben Größe wie das Gel, die Nylonmembran, 3 mit 20 x SSC-Puffer befeuchtete Filterpapiere und ein Stapel *Kleenex* Papiertücher geschichtet und mit Hilfe einer Glasplatte und eines Gewichts von etwa 500 g beschwert. Nach etwa 16 h wurde die Membran zur Fixierung der RNA 35 s im *Stratalinker 2400* (254 nm, „auto crosslink“) UV-bestrahlt und danach für 2 h bei 80°C inkubiert.

**Nachweis von spezifischer mRNA mit  $^{32}\text{P}$ -markierten cDNA-Sonden (Denhardt, 1966; Alwine *et al.*, 1977)**

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Nylonmembran vorhybridisiert. Dazu wurde die Membran in 200 ml 4 x SSC, 1 x Denhardt's (0,02 % BSA; 0,02 % Ficoll; 0,02 % PVP), 3,3 % PiPPi (0,2 M  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ ; 0,3 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 %  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ), 0,1 % SDS für 1 h bei 65°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Danach wurde für 2-3 h 40 µg/ml denaturierte Hering-Sperma-DNA zugegeben.

Die Hybridisierung wurde in einer Hybridisierungsröhre aus Glas durchgeführt. Für den Hybridisierungs-Mix wurde die radioaktive Sonde zusammen mit 20 µg/ml denaturierter Hering-Sperma-DNA 10 min gekocht, sofort auf Eis abgeschreckt und mit 4 x SSC, 10 mM EDTA und 0,1 % SDS gemischt. Die Membran wurde in die Röhre gegeben und mit der Hybridisierungs-Lösung für mindestens 14 h im Hybridisierungs-ofen bei 65°C rotieren gelassen. Nach der Hybridisierung wurde die Membran je 30 min bei 65°C mit folgenden Lösungen im Ofen gewaschen: einmal mit 200 ml Lösung A (2 x SSC; 0,1 % SDS; 0,2 M  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ ; 0,3 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 %  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ), zweimal mit je 200 ml Lösung B (1 x SSC; 0,1 % SDS; 0,2 M  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ ; 0,3 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 %  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) und einmal mit 200 ml Lösung C (0,5 x SSC; 0,1 % SDS; 0,2 M  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ ; 0,3 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 %  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ). Die Membran wurde in eine Plastikfolie eingeschweißt und ein Röntgenfilm exponiert. Vor der Hybridisierung mit einer weiteren cDNA-Sonde wurde die vorherige Sonde durch 15minütiges Kochen der Membran in 0,1 x SSC und 0,5 % SDS entfernt und die Vorhybridisierung wiederholt.

**Nachweis von spezifischer mRNA mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten Ribosonde**

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Nylonmembran in einer Hybridisierungsröhre aus Glas mit 10 ml 5 x SSC, 5 x Denhardt's (0,1 % BSA; 0,1 % Ficoll; 0,1 % PVP), 50 % (w/v) rekristallisiertes Formamid und 0,2 % SDS für 1 h bei 50°C im Hybridisierungs-ofen inkubiert. Danach wurden 100 µg/ml denaturierte Hering-Sperma-DNA und 100 µg/ml Hefe-tRNA zugegeben und für weitere 3-4 h bei 50°C vorhybridisiert.

Für den Hybridisierungs-Mix wurde die radioaktive Ribo-Sonde zusammen mit 20 µg/ml denaturierter Hering-Sperma-DNA und 100 µg/ml Hefe-tRNA 10 min gekocht, sofort auf Eis abgeschreckt, zu der Vorhybridisierungs-Lösung gegeben und für 16 h im Ofen bei 50°C rotiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran wie beim Nachweis mit einer markierten cDNA-Sonde gewaschen (siehe oben), in eine Plastikfolie eingeschweißt und ein Röntgenfilm

exponiert. Vor der Hybridisierung mit einer weiteren cDNA-Sonde wurde die Membran für 15 min in 0,1 x SSC und 0,5 % SDS gekocht und die Vorhybridisierung wiederholt.

### **Markierung von cDNA-Fragmenten mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP für Northern-Blot-Analysen**

Die gewünschten cDNA-Fragmente wurden nach Restriktionsverdau der entsprechenden Plasmid-DNAs in einem Agarosegel aufgetrennt und aus diesem isoliert. Die radioaktive Markierung erfolgte mit dem „rediprime“-DNA Markierungs-Kit der Firma *Amersham* nach Herstellerangaben. Es wurden 50-100 ng cDNA-Fragmente mit Wasser in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zu einem Endvolumen von 45  $\mu$ l aufgefüllt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach kurzem Abkühlen bei RT wurde die Nukleinsäure-Lösung in ein vorpräpariertes 1,5 ml Reaktionsgefäß aus dem Kit überführt, mit 5  $\mu$ l [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP (10 mCi/ml) gemischt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1  $\mu$ l 0,5 M EDTA abgestoppt. Das Volumen wurde auf 100  $\mu$ l erhöht und nicht polymerisierte Nukleotide wurden durch Gelfiltration (*Sephadex G-50 Matrix*) abgetrennt. 1  $\mu$ l der Reaktion wurde abgenommen und im Szintillationsmeßgerät ohne Szintillationsflüssigkeit gemessen (*Cherenkow-cpm*).

### **$^{32}$ P-Markierung von RNA-Sonden für Northern-Blot-Analysen (verändert nach Melton *et al.*, 1984)**

Als radioaktiv markierte Ribo-Sonde wurde *antisense* RNA des gewünschten Gens verwendet. Diese wurde durch *In-vitro*-Transkription eines entsprechenden Genfragmentes von einem SP6-Bakteriophagen-Promotor in Gegenwart von [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-rCTP erhalten. Als Matrize dienten linearisierte Plasmide. In einer 20  $\mu$ l Reaktion wurden 8  $\mu$ l [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-rCTP (20 mCi/ml), 2  $\mu$ l Wasser, 4  $\mu$ l 5 x Transkriptions-Puffer (5 x Tsc-Puffer, *Promega*), 1  $\mu$ l 100 mM DTT, 1  $\mu$ l Matrizen-DNA (100-500 ng/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l 10 x rNTPs (je 5 mM rATP, rUTP, rGTP und 0,5 mM rCTP), 1  $\mu$ l RNase-Inhibitor (1 U/ $\mu$ l) und 1  $\mu$ l SP6 RNA-Polymerase (10 U/ $\mu$ l) gemischt und 45 min bei 40°C inkubiert. Zum Transkriptionsmix wurden 22  $\mu$ l Wasser, 6  $\mu$ l 5 x Transkriptions-Puffer und 2  $\mu$ l RQ1 DNase (1 U/ $\mu$ l) pipettiert und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1  $\mu$ l 0,5 M EDTA abgestoppt. Das Volumen wurde auf 100  $\mu$ l erhöht und nicht polymerisierte Ribonukleotide durch Gelfiltration (*Sephadex G-25 Matrix*) abgetrennt. 1  $\mu$ l der Markierungs-Reaktion wurde abgenommen und im Szintillationsmeßgerät ohne Szintillationsflüssigkeit gemessen (*Cherenkow-cpm*).

## 4. Protein-Methoden

### Präparation von Zytoplasma- und Kernextrakten (Stein *et al.*, 1989b)

Mit dieser Methode wurden Extrakte aus einer 9 bzw. 15 cm Petrischale ( $2,5-4 \times 10^6$  Zellen) für Gelretardationsanalysen präpariert. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,6 mM MgCl<sub>2</sub>; 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,6) gewaschen, mit einem Gummischaber abgeschabt und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis für 5 min in Zell-Lysispuffer (10 mM HEPES-KOH pH 7,9; 60 mM KCl; 1 mM EDTA; 0,5 % NP-40; 1 mM DTT; 1 mM PMSF) aufgebrochen. Die Zytoplasma-Extrakte wurden durch 5 min Zentrifugieren bei 1.000 x g von den Kernen getrennt, mit dem 1/2 Volumen an Kern-Puffer verdünnt und anschließend für 25 min bei 4°C und 13.000 x g klar zentrifugiert. Die Kerne wurden einmal vorsichtig mit Zell-Lysispuffer ohne NP 40 gewaschen und in 100 µl Kern-Puffer (250 mM Tris-pH 7,8; 60 mM KCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF) resuspendiert. Durch dreimaliges Frieren und Tauen in flüssigem Stickstoff/Eiswasser-Bad wurden die Kerne aufgebrochen. Die Kerntrümmer wurden durch 25 min Zentrifugation bei 4°C und 13.000 x g entfernt. DTT und PMSF wurden den Puffern frisch zugegeben. Die Proteinkonzentration der Extrakte wurde nach Lowry *et al.* (1951) bestimmt.

### Präparation von Zytoplasmaextrakten (modifiziert nach Koong *et al.*, 1994)

Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Zur vollständigen Entfernung des PBS wurden die Petrischalen leicht schräg gestellt und die Zellen anschließend direkt in IκBα-Lysismix (20 mM Tris pH 8,0; 137 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1 % Triton X-100; 10 % Glycerin; 50 mM NaF; 10 mM NaPPi; 10 µM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 50 µM ZnCl<sub>2</sub>; 20 mM β-Glycerophosphat; 1 mM PMSF; 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 10 µg/ml Leupeptin; 10 µg/ml Aprotinin) auf Eis lysiert. Die Zellysate wurden abgeschabt, in 1,5 ml Reaktionsgefäßen auf Eis gesamt und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Durch Triton X-100 wird die Zellmembran lysiert aber die Kernmembran bleibt intakt. Nach etwa 20 s starkem Schütteln (Vortexen) wurden die Kerne mit 13.000 x g bei 4°C für 25 min pelletiert. Die klaren Überstände wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration konnten die Extrakte für Western-Blot-Analysen und zur Immunpräzipitation eingesetzt werden.

## Nachweis von DNA-bindenden Proteinen durch Gelretardationsanalyse

### („Bandshift Analyse“)

Die *Bandshift*-Reaktionen wurden in einem Volumen von 20 µl je Probe durchgeführt. Dazu wurden 5 µg Kernextrakt mit 1 µg poly (dIdC), 2 µg BSA, 12 mM Hepes-KOH pH 7,9, 60 mM KCl, 62,5 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,6 mM EDTA, 6 % Glyzerin und 5 mM DTT für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 fmol <sup>32</sup>P-markiertes Oligonukleotid (~25.000 cpm) in 2 µl Wasser zugegeben und weitere 30 min bei RT inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend auf ein 14 x 15 cm großes 5 %iges Acrylamid-Gel (30 ml Gel-Lösung: 5 ml Acrylamid : Bisacrylamid [30 : 0,8]; 1,5 ml 5 x TBE; 23,5 ml Wasser; 25 µl TEMED; 250 µl APS) aufgetragen. Die Elektrophorese der Proben erfolgte mit 100 V in 0,25 x TBE für etwa zwei Stunden. Das Gel wurde dann mit 50 % Methanol und 10 % Essigsäure fixiert, auf ein *Whatman 3MM*-Papier aufgebracht, im Wasserstrahlvakuum getrocknet und gegen einen Röntgenfilm exponiert.

### Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry *et al.* (1951)

Zur Quantifizierung der Proteinproben wurden Eichlösungen bekannter Proteinkonzentration (0-60 µg) mit Serumalbumin (BSA) parallel angelegt. Zur Berücksichtigung des Proben-Puffers wurden 5 µl in jede Eichlösung gegeben. Je 5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung wurden auf 150 µl mit Lowry-1 (2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,1 N NaOH) aufgefüllt und dann mit 250 µl Lowry-IV (0,02 % NaK-Tartrat; 0,01 % CuSO<sub>4</sub> in Lowry-1) gemischt. Nach 10minütiger Inkubation bei RT wurden 30 µl 50 %iges Folin-Ciocalteus-Reagenz (mit Wasser verdünnt) zugegeben und für mindestens 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Je 200 µl des Reaktionsansatzes wurden dann in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion der Farbreaktion bei 660 nm im ELISA-Reader (*Multiskan PLUS MK II*) gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentrationen der Proben erfolgte anhand der Regressionsgeraden der Eichkurve.

### SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese analysiert (Laemmli *et al.*, 1970). Dabei wurden sie zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und in einem sich direkt anschließenden, höherprozentigen Trenngel ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Die Trenngel-Lösung (6-12 % Acrylamid; 0,16-0,32 % N,N'-Methylenbisacrylamid; 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % SDS; 0,1 % APS;

0,05 % TEMED) wurde nach vorsichtigem Mischen zwischen zwei, durch 0,75-1,5 mm dicke Abstandshalter voneinander getrennte Glasplatten gegossen und während des Polymerisationsvorganges in vertikaler Lage mit Ethanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Ethanol entfernt, mit Wasser gespült, die Sammelgel-Lösung (4 % Acrylamid; 0,1 % N,N'-Methylenbisacrylamid; 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 % SDS; 0,1 % APS; 0,1 % TEMED) direkt auf das Trenngel gegossen und der Kamm zur weiteren Polymerisation eingesetzt. Anschließend wurde das Gel in eine Vertikal-Elektrophorese-Kammer eingespannt und die Reservoirs mit Elektrophorese-Puffer (25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 0,1 % SDS pH 8,3) gefüllt. Die Proben wurden mit einfachem Volumen 2 x Probenpuffer (0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 2 % SDS; 20 % Glycerin; 0,02 % Bromphenolblau; 5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol) versetzt, zum Denaturieren 5 min auf 100°C erhitzt und nach Entfernen des Kammes in die Taschen des Gels transferiert. Die Elektrophorese erfolgte in der Regel bei einer Stromstärke von 30-40 mA. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die beiden Glasplatten voneinander getrennt, das Gel entweder direkt oder nach Anfärbung der Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blau getrocknet oder die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen (Western-Blot).

### **Übertragung von Proteinen auf PVDF-Membran und Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern ("Western-Blot")**

Damit die in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine durch Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern analysiert werden konnten, mußten sie zuvor auf eine geeignete Membran übertragen werden. Hierfür wurde eine PVDF Immobilon<sup>TM</sup>-P Transfermembran (Millipore) und eine Naßtransferkammer (Trans-Blot, BioRad) verwendet. Die PVDF-Membran wurde in Methanol aktiviert und auf zwei Lagen *Whatman 3MM*-Papier gelegt, die zuvor in Transfer-Puffer (25 mM Tris pH 8,3; 192 mM Glyzin; 20 % Methanol) getränkt worden waren, darauf wurde das SDS-Polyacrylamidgel gelegt und von zwei weiteren Lagen *Whatman 3MM*-Papier bedeckt. Diese Blotpackung wurde in die mit Transfer-Puffer gefüllte Blotzelle eingesetzt und die Elektroden so angelegt, daß die PVDF-Membran zum Pluspol der Spannungsquelle gerichtet war. Der Transfer erfolgte entweder über Nacht mit 250 mA oder für 4 h mit 500 mA im Kühlraum.

Nach erfolgtem Transfer wurde zum Schutz vor unspezifischen Bindungen von Antikörpern an die Membran mit 10 % Magermilch in PBS-Tween (PBST: PBS mit 0,16 % Tween-20) für 30 min unter ständigem Schwenken bei RT inkubiert. Für die Bindung des primären Antikörpers an das zu detektierende Protein wurde die Membran in eine Plastikfolie

eingeschweißt, welche eine geeignete Verdünnung des Antikörpers (meist 1 : 1.000) in 10 % Magermilch in PBST enthielt und für 2 h auf einer Wippe unter ständiger Bewegung bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal in einem großen Volumen an PBST für je 7 min gewaschen und mit einem gegen den primären Antikörper gerichteten Pferde-Peroxidase gekoppelten Antikörper (Verdünnung 1 : 3000) für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Zur fluorographische Detektion wurde die Membran dreimal in PBST für je 10 min gewaschen, mit einer ECL-Lösung (*Amersham*) laut Herstellerangaben für 1 min bedeckt und je nach Signalstärke für Sekunden oder Minuten gegen einen Röntgenfilm exponiert.

### **Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteingelen**

Proteine, die in SDS-PAGE aufgetrennt worden sind, wurden durch Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel für 30 min in Färbelösung (0,2 % Coomassie-Brilliant-Blau R250; 50 % Methanol; 7,5 % Essigsäure) bei RT geschwenkt. Die Entfärbung der Gele erfolgte in zwei Schritten bis die Proteinbanden gut sichtbar wurden. Im ersten Schritt wurde mit Entfärbelösung 1 (50 % Methanol; 10 % Essigsäure) für 30 min geschwenkt und danach für 30 min in Entfärbelösung 2 (5 % Methanol; 7 % Essigsäure). Anschließend wurde das Gel auf ein *Whatman 3MM*-Papier gelegt und im Wasserstrahlvakuum getrocknet.

### **Immunpräzipitation (IP) von Proteinen**

Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis in 0,5-0,8 ml Lysis-Puffer (siehe Präparation von Zytoplasmaextrakten und *In vivo* Markierung von Proteinen) lysiert. Nach 5minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben kurz gemischt (Vortexen) und die Kerne wurden durch Zentrifugation (15 min; 13.000 x g; 4°C) pelletiert. Die Immunpräzipitation erfolgte im „Batch-Verfahren“. Dazu wurden die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit Lysis-Puffer auf 800 µl aufgefüllt und in Gegenwart von 0,5 µg des entsprechenden Antikörpers für 1 h im Kühlraum gerollt. Danach wurde in Lysis-Puffer äquilibrierte Protein A-Sepharose (20 µl gepacktes Volumen) zugegeben und für 2 h bis über Nacht im Kühlraum gerollt. Die an die Sepharose gekoppelten Antigen-Antikörperkomplexe wurden durch kurzes Zentrifugieren (20 s bei 13.000 x g) pelletiert und dreimal mit je 0,5 ml eiskaltem Lysis-Puffer und einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurde die Sepharose mit Hilfe einer Kanüle trocken gesaugt und in 45 µl 2 x Probenpuffer (0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 2 % SDS; 20 % Glycerin; 0,02 % Bromphenolblau; 5 % β-

Mercaptoethanol) aufgenommen. Die Proben wurden vor der Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel je zweimal für 5 min aufgeköcht, kurz gemischt und abzentrifugiert.

### **Nachweis von IL-1 $\alpha$ im Kulturmedium mittels Immunpräzipitation**

Das Medium von unbehandelten oder UV-bestrahlten Zellen wurde auf Eis gesammelt und zur Entfernung von eventuellen Zellrückständen für 5 min bei 800 x g und 4°C im Schwingbecherrotor (*Heraeus* Omnifuge 2.0 RS) zentrifugiert. Die in PBS äquilibrierte Protein A-Sepharose wurde mit 0,1  $\mu$ g entsprechendem Antikörper pro ml eingesetztem Medium vorgekoppelt. Für jeden Ansatz wurden 25  $\mu$ l Protein A-Sepharose (gepacktes Volumen) eingesetzt. Zum Vorkoppeln wurden die Antikörper mit der Protein A-Sepharose in einem Volumen von 900  $\mu$ l PBS für 2 h im Kühlraum gerollt. Nach dreimaligem Waschen mit kaltem PBS wurde die Antikörper-gekoppelte Protein A-Sepharose direkt in das Medium gegeben. Das Medium wurde anschließend für 3 h im Kühlraum gerollt. Die Sepharose wurde danach pelletiert und zum dreimaligen Waschen mit eiskaltem PBS in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nach dem letzten Waschen wurde die Sepharose mit Hilfe einer Kanüle trocken gesaugt und in 45  $\mu$ l 2 x Probenpuffer (0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 2 % SDS; 20 % Glycerin; 0,02 % Bromphenolblau; 5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol) aufgenommen. Die Proben wurden vor der Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel je zweimal für 5 min aufgeköcht, kurz gemischt und abzentrifugiert.

### **TCA-Fällung von Proteinen**

Von den Zytoplasmaextrakten, die aus  $^{35}\text{S}$ -markierten Zellen präpariert worden waren, wurden 50  $\mu$ l in 0,5 ml BSA-Lösung (0,1 mg/ml) gegeben und nach Versetzen mit dem selben Volumen eiskalter 20 %iger TCA-Lösung kurz gevortext und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde auf einen GF/C-Filter gegeben. Die Filter wurden anschließend wie folgt gewaschen: dreimal mit je 5 ml 10 %iger TCA-Lösung, einmal mit 100 % Ethanol, einmal mit 100 % Methanol und danach an der Luft getrocknet. Die GF/C-Filter wurden in ein Meßröhrchen gegeben und die eingebaute Radioaktivität nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit im Szintillationsmeßgerät bestimmt.

### **Herstellung einer Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )-Stammlösung (Kypta *et al.*, 1988)**

Um die Dephosphorylierung von Proteinen zu verhindern wurde Natriumorthovanadat als Tyrosinphosphatase-Inhibitor mit einer Konzentration von 1-5 mM bei der Präparation und weiteren Behandlung von Proteinextrakten eingesetzt. Zur Herstellung einer Stammlösung

wurden 183 mg  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  eingewogen und in 10 ml Wasser unter ständigem Rühren (~20 min) gelöst. Nach Zugabe von etwa 150  $\mu\text{l}$   $\text{HCl}_{\text{konz.}}$  (37 %) zeigte sich ein Farbumschlag nach gelb. Die Lösung wurde anschließend gekocht bis sie farblos war und der pH-Wert wurde überprüft. Lag dieser nicht bei 10,0 wurde die Einstellung mit HCl nochmals wiederholt. Die Lösung ist bei +4°C etwa 2 Wochen verwendbar.

### **Herstellung von Pervanadat-Lösung (Imbert *et al.* 1996)**

Natriumorthovanadat wird durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Pervanadat umgewandelt. Zur Herstellung wurde 0,1 M Vanadat-Lösung in Inkubations-Puffer (30 mM HEPES pH 7,4; 150 mM NaCl; 4 mM KCl; 0,8 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1,8 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 10 mM Glukose) mit 30 %-igem  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei RT für 15-20 min inkubiert. Zur Entfernung von überschüssigem  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde Katalase in gleichem Volumen Inkubations-Puffer zu einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  zugegeben. Die Konzentration der pV-Lösung richtete sich nach der eingesetzten Konzentration an Orthovanadat, in diesem Falle war sie 50 mM. Die Lösung wurde jeweils frisch angesetzt.

## **5. Zellkultur**

Alle Zellen wurden bei 6 %  $\text{CO}_2$ , 95 % Luftfeuchte und 37°C in einem Brutschrank (*Labotect*, Göttingen) kultiviert. Sämtliche Manipulationen an den Zellen erfolgten an einer Sterilbank. Medien, Puffer und Glaswaren wurden vor Gebrauch sterilisiert (120°C; 1,4 bar; 20 min).

HeLa tk<sup>-</sup>-Zellen wurden in *Dulbeccos Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 8 % fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Primäre Fibroblasten (NFB, XPA) wurden in DMEM mit 10 % bzw. 20 % FCS kultiviert. Jurkat T-Zellen wurden in RPMI mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Alle Kulturmedien enthielten 1 % PS-Lösung (10.000 U/ml Penicillin; 10.000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin).

### **Umsetzen von Zellen**

Die Zellen wurden einmal mit warmem PBS gewaschen und für einige Minuten mit Trypsin-Lösung (0,25 %) im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Kulturmedium resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung auf frische Zellkulturflaschen oder -schalen verteilt. Sollten die Zellen für ein Experiment eingesät werden wurden diese nach dem Trypsinieren bei 310 x g (*Haraeus* Omnifuge) für 3 min pelettiert und in frischem Medium aufgenommen, um restliches Trypsin zu entfernen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Zählkammer nach *Neubauer* verwendet.

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

Die Zellen wurden aus einer logarithmisch wachsenden Population eingefroren. Dazu wurden sie abtrypsiniert, abzentrifugiert (310 x g, 3 min) und in eiskaltem Einfriermedium (DMEM mit 20 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert, so daß die Zellzahl 2-5 x 10<sup>6</sup>/ml betrug. Je 1,5 ml wurden in ein Einfrierrohrchen (*Wheaton Scientific*, Millville, USA) abgefüllt und zum Abkühlen 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen langsam auf -80°C (möglichst 1°C/min) abgekühlt und am nächsten Tag zur Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte schnell bei 37°C im Wasserbad. Zur Entfernung des DMSO wurden die Zellen in 9 ml Kulturmedium aufgenommen, abzentrifugiert (310 x g für 3 min) und mit frischem Kulturmedium auf Zellkulturgefäße in geeigneter Verdünnung verteilt.

### **Behandlung von Zellen mit Induktoren**

Für die Bestrahlung mit UV-Licht wurden die Zellen einmal mit warmem PBS gewaschen, gut abgesaugt und von oben mit der entsprechenden UV-Leuchte (*Vetter*, Wiesloch) bestrahlt. Das ursprüngliche Medium wurde sofort auf die Zellen zurückgegeben und diese bis zur Ernte bei 37°C und 6 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Kontrollzellen wurden, abgesehen von der Bestrahlung, in gleicher Weise behandelt.

Zur Behandlung von Zellen mit Actinomycin D (Act. D), Anisomycin (Am), Cycloheximid (CHX), 5,6 Dichloro-1-β-D-Ribofuranosylbenzimidazol (DRB), Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Interleukin 1α (IL-1α), Puromycin (Pm), Tumornekrosefaktor α (TNFα) und 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA) wurden diese Substanzen direkt aus konzentrierten Stammlösungen ins Medium pipettiert, anschließend wurden die Zellen für die entsprechenden Inkubationszeiten bei 37°C und 6 % CO<sub>2</sub> gehalten.

### **Transfektion von Zellen mit DEAE-Dextran (Kawai u. Nishizana, 1987)**

Die DEAE-Dextran-Methode wurde hauptsächlich für die transiente Transfektion von HeLa tk<sup>-</sup>-Zellen verwendet. Die Zellen wurden etwa 20 h zuvor aus einer logarithmisch wachsenden Zell-Population mit einer Dichte von 1 x 10<sup>6</sup>-Zellen in eine 9 cm Petrischale eingesät. Der Transfektionsmix bestand aus 2-10 µg/ml Plasmid-DNA in 1 x TBS (137 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl pH 7,4; 5 mM KCl; 0,7 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) und 0,5 µg/ml DEAE-Dextran. Zur Transfektion wurden die Zellen mit etwa 10 ml warmem PBS gewaschen. Zur vollständigen Entfernung des PBS wurden die Petrischalen leicht schräg gestellt. Von dem Transfektionsmix wurde 1 ml auf die Zellen gegeben und diese für 30 min

bei RT unter gelegentlichem Schwenken der Petrischale inkubiert. Danach wurden 9 ml vorgewärmtes Kulturmedium zugegeben und durch Schwenken der Schale gemischt. Nach 4-6 Stunden Inkubation im Brutschrank (37°C und 6 % CO<sub>2</sub>) wurde der Transfektionsmix abgesaugt, einmal mit warmem PBS gewaschen und frisches Kulturmedium auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 16-40 h (je nach Versuchsbedingungen) wurden die Zellen induziert.

### **Transfektion von Zellen mit Lipofectamine**

Die Transfektion mit Lipofectamine<sup>TM</sup> Reagents (*GIBCO BRL*) wurde bevorzugt für primäre Fibroblasten verwendet. Zellen aus einer logarithmisch wachsenden Population wurden in 9 cm Petrischalen eingesät und zu einer Konfluenz von 50-80 % wachsen gelassen. Folgende Lösungen wurden in 15 ml Polystyrene-Röhrchen (*Greiner*) angesetzt. Lösung A enthielt 2-10 µg zu transfizierende Plasmid-DNA in 250 µl serumfreiem Kulturmedium. Lösung B enthielt 12,5 µl Lipofectamine<sup>TM</sup> Reagents in 250 µl serumfreiem Kulturmedium. Die beiden Lösungen wurden vorsichtig gemischt und für 30 min bei RT inkubiert, damit sich die DNA-Liposomen-Komplexe bilden konnten. Anschließend wurden die Ansätze mit 4 ml serumfreiem Medium verdünnt, auf die zuvor zweimal mit serumfreiem Medium gewaschenen Zellen gegeben und für 6-7 h im Brutschrank (37°C und 6 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Danach wurde mit warmem serumfreiem Medium einmal gewaschen und frisches Medium mit Serum zugegeben. Die Zellen wurden 16-24 h nach Mediumwechsel induziert.

### **In vivo Markierung von Proteinen mit L-[<sup>35</sup>S]-Cystein und L-[<sup>35</sup>S]-Methionin**

Die radioaktive Markierung von zellulären Proteinen erfolgte durch den Einbau von <sup>35</sup>S-markiertem L-Cystein und L-Methionin und wurde im Isotopenlabor des Institutes durchgeführt. Hierfür wurden HeLa tk<sup>-</sup>-Zellen 24 h zuvor mit einer Dichte von 0,8-2 x 10<sup>6</sup> in eine 5 cm oder 9 cm Petrischale eingesät. Da die Neusynthese von Proteinen gemessen werden sollte wurden die Zellen nicht gehungert, sondern unmittelbar vor Behandlung 2 x mit 3 ml warmem Methionin-freiem Medium (RPMI) gewaschen. Anschließend wurden 1,3 ml Markierungsmedium (Methionin-freies RPMI mit 1 x L-Leucin; 1 x L-Lysin; 2 mM L-Glutamin; 5 % dialysiertes FCS; 307 µCi/ml L-[<sup>35</sup>S]-Cystein und L-[<sup>35</sup>S]-Methionin) auf die Zellen gegeben und diese bei 37°C und 6 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Um flüchtige, radioaktive Abbauprodukte des Methionins binden zu können wurden mit Aktivkohle gefüllte Petrischalen in den Brutschrank gestellt. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Petrischalen auf Eis gestellt, das Markierungsmedium vorsichtig abgenommen, 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen und die Zellen sofort in 800 µl Triton-Puffer (30 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,5 % Triton X-100; 0,5 % NaDOC; 1 mM PMSF; 10 µg/ml

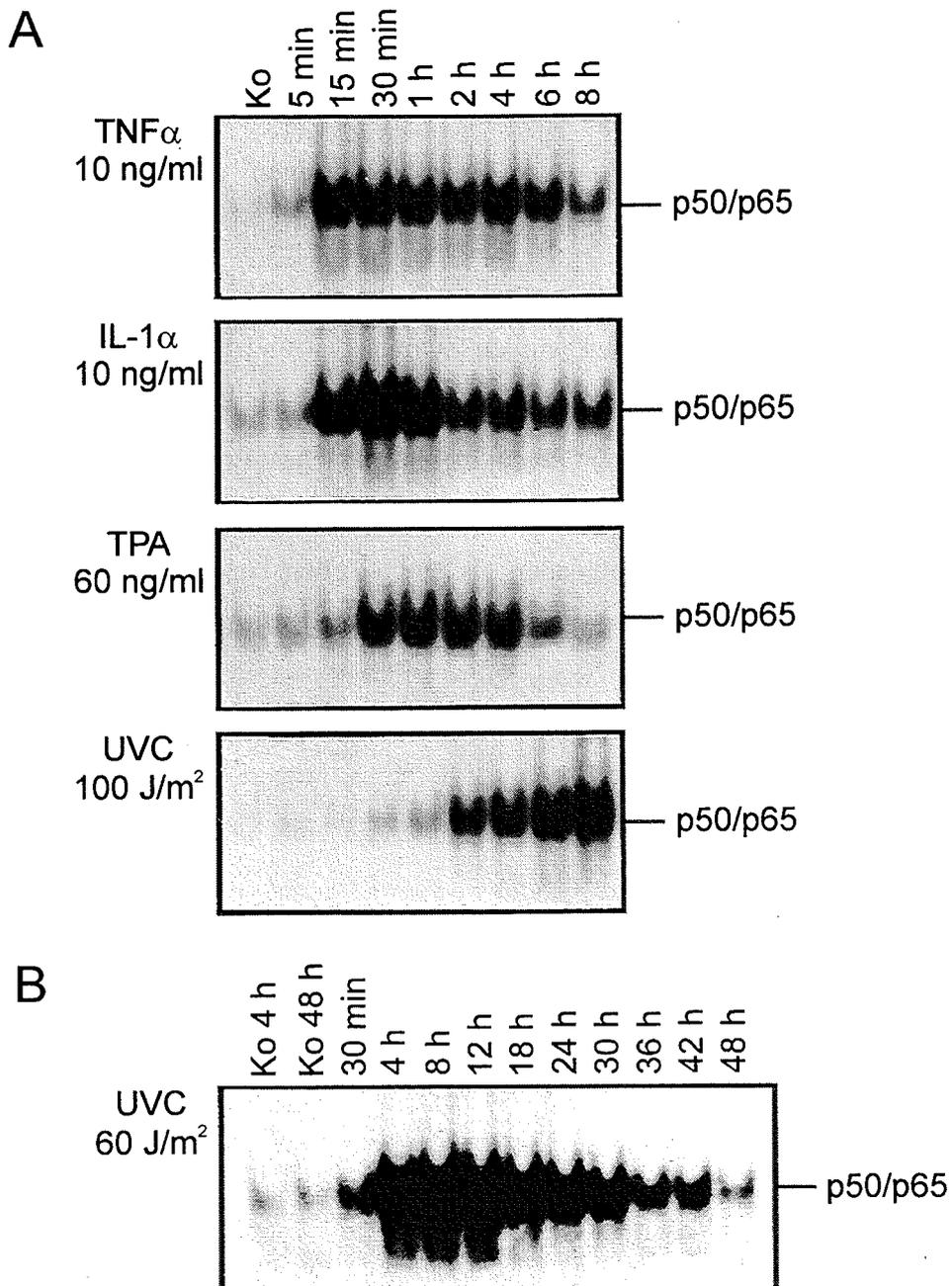
Leupeptin; 10 µg/ml Aprotinin) lysiert. Die Lysate wurden abgeschabt, mehrmals Hoch- und Runterpipettiert (Gilson mit Blauer Spitze) und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Die Kerne wurden für 15 min bei 13.000 x g und 4°C pelletiert, der zytoplasmatische Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Immunpräzipitation eingesetzt. Die präzipitierten Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel geeigneter Prozentigkeit aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Um die Proteine an die Membran zu fixieren wurde diese nach dem Transfer kurz in Methanol gelegt und anschließend getrocknet. Zur Detektion der radioaktiv markierten Proteine wurde die PVDF-Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert.

## Ergebnisse

### Unterschiedliche Kinetiken bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B

Viele physiologische und unphysiologische Agenzien führen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Im folgenden werden die Induktionskinetiken einiger dieser Induktoren verglichen. HeLa-Zellen wurden mit TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  bzw. TPA behandelt oder mit UVC bestrahlt. Zu entsprechenden Zeiten wurden Zytoplasma- und Kernextrakte präpariert. Die Kernextrakte wurden, mit Hilfe von Gelretardationsanalysen, auf die DNA-Bindeaktivität von NF- $\kappa$ B an ein radioaktiv markiertes Oligonukleotid, welches zwei NF- $\kappa$ B Bindestellen aus dem HIV Promotor enthält, untersucht. Die gezeigten Protein-Komplexe (Abb. 5) entsprechen, in HeLa tk<sup>-</sup>-Zellen (im folgenden als HeLa-Zellen bezeichnet), den p50/p65-Heterodimeren des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Stein *et al.*, 1989b).

Im Gegensatz zu der schnellen NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch viele der bisher getesteten Induktoren, erfolgt die UV-vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung verzögert. Während TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  und Phorbolster schon innerhalb von 5 bis 30 Minuten zu einer induzierten Translokation von NF- $\kappa$ B in den Kern und der Bindung dieses Transkriptionsfaktors an seine Erkennungssequenzen in der DNA führen (Abb. 5A), erkennt man nach der Bestrahlung mit 100 J/m<sup>2</sup> UVC eine Aktivierung erst nach etwa 1-2 Stunden. Sie erreicht ein Maximum nach etwa acht Stunden (Abb. 5A) und bleibt, je nach verwendeter UVC-Dosis, bis über 42 Stunden erhalten (Abb. 5B).



**Abb. 5: Kinetiken der induzierten DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B**

**A.** HeLa-Zellen wurden mit TNF $\alpha$  (10 ng/ml), IL-1 $\alpha$  (10 ng/ml) und TPA (60 ng/ml) behandelt oder mit UVC (100 J/m $^2$ ) bestrahlt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Kernextrakte präpariert (Stein *et al.*, 1989b) und die DNA-Bindefähigkeit von NF- $\kappa$ B in „bandshift“ Analysen bestimmt. Dazu wurden je 5  $\mu$ g der Extrakte mit  $^{32}$ P-markierten ds HIV-1 Oligonukleotiden inkubiert und auf einem nativen 5% Acrylamidgel aufgetrennt. Die Abbildungen zeigen die Ausschnitte der Autoradiogramme mit den DNA-Protein-Komplexen.

**B.** HeLa-Zellen wurden mit 60 J/m $^2$  UVC bestrahlt. Zu angegebenen Zeiten wurden Kernextrakte hergestellt und, wie in A beschrieben, auf ihre NF- $\kappa$ B DNA-Bindeaktivität untersucht.

## Zwei unterschiedliche Mechanismen der NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach UV-Bestrahlung

Die Anschaltung von Signalketten, die in der UV-induzierten Aktivierung vieler Gene endet, kann ihren Ursprung in der Plasmamembran haben (Devary *et al.*, 1993; Sachsenmaier *et al.*, 1994; Schieven *et al.*, 1994; Warmuth *et al.*, 1994; Coffey *et al.*, 1995; Knebel *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1996; Rosette und Karin, 1996). Dies gilt offensichtlich auch für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, der durch UVC- bzw. UVB-Strahlung auch in Zellen ohne Zellkern (sog. Zytoplasten) oder sogar zellfrei aktiviert werden kann (Devary *et al.*, 1993; Simon *et al.*, 1994). Dem widersprechen Untersuchungen, in denen eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B nach UV-Bestrahlung nur über einen DNA-Schaden-abhängigen Vorgang zu erklären ist.

Ein gutes Modellsystem zur Untersuchung zellulärer Prozesse, die durch DNA-Schädigung reguliert werden, stellen mutierte Zellen dar, die Defekte in der DNA-Schadenreparatur aufweisen. So wurde in Zellen, die keine UV-induzierten DNA-Schäden reparieren können, eine viel geringere UV-Dosis für eine maximale Aktivierung eines NF- $\kappa$ B-abhängigen CAT-Reporters benötigt als in vergleichbaren Wildtyp-Zellen (Stein *et al.*, 1989b). Zusätzlich konnte diese UV-vermittelte NF- $\kappa$ B-CAT-Aktivierung durch Einschleusen eines DNA-Reparaturenzyms, der T4 Endonuklease 5, in die Zelle gehemmt werden (Yarosh *et al.*, 1993; Yarosh and Kripke, 1996).

Diese beiden Wege schließen sich nicht gegenseitig aus, weil sie in unterschiedlichen experimentellen Systemen analysiert wurden. Insbesondere zeigt der Vergleich der bisher publizierten Untersuchungen, daß dabei unterschiedliche Zeitpunkte betrachtet wurden. Alle Untersuchungen, die gegen eine Beteiligung von DNA-Schäden sprechen, wurden in einem kurzen Zeitraum von bis zu fünf Stunden nach der Bestrahlung durchgeführt. Dagegen wurden Untersuchungen, die für eine Beteiligung der DNA-Schäden sprechen, zu viel späteren Zeiten (24-42 h) gemacht. Ist eventuell der unterschiedlich gewählte Zeitpunkt der Untersuchungen zur UV-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung eine Erklärung für die verschiedenen Resultate und deren Interpretation?

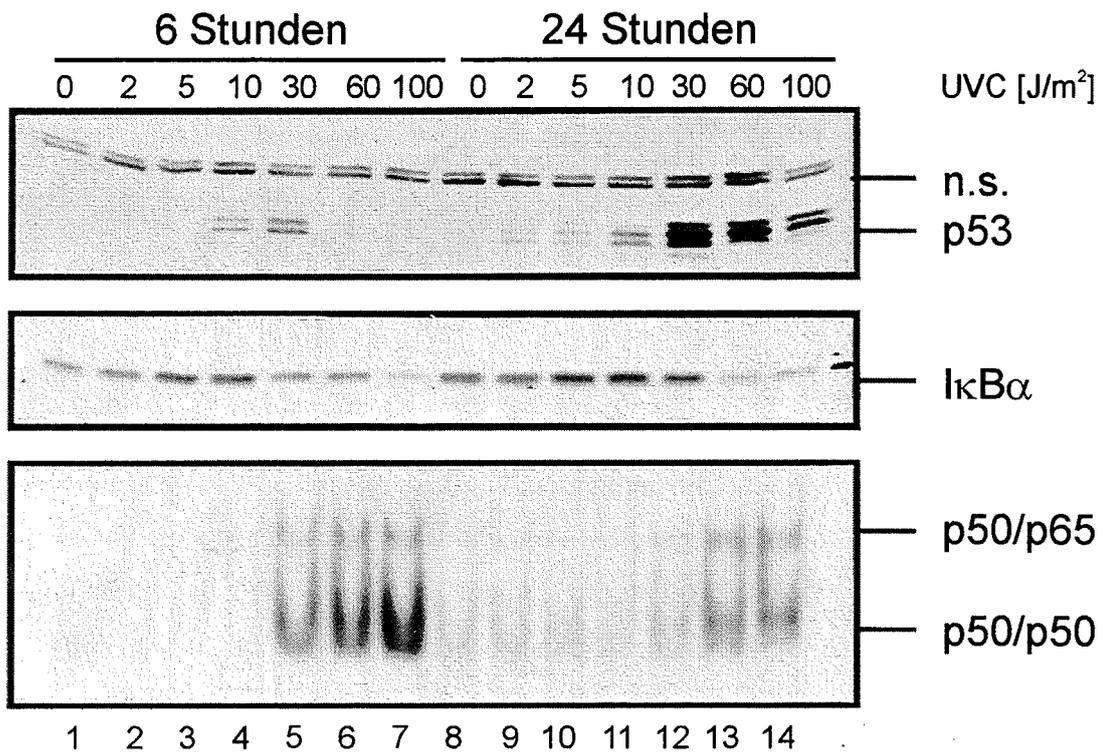
Für die folgenden Experimente wurden primäre Fibroblasten verwendet, die entweder aus gesunden Spendern (Wildtyp-Zellen = Normal-Fibroblasten) oder aus Spendern, die an

*Xeroderma Pigmentosum* (XP, Komplementationsgruppe A) leiden, isoliert worden waren. Die XPA-Fibroblasten können keine UV-induzierten DNA-Schäden reparieren.

Die Fibroblasten wurden mit unterschiedlichen UVC-Dosen ( $5-100 \text{ J/m}^2$ ) bestrahlt. Sechs und 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden Zytoplasma- und Kernextrakte präpariert. Mit Hilfe der Gelretardationsanalyse wurde die NF- $\kappa$ B DNA-Bindeaktivität bestimmt. Parallel wurde in Western-Blot-Analysen die zelluläre Menge des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins in den Zytoplasmaextrakten bestimmt. Die NF- $\kappa$ B DNA-Bindeaktivität war sechs Stunden nach der Bestrahlung, ab einer UVC-Dosis von  $30 \text{ J/m}^2$ , induziert. Dabei waren keine Unterschiede in der Dosisabhängigkeit der aktivierten DNA-Bindung zwischen Wildtyp-Fibroblasten und den reparaturdefizienten XPA-Fibroblasten zu erkennen (Abb. 6A und B, jeweils unteres Gel, Bahn 1-7). Parallel zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B fand der Abbau des Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$  statt (Abb. 6, vergleiche die mittleren Teile von A und B, Bahn 1-7). Nach 24 Stunden war in den Wildtyp-Fibroblasten die NF- $\kappa$ B-Aktivierung noch nachweisbar, jedoch deutlich abgeschwächt gegenüber dem sechs Stunden-Wert (Abb. 6A, unteres Gel, Bahn 8-14). Im Gegensatz dazu war die UV-vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B in den reparaturdefizienten XPA-Fibroblasten 24 Stunden nach der Bestrahlung schon bei einer Dosis von  $5 \text{ J/m}^2$  zu erkennen (Abb. 6B, unteres Gel, Bahn 8-14). Die Beobachtung, daß in Wildtyp-Fibroblasten die Bestrahlung mit  $30 \text{ J/m}^2$  UVC zu einer deutlichen frühen NF- $\kappa$ B-Aktivierung führt, dieselbe UV-Dosis aber nur eine schwache Aktivierung 24 Stunden nach der Bestrahlung bewirkt, läßt vermuten, daß der UV-induzierte DNA-Schaden zu späteren Zeiten, aufgrund von stattgefundenener Reparatur, stark reduziert ist und unmittelbar mit der Abnahme der NF- $\kappa$ B-Aktivierung korreliert. Der Abbau des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins entsprach in jedem Fall der Aktivierung der DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B (Abb. 6, vergleiche die mittleren Teile von A und B, Bahn 8-14).

Der entscheidende Unterschied zwischen den beiden untersuchten Zellen ist die Reparaturdefizienz der XPA-Fibroblasten in Bezug auf UV-induzierte DNA-Schäden. Die Höhe der UV-Dosis, die für eine frühe Aktivierung von NF- $\kappa$ B notwendig ist, unterscheidet sich zwischen den beiden Zelllinien nicht. Jedoch erfolgt die späte Aktivierung von NF- $\kappa$ B in den reparaturdefizienten Zellen bei deutlich niedrigeren UV-Dosen als in den Wildtyp-Zellen. Die späte NF- $\kappa$ B-Aktivierung muß daher von dem nicht-reparierten DNA-Schaden abhängig sein, wohingegen die frühe Aktivierung von einem DNA-Schaden unabhängig ist. Dies deutet darauf hin, daß die Aktivierung von NF- $\kappa$ B nach UV-Bestrahlung durch zwei unterschiedliche Mechanismen bewirkt wird.

## A Wildtyp-Fibroblasten



## B XPA-Fibroblasten

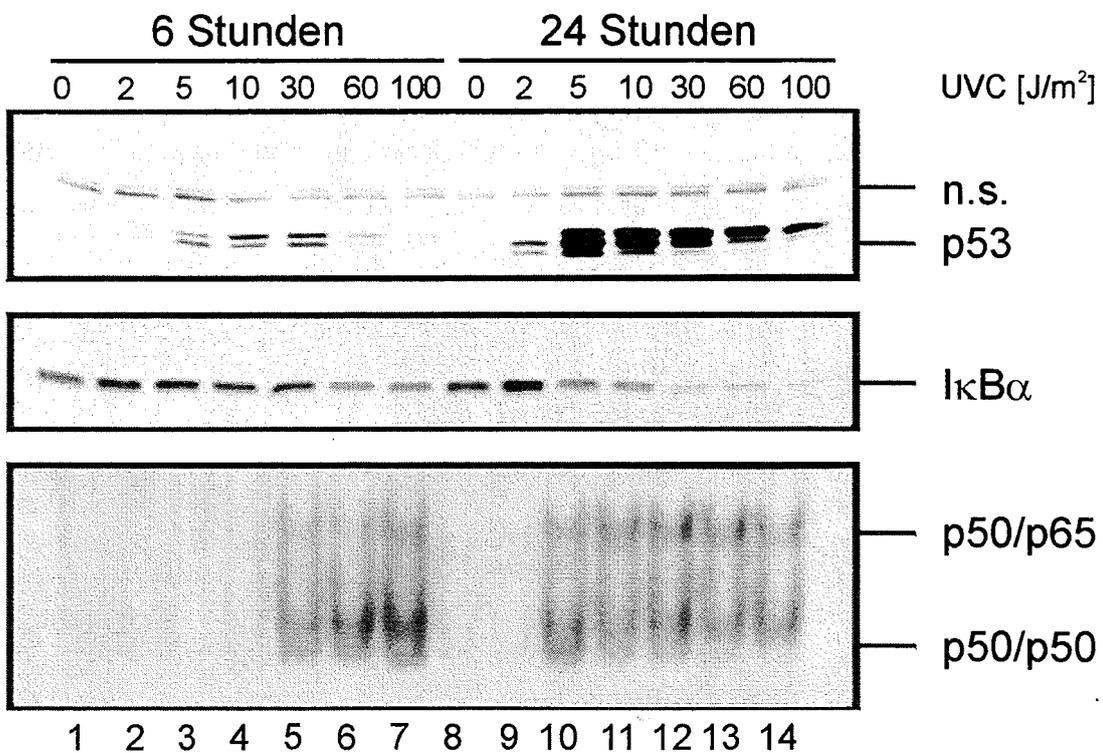


Abb. 6: Erhöhte Empfindlichkeit DNA-Reparatur-defizienter Fibroblasten für die späte NF-κB-Aktivierung durch UV-Strahlung

**A.** Wildtyp-Fibroblasten wurden mit steigenden UVC-Dosen bestrahlt. Sechs Stunden bzw. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden Zytoplasma- und Kernextrakte hergestellt. Für die Gelretardationsanalysen wurden jeweils 5 µg Kernextrakt mit <sup>32</sup>P-markierten HIV-1 Oligonukleotiden inkubiert und auf einem nativen Acrylamidgel aufgetrennt (der untere Teil der Abbildung zeigt den Ausschnitt der Autoradiogramme mit den DNA-Protein-Komplexen). Die zellulären Mengen von IκBα (mittlerer Teil der Abb.) und von p53 (oberer Teil der Abb.) wurden durch die Western-Blot-Analyse von 30 µg Zytoplasmaextrakt (IκBα) bzw. 35 µg Kernextrakt (p53) mittels spezifischer Antikörper gegen die menschlichen Proteine nachgewiesen.

**B.** Das Experiment wurde genau wie in A beschrieben durchgeführt, nur wurden XPA-Fibroblasten eingesetzt.

Um zu zeigen, daß sechs Stunden nach UV-Bestrahlung ein ausreichender Unterschied in der Menge UV-induzierter DNA-Schäden zwischen reparaturdefizienten und reparaturfähigen Zellen besteht, um einen DNA-Schaden-abhängigen zellulären Prozess auszulösen, wurde die DNA-Schaden-abhängige Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins p53 untersucht. Dieses Protein unterliegt einem sehr schnellen Proteinumsatz. Es wird jedoch nach der Behandlung von Zellen mit DNA-schädigenden Agenzien, wie z.B. UV-Strahlung oder 4-Nitroquinolinoxid (4-NQO), stabilisiert und akkumuliert dadurch in den Zellen (Maltzman und Czyzyk, 1984). Die UV-abhängige Stabilisierung von p53 kann schon sechs Stunden nach UV-Bestrahlung gut nachwiesen werden und hängt von UV-induzierter DNA-Schädigung ab (Yamaizumi und Sugano, 1994).

Dieselben Kernextrakte, die für die obigen Gelretardationsanalysen verwendet wurden, wurden daher mittels Western-Blot-Analyse auf die Stabilisierung des p53-Proteins untersucht. In Extrakten aus XPA-Fibroblasten war eine p53-Anreicherung nach sechs Stunden bei einer Bestrahlung mit 5 J/m<sup>2</sup> deutlich zu erkennen und nach 24 Stunden schon bei einer Bestrahlung mit 2 J/m<sup>2</sup> UVC. Im Gegensatz dazu erreichte die p53-Anhäufung in Wildtyp-Fibroblasten sowohl sechs Stunden als auch 24 Stunden nach der Bestrahlung erst bei einer UV-Dosis von 30 J/m<sup>2</sup> einen maximalen Wert (Abb. 6A und B jeweils oberes Gel). In dem hier verwendeten Modellsystem ist somit ein DNA-Schaden-abhängiger Vorgang zu beiden betrachteten Zeitpunkten nachweisbar.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollten die beiden Mechanismen der UV-induzierten NF-κB-Aktivierung getrennt voneinander untersucht und charakterisiert werden.

## **Wie ist die frühe DNA-Schaden-unabhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu erklären?**

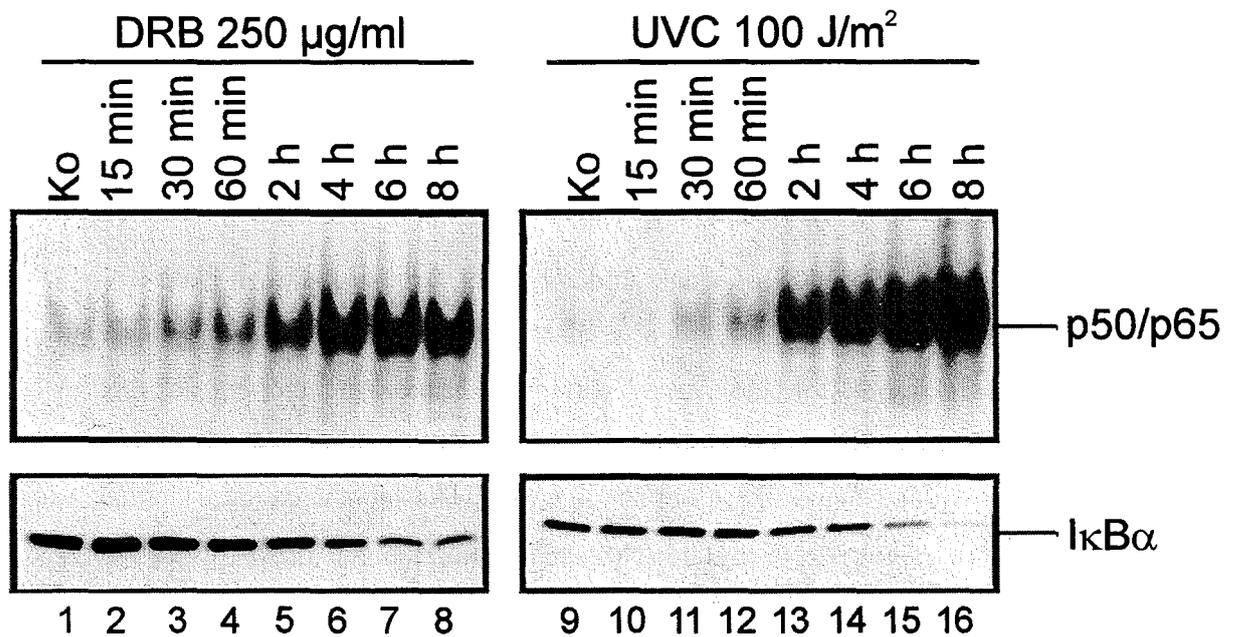
Die NF- $\kappa$ B-Aktivierung erfolgt in den meisten Fällen durch den induzierten Abbau des inhibitorischen I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins. Dieses ist ein sehr kurzlebiges Protein. Wenn I $\kappa$ B $\alpha$  frei in der Zelle vorliegt, hat es eine Halbwertszeit von etwa 40 Minuten (Scott *et al.*, 1993; Miyamoto *et al.* 1994). Im Gegensatz dazu haben I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteine, die im Komplex mit Rel/NF- $\kappa$ B Proteinen gebunden sind, in der selben Zelle eine deutlich höhere Lebensdauer von mehr als vier bis fünf Stunden (Sun *et al.*, 1993; Miyamoto *et al.*, 1994). Ebenso wie das freie I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein, ist auch dessen mRNA sehr kurzlebig (Haskill *et al.*, 1991). Der Abbau des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins erfolgt meist durch induzierte Phosphorylierung und anschließende Ubiquitin-abhängige proteolytische Spaltung. In den folgenden Experimenten sollte aufgeklärt werden, wie die frühe UV-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung reguliert ist.

Dazu wurde der Einfluß von UV-Strahlung auf die Transkription bzw. Translation von I $\kappa$ B $\alpha$  untersucht. Es wurde überprüft, ob eine Phosphorylierung des Proteins erfolgt und welche Domänen des Proteins eine wichtige Rolle für den UV-induzierten Abbau spielen.

### **Die Hemmung der Transkription in UV-bestrahlten Zellen ist nicht für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B verantwortlich**

Neben der Schädigung der Erbsubstanz und zellulärer Proteine, können auch RNA-Moleküle durch UV-Strahlung geschädigt werden, so daß es zu einer Dosis-abhängigen Hemmung der Proteinsynthese kommt (Iordanov, pers. Mitteilung). Eine Verringerung der mRNA-Menge, z.B. durch Hemmung der Transkription, führt zu einem schnellen Verschwinden kurzlebiger Proteine, da die zur Nachsynthese notwendigen mRNAs fehlen. Es wäre demnach denkbar, daß eine Verringerung der zellulären Menge an kurzlebiger I $\kappa$ B $\alpha$ -mRNA, infolge einer Hemmung der Transkription durch UVC-Bestrahlung, zu einer Verarmung an I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinen führt. Diese Verarmung hätte die Freisetzung von NF- $\kappa$ B, den Transport in den Kern und die DNA-Bindung zur Folge. Ein ähnliches Ergebnis entstünde durch UV-induzierte generelle Hemmung der Proteinsynthese und damit der Translation von I $\kappa$ B $\alpha$ . Dies würde ebenfalls die Menge an freien NF- $\kappa$ B-Komplexen (p50/p65) erhöhen und damit eine indirekte NF- $\kappa$ B-Aktivierung bewirken. Falls UV-Strahlung NF- $\kappa$ B auf diesem Weg aktiviert, sollte dies auch mit Inhibitoren der Transkription oder Translation imitierbar sein.

Hierzu wurden die Zeitabhängigkeit und das Ausmaß des proteolytischen Abbaus von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  und die dadurch bewirkte Aktivierung von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , nach der Behandlung mit dem Transkriptions-Inhibitor 5,6 Dichlor-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB), mit den Auswirkungen der Bestrahlung mit UVC verglichen. Die Aktivierung von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  wurde mittels Gelretardationsanalyse von DRB-behandelten und UVC-bestrahlten HeLa-Zellen bestimmt. Eine schwache DNA-Bindung von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  war schon nach 30 Minuten erkennbar und stieg bis zu acht Stunden deutlich an (Abb. 7, oben, Bahn 3-8 und Bahn 11-16). Die Menge an zellulärem  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  wurde parallel dazu in Western-Blot-Analysen bestimmt. Ein induzierter Abbau von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  war sowohl nach der DRB-Behandlung als auch nach UV-Bestrahlung erst zwei Stunden nach der Behandlung nachweisbar und wurde zu späteren Zeiten deutlicher (Abb. 7, unten). Die gegenüber des  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Abbaus scheinbar früher induzierte  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Bindeaktivität beruht auf der höheren Sensitivität der Gelretardationsanalyse. Die Aktivierung von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  durch DRB und UV-Bestrahlung zeigte somit die gleichen Induktionskinetiken.



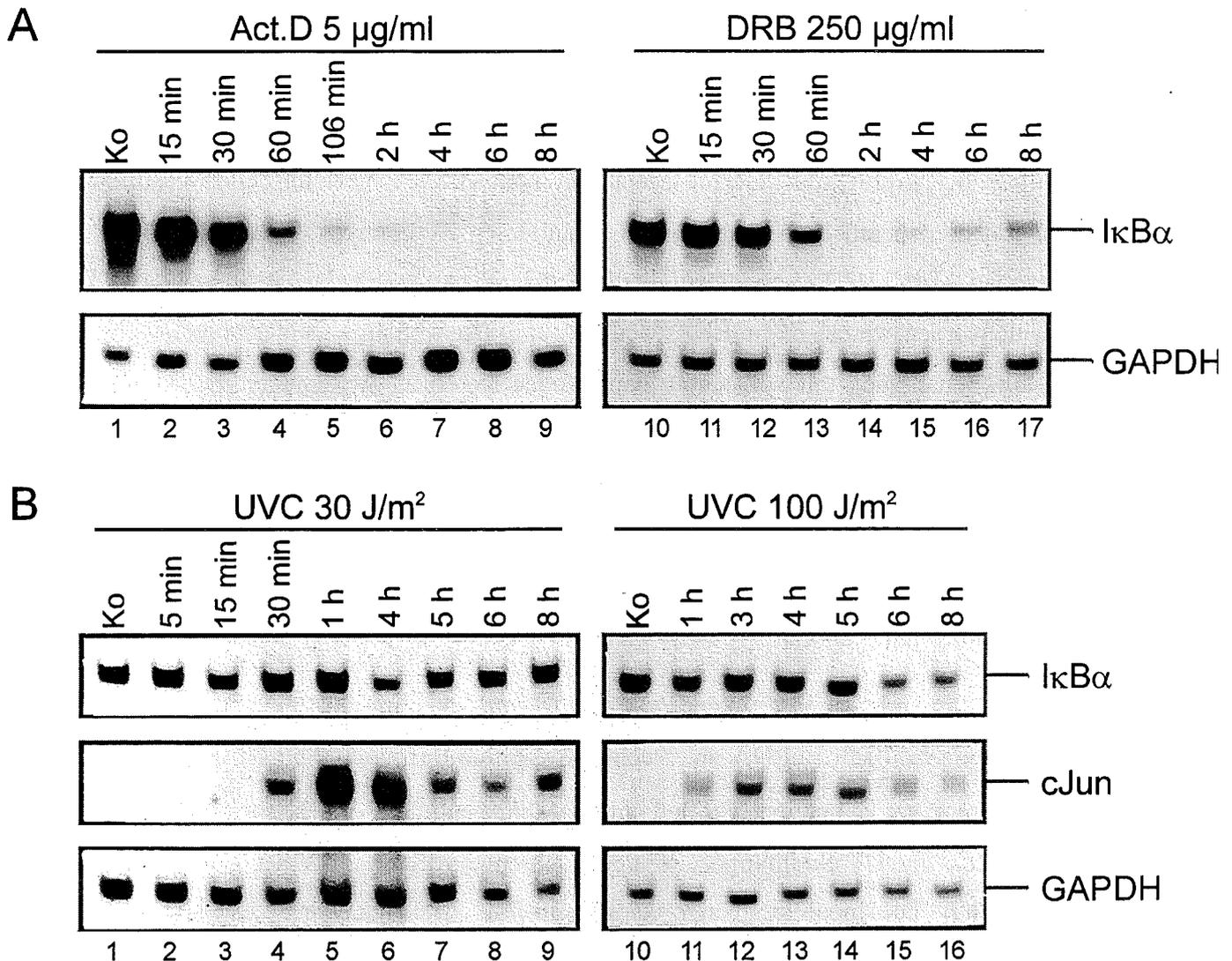
**Abb. 7: DRB und UVC zeigen ähnliche Kinetiken für den Abbau von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  und die Aktivierung von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$**

HeLa Zellen wurden mit 250  $\mu\text{g/ml}$  5,6 Dichlor-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB) behandelt oder mit 100  $\text{J/m}^2$  UVC bestrahlt. Zu den angegebenen Zeiten wurden Zytoplasma- und Kernextrakte gewonnen. Je 5  $\mu\text{g}$  Kernextrakt wurde mit radioaktiv markierten HIV-1 Oligonukleotiden inkubiert und auf einem nativen Acrylamidgel aufgetrennt (die oberen Teile der Abbildungen zeigen die Ausschnitte der Autoradiogramme mit den DNA-Proteinkomplexen). Die zellulären Mengen an  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  wurden durch Western-Blot-Analyse von 40  $\mu\text{g}$  Zytoplasmaextrakt mittels spezifischen Antikörpern, gegen menschliches  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , bestimmt (untere Teile der Abbildungen).

Da Inhibitoren der Transkription und Bestrahlung mit UVC nahezu gleiche Zeitabhängigkeiten für die Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  zeigten, stellte sich die Frage, ob die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch beide Agenzien nur durch die Abnahme der kurzlebigen I $\kappa$ B $\alpha$ -mRNA, infolge der Transkriptionshemmung, zu erklären ist.

Um dies zu überprüfen, wurde die Menge an I $\kappa$ B $\alpha$ -mRNA in HeLa-Zellen bestimmt, die zuvor mit den spezifischen Transkriptions-Inhibitoren Actinomycin D oder DRB behandelt (Mittleman *et al.*, 1983; Zandomeni *et al.*, 1983; Yankulov *et al.*, 1995) bzw. mit UVC bestrahlt worden waren. Die mRNA-Mengen für I $\kappa$ B $\alpha$  wurden zu unterschiedlichen Zeiten nach der Behandlung mit vollständig hemmenden Dosen an Actinomycin D (5  $\mu$ g/ $\mu$ l) oder DRB (250  $\mu$ g/ $\mu$ l) aus HeLa-Zellen isoliert und mittels Northern-Blot-Analysen bestimmt. Die Behandlung mit den Transkriptions-Inhibitoren führte zu einer Abnahme der I $\kappa$ B $\alpha$ -mRNA mit einer Halbwertszeit ( $T_{1/2}$ ) von etwa 30-40 Minuten (Abb. 8A). Das Wiederkehren der I $\kappa$ B $\alpha$ -mRNA, acht Stunden nach Beginn der Behandlung, beruht offensichtlich auf der Instabilität des Inhibitors.

Parallel dazu wurde der Einfluß der Bestrahlung von Zellen mit 30 J/m<sup>2</sup> bzw. 100 J/m<sup>2</sup> UVC auf die Menge an I $\kappa$ B $\alpha$ -mRNA untersucht. Sowohl die Bestrahlung mit 30 J/m<sup>2</sup> als auch die mit 100 J/m<sup>2</sup> hatte kaum einen Einfluß auf die Menge an mRNA für I $\kappa$ B $\alpha$  (Abb. 8B). Um die Wirksamkeit der UV-Strahlung zu zeigen, wurden die Filter mit einer cJun-cDNA-Sonde rehybridisiert. Die Induktion von *c-jun* mit 30 J/m<sup>2</sup> erreichte, wie zu erwarten war, eine Stunde nach der Bestrahlung ein Maximum. Zellen, die mit 100 J/m<sup>2</sup> UVC bestrahlt worden waren, wiesen interessanterweise eine zeitliche Verschiebung der *c-jun* Aktivierung auf. Sie war erst nach drei Stunden maximal und nahm danach langsam ab (Abb. 8B). Demnach hat in den Zellen eine UV-induzierte Genexpression stattgefunden, die I $\kappa$ B $\alpha$ -mRNA wurde jedoch nur unwesentlich reduziert.



**Abb. 8: Verminderung der mRNA-Menge für  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  durch Inhibitoren der Transkription, aber nicht durch UVC-Strahlung**

**A.** HeLa-Zellen wurden mit den Transkriptions-Inhibitoren Act. D (5 µg/ml) oder DRB (250 µg/ml) behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Poly (A)<sup>+</sup> mRNA isoliert und jeweils 9 µg auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Menge an spezifischer mRNA für  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  wurde durch Hybridisierung mit einer <sup>32</sup>P-markierten cDNA-Sonde in der Northern-Blot-Analyse bestimmt. Zur Überprüfung der mRNA-Mengen wurden die Filter mit einer spezifischen cDNA-Sonde gegen die Glycerin-aldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) rehybridisiert.

**B.** HeLa-Zellen wurden mit zwei unterschiedlichen UVC-Dosen (30 J/m<sup>2</sup> und 100 J/m<sup>2</sup>) bestrahlt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Poly (A)<sup>+</sup> mRNA präpariert. Die Mengen an spezifischer mRNA für  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  und GAPDH wurden durch Northern-Blot-Analyse bestimmt. Zur Kontrolle der Funktionalität der UVC-Bestrahlung wurde die Menge an *c-jun*-spezifischer mRNA bestimmt.

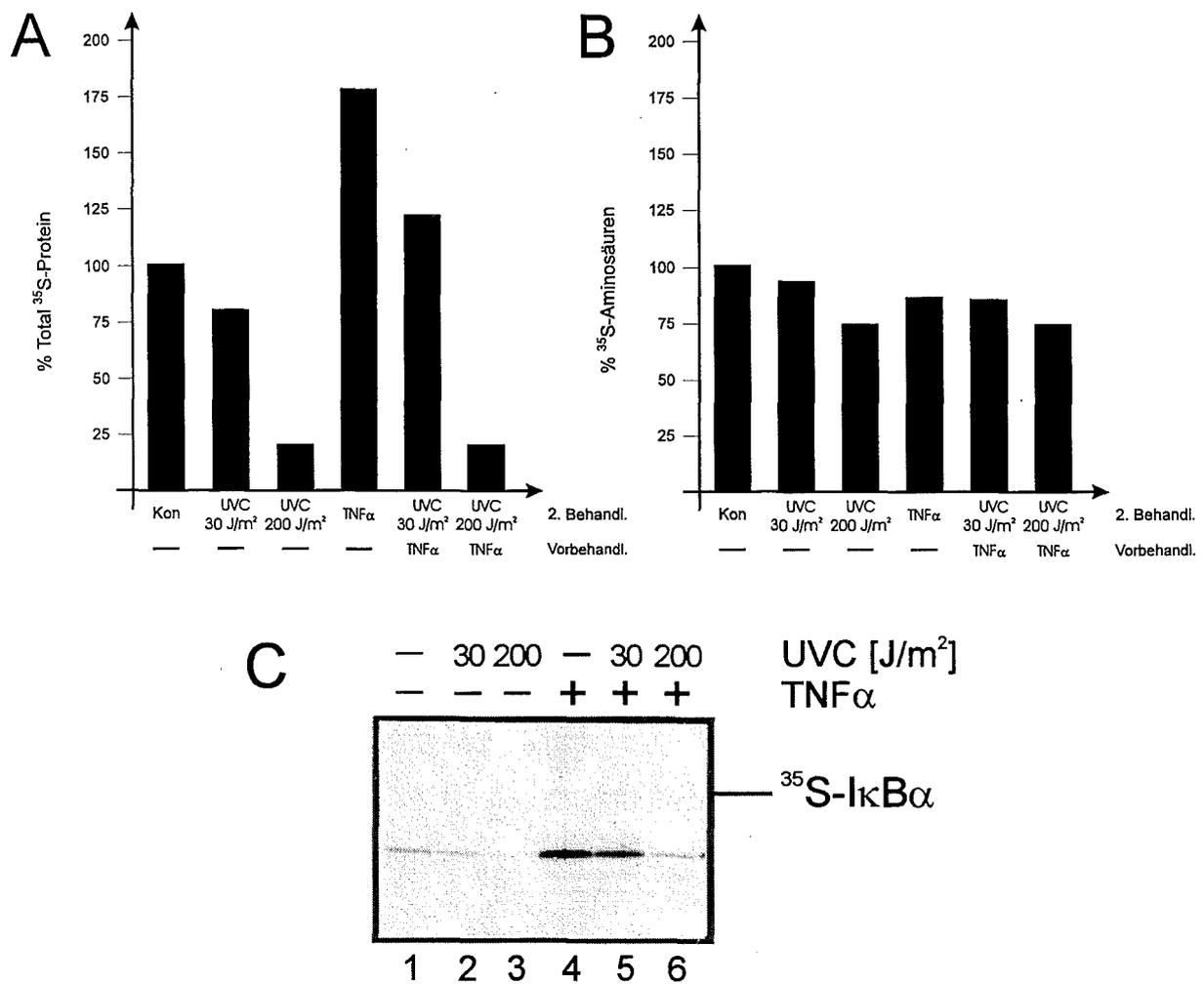
Für die DRB-vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist die Hemmung der Transkription des I $\kappa$ B $\alpha$ -Gens und die damit verbundene Verringerung der Menge an inhibitorischem I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein verantwortlich. Da die UV-Bestrahlung keine oder kaum eine Verringerung der I $\kappa$ B $\alpha$ -mRNA Menge bewirkte, konnte die oben aufgestellte Hypothese, daß die UV-vermittelte Transkriptionshemmung die Ursache der NF- $\kappa$ B-Aktivierung sei, nicht aufrechterhalten werden.

### **Die frühe I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung bzw. die Aktivierung von NF- $\kappa$ B beruhen nicht auf einer Hemmung der Translation durch UV-Strahlung**

Da eine transkriptionelle Hemmung durch UV-Bestrahlung nicht die Ursache für die UV-vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist, sollte untersucht werden, ob eine UV-vermittelte Hemmung der Proteinsynthese ausreicht, um die beobachtete Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch UV-Strahlung zu erklären.

Durch *in vivo* Markierung neusynthetisierter Proteine mit  $^{35}$ S-Methionin und anschließender TCA-Fällung der Proteine aus den Zytoplasmaextrakten unbehandelter und UV-bestrahlter HeLa-Zellen wurde die Translationsrate bestimmt. Die Neusyntheserate wird durch Bestimmung des Einbaus radioaktiv markierter Aminosäuren festgelegt. Während die Bestrahlung mit 30 J/m<sup>2</sup> UVC nahezu keinen Einfluß auf die Proteinsynthese hatte, wurde diese durch 200 J/m<sup>2</sup> UVC auf 20 % gehemmt (Abb. 9A, vergleiche Säule 1 mit 2 und 3). Die Behandlung der Zellen mit TNF $\alpha$  führte zur Erhöhung der Proteinsynthese (Abb. 9A, Säule 4). Da UV-Bestrahlung neben einer Hemmung der Proteinsynthese auch die Aufnahme von Aminosäuren in die Zelle stören könnte, und damit das Markierungsergebnis verfälschen würde, wurde die Menge an aufgenommenen,  $^{35}$ S-markierten Aminosäuren aus einem Aliquot Zytoplasmaextrakt im Szintillationsmeßgerät bestimmt. Die Aufnahme von Aminosäuren nach der Bestrahlung mit 30 J/m<sup>2</sup> UVC und TNF $\alpha$  unterlag nur unspezifischen Schwankungen, die je nach Experiment im Bereich von 5-15 % lagen. Nach einer Bestrahlung mit 200 J/m<sup>2</sup> UVC war eine Hemmung der Aminosäureaufnahme um etwa 25 % deutlich meßbar (Abb. 9B). Die Bestimmung der Translationsrate nach einer Bestrahlung mit 100 J/m<sup>2</sup> UVC ergab je nach Experiment eine Hemmung um 50-60 % (nicht gezeigt und Iordanov, pers. Mitteilung).

Für die Bestimmung des Einflusses von UVC auf die Proteinsyntheserate von I $\kappa$ B $\alpha$  wurden die radioaktiv markierten Proteine mit einem polyklonalen Antikörper, der gegen das menschliche I $\kappa$ B $\alpha$  Protein gerichtet ist, aus den Zytoplasmaextrakten präzipitiert. Die Hemmung der I $\kappa$ B $\alpha$ -Neusynthese entsprach der Hemmung, die für die Gesamtproteinsynthese gemessen wurde (Abb. 9A, Säule 1-3 und C, Bahn 1-3). Die Behandlung der Zellen mit TNF $\alpha$  für 30 Minuten führte zu einer 14fachen Erhöhung der I $\kappa$ B $\alpha$  Synthese (Abb. 9C, Bahn 4). Wurden die Zellen nach 30minütiger Vorbehandlung mit TNF $\alpha$  unmittelbar vor der Markierung UVC bestrahlt, verringerte sich die TNF $\alpha$ -induzierte I $\kappa$ B $\alpha$  Synthese um etwa den Prozentsatz, um den auch die Gesamtproteinsynthese nach UVC-Bestrahlung verringert war. Die Induktionsfaktoren für die erhöhte I $\kappa$ B $\alpha$  Synthese blieben dabei gleich (Abb. 9C, vergleiche Bahn 4-6 mit Bahn 1-3).



**Abb. 9: Messung der Proteinsynthese durch <sup>35</sup>S-Markierung nach UV-Bestrahlung**

HeLa-Zellen blieben unbehandelt (Kon), wurden mit 30 J/m<sup>2</sup> bzw. 200 J/m<sup>2</sup> UVC bestrahlt, mit 5 ng/ml TNF $\alpha$  für 30 min. behandelt oder nach der Vorbehandlung mit TNF $\alpha$  für 30 min. mit

UVC bestrahlt. Die Zellen wurden anschließend für 15 min. mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert. Die Zellen wurden auf Eis lysiert und Zytoplasmaextrakte hergestellt.

**A.** Quantifizierte Darstellung der Gesamtproteinsynthese: Dazu wurden aus einem Aliquot der Extrakte die markierten Proteine mittels TCA-Fällung präzipitiert, auf einen GF/C-Filter übertragen und die Menge der eingebauten Radioaktivität im Szintillationsmeßgerät bestimmt.

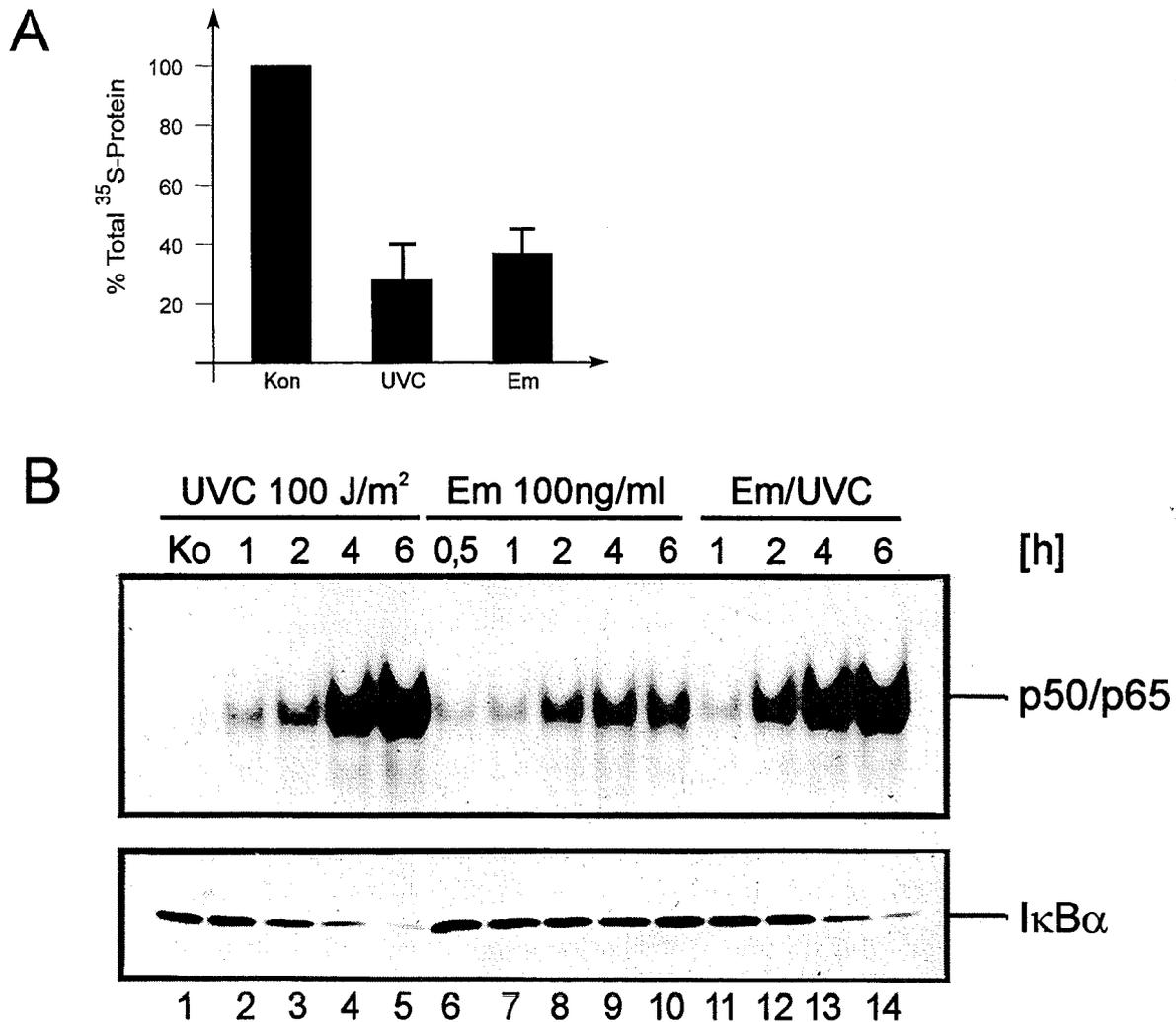
**B.** Quantifizierte Darstellung der Gesamtmenge an aufgenommenen,  $^{35}\text{S}$ -markierten Aminosäuren: Dazu wurde jeweils ein Aliquot der Extrakte auf einen GF/C-Filter übertragen und die Menge der zellulären,  $^{35}\text{S}$ -markierten Aminosäuren im Szintillationsmeßgerät bestimmt.

**C.** Aus den Zytoplasmaextrakten wurde das I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein mit einem polyklonalen Antikörper (sc-371; Santa Cruz) immunpräzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden auf einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden danach auf eine PVDF-Membran übertragen und nach Fixierung mit Methanol gegen einen Röntgenfilm exponiert.

Wie im vorangegangenen Versuch nachgewiesen wurde, hemmt UVC-Bestrahlung bei hohen Dosen die Proteinsynthese von I $\kappa$ B $\alpha$ . I $\kappa$ B $\alpha$  hat eine kurze Halbwertszeit, solange es nicht mit NF- $\kappa$ B/Rel-Faktoren komplexiert ist. Die entscheidende Frage ist, ob unter den Bedingungen der durch UV-Strahlung reduzierten I $\kappa$ B $\alpha$ -Neusynthese ausreichende Mengen für die Komplexierung von NF- $\kappa$ B/Rel gebildet werden. Um dies zu überprüfen, wurden HeLa-Zellen mit einem Proteinsynthese-Inhibitor behandelt, dessen Konzentration so eingestellt war, daß die Hemmung der Translation durch  $100 \text{ J/m}^2$  UVC und den Inhibitor (100 ng/ml Emetin) etwa gleich stark ist (Abb. 10A). Diese wurde durch die Messung der Gesamt-Proteinsyntheserate nach der Behandlung mit dem Inhibitor mittels einer  $^{35}\text{S}$ -Markierung (wie oben beschrieben) bestimmt. Proteinsynthese-Inhibitoren führen neben ihrer Hemmwirkung auch zur Aktivierung von zellulären Signalketten (Mahadevan und Edwards, 1991; Cano *et al.*, 1994; Jordanov *et al.*, 1997b). Der Translations-Inhibitor Emetin soll im Gegensatz zu Anisomycin, Cycloheximid und Puromycin keine Signaltransduktion auslösen (Jordanov *et al.*, 1997b). Im folgenden Experiment blieben HeLa-Zellen entweder unbehandelt, wurden nur mit  $100 \text{ J/m}^2$  UVC bestrahlt, mit Emetin alleine behandelt oder nach 5minütiger Vorbehandlung mit Emetin UV-bestrahlt. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach den Behandlungen wurde die NF- $\kappa$ B DNA-Bindeaktivität in Gelretardationsanalysen und die zelluläre Menge des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins in der Western-Blot-Analyse bestimmt (Abb. 10B).

Emetin führte zu einem schwachen Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  und einer geringen Aktivierung der NF- $\kappa$ B DNA-Bindeaktivität. Sie war deutlich schwächer als in Zellen, die nur bestrahlt wurden oder mit beiden Induktoren behandelt worden waren (Abb. 10B, vergleiche Bahn 6-10 mit Bahn 1-5 bzw. mit Bahn 11-14). Damit führt die Hemmung der Proteinsynthese nur zu einer unmerklichen Reduktion des komplexierten I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins. Die unterschiedliche

Effizienz mit der diese beiden Induktoren zum Abbau des Inhibitors  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  bzw. zur Aktivierung von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  führen, bestätigt eindeutig die Annahme, daß die UV-induzierte Aktivierung von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  einem UV-spezifischen Mechanismus unterliegt und nicht ein sekundärer Effekt der Proteinsynthesehemmung ist.



**Abb. 10: Emetin und UVC aktivieren  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  mit unterschiedlicher Effizienz**

**A.** Quantifizierte Darstellung der Gesamtproteinsynthese: HeLa-Zellen blieben unbehandelt (Kon), wurden mit  $100 \text{ J/m}^2$  UVC bestrahlt oder mit  $100 \text{ ng/ml}$  Emetin behandelt. Die Zellen wurden anschließend für  $15 \text{ min.}$  mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert, sofort auf Eis lysiert und Zytoplasmaextrakte daraus hergestellt. Aus einem Aliquot der Extrakte wurden die markierten Proteine mittels einer TCA-Fällung präzipitiert, auf einen GF/C-Filter übertragen und die Menge der eingebauten Radioaktivität im Szintillationsmeßgerät bestimmt (MW  $\pm$  Standardabweichung aus 3 Experimenten).

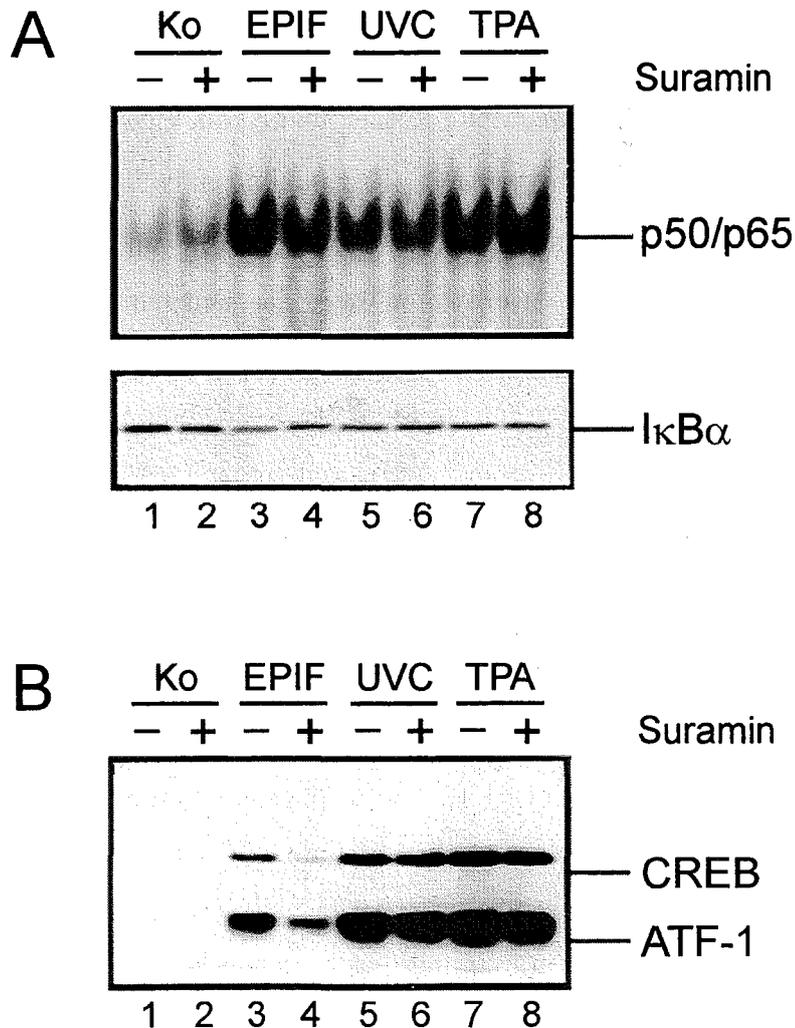
**B.** HeLa-Zellen blieben unbehandelt oder wurden entweder mit  $100 \text{ J/m}^2$  UVC bestrahlt, mit  $100 \text{ ng/ml}$  Emetin behandelt (Bahn 6-10) oder nach 5minütiger Vorbehandlung mit Emetin mit  $100 \text{ J/m}^2$  UVC bestrahlt. Die DNA Bindeaktivitäten von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  und die zellulären Mengen der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteine wurden wie in Abb. 7 bestimmt.

### **Die frühe UV-induzierte I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung bzw. NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist nicht von Membran-Rezeptoren abhängig**

UV-Bestrahlung von Zellen führt u.a. zur Aktivierung von frühen Genen, die z.B. für die Transkriptionsfaktoren cJun und cFos kodieren. Die Signale, die zur Anschaltung solcher frühen Gene führen, gehen hauptsächlich von der Plasmamembran aus, wobei Rezeptoren von Wachstumsfaktoren bzw. Zytokinen an der Signalgebung entscheidend beteiligt sind (Sachsenmaier *et al.*, 1994; Knebel *et al.*, 1996; Rosette und Karin, 1996). Da NF- $\kappa$ B sowohl von TNF $\alpha$  als auch von IL-1 $\alpha$  über deren Rezeptoren aktiviert wird, könnte die UV-abhängige Rezeptoraktivierung Ursache der Aktivierung von NF- $\kappa$ B sein. Die Aktivierung von Liganden-bindenden Rezeptoren der Plasmamembran kann durch das Polyanion Suramin gehemmt werden (Sachsenmaier *et al.*, 1994). Wird die UV-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung über die Aktivierung solcher Membran-Rezeptoren vermittelt, dann sollte die Vorbehandlung mit Suramin diese Aktivierung hemmen. Repräsentativ für Wachstumsfaktoren bzw. Zytokine wurde das konditionierte Medium bestrahlter Zellen verwendet, sogenanntes EPIF-Medium. Dieses enthält Wachstumsfaktoren und Zytokine, die von den Zellen nach UV-Bestrahlung freigesetzt werden. Die Gesamtheit dieser freigesetzten Faktoren wurde als EPIF bezeichnet (Schorpp *et al.*, 1984). EPIF induzierte Aktivierung von ERK 1,2 bzw. die Expression der Kollagenase I ist durch Suramin hemmbar (Krämer *et al.*, 1993; Sachsenmaier *et al.*, 1994). Wenn ERK1,2 und Kollagenase I durch Phorbol ester (TPA) induziert werden, ist die Induktion nicht durch Suramin hemmbar (Krämer *et al.*, 1993; Sachsenmaier *et al.*, 1994), da TPA als Analog von Diacylglycerol (DAG) wirkt und einen von RTKs unabhängigen intrazellulären Wirkungsmechanismus hat. TPA induziert NF- $\kappa$ B und diente daher als Kontrolle für eine Suramin-unabhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung.

Wie in Abbildung 12 zu erkennen ist, wurde die DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B durch das EPIF-Medium stark induziert. Diese Aktivierung, sowie der Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$ , waren durch Suramin teilweise hemmbar (Abb. 11A, oben, vergleiche Bahn 3 und 4). Die Aktivierung durch TPA war dagegen nicht gehemmt worden (Abb. 11A, oben, vergleiche Bahn 7 und 8). Im Gegensatz zur EPIF-Behandlung war die frühe UVC-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung nicht durch Suramin hemmbar (Abb. 11A, oben, vergleiche Bahn 5 und 6). Das Signal, welches NF- $\kappa$ B früh nach UV-Bestrahlung aktiviert, scheint demnach nicht über die Aktivierung Suramin-hemmbarer Membran-Rezeptoren vermittelt zu werden. Interessanterweise wird auch die UV-induzierte Phosphorylierung des CRE-Bindeproteins CREB, welche sehr schnell

nach der Bestrahlung erfolgt (15 Minuten), nicht durch Suramin gehemmt (Abb. 11A, unten und Jordanov *et al.*, 1997a). Dies deutet darauf hin, daß UV-Strahlung neben Wachstumsfaktor-Rezeptoren weitere primäre „Sensoren“ in der Zelle aktiviert, von denen einer offensichtlich zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung führt.



**Abb. 11: Der Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  und die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch UV sind nicht durch Suramin beeinflusst**

**A.** HeLa-Zellen blieben unbehandelt oder wurden mit 0,3 mM Suramin für 45 min. vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen entweder mit konditioniertem Medium von HeLa-Zellen, die 48 h zuvor UV-bestrahlt worden waren (EPIF-Medium), inkubiert, mit 40 J/m<sup>2</sup> UVC bestrahlt oder mit 60 ng/ml TPA behandelt. 30 min. nach der EPIF-Zugabe, sechs Stunden nach der UVC-Bestrahlung und eine Stunde nach der TPA-Behandlung wurden Zytoplasma- und Kernextrakte präpariert. Die DNA-Bindeaktivitäten von NF- $\kappa$ B und die zellulären Mengen der I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteine wurden wie in Abb. 7 bestimmt.

**B.** HeLa-Zellen wurden wie in A beschrieben mit Suramin vorbehandelt und danach mit (EPIF-Medium) inkubiert, mit 40 J/m<sup>2</sup> UVC bestrahlt oder mit 60 ng/ml TPA behandelt. 15 min. nach der Stimulation wurden die Zellen für die Western-Blot-Analyse geerntet und mit einem spezifischen Antikörper, der gegen die phosphorylierte Form des CREB-Proteins (und des ATF-1-Proteins) gerichtet ist, analysiert.

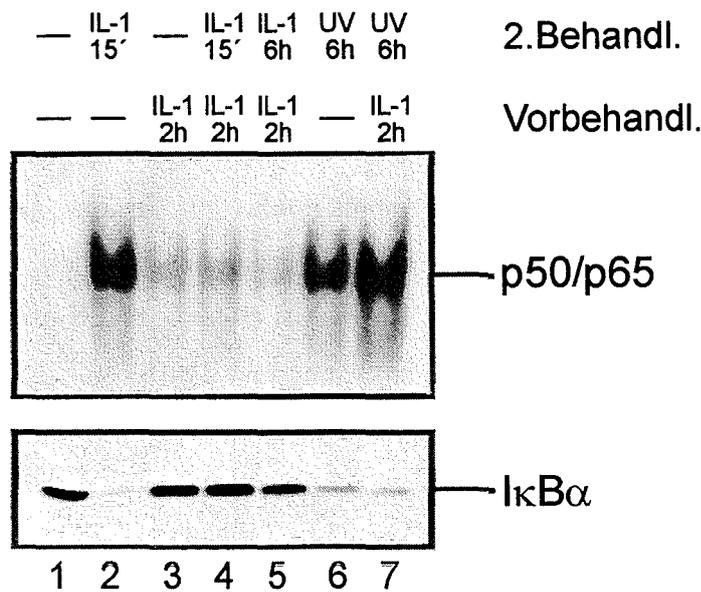
### **Die frühe UV-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung benützt nicht IL-1 $\alpha$ R- oder TNF $\alpha$ R-abhängige Signalwege**

Die Suraminresistenz macht es schon unwahrscheinlich, daß die Rezeptoren für IL-1 $\alpha$  oder TNF $\alpha$  involviert sind. Dafür konnte noch ein zweiter Hinweis erhalten werden.

Membran-Rezeptoren werden durch die Bindung ihres Liganden aktiviert. In den meisten Fällen führt diese Bindung zur Internalisierung und Degradierung des Liganden-Rezeptor-Komplexes (Stoscheck und Carpenter, 1984; Downing *et al.*, 1989). Eine Zelle kann erst dann wieder auf den selben Liganden reagieren, wenn der Rezeptor resynthetisiert worden ist; dieses Phänomen wird als Refraktivität bezeichnet. Führen zwei verschiedene Induktoren zur Anschaltung der selben Signalkette, und kann nach einer ersten Aktivierung, mit einem der beiden Induktoren, keine weitere Aktivierung oder Steigerung der ersten Aktivierung durch den zweiten Induktor erreicht werden, spricht man von „Kreuzrefraktivität“. Dies trifft z.B. für die Induktion der *c-fos*-mRNA durch für den Epidermale-Wachstums-Faktor (EGF) und durch UV-Bestrahlung zu (Sachsenmaier *et al.*, 1994). Obwohl die *c-fos*-mRNA bereits eine Stunde nach der Induktion mit EGF wieder ihren basalen Wert erreicht hat, ist es auch drei Stunden nach der ersten Behandlung noch nicht möglich, eine zweite Aktivierung durch EGF oder UVC zu erreichen. Ebenso ist es nicht möglich, drei Stunden nach der Vorbehandlung mit IL-1 $\alpha$  eine zweite Induktion der *c-fos*-mRNA durch IL-1 $\alpha$  bzw. UVC zu erhalten (Sachsenmaier *et al.*, 1994). UV-Strahlung führt zur Zusammenlagerung und zur Aktivierung vieler Wachstumsfaktor- und Zytokin-Rezeptoren, ähnlich wie es bei deren Aktivierung durch ihre natürlichen Liganden der Fall ist (Rosette und Karin, 1996). Da UVC offensichtlich den IL-1 $\alpha$  Rezeptor aktivieren kann, und IL-1 $\alpha$  ein sehr effizienter und schneller Aktivator von NF- $\kappa$ B ist, sollte untersucht werden, ob die UVC-vermittelte Aktivierung und die IL-1 $\alpha$ -induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B eine Kreuzrefraktivität zeigen.

Die Behandlung von HeLa-Zellen mit IL-1 $\alpha$  führte zu einem schnellen Abbau des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins und einer schnellen Aktivierung der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung schon 15 Minuten nach der Behandlung (Abb. 12, Bahn 1 und 2). Diese NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist transient, die DNA-Bindung ist nach zwei Stunden fast wieder auf den basalen Wert zurückgekehrt. Verantwortlich hierfür ist die schnelle Neusynthese des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins (Ito *et al.*, 1994; Tzen *et al.*, 1994; Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1995), welches ebenfalls zwei Stunden nach der Induktion wieder seine ursprüngliche zelluläre Konzentration erreicht (Abb. 12, Bahn 3). Eine weitere Stimulation mit IL-1 $\alpha$  war zwei Stunden nach der ersten IL-1 $\alpha$ -Behandlung nicht

mehr möglich (Abb. 12, Bahn 4). Offenbar ist eine Komponente des Signalweges nicht mehr verfügbar. Der Weg ist refraktär. Mit  $\text{TNF}\alpha$  konnte jedoch zu diesem Zeitpunkt eine zweite Aktivierung erreicht werden (nicht gezeigt). Die Zelle war somit nur gegen  $\text{IL-1}\alpha$  refraktär. Die Vorbehandlung der HeLa-Zellen mit  $\text{IL-1}\alpha$  hatte jedoch keine Auswirkung auf eine zweite  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivierung durch UVC (Abb. 12, vergleiche Bahn 6 und 7). Ähnliche Resultate wurden für die Vorbehandlung mit  $\text{TNF}\alpha$  erhalten (nicht gezeigt), jedoch war die erste  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivierung zwei Stunden nach der Aktivierung noch nicht vollständig herunterreguliert. Das Fehlen einer Refraktivität zwischen der Zytokin-Behandlung und der UV-Bestrahlung, in Bezug auf die Aktivierung von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , bestätigt, gemeinsam mit den Ergebnissen aus den Suraminexperimenten, die Vermutung, daß UV über einen von der Zellmembran unabhängigen Mechanismus zur frühen Aktivierung von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  führt.



**Abb. 12: Vorbehandlung mit  $\text{IL-1}\alpha$  beeinflusst die UVC-induzierte  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivierung nicht**

HeLa-Zellen blieben unbehandelt (---), wurden mit 10 ng/ml  $\text{IL-1}\alpha$  inkubiert, mit  $100 \text{ J/m}^2$  UVC bestrahlt oder mit 10 ng/ml  $\text{IL-1}\alpha$  für 2 Stunden vorbehandelt. Die mit  $\text{IL-1}\alpha$  vorbehandelten Zellen wurden anschließend entweder ein zweites Mal für die angegebenen Zeiten mit  $\text{IL-1}\alpha$  behandelt oder mit UVC bestrahlt. Anschließend wurden Zytoplasma- und Kernextrakte hergestellt. Die DNA Bindeaktivitäten von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  und die zellulären Mengen der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteine wurden wie in Abb. 7 bestimmt.

### **N-Terminale Bereiche des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins sind für den UV-induzierten Abbau essentiell**

Der frühe I $\kappa$ B $\alpha$  Abbau nach UV-Bestrahlung von Zellen ist induziert und folgt einem bisher nicht geklärten Mechanismus. Um den UV-induzierten I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau zu charakterisieren wurde analysiert, welche Domänen und Aminosäuren in I $\kappa$ B $\alpha$  für die Induktion dieses Abbauweges verantwortlich sind. Mutanten von I $\kappa$ B $\alpha$  wurden durch transiente Transfektion in HeLa-Zellen exprimiert und anschließend durch eine Western-Blot-Analyse mit den entsprechenden Antikörpern untersucht. Eine schematische Darstellung des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins mit einer Markierung der relevanten Domänen und Aminosäuren ist später in Abb. 16 gezeigt.

Der durch viele der bekannten Induktoren induzierte Abbau des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins, hängt von der Phosphorylierung der Serine in den Positionen 32 und 36 ab (Brockman *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1995; DiDonato *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1995; Traenckner *et al.*, 1995; Whiteside *et al.*, 1995). Diese Phosphorylierung ist Voraussetzung für den nachfolgenden Ubiquitin-abhängigen Abbau durch das 26S Proteasom (Traenckner *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Scherer *et al.*, 1995). Eine I $\kappa$ B $\alpha$ -Mutante, bei der die ersten 36 Aminosäuren fehlen, ist nicht mehr durch TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , TPA oder das HTLV-1 Tax-Protein induziert abbaubar (Brockman *et al.*, 1995). Im folgenden Experiment sollte festgestellt werden, ob der UV-vermittelte Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  ebenfalls von diesem Protein-Bereich abhängt.

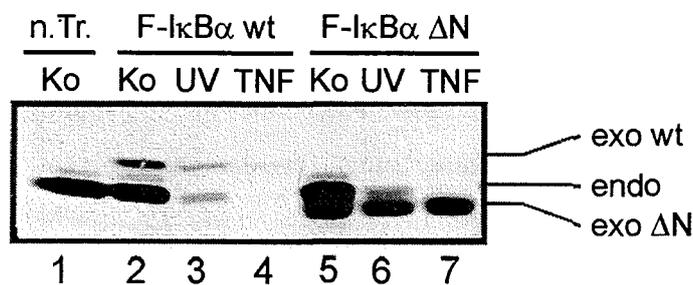
Zunächst wurde überprüft, ob der Abbau eines transient exprimierten I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins durch UVC und als Kontrolle durch TNF $\alpha$  induziert wird (Abb. 13, Bahn 1-4). Um das exogene I $\kappa$ B $\alpha$  vom endogenen unterscheiden zu können, wurde die transfizierte cDNA mit einem FLAG-Epitop im Leseraster versehen. Als FLAG wird eine acht Aminosäuren lange (DYKDDDDK), artifizielle, antigene Determinante bezeichnet, die von einem Antikörper, der gegen dieses Epitop gerichtet ist, erkannt wird (Prickett *et al.*, 1989) und eine einfache Unterscheidung vom endogenen Protein ermöglicht. Zusätzlich läuft das Fusionsprotein etwas langsamer in einem SDS-Polyacrylamidgel als das endogene Protein. Dies macht den Nachweis beider Proteine mit nur einem Antikörper, der gegen das endogene Protein gerichtet ist, möglich. Die FLAG-Sequenz, im N-Terminus des Proteins, hat keinen Einfluß auf die Funktionalität von I $\kappa$ B $\alpha$  (Brockman *et al.*, 1995).

In Extrakten aus nicht transfizierten Zellen wird von einem I $\kappa$ B $\alpha$ -spezifischen Antikörper nur das endogene Protein erkannt (Abb. 13, Bahn 1, endo). In transfizierten Zellen wird zusätzlich das transfizierte Protein erkannt (Abb. 13, Bahn 1, exo). Die Behandlung mit UVC als auch

mit  $\text{TNF}\alpha$  führte sowohl zum Abbau des endogenen als auch des exogenen Wildtyp- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  (Abb. 13, Bahn 2-4).

Um die Notwendigkeit der ersten 36 N-terminalen Aminosäuren zu untersuchen, wurde eine entsprechende Deletionsmutante (F- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha \Delta\text{N}$ ) von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  in HeLa-Zellen überexprimiert.

Im Gegensatz zum endogenen  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  bewirkte keiner der beiden Induktoren den Abbau der exogenen Deletions-Mutante (Abb. 13, Bahn 5-7). Damit stand fest, daß UV-Strahlung ebenso wie  $\text{TNF}\alpha$  für den induzierten Abbau auf den N-terminalen Bereich von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  angewiesen ist.



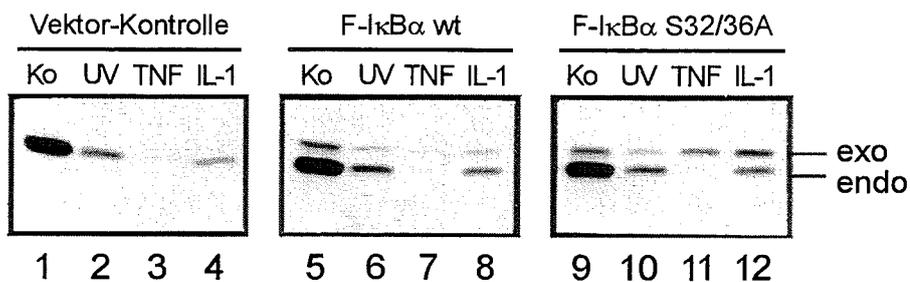
**Abb. 13: Abbau von transient überexprimiertem  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  durch  $\text{TNF}\alpha$  und UVC**

HeLa-Zellen wurden entweder ohne DNA oder mit je  $2 \mu\text{g}$  Expressionsvektor, der für das Wildtyp  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  oder eine N-terminale Deletionsmutante von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  (FLAG- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha \Delta\text{N}$ ) kodiert, transfiziert. 16 Stunden nach der Transfektion blieben die Zellen entweder unbehandelt, wurden mit  $100 \text{ J/m}^2$  UVC bestrahlt oder mit  $10 \text{ ng/ml}$   $\text{TNF}\alpha$  behandelt. Sechs Stunden nach der UVC-Bestrahlung bzw. 15 min. nach der  $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung wurden Zytoplasmaextrakte präpariert.  $80 \mu\text{g}$  Extrakt wurden auf einem 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und nach Übertragung auf eine PVDF-Membran mit einem Antikörper, der gegen das menschliche  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Protein gerichtet ist, detektiert. Zur Unterscheidung der endogenen und exogenen  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteine wurde das exogene Protein als N-terminales FLAG-Fusionsprotein kloniert. In der Abbildung geben „exo wt“ bzw. „exo  $\Delta\text{N}$ “ jeweils die Lage der epitopmarkierten  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteine an, während „endo“ das endogene  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Protein bezeichnet.

## Die Serine 32 und 36 des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins sind für den frühen UV-induzierten Abbau entbehrlich

Da der N-Terminus von I $\kappa$ B $\alpha$  sowohl essentielle phosphorylierbare Serine, als auch zwei für den Ubiquitin-abhängigen Abbau wichtige Lysine in den Position 21 und 22 enthält (Chen *et al.*, 1995; Scherer *et al.*, 1995; Van Antwerp und Verma, 1996; Roff *et al.*, 1996), war mit Hilfe der Deletionsmutante keine eindeutige Aussage möglich, ob der UVC-vermittelte Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  von den beiden Serinen abhängig ist, oder ob das Fehlen der beiden Lysine für den ausgebliebenen Abbau verantwortlich war. In der Mutante, F-I $\kappa$ B $\alpha$  S32/36A, sind die beiden phosphorylierbaren Serine an den Positionen 32 und 36 gegen nicht phosphorylierbare Alanine ausgetauscht worden. Auch hier handelte es sich um ein FLAG-Fusionsprotein, um die Mutante vom endogenen Protein unterscheiden zu können.

Wie erwartet, wurde sowohl das endogene, als auch das transient exprimierte Wildtyp-I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein durch UV-Bestrahlung und Behandlung mit TNF $\alpha$  oder IL-1 $\alpha$  abgebaut (Abb. 14, Bahn 1-8; vergl. auch Abb. 13 Bahn 1-3). Im Vergleich dazu wurde der Abbau der Mutante durch TNF $\alpha$  oder IL-1 $\alpha$  nicht induziert (Abb. 14, vergleiche Bahn 9 mit Bahn 11 und 12). UV-Strahlung jedoch induziert den Abbau dieser Serin-Mutante genauso gut wie den Abbau des exogenen Wildtyp-Proteins (Abb. 14, vergleiche Bahn 6 und 10).



**Abb. 14: Die I $\kappa$ B $\alpha$  S32/36A-Mutante wird durch UVC abgebaut**

HeLa-Zellen wurden transient transfiziert. Der Kontroll-Vektor entsprach den Expressionsvektoren ohne Insert. Diese kodieren für FLAG Epitop-markierte I $\kappa$ B $\alpha$ -Fusionsproteine. Der Vektor FLAG-I $\kappa$ B $\alpha$  wt kodiert für das Wildtyp-Protein und der Vektor FLAG-I $\kappa$ B $\alpha$  S32/36A für das punktmutierte Protein. 16 Stunden nach der Transfektion blieben die Zellen unbehandelt oder wurden mit folgenden Agenzien behandelt: 100 J/m<sup>2</sup> UVC, 10 ng/ml TNF $\alpha$  und 10 ng/ml IL-1 $\alpha$ . Sechs Stunden nach der UVC-Bestrahlung, sowie 15 min. nach der TNF $\alpha$ - bzw. IL-1 $\alpha$ -Behandlung wurden Zytoplasmaextrakte hergestellt. Der Nachweis der I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteine erfolgte wie in Abb. 13, wobei „endo“ bzw. „exo“ jeweils die Lage der endogenen bzw. der epitopmarkierten, exogenen I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteine angeben.

Aus diesem Experiment konnte geschlossen werden, daß der UVC-vermittelte I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau nicht von den Serinen in den Positionen 32 und 36 abhängt. Da der Abbau dieser Serin-Mutante, im Unterschied zur N-terminalen Deletionsmutante, durch UV-Strahlung induzierbar ist, scheint es sehr wahrscheinlich, daß der UV-induzierte Abbau die Lysine des N-Terminus benötigt.

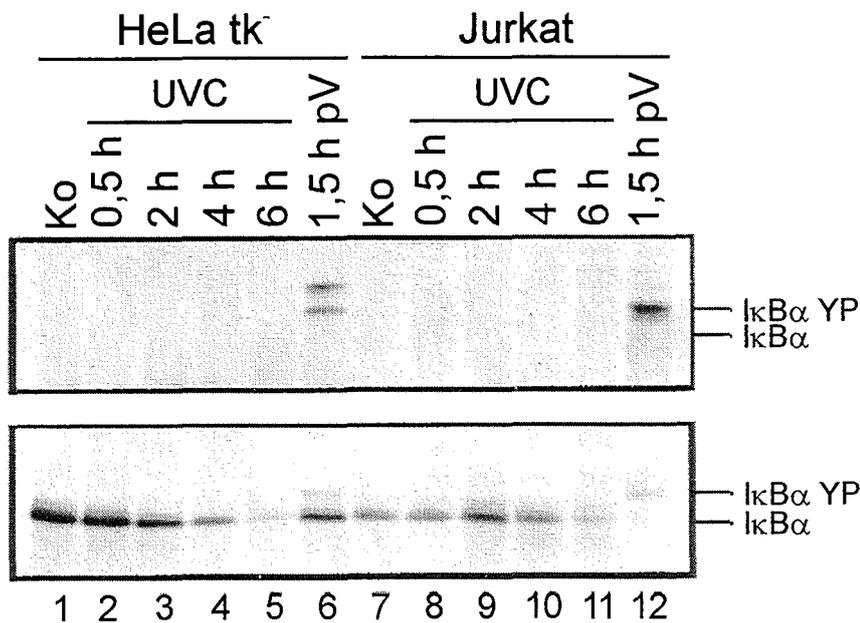
### **UVC führt nicht zur Tyrosin-Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$**

Aus den oben beschriebenen Untersuchungen folgt, daß der UV-vermittelte I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau nicht von den Serinen in den Positionen 32 und 36 abhängt und damit wohl auch nicht von einer Phosphorylierung dieser Aminosäuren. Da I $\kappa$ B $\alpha$  jedoch für die Ubiquitinierung kenntlich gemacht werden muß, stellte sich die Frage, ob das I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein nach der UV-Bestrahlung von Zellen überhaupt einer Modifikation durch eine zusätzliche Phosphorylierung unterliegt, und wenn dies der Fall ist, an welcher Aminosäure diese Phosphorylierung erfolgt.

Es war bekannt, daß die Reoxygenierung von hypoxischen Zellen oder die Behandlung von Zellen mit dem Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor Pervanadat zur Tyrosin-Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  führt (Imbert *et al.*, 1996). Ob an dem UVC-induzierten Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  eine Tyrosin-Phosphorylierung als Modifikation des Proteins beteiligt ist, war bisher noch nicht untersucht worden. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurden Jurkat T Zellen, für die eine Phosphorylierung für das Tyrosins in der Position 42, infolge einer Pervanadat-Behandlung, beschrieben worden ist (Imbert *et al.*, 1996), und die von mir verwendeten HeLa-Zellen mit Pervanadat (pV) oder UVC behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde durch die Western-Blot-Analyse zytosolischer Extrakte die Menge an I $\kappa$ B $\alpha$  nachgewiesen. Die Tyrosin-Phosphorylierung wurde durch die Western-Blot-Analyse von immunpräzipitiertem I $\kappa$ B $\alpha$  mittels eines Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers detektiert.

Die Behandlung mit Pervanadat führte in beiden Zelllinien zu einer Veränderung des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins, die, im Vergleich zum I $\kappa$ B $\alpha$  unbehandelter Zellen, einen verzögerten Lauf des Proteins im SDS-Polyacrylamidgel bewirkte (Abb. 15, unten, vergleiche Bahn 1 mit Bahn 6 bzw. Bahn 7 mit Bahn 12). Durch die Hybridisierung der Immunpräzipitationen mit einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper, der gegen phosphoryliertes Tyrosin gerichtet ist, wurde die langsamer laufende Bande als Tyrosin-phosphorylierte Form identifiziert (Abb. 15,

oben, Bahn 6 und 12). Die Bestrahlung der Zellen mit UVC führte bei beiden Zelllinien zum Abbau des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins (Abb. 15, unten, Bahn 1-5 und Bahn 7-11), jedoch zu keinem der beobachteten Zeitpunkte zu einer Tyrosin-Phosphorylierung des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins (Abb. 15, oben, Bahn 2-5 und Bahn 8-11). Da mittels der Pervanadat-Behandlung, nicht aber durch UV-Bestrahlung, eine klare Phosphorylierung des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins an einem Tyrosin erreicht werden konnte, kann davon ausgegangen werden, daß UV-Strahlung das I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein nicht durch Tyrosin-Phosphorylierung für den Abbau markiert.

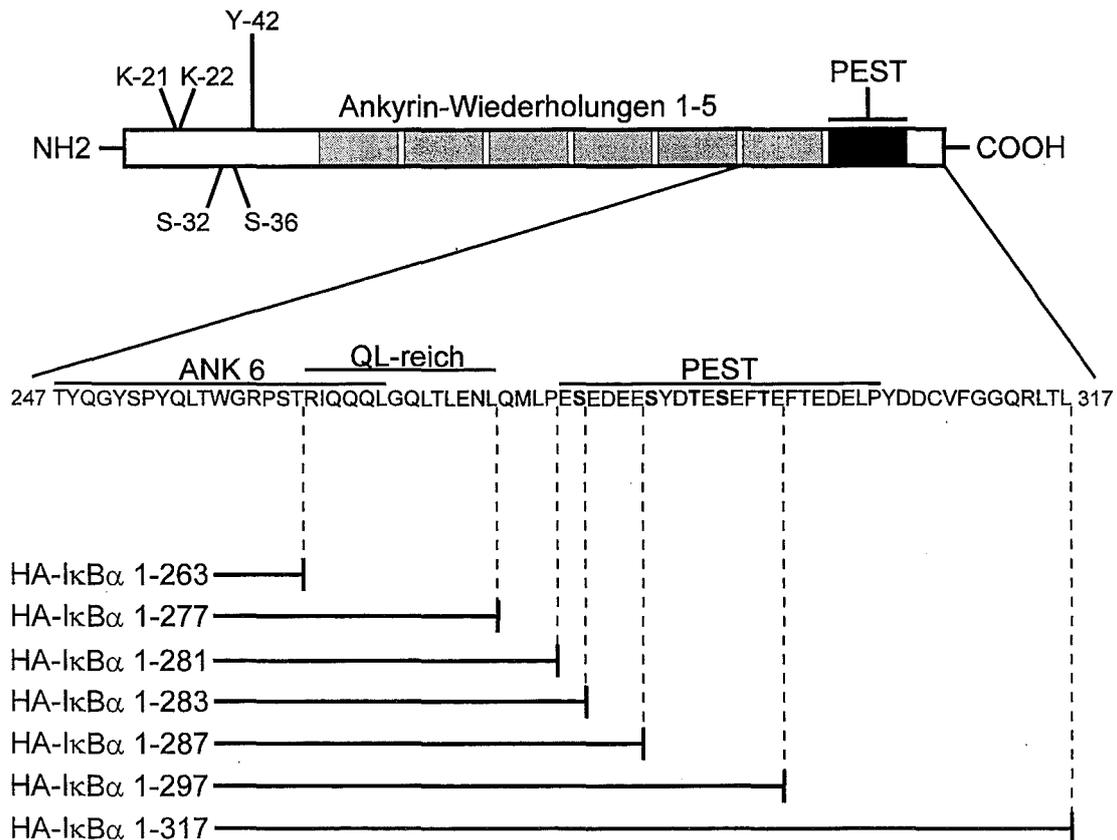


**Abb. 15: UVC führt nicht zur Tyrosin-Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$**

HeLa-Zellen bzw. Jurkat T Zellen blieben entweder unbehandelt, wurden mit 100 J/m<sup>2</sup> UVC bestrahlt oder mit 250  $\mu$ M Pervanadat behandelt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen direkt auf Eis lysiert. Ein Aliquot der Zellextrakte wurde elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit einem Antikörper, der gegen das I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein gerichtet ist, detektiert (unterer Teil). Aus dem Rest der Extrakte wurde das I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein mit einem spezifischen Antikörper präzipitiert. Dieses wurde ebenfalls elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Nach dem Transfer wurde die Immunpräzipitation mit einem Antikörper, der spezifisch gegen Tyrosin-Phosphate (PY20; Transd. Labs) gerichtet ist, analysiert (oberer Teil).

## Der C-Terminus von I $\kappa$ B $\alpha$ ist für den frühen UV-vermittelten Abbau erforderlich

Vereinfacht dargestellt besteht das I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein aus drei Bereichen (Abb. 16).



**Abb. 16: Schematische Karte des humanen I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins.**

Der N-terminale Bereich (Aminosäuren 1-72) enthält zwei Serine in den Positionen 32 und 36 (DSGLDS) und zwei Lysine in den Positionen 21 und 22 sowie ein Tyrosin in der Position 42 (Y-Phosphorylierungs-Stelle; KDEEYEQMVK). Diese Aminosäuren sind für den induzierten Abbau bzw. für die induzierte Dissoziation des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins notwendig. Den zentralen Bereich des Proteins (Aminosäuren 73-269) bilden fünf vollständige Ankyrin-Wiederholungen (ANK) sowie eine unvollständige sechste Ankyrin-Wiederholung (Aminosäuren 247-269). Der C-terminale Bereich (Aminosäuren 270-317) enthält eine PEST-ähnliche Sequenz (Aminosäuren 281-304) und einen kleinen benachbarten Bereich von 14 Aminosäuren, der am Ende der sechsten unvollständigen Ankyrin-Wiederholung liegt und mehrere Glutamine (Q) und Leucine (L) enthält. Diese Sequenz wird daher als QL-reiche Region bezeichnet (Sun *et al.*, 1996). Innerhalb der PEST-Sequenz befinden sich fünf Phosphorylierungsstellen für Kasein-Kinase II (fett gedruckte AS). Die Längen der verwendeten C-terminalen Deletionsmutanten sind unten schematisch dargestellt.

Die Bedeutung C-terminaler Sequenzen für den induzierten Abbau des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins wird unterschiedlich diskutiert. Allen Untersuchungen ist jedoch gemeinsam, daß C-terminale Deletionsmutanten des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins, die kürzer als 268 Aminosäuren (AS) sind, nach TNF $\alpha$ -Behandlung nicht mehr induziert abgebaut werden. Alle C-terminalen Deletionsmutanten mit einer Mindestlänge von 277 AS werden nach der TNF $\alpha$ -Behandlung abgebaut (Aoki *et al.*, 1996; Beauparlant *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1996; Van Antwerp und Verma, 1996). In Übereinstimmung dazu ist auch die Deletionsmutante I $\kappa$ B $\alpha$  1-256 von Rodriguez (1995) nicht TNF $\alpha$ -induziert abbaubar. Jedoch war eine weitere Mutante (I $\kappa$ B $\alpha$   $\Delta$ 257-264), in der acht Aminosäuren deletiert sind, durch TNF $\alpha$  abbaubar. Dieser Befund schien zunächst im Widerspruch mit den obigen Daten zu stehen. Er läßt sich aber damit erklären, daß der I $\kappa$ B $\alpha$  1-256-Mutante die von Sun *et al.* (1996) beschriebene QL-reiche Region fehlt, welche für den TNF $\alpha$ -vermittelten Abbau essentiell ist. In der I $\kappa$ B $\alpha$   $\Delta$ 257-264-Mutante ist diese Region allerdings vollständig erhalten geblieben. Ein Widerspruch zu den bisher beschriebenen I $\kappa$ B $\alpha$ -Mutanten besteht jedoch für die von Brown *et al.* (1995) verwendete I $\kappa$ B $\alpha$   $\Delta$ C(1-275)-Mutante. Diese wird nach der TNF $\alpha$ -Behandlung nicht abgebaut, obwohl sie einen Großteil der QL-reichen Region enthält. Möglicherweise reicht eine Verkürzung der QL-reichen Region um nur zwei AS aus, um den Abbau zu verhindern. Weder die I $\kappa$ B $\alpha$   $\Delta$ C(1-269)-Mutante noch die I $\kappa$ B $\alpha$   $\Delta$ C(1-279)-Mutante von Whiteside *et al.* (1995) wird nach Behandlung mit LPS oder PMA induziert abgebaut. Erst eine längere Mutante, welche die ersten 291 AS enthielt, war abbaubar. Dies steht, in bezug auf die Abbaubarkeit der I $\kappa$ B $\alpha$   $\Delta$ C(1-279)-Mutante, scheinbar im Widerspruch zu den obigen Untersuchungen. Die Daten können aber nicht direkt verglichen werden, da die Induktionen hier nicht mit TNF $\alpha$  durchgeführt wurden, sondern mit LPS. Der LPS-induzierte Abbau wird möglicherweise durch einen anderen Mechanismus gesteuert. Eine noch nicht charakterisierte 42 kD Kinase soll das Protein an den Positionen 288, 293 und 288 im C-Terminus phosphorylieren können (Kuno *et al.*, 1995).

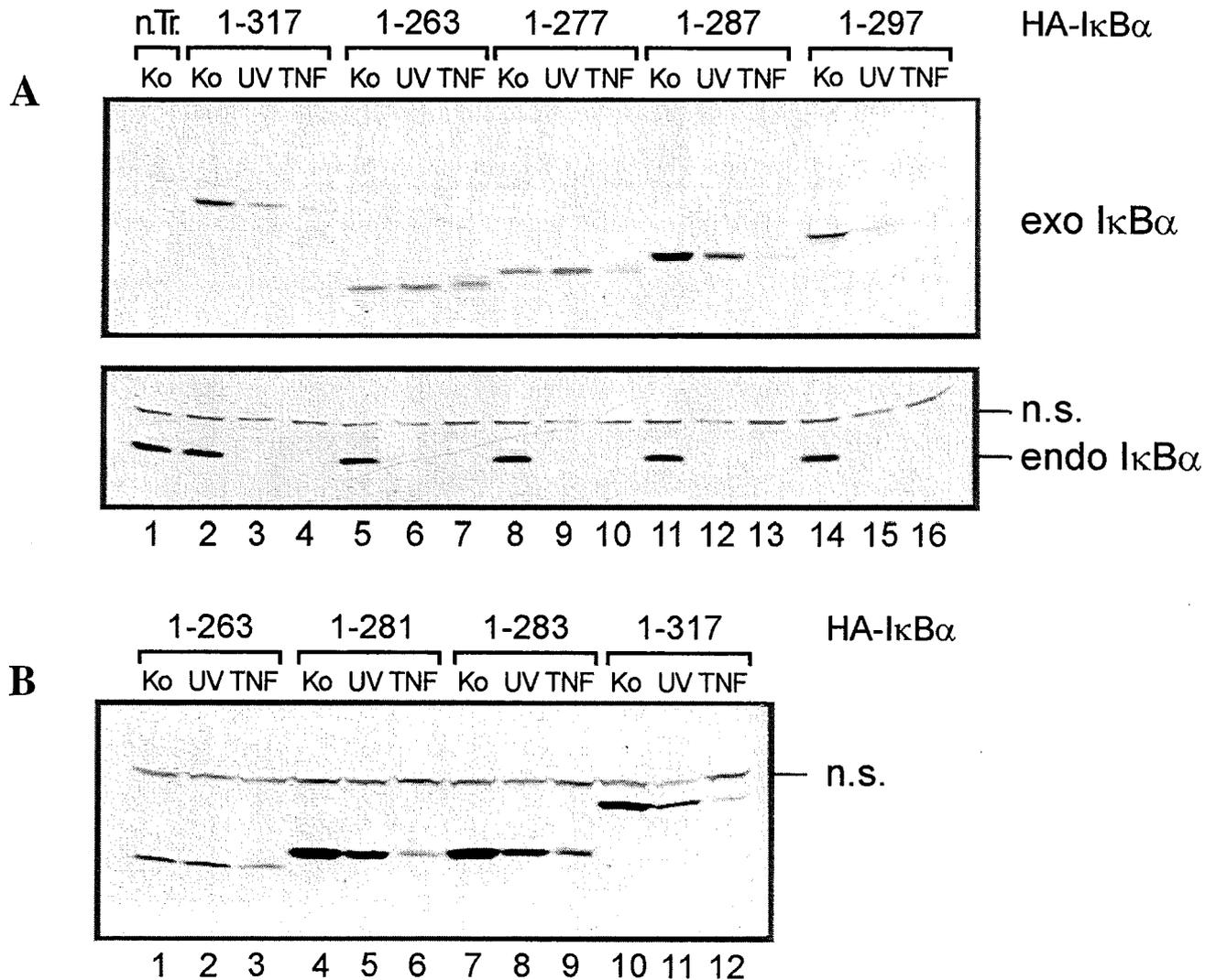
Im N-Terminus des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins konnte keine Modifikation nachgewiesen werden, die das Protein für den UV-induzierten Abbau markiert. Die Notwendigkeit des C-terminalen Bereichs für einen induzierten Abbau ist umstritten. Daher untersuchte ich, welche Rolle dieser Bereich für den UV-induzierten Abbau spielt.

Um dies zu testen, wurden in HeLa-Zellen C-terminale Deletionsmutanten des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins transient überexprimiert und der Abbau nach der Behandlung mit UVC bzw. TNF $\alpha$  analysiert. Die verwendeten Deletionmutanten habe ich z.T. aus dem Labor von Dr. Greene erhalten (Sun *et al.*, 1996). Sie sind in Abb. 16 schematisch dargestellt. Alle Expressionsvektoren kodieren für ein I $\kappa$ B $\alpha$ -Fusionsprotein, das 3 Kopien des Influenza Virus Hemagglutinin Epitops („HA“; YPYDVPDYA) am N-Terminus trägt. Dies macht eine Unterscheidung der exogenen von den endogenen I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinen mit einem entsprechenden Antikörper, der gegen das HA-Epitop gerichtet ist, möglich.

Der UV-induzierte Abbau des endogenen I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins erfolgte in diesen Experimenten genauso gut wie nach der TNF $\alpha$ -Behandlung (Abb. 17A, unten). Der verwendete Antikörper erkennt die transfizierten Mutanten nicht, weil er gegen ein Epitop im C-Terminus (AS 297-317) gerichtet ist. Daher wurden die Mutanten mit einem Antikörper, der das Influenza HA-Epitop erkennt, analysiert. Das exogene Wildtyp-I $\kappa$ B $\alpha$  (HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-317) wurde sowohl in UVC-bestrahlten, als auch in TNF $\alpha$ -behandelten Zellen, wie erwartet, abgebaut (Abb. 17A, oben, Bahn 2-4). Der Mutante HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-263 fehlt neben der PEST-Sequenz die gesamte QL-reiche Region, die für den induzierten Abbau des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins nach TNF $\alpha$  notwendig ist (Sun *et al.*, 1996). Diese Mutante wurde weder in UV-bestrahlten, noch in TNF $\alpha$ -behandelten Zellen abgebaut (Abb. 17A, Bahn 5-7). Mit einer längeren Mutante, welche die QL-reiche Region enthielt (HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-277), war der TNF $\alpha$ -induzierte I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau wieder hergestellt. Im Unterschied dazu war der Abbau dieser Mutante durch UV-Strahlung nicht erfolgt (Abb. 17A, Bahn 8-10). Erst nach Anfügen weiterer 10 Aminosäuren (HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-287) war wieder ein Abbau in UVC-bestrahlten Zellen zu erreichen (Abb. 17A, Bahn 11-13). Der Abbau der längsten Deletionsmutante HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-297 entsprach dem des vollständigen exogenen Proteins (Abb. 17A, vergleiche Bahn 2-4 mit Bahn 14-16).

Im Bereich zwischen den Aminosäuren 277 und 287 sind mehrere saure Aminosäuren und ein Serin lokalisiert (siehe Abb. 16). Ob diesen eine Bedeutung für den UV-induzierten I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau zukommt, wurde nachgeprüft, indem zwei weitere Deletionsmutanten hergestellt wurden. Bei diesen Mutanten wurden entweder alle sauren Aminosäuren und das Serin dieses Bereiches entfernt (HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-281) oder nur ein Teil der sauren Aminosäuren (HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-283). Nach Überexpression dieser Mutanten in HeLa-Zellen und der Bestrahlung mit UVC bzw. der Behandlung mit TNF $\alpha$  wurden diese Mutanten im Vergleich zur kurzen Mutante

HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-263 (Abb. 17B, vergleiche Bahn 4-6 und Bahn 7-9 mit Bahn 1-3) bzw. HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-277 (Abb. 17A, Bahn 11-13) abgebaut, jedoch mit einer geringeren Effizienz als das exogene Wildtyp-Protein (Abb. 17B, vergleiche Bahn 4-6 und Bahn 7-9 mit Bahn 10-12). Für den Abbau besteht offensichtlich ein gradueller (277<281<283<287) Übergang.



**Abb. 17: Der C-Terminus des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins ist für den UVC-vermittelten Abbau wichtig**

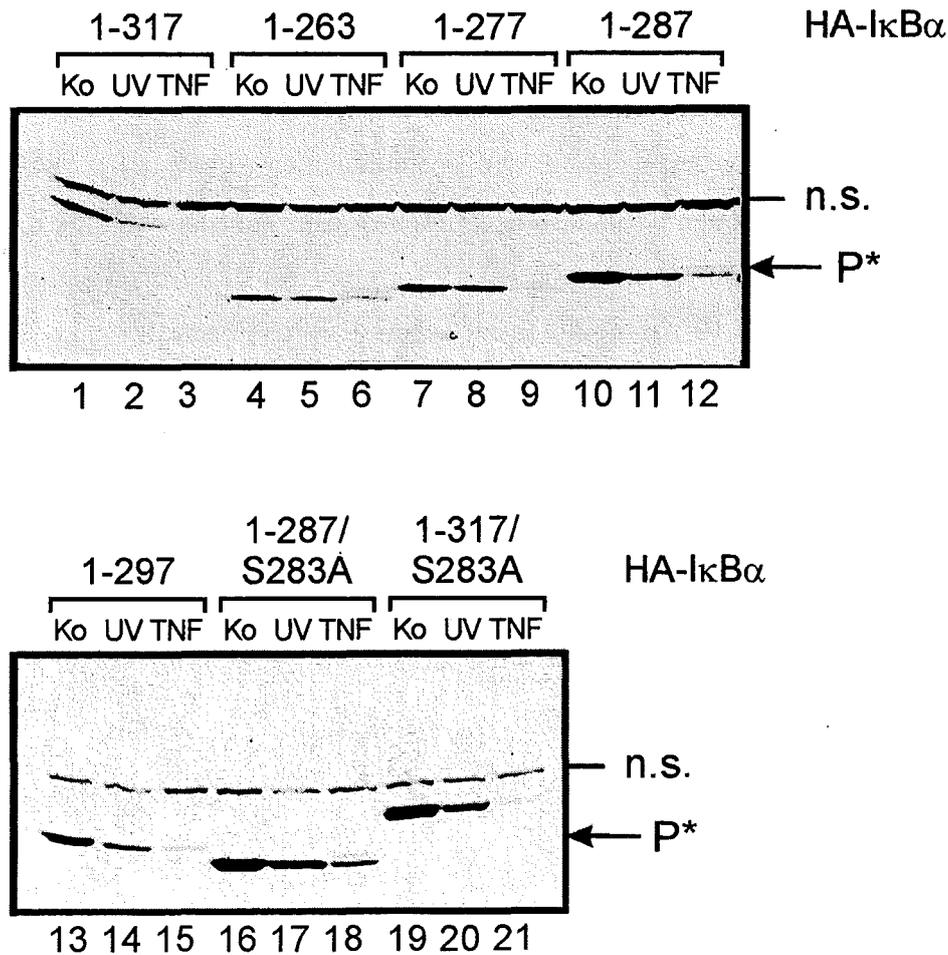
**A.** Western-Blot-Analyse für den Abbau überexprimierter C-terminaler Deletionsmutanten des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins. HeLa-Zellen wurden mit je 2  $\mu$ g Expressionsvektoren, die für die RNAs der verschiedenen angegebenen C-terminalen Deletionsmutanten kodieren, transient transfiziert. Die Expressionsvektoren kodieren für HA-Epitop-markierte I $\kappa$ B $\alpha$ -Fusionsproteine. 40 Stunden nach der Transfektion blieben die Zellen unbehandelt, wurden mit 100 J/m<sup>2</sup> UVC bestrahlt oder mit 10 ng/ml TNF $\alpha$  behandelt. Sechs Stunden nach der UV-Bestrahlung oder 15 min. nach Behandlung mit TNF $\alpha$  wurden die Zellen auf Eis lysiert und Zytoplasmaextrakte hergestellt. 80  $\mu$ g der Extrakte wurden auf einem SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit einem Antikörper, der gegen das HA-Epitop (oberer Teil) oder gegen das I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein (unterer Teil) gerichtet ist, detektiert.

n.T. = nicht transfiziert, n.s. = nicht spezifische Bande.

**B.** Die C-terminalen I $\kappa$ B $\alpha$ -Deletionsmutanten (HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-281 und 1-283) wurden, wie in A beschrieben, in HeLa-Zellen überexprimiert und analysiert. Zur Kontrolle wurden die Konstrukte HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-263 und HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-317 analysiert.

Durch diese Untersuchung war der C-terminale Bereich des Proteins, zwischen den Aminosäuren 277 und 287, besonders interessant geworden. In diesem Bereich befindet sich eine Phosphorylierungsstelle für die Casein-Kinase II in Position 283 (Barroga *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1996; McElhinny *et al.*, 1996; Schwarz *et al.*, 1996). Dieses Serin könnte außerdem auch einer bisher nicht bekannten UV-induzierbaren Kinase als Phosphorylierungsstelle dienen, die damit das I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein für den Abbau markieren könnte.

Durch die *in vitro* Mutagenisierung dieses Serins in ein nicht-phosphorylierbares Alanin sollte diese Hypothese überprüft werden. Das Serin 283 wurde sowohl im Wildtyp HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-317, als auch in der Mutante HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-287 gegen ein Alanin ausgetauscht (HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-287/S283A und HA-I $\kappa$ B $\alpha$  1-317/S283A). Diese beiden S283A-Mutanten, sowie die bisher untersuchten Deletionsmutanten, wurden in HeLa-Zellen überexprimiert. Dabei wurden beide S283A-Mutanten sowohl in den UV-bestrahlten, als auch in den TNF $\alpha$ -behandelten Zellen mit der gleichen Effizienz abgebaut, wie die entsprechenden, das Serin enthaltenden, Proteine (Abb. 18, vergleiche Bahn 1-3 mit Bahn 19-21 und Bahn 10-12 mit Bahn 16-18). Offenbar ist das Serin in der Position 283 für den UV und (TNF $\alpha$ ) -induzierten I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau entbehrlich.



**Abb. 18: Das Serin 283 ist für den UVC (und TNF $\alpha$ ) -vermittelten Abbau von IκB $\alpha$  entbehrlich**

HeLa-Zellen wurden, wie in Abb. 18 beschrieben, mit je 2  $\mu$ g Expressionsvektoren transient transfiziert. In diesem Falle kodierten die Vektoren zusätzlich für IκB $\alpha$ -Proteine, in denen das Serin 283 gegen ein Alanin im Wildtyp bzw. der HA-IκB $\alpha$  1-287 Deletionsmutante ausgetauscht worden ist. 40 Stunden nach der Transfektion blieben die Zellen unbehandelt, wurden mit 100 J/m<sup>2</sup> UVC bestrahlt oder 10 ng/ml TNF $\alpha$  behandelt. Sechs Stunden nach der UV-Bestrahlung oder 15 min. nach der Behandlung mit TNF $\alpha$  wurden die Zellen auf Eis lysiert und Zytoplasmaextrakte hergestellt. Der Nachweis der IκB $\alpha$ -Proteine erfolgte wie in Abb. 13. P\* = phosphorylierte Form des IκB $\alpha$ -Proteins, n.s. = nicht spezifische Bande.

Nach der Behandlung mit TNF $\alpha$  war eine zusätzliche, langsamer laufende Bande zu erkennen (Abb. 18, mit P\* markiert), welche die phosphorylierte Form des Proteins darstellt (Brockman *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1995; DiDonato *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1995; Traenckner *et al.*, 1995; Whiteside *et al.*, 1995). Eine entsprechende, langsamer laufende Proteinbande wurde aber bei keinem der Experimente in Extrakten aus UVC-bestrahlten Zellen beobachtet. Sie trat

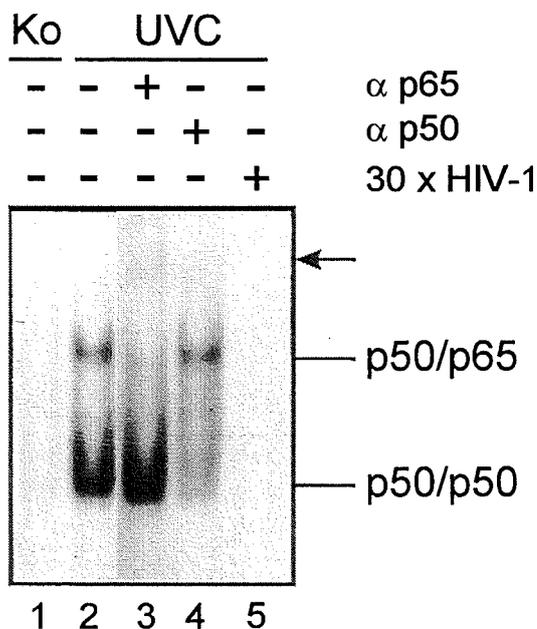
aber immer in TNF $\alpha$ -behandelten Zellen auf. Dies läßt vermuten, daß der I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau nach UV-Bestrahlung nicht durch eine Phosphorylierung reguliert wird.

Meine Analysen haben gezeigt, daß für den UV-induzierten Abbau des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins weder die Serine in den Positionen 32 und 36 noch eine Tyrosin-Phosphorylierung notwendig sind. Es zeigte sich jedoch, daß eine Region des C-Terminus für den Abbau essentiell ist. Dabei konnte ein Bereich von 10 Aminosäuren zwischen den Positionen 277 und 287 eingegrenzt werden. Eine für den Abbau notwendige Phosphorylierung in diesem Bereich konnte ausgeschlossen werden.

Im anschließenden Teil dieser Arbeit wurde die späte DNA-Schaden-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B weiter charakterisiert.

## Wie ist die späte DNA-Schaden-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B reguliert?

Die Bestrahlung der Fibroblasten führte zu einer deutlichen Erhöhung der DNA-Bindeaktivität von zwei Protein-Komplexen (Abb. 19, Bahn 1 und 2). Durch Kompetition der radioaktiv markierten Oligonukleotide mit einem 30fachen Überschuß an nicht markierten Oligonukleotiden, welche die spezifischen NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungen verhindern, wurde die Spezifität dieser beiden Signale nachgewiesen (Abb. 19, Bahn 5). Unspezifische Oligonukleotide verhinderten nicht die DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B (nicht gezeigt). Durch Inkubation der Kernextrakte mit Antikörpern, die gegen Rel/NF- $\kappa$ B Untereinheiten gerichtet sind, wurde die Identität der DNA-bindenden Proteine bestimmt. Antikörper, die gegen das p65-Protein gerichtet waren, verzögerten den Lauf des oberen Komplexes im Gel („supershift“  $\leftarrow$ ) (Abb. 19, vergleiche Bahn 2 mit Bahn 3). Die Behandlung mit Antikörpern, die gegen das p50-Protein gerichtet waren, verhinderte die Bildung des unteren NF- $\kappa$ B-Komplexes (Abb. 19, vergleiche Bahn 2 mit Bahn 4). Demnach repräsentiert die obere Bande in der Gelretardationsanalyse p50/p65-Heterodimere bzw. p65/p65-Homodimere und die untere Bande p50/p50 Homodimere der NF- $\kappa$ B-Komplexe. Der obere Komplex wird in dieser Arbeit zur Vereinfachung durchgehend als p50/p65 bezeichnet.



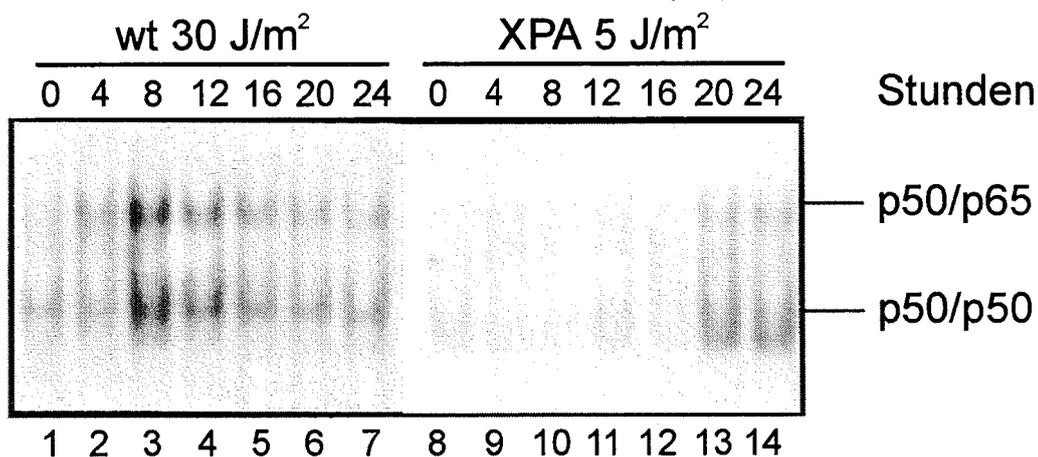
**Abb. 19: Die UV-induzierten Protein-Bindungen an die HIV-1 Oligonukleotide sind NF- $\kappa$ B spezifisch**

Fibroblasten blieben entweder unbehandelt oder wurden mit UVC bestrahlt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden Kernextrakte präpariert. Jeweils 5  $\mu$ g Extrakt wurden mit  $^{32}$ P-markierten HIV-1 Oligonukleotiden inkubiert, auf einem nativen 5% Acrylamidgel aufgetrennt und autoradiographiert. Wo angegeben, wurden die Kernextrakte vor der Analyse für 2 h mit

Antikörpern, die gegen das p65- oder das p50-Protein gerichtet sind (200 ng pro Ansatz, Fa. Santa Cruz), auf Eis inkubiert. Zur Konkurrenz der  $^{32}\text{P}$ -markierten HIV-1 Oligonukleotide wurde ein 30facher Überschuß an nicht-markierten Oligonukleotiden dem Ansatz zugegeben.

### Die DNA-Schaden-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist verzögert

Wie zu Beginn dargestellt wurde, erfolgt die UV-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B über zwei unterschiedliche Mechanismen: einem frühen DNA-Schaden-unabhängigen und einem späten DNA-Schaden-abhängigen Mechanismus. Zellen, die DNA-Schäden nicht mehr reparieren können (XPA-Fibroblasten), erwiesen sich, bezüglich der späten NF- $\kappa$ B-Aktivierung, als deutlich empfindlicher gegenüber UV-Strahlung. Es sollte nun untersucht werden, ab welchem Zeitpunkt nach der Bestrahlung dieser DNA-Schaden-abhängige Mechanismus erkennbar wird. Hierzu wurde die Zeitabhängigkeit der Aktivierung von NF- $\kappa$ B nach der UVC-Bestrahlung in Wildtyp- und in XPA-Fibroblasten untersucht. Die Aktivierung in den Wildtyp-Fibroblasten war nach acht Stunden maximal und nahm danach wieder ab (Abb. 20, Bahn 1-7). In XPA-Zellen, die mit  $5 \text{ J/m}^2$  bestrahlt worden waren, konnte eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung erst nach 20 Stunden nachgewiesen werden (Abb. 20, Bahn 8-14). Dies deutet darauf hin, daß zwischen der Erkennung des UV-induzierten DNA-Schadens und der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B ein oder mehrere Schritte liegen müssen.



**Abb. 20: Unterschiedliche Zeitabhängigkeit der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Wildtyp- und XPA-Fibroblasten nach UVC-Bestrahlung**

Wildtyp- bzw. XPA-Fibroblasten blieben entweder unbehandelt oder wurden mit  $30 \text{ J/m}^2$  bzw.  $5 \text{ J/m}^2$  UVC bestrahlt. Zu den angegebenen Zeiten wurden Kernextrakte präpariert. Jeweils  $5 \mu\text{g}$  der Kernextrakte wurden in Gelretardationsanalysen mit  $^{32}\text{P}$ -markierten HIV-1 Oligonukleotiden inkubiert und auf einem nativen Acrylamidgel aufgetrennt. Die Abbildung zeigt den Ausschnitt des Autoradiogramms mit den DNA-Proteinkomplexen.

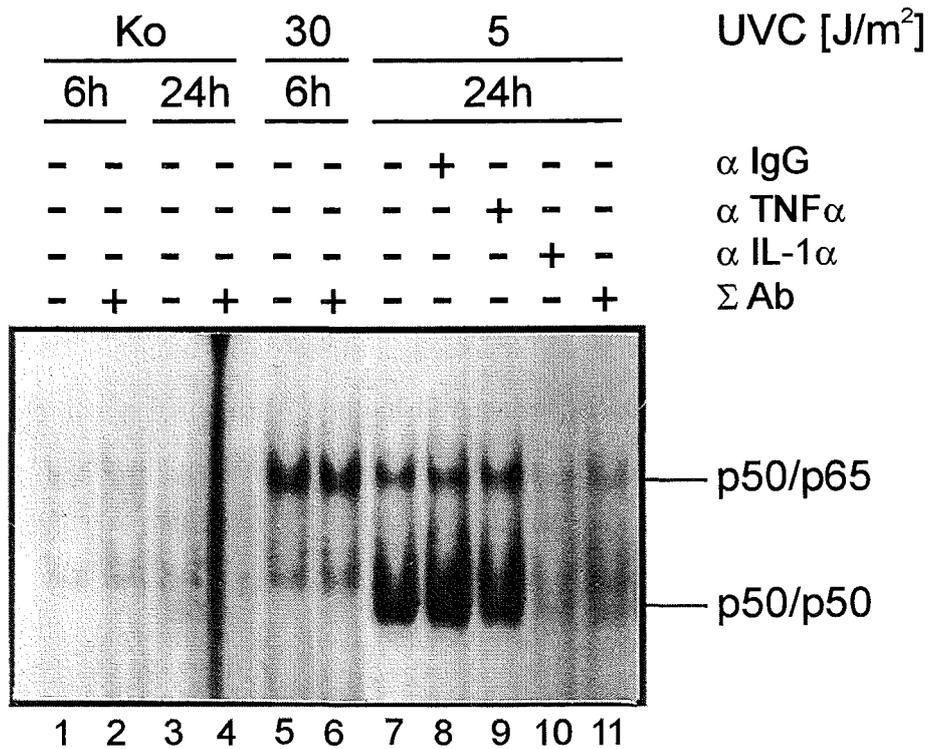
### Die verzögerte Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Komplexe wird durch IL-1 $\alpha$ vermittelt

Im Kulturmedium UV-bestrahlter Zellen kommt es zu einer Erhöhung der Wachstumsfaktor- und Zytokinkonzentration. Diese Faktoren wurden in ihrer Gesamtheit als EPIF (= Extrazellulärer Proteinsynthese-induzierender Faktor) (Schorpp *et al.*, 1984) oder als UVIS (= „UV-induced secreted protein“) (Rotem *et al.*, 1987) bezeichnet. Dieses UV-induzierte, offensichtlich DNA-Schaden-abhängig synthetisierte und freigesetzte EPIF besteht hauptsächlich aus dem basischen Wachstumsfaktor (bFGF) und dem transformierenden Wachstumsfaktor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) sowie dem Zytokin IL-1 $\alpha$  (Krämer *et al.*, 1993; Krutmann und Grewe, 1995). Daneben werden in geringer Konzentration weitere Zytokine freigesetzt, wie z.B. TNF $\alpha$  (Köck *et al.*, 1990; Schwarz *et al.*, 1995), IL-10 (Rivas und Ullrich, 1992; Grewe *et al.*, 1995) und IL-15 (Mohamadzadeh *et al.*, 1995). IL-1 $\alpha$  und TNF $\alpha$ , nicht jedoch bFGF, sind effiziente Aktivatoren von NF- $\kappa$ B (Krämer, 1991). Mit der Kenntnis, daß UV-Strahlung IL-1 $\alpha$ - und/oder TNF $\alpha$ -Synthese induziert, wurde postuliert, daß die verzögerte NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Sekretion und Akkumulation von IL-1 $\alpha$  und/oder TNF $\alpha$  im Medium verursacht wird. In Kulturzellen wird erst nach dem Erreichen genügender Zytokin-Konzentrationen im Kulturmedium eine autokrine/parakrine Stimulation meßbar. Demnach könnten IL-1 $\alpha$  und/oder TNF $\alpha$  bei der späten, DNA-Schaden-abhängigen Aktivierung von NF- $\kappa$ B eine Rolle spielen. Um dies zu untersuchen, sollte die Wirkung der von den Zellen freigesetzten Zytokine durch spezifische, neutralisierende Antikörper gehemmt werden. Die Bedingungen wurden so gewählt, daß zwischen der DNA-Schaden-abhängigen und der DNA-Schaden-unabhängigen Aktivierung von NF- $\kappa$ B klar zu unterscheiden war. Dies war nur in XPA-Fibroblasten zu späten Zeitpunkten nach der Bestrahlung mit 5 J/m<sup>2</sup> UVC möglich, da bei dieser Dosis keine frühe DNA-Schaden-unabhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B stattfindet. Die neutralisierenden Antikörper gegen IL-1 $\alpha$  und TNF $\alpha$  wurden unmittelbar nach der UV-Bestrahlung ins Kulturmedium gegeben. Um eventuelle Einflüsse der Antikörper auf die basale NF- $\kappa$ B Aktivität oder auf die frühe Aktivierung zu berücksichtigen, wurden ebenfalls neutralisierende Antikörper ins Medium entsprechender Kontrollzellen gegeben.

Die Behandlung der Zellen mit einer Kombination aus neutralisierenden Antikörpern ( $\Sigma$ Ab), die gegen IL-1 $\alpha$  und TNF $\alpha$  gerichtet waren, führte zu einer vollständigen Hemmung der späten NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Abb. 21, vergleiche Bahn 7 und 11). Im Gegensatz dazu hatten diese Antikörper keinen Einfluß auf die frühe DNA-Schaden-unabhängige Aktivierung von

NF- $\kappa$ B (Abb. 21, Bahn 5 und 6). Ein unspezifischer Einfluß der Antikörper konnte durch die Verwendung eines unabhängigen Kontroll-Immunglobulins ( $\alpha$ IgG) ausgeschlossen werden (Abb. 21, vergleiche Bahn 7 und 8). Ebenso hatten diese neutralisierenden Antikörper keine Effekte in Bezug auf die basale DNA-Bindeaktivität von NF- $\kappa$ B in den nicht bestrahlten Kontrollzellen (Abb. 21, vergleiche Bahn 1 und 2 sowie Bahn 3 und 4).

Um zu untersuchen, ob beide Zytokine gleichwertig zur späten NF- $\kappa$ B-Aktivierung beitragen, wurden UV-bestrahlte Zellen mit jeweils nur einem dieser neutralisierenden Antikörper behandelt. Dabei stellte sich heraus, daß TNF $\alpha$  keine Bedeutung für die verzögerte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in XPA-Fibroblasten hat, sondern daß die späte NF- $\kappa$ B-Aktivierung fast ausschließlich von der Akkumulation und Wirkung des Zytokins IL-1 $\alpha$  abhängt (Abb. 21, vergleiche Bahn 7 mit Bahn 9 und 10).



**Abb. 21: IL-1 $\alpha$  vermittelt die verzögerte Aktivierung von NF- $\kappa$ B nach UVC-Bestrahlung**

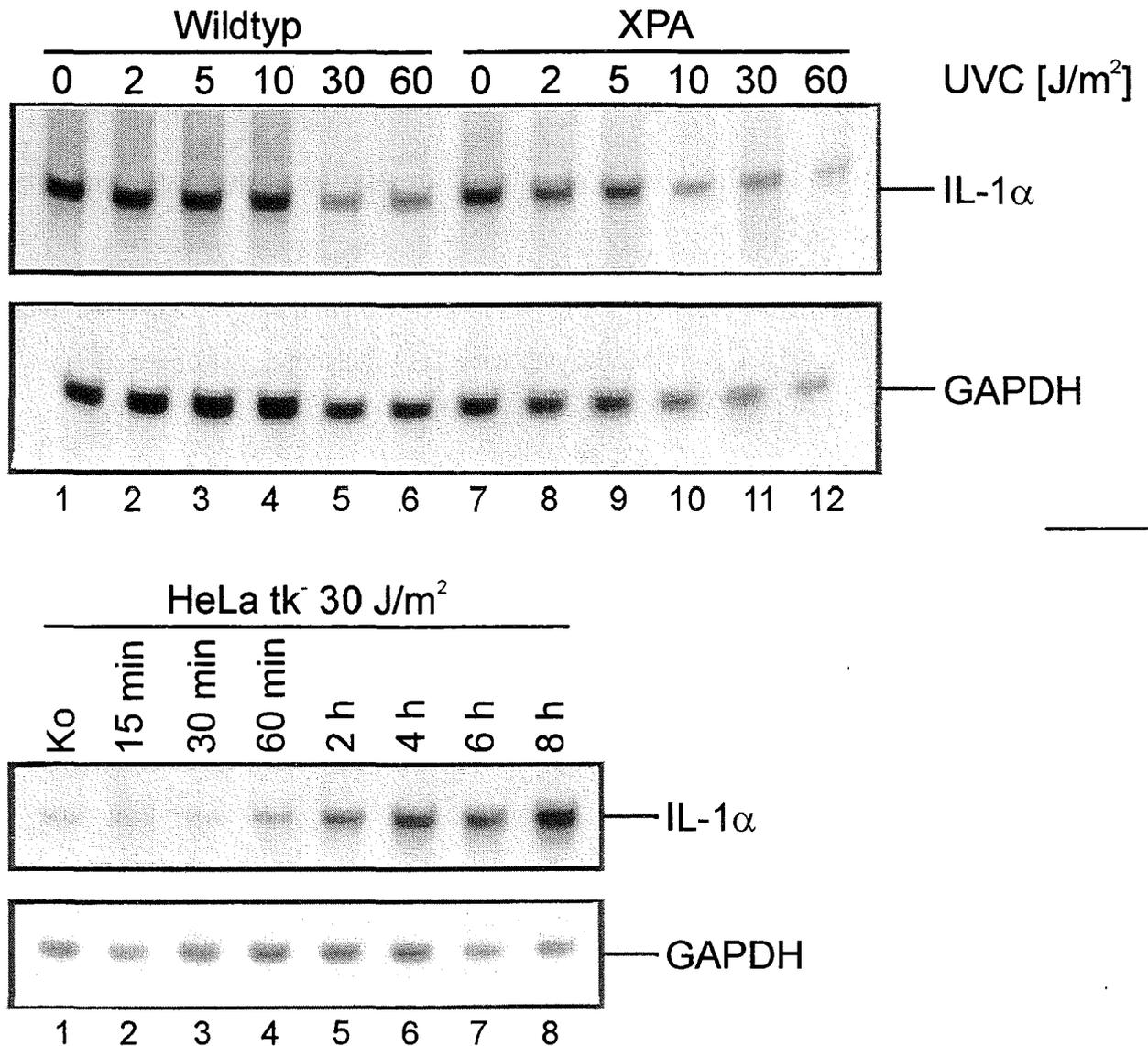
XPA-Fibroblasten blieben entweder unbehandelt oder wurden mit 30 J/m<sup>2</sup> bzw. 5 J/m<sup>2</sup> UVC bestrahlt. Wo gekennzeichnet (+), wurden neutralisierende Antikörper gegen IL-1 $\alpha$  (10  $\mu$ g/ml; Fa. Bio Tech Trade), gegen TNF $\alpha$  (10  $\mu$ g/ml; Fa. Bio Tech Trade), der Summe aus IL-1 $\alpha$  und TNF $\alpha$  ( $\Sigma$ Ab, jeweils 10  $\mu$ g/ml) oder Kontrollimmunglobuline ( $\alpha$ IgG, 10  $\mu$ g/ml; Fa. Dianova) unmittelbar nach der Bestrahlung ins Kulturmedium gegeben. Sechs Stunden (Ko, UVC 30 J/m<sup>2</sup>) und 24 Stunden (Ko, UVC 5 J/m<sup>2</sup>) nach der Behandlung wurden die Zellen geerntet und Kernextrakte präpariert. Jeweils 5  $\mu$ g Extrakt wurden mit <sup>32</sup>P-markierten HIV-1 Oligonukleotiden inkubiert, auf einem nativen 5 % Acrylamidgel aufgetrennt. Die Abbildung zeigt den Ausschnitt des Autoradiogramms mit den DNA-Proteinkomplexen.

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, auf welchem Wege UV-Bestrahlung von XPA-Fibroblasten eine verstärkte Akkumulation von IL-1 $\alpha$  im Kulturmedium bewirkt.

### **Die Menge der IL-1 $\alpha$ mRNA ist in primären Fibroblasten nach UV-Bestrahlung nicht erhöht**

Die Transkription und die Synthese von preIL-1 $\alpha$  werden durch eine Vielzahl von Induktoren angeschaltet. Sie erfolgt z.B. in Monozyten nach LPS-Behandlung (Kobayashi *et al.*, 1988) und in NIH 3T3-Mausfibroblasten durch TNF $\alpha$ - bzw. LPS (Carruth *et al.*, 1991).

In HeLa-Zellen führt die UV-Bestrahlung zur verstärkten Synthese der IL-1 $\alpha$ -mRNA. Sie ist etwa eine Stunde nach der Bestrahlung nachweisbar und erreicht nach einem Maximum bei acht Stunden, ihre basale Expression innerhalb von 24 Stunden wieder (Krämer, 1991). Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß die späte NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch UVC in primären Fibroblasten ebenfalls über eine Erhöhung der IL-1 $\alpha$ -mRNA Synthese vermittelt wird. Um dies zu überprüfen, wurden Wildtyp- und XPA-Fibroblasten mit unterschiedlichen UVC-Dosen bestrahlt und die mRNA-Menge von IL-1 $\alpha$  mittels der Northern-Blot-Analyse acht Stunden nach der Bestrahlung bestimmt. Dabei stellte sich heraus, daß weder in den Wildtyp-Fibroblasten (Abb. 22, oben, Bahn 1-7) noch in den XPA-Fibroblasten (Abb. 22, oben, Bahn 8-14) eine erhöhte Menge an IL-1 $\alpha$ -mRNA zu beobachten war. Statt dessen nahm in beiden Zellen die IL-1 $\alpha$  RNA-Menge mit höheren UV-Dosen deutlich ab. In den Wildtyp-Fibroblasten war dies ab einer UV-Dosis von 30 J/m<sup>2</sup> der Fall, in den XPA-Zellen schon mit 10 J/m<sup>2</sup> (Abb. 22, oben, ab Bahn 5 bzw. Bahn 10). UV-Bestrahlung führt *in vivo* zur transienten Hemmung der DNA- als auch der RNA-Synthese (Hackett und Sauerbier, 1975; Lehmann *et al.*, 1979; Mayne und Lehmann, 1982) und blockiert die Transkription durch die RNA-Polymerase II *in vitro* vollständig (Donahue *et al.*, 1994). In menschlichen Fibroblasten wird bei einer Bestrahlung von 100 J/m<sup>2</sup> UVC je ein Pyrimidin-Dimer pro 1.100 bp gebildet (Lehmann, 1979). Je nach Reparaturfähigkeit der Zelle können noch nicht entfernte DNA-Schäden zur Verringerung der Transkription von dem immerhin 12 kbp langen IL-1 $\alpha$ -Gen (March *et al.*, 1985; Furutani *et al.*, 1986; Furutani, 1994) führen. Im Gegensatz zu den Fibroblasten bewirkte in HeLa-Zellen eine UV-Dosis von 30 J/m<sup>2</sup> eine deutliche Induktion der IL-1 $\alpha$ -mRNA acht Stunden nach der Bestrahlung (Abb. 22, unten, Bahn 8; siehe auch Krämer *et al.*, 1993).

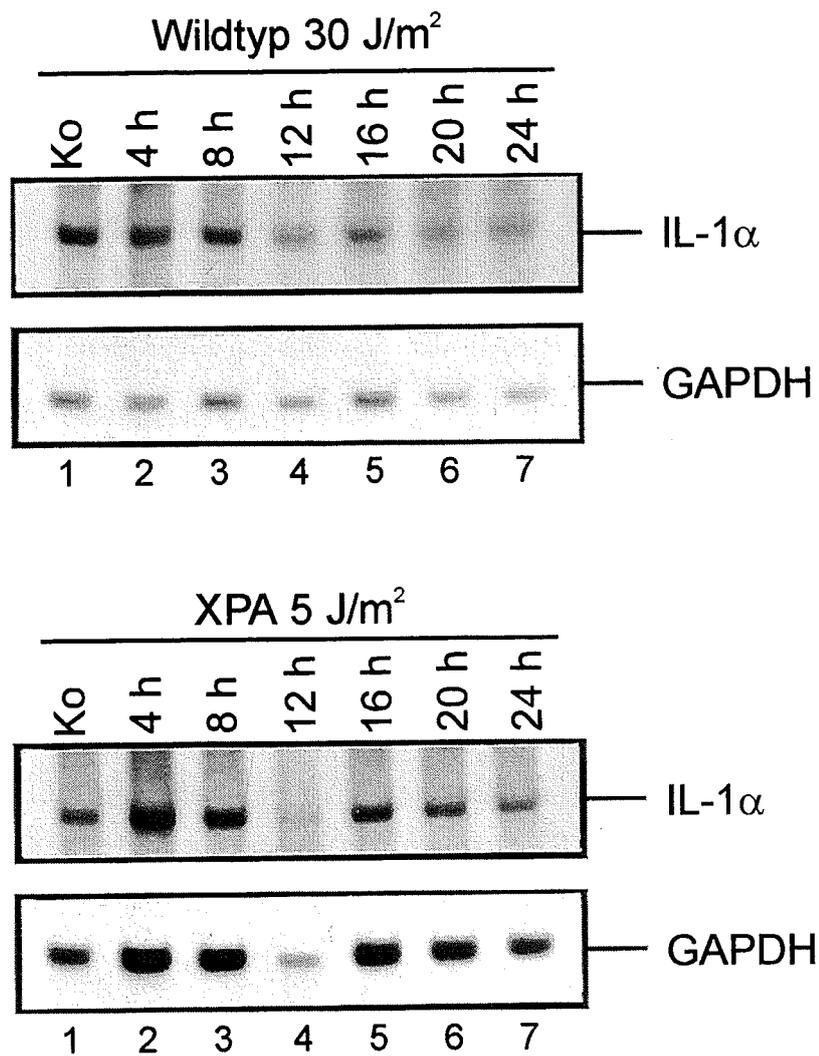


**Abb. 22: IL-1 $\alpha$ -mRNA in UVC-bestrahlten Zellen**

Wildtyp- und XPA-Fibroblasten wurden mit steigenden UVC-Dosen (2-60 J/m<sup>2</sup>) bestrahlt und acht Stunden später wurde die Poly (A)<sup>+</sup>mRNA der Zellen isoliert. HeLa-Zellen wurden mit UVC 30 J/m<sup>2</sup> bestrahlt und die Poly (A)<sup>+</sup>mRNA zu unterschiedlichen Zeiten präpariert. Jeweils 9  $\mu$ g mRNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt, um die Menge an IL-1 $\alpha$  spezifischer mRNA in Northern-Blot-Analysen zu bestimmen. Dazu wurden die Filter mit einer <sup>32</sup>P-markierten, spezifischen RNA-Sonde hybridisiert. Zur Überprüfung der mRNA-Mengen wurden die Filter mit einer spezifischen cDNA-Sonde gegen die Glycerin-aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) rehybridisiert.

Um ausschließen zu können, daß in primären Fibroblasten IL-1 $\alpha$  eventuell zu unterschiedlichen Zeiten als in HeLa-Zellen, nach der UV-Bestrahlung, induziert wird,

wurden diese Fibroblasten mit einer geeigneten UV-Dosis bestrahlt (Wildtyp mit  $30 \text{ J/m}^2$  und XPA mit  $5 \text{ J/m}^2$ ) und die IL-1 $\alpha$  mRNA-Menge bis zu 24 Stunden nach der Bestrahlung analysiert. In der Northern-Blot-Analyse war jedoch zu keinem der untersuchten Zeitpunkte die IL-1 $\alpha$  Expression erhöht (Abb. 23). Die Erhöhung der IL-1 $\alpha$ -Konzentration im Kulturmedium UV-bestrahlter, primärer Fibroblasten wird demnach nicht über eine verstärkte Transkription von IL-1 $\alpha$  oder eine Stabilisierung der RNA reguliert.



**Abb. 23: IL-1 $\alpha$ -mRNA UVC-bestrahlter Wildtyp- und XPA-Fibroblasten**

Wildtyp-Fibroblasten wurden mit  $30 \text{ J/m}^2$  UVC und XPA-Fibroblasten mit  $5 \text{ J/m}^2$  UVC bestrahlt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Poly (A)<sup>+</sup> mRNA der Zellen isoliert. Die Mengen an spezifischer mRNA für IL-1 $\alpha$  und GAPDH wurden durch eine Northern-Blot-Analyse wie in Abb. 22 bestimmt.

### Die UV-induzierte Spaltung von preIL-1 $\alpha$ wird durch Caspasen vermittelt

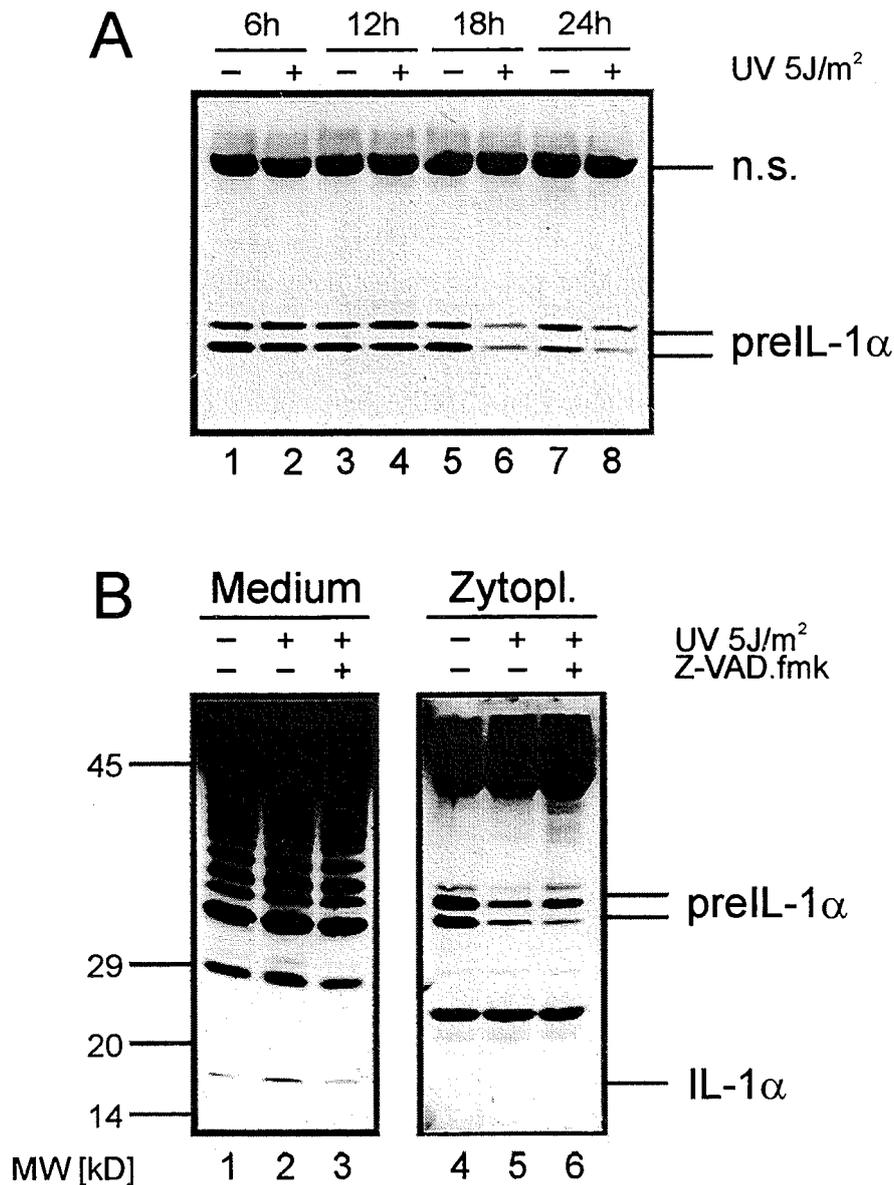
Wie zuvor beschrieben worden ist, wird in XPA-Fibroblasten die späte Aktivierung von NF- $\kappa$ B nach UV-Bestrahlung durch das Interleukin-1 $\alpha$  vermittelt. Da dieser Effekt mit neutralisierenden Antikörpern gegen IL-1 $\alpha$  hemmbar ist, muß IL-1 $\alpha$  von bestrahlten Zellen vermehrt ausgeschieden worden sein, um dann auf dieselben Zellen oder Nachbarzellen wirken zu können.

Aufgrund der Beobachtung, daß die Menge der IL-1 $\alpha$ -mRNA in diesen Zellen nach UV-Bestrahlung nicht erhöht ist und der Kenntnis, daß IL-1 $\alpha$  als Vorläuferprotein synthetisiert wird, das durch proteolytische Spaltung ins Medium abgegeben werden kann, wäre es möglich, daß diese proteolytische Aktivität infolge der UV-Bestrahlung von Fibroblasten erhöht ist. Dies sollte in einer Abnahme der zellulären Menge des IL-1 $\alpha$ -Vorläufers (preIL-1 $\alpha$ ) bzw. in einer Zunahme der extrazellulären Menge an IL-1 $\alpha$  nachzuweisbar sein. Die endogene Menge von preIL-1 $\alpha$  ist in den verwendeten Fibroblasten sehr gering. Daher wurde in XPA-Fibroblasten das preIL-1 $\alpha$ -Protein transient überexprimiert. Die verwendeten Expressionsvektoren kodieren für ein Fusionprotein des humanen preIL-1 $\alpha$ , das am C-Terminus ein FLAG-Epitop trägt. Das „reife“ IL-1 $\alpha$  ist das C-terminale Spaltprodukt des Vorläufers. Daher kann sowohl der Vorläufer als auch das „reife“ IL-1 $\alpha$  durch einen Antikörper, der gegen das FLAG-Epitop gerichtet ist, nachgewiesen werden.

Um zu prüfen, zu welchem Zeitpunkt nach der UV-Bestrahlung die Spaltung von preIL-1 $\alpha$  am höchsten ist, wurden transient transfizierte XPA-Fibroblasten mit 5 J/m<sup>2</sup> UVC bestrahlt und zu den angegebenen Zeiten Zytoplasmaextrakte präpariert. Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse wurden die Mengen an exogenem preIL-1 $\alpha$  bestimmt. Die Identität der exogenen preIL-1 $\alpha$ -Banden wurde in Vorexperimenten abgesichert (nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, daß erst 18 Stunden nach der Bestrahlung eine deutliche Spaltung des preIL-1 $\alpha$  stattfindet (Abb. 24A). Für das Vorläuferprotein von IL-1 $\beta$  ist bekannt, daß es durch das Enzym Caspase-1 gespalten und aktiviert wird. Diese Spaltung kann durch spezifische Inhibitoren verhindert werden (Zhu *et al.*, 1995; Nicholson und Thornberry, 1997). Daher wurde untersucht, ob die Spaltung des preIL-1 $\alpha$  bzw. die Freisetzung des „reifen“ IL-1 $\alpha$  durch Caspase-Inhibitoren gehemmt wird. Dazu wurde in das Medium von XPA-Fibroblasten, die das preIL-1 $\alpha$  transient überexprimierten, unmittelbar nach der UV-Bestrahlung der Caspase-

Inhibitor Z-VAD.fmk gegeben. 24 Stunden später wurde das extrazelluläre IL-1 $\alpha$  aus dem konditionierten Medium unbehandelter oder behandelter Zellen immunpräzipitiert. Parallel dazu wurde das preIL-1 $\alpha$  mit einem Antikörper, der gegen das humane IL-1 $\alpha$  gerichtet ist, aus den Zytoplasmaextrakten immunpräzipitiert.

24 Stunden nach der UV-Bestrahlung war die Menge des „reifen“ IL-1 $\alpha$  im Medium erhöht. Parallel dazu zeigte sich eine deutliche Spaltung des pre IL-1 $\alpha$  in der Zelle (Abb. 24B, vergleiche Bahn 1 und 2 sowie Bahn 4 und 5). Die Behandlung der Zellen mit dem Caspase-Inhibitor hemmte sowohl die Spaltung des Vorläuferproteins, als auch die Freisetzung des „reifen“ IL-1 $\alpha$  ins Medium (Abb. 24B, vergleiche Bahn 2 und 3 sowie Bahn 5 und 6). Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigte, daß in Fibroblasten die IL-1 $\alpha$ -Spaltung nach UV-Bestrahlung von der Aktivität von Caspasen abhängen könnte.



**Abb. 24: Die Prozessierung des preIL-1 $\alpha$  ist durch Caspase-Inhibitoren hemmbar**

**A.** XPA-Fibroblasten wurden mit einem Expressionsvektor, der für das Vorläuferprotein des IL-1 $\alpha$  (preIL-1 $\alpha$ ) kodiert, transient transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion blieben die Zellen entweder unbehandelt oder wurden mit 5 J/m<sup>2</sup> UVC bestrahlt. Zu den angegebenen Zeiten wurden Zytoplasmaextrakte präpariert und das preIL-1 $\alpha$  mit einem Antikörper, der gegen das menschliche IL-1 $\alpha$  gerichtet ist (#1190), immunpräzipitiert. In der Western-Blot-Analyse wurden die Mengen an preIL-1 $\alpha$  mit einem zweiten IL-1 $\alpha$ -spezifischen Antikörper (AB-200NA) nachgewiesen.

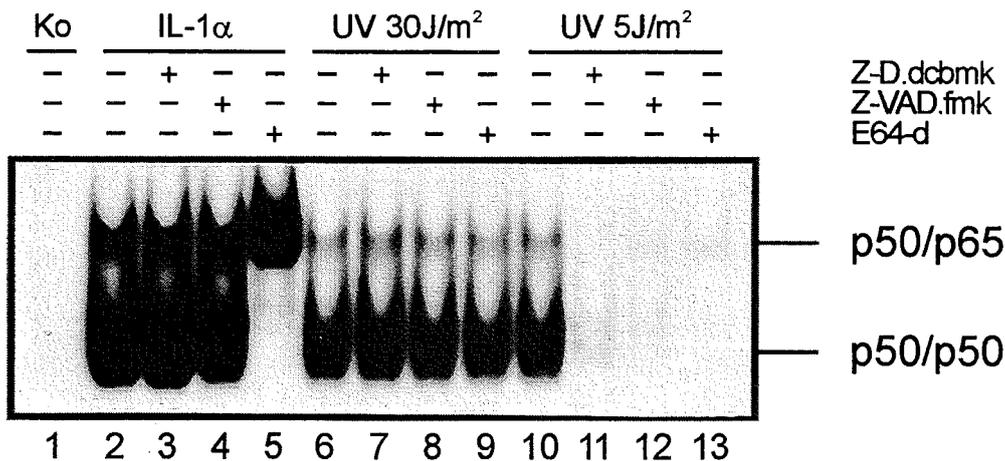
**B.** In XPA-Fibroblasten wurde das Vorläuferprotein transient überexprimiert. Die Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit 5 J/m<sup>2</sup> UVC bestrahlt. Wo gekennzeichnet, wurde unmittelbar nach der Bestrahlung der Caspase-Inhibitor Z-VAD.fmk (50  $\mu$ M) ins Kulturmedium gegeben. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurde das Kulturmedium abgenommen und Zytoplasma- bzw. Kernextrakte präpariert. Aus dem Medium wurde das extrazelluläre, exogene IL-1 $\alpha$ -mit einem Antikörper, der gegen das FLAG-Epitop gerichtet ist, immunpräzipitiert. Aus den Zytoplasmaextrakten wurde das preIL-1 $\alpha$  mit einem IL-1 $\alpha$ -spezifischen Antikörper (#1190) immunpräzipitiert. In der Western-Blot-Analyse wurden anschließend die Mengen an IL-1 $\alpha$  bzw. preIL-1 $\alpha$  mit einem zweiten IL-1 $\alpha$ -spezifischen Antikörper (AB-200NA) nachgewiesen.

### **Inhibitoren von Caspasen und ein Calpain-Inhibitor hemmen die späte NF- $\kappa$ B-Aktivierung**

Aus den Daten der vorigen Experimente läßt sich schließen, daß in primären Fibroblasten eine UV-vermittelte Erhöhung der Caspasen-Aktivität zur Sekretion von IL-1 $\alpha$  führt. Wenn die späte NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch freigesetztes IL-1 $\alpha$  reguliert ist, dann sollte diese NF- $\kappa$ B-Aktivierung auch durch Caspase-Inhibitoren hemmbar sein. Da das Enzym Calpain in der Zelle das IL-1 $\alpha$  Vorläuferprotein spaltet (Kobayashi *et al.*, 1990; Carruth *et al.*, 1991; Kavita und Mizel, 1995), wurde auch ein spezifischer Inhibitor gegen dieses Enzym (Mehdi, 1991) getestet.

Hierzu wurden XPA-Fibroblasten mit 5 J/m<sup>2</sup> bestrahlt und unmittelbar nach der Bestrahlung verschiedene Caspase-Inhibitoren bzw. der Calpain-Inhibitor E64-d ins Kulturmedium gegeben. Um eventuelle Einflüsse der Inhibitoren auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch IL-1 $\alpha$  oder auf die frühe DNA-Schaden-unabhängige Aktivierung zu berücksichtigen, wurden Kontrollzellen mit IL-1 $\alpha$  behandelt oder mit 30 J/m<sup>2</sup> UVC bestrahlt.

Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B wurde in Gelretardationsanalysen 30 Minuten nach der IL-1 $\alpha$ -Behandlung oder sechs Stunden (30 J/m<sup>2</sup>) bzw. 24 Stunden (5 J/m<sup>2</sup>) nach der Bestrahlung bestimmt. Die NF- $\kappa$ B DNA-Bindeaktivität war durch alle Induktoren stark erhöht (Abb. 25, vergleiche Bahn 1 mit Bahn 2, 6 und 10). Die späte NF- $\kappa$ B-Aktivierung konnte tatsächlich durch die Caspase-Inhibitoren und den Calpain-Inhibitor deutlich gehemmt werden (Abb. 25, vergleiche Bahn 10 mit Bahn 11-13). Dagegen blieb die frühe Aktivierung von NF- $\kappa$ B unbeeinflusst (Abb. 25, Bahn 6-9). Ebenso hatten die Caspase-Inhibitoren keinen Effekt auf die IL-1 $\alpha$ -vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Abb. 25, Bahn 3 und 4). Interessanterweise wurde durch den Calpain-Inhibitor die durch IL-1 $\alpha$  induzierte Bindung des p50-Homodimers vollständig gehemmt und die Bindung des p50/p65-Heterodimers stark erhöht (Abb. 25, Bahn 5). Dies war auch bei der längeren Exposition für die späte Aktivierung durch UV erkennbar. Dieses Ergebnis macht eine Beteiligung von Caspasen und/oder von Calpain an der UV-induzierten DNA-Schaden-abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung sehr wahrscheinlich.



**Abb. 25: Inhibitoren von Caspasen und von Calpain hemmen die späte UV-vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in XPA-Fibroblasten**

XPA-Fibroblasten blieben entweder unbehandelt oder wurden mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  inkubiert bzw. mit 5 J/m<sup>2</sup> oder 30 J/m<sup>2</sup> UVC bestrahlt. Wo gekennzeichnet wurden unmittelbar nach der Bestrahlung die Caspase-Inhibitoren Z-VAD.fmk (50  $\mu$ M) und Z-D.dcbmk (100  $\mu$ M) oder der Calpain-Inhibitor E64-d (50  $\mu$ M) ins Kulturmedium gegeben. 30 min. nach der IL-1 $\alpha$  Zugabe, sechs Stunden nach der Bestrahlung mit 30 J/m<sup>2</sup> UVC und 24 Stunden nach der Bestrahlung mit 5 J/m<sup>2</sup> UVC wurden die Zellen geerntet und Kernextrakte präpariert. Jeweils 6  $\mu$ g Kernextrakt wurden mit <sup>32</sup>P-markierten HIV-1 Oligonukleotiden inkubiert, auf einem nativen 5 % Acrylamidgel aufgetrennt. Die Abbildung zeigt den Ausschnitt des Autoradiogramms mit den DNA-Proteinkomplexen.

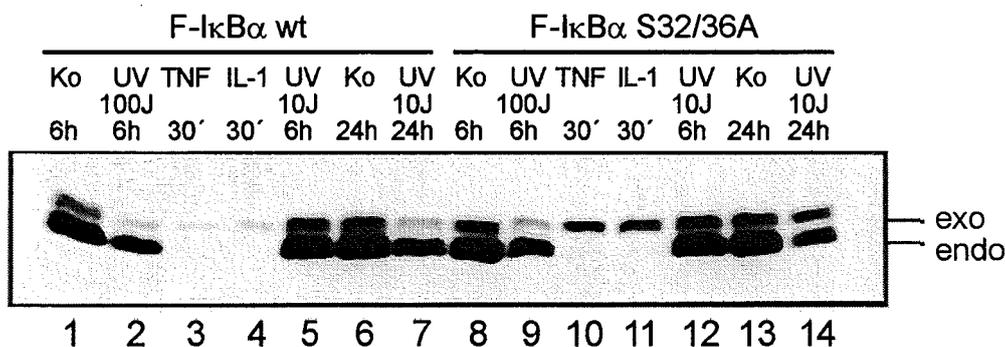
Z-D.dcbmk = Z-Asp-2,6-dichlorbenzoyloxymethylketon, Z-VAD.fmk = Z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketon.

### Die N-terminalen Serine des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins sind für die späte UV-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B notwendig

In den obigen Abschnitten wurde dargelegt, daß UV-Strahlung die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B über zwei unterschiedliche Mechanismen bewirkt. Der frühe Mechanismus der Aktivierung ist unabhängig von den Serinen an den Positionen 32 und 36 des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins. Die verzögerte NF- $\kappa$ B-Aktivierung geht von einer UV-vermittelten DNA-Schädigung aus und wird hauptsächlich über das Zytokin IL-1 $\alpha$  vermittelt. Nimmt man diese Kriterien als Voraussetzung, dann sollte die späte NF- $\kappa$ B-Aktivierung, im Gegensatz zur frühen Aktivierung, von der Existenz dieser beiden Serine abhängen.

Um diese Hypothese zu beweisen wurde in XPA-Fibroblasten das Wildtyp-I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein sowie die Serin-Mutante (F-I $\kappa$ B $\alpha$  S32/36A) transient überexprimiert. Es wurden Bedingungen gewählt, die eine Unterscheidung zwischen der frühen und der verzögerten NF- $\kappa$ B-Aktivierung zuließen. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen induziert.

Wie in den Untersuchungen mit HeLa-Zellen, wurde der Abbau des endogenen I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins und der des exogenen Wildtyp-I $\kappa$ B $\alpha$  durch die Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\alpha$  vermittelt und der Abbau der Serin-Mutante war gehemmt (Abb. 26, vergleiche Bahn 3 und 4 mit Bahn 10 und 11). Sechs Stunden nach der Bestrahlung mit hohen UV-Dosen (100 J/m<sup>2</sup>) waren das endogene I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein, die exogene Wildtyp-Form als auch die Serin-Mutante von I $\kappa$ B $\alpha$  abgebaut worden (Abb. 26, Bahn 2 und 9). Im Gegensatz dazu bewirkte die Bestrahlung mit niedrigen UV-Dosen (10 J/m<sup>2</sup>), die nur die späte NF- $\kappa$ B-Aktivierung zuläßt, den Abbau des endogenen als auch des exogenen Wildtyp-I $\kappa$ B $\alpha$ . Sie konnte aber den Abbau der exogenen Serin-Mutante nicht induzieren (Abb. 26, vergleiche Bahn 6 und 7 mit Bahn 13 und 14). Dieses Experiment steht mit den oben dargestellten Ergebnissen im Einklang, daß die späte UV-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung über das Zytokin IL-1 $\alpha$  vermittelt wird und daß die frühe und späte Aktivierung durch unterschiedliche Mechanismen reguliert sind.



**Abb. 26: Die späte NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch UVC erfordert die N-terminalen Serine**

XPA-Fibroblasten wurden mit jeweils 2  $\mu$ g Expressionsvektoren, die für das Epitop-markierte Wildtyp I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein (FLAG-I $\kappa$ B $\alpha$  wt) oder das punktmutierte I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein (FLAG-I $\kappa$ B $\alpha$  S32/36A) kodieren, transient transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion blieben die Zellen unbehandelt oder wurden wie folgt stimuliert: 100 J/m<sup>2</sup> UVC (6 h), 10 J/m<sup>2</sup> UVC (6 h und 24 h), jeweils 10 ng/ml TNF $\alpha$  bzw. IL-1 $\alpha$  (15 min.). Nach den angegebenen Zeiten wurde in je 80  $\mu$ g zytosolischem Extrakt die Mengen an I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein mittels der Western-Blot-Analyse bestimmt. In der Abbildung geben „endo“ bzw. „exo“ die Lage der endogenen bzw. der epitopmarkierten exogenen I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteine an.

Für die späte UV-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde an Hand von diesen Resultaten gezeigt, daß es sich um einen Mechanismus handelt, der abhängig von einem DNA-Schaden zur Prozessierung des Vorläuferpeptides für IL-1 $\alpha$  führt, welches dann über einen autokrinen/parakrinen Mechanismus die Aktivierung von NF- $\kappa$ B bewirkt.

## Diskussion

Ultraviolette Strahlung führt aufgrund der Schädigung zellulärer Komponenten zu einer veränderten Expression spezifischer Gene, die Ursache für die Transformation von Zellen und Entstehung von Tumoren sein kann. Bei der Regulation solcher Gene spielt der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B eine entscheidende Rolle.

Viele Arbeiten der letzten Jahre haben nachgewiesen, daß die Quelle des Signals, welches viele UV-induzierbaren Prozesse aktiviert, innerhalb oder nahe der Zellmembran lokalisiert ist (Devary *et al.*, 1992; Schieven *et al.*, 1994; Warmuth *et al.*, 1994; Coffey *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1996; Knebel *et al.*, 1996; Rosette und Karin, 1996). Die Hemmung von Phosphatasen durch UV-Strahlung führt indirekt zur Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die nicht auf der Bindung eines Liganden beruht (Knebel *et al.*, 1996). Einige Rezeptoren, die durch UV-Strahlung aktiviert werden, wie der IL-1R (Sachsenmaier *et al.*, 1994) oder der TNFR (Rosette und Karin, 1996), könnten die Aktivierung von NF- $\kappa$ B vermitteln. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, daß NF- $\kappa$ B in Zellen ohne Zellkern (Zytoplasten) durch UV aktivierbar ist (Devary *et al.*, 1993) und daß NF- $\kappa$ B in Zytoplasmaextrakten, die Zellmembranen enthalten, durch UVB-Strahlung aktiviert wird (Simon *et al.*, 1994). Es gibt aber auch Befunde, die eine deutliche Abhängigkeit der UV-vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung von der UV-induzierten DNA-Schädigung belegen (Stein *et al.*, 1989b; Yarosh *et al.*, 1993; Yarosh und Kripke, 1996). Die Frage war, welche Schädigungen durch UV-Strahlung und welche zellulären Signalwege zu der beobachteten Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen.

Als geeignetes Modellsystem, um einen Einfluß von DNA-Schäden zu untersuchen, wurden Wildtyp-Fibroblasten und XPA-Zellen verwendet.

In Wildtyp-Fibroblasten (NFB) werden DNA-Schäden durch die Exzisionsreparatur entfernt. Im Gegensatz dazu bleibt in reparaturdefizienten Zellen (XPA) der DNA-Schaden bestehen. Die späte Aktivierung von NF- $\kappa$ B in den reparaturdefizienten Zellen erfolgt mit deutlich niedrigeren UV-Dosen als in den Wildtyp-Zellen. Die offensichtlichste Erklärung dieses Befundes ist, daß bei diesen niedrigen Dosen in XPA-Zellen schon eine ausreichende Anzahl von Schäden persistiert, während dies in Wildtyp-Zellen aufgrund der ablaufenden Reparatur nicht der Fall ist. Dieser akkumulierte Schaden ist die Ursache für die verzögerte NF- $\kappa$ B-

Aktivierung. Die frühe NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist nicht unterschiedlich zwischen den Zellen, sie beruht daher nicht auf einer Akkumulation der DNA-Schäden. Dabei sind Wildtyp-Fibroblasten nicht generell unempfindlicher gegenüber der UV-Strahlung, denn die frühe NF- $\kappa$ B-Aktivierung erfolgt in beiden Zellen mit gleicher Effizienz.

Diese Daten lassen sich nur mit der Existenz zweier unterschiedlicher Mechanismen für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch UVC erklären, wobei eine frühe NF- $\kappa$ B-Aktivierung DNA-Schaden-unabhängig erfolgt und eine späte NF- $\kappa$ B-Aktivierung ein DNA-Schaden-abhängiger Vorgang ist.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden diese beiden Mechanismen in ihren Einzelheiten untersucht.

### **Mechanismus der frühen UV-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung**

Nach UV-Bestrahlung erfolgt eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B in zwei Wellen. Die erste Welle zeigt eine schwache Induktion nach 30-60 Minuten und hat je nach Zelltyp und verwendeter UV-Dosis ein Maximum bei vier bis acht Stunden (Stein *et al.*, 1989b; diese Arbeit: Abb. 5 und 21). Bei hohen UV-Dosen überlagern sich die ersten und zweiten Aktivierungen, so daß daraus eine verzögerte und langanhaltende Anregung von bis zu 42 Stunden resultiert (Abb. 5B). Parallel zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung kommt es zum Abbau des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins. Der aktivierte Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B induziert jedoch wieder die Resynthese des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins (Haskill *et al.*, 1991; Grilli, *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1994), welches in den Zellkern wandert, dort die DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B hemmt und die Induktion beendet (Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1995). Bei niedrigen UV-Dosen erreicht die zelluläre Konzentration an I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein längerfristig wieder die basalen Werte (etwa nach 16-24 Stunden). Bei höheren UV-Dosen ist der I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau jedoch stärker und wird von einer verzögerten zweiten Aktivierungswelle verlängert.

Die UV-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B erfolgt relativ langsam, wenn man sie mit der Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren vergleicht, wie p62<sup>TCF</sup> (Sachsenmaier *et al.*, 1994; Price *et al.*, 1996), cJun/ATF-2 (Devary *et al.*, 1992; Radler-Pohl *et al.*, 1993; Livinstone *et al.*, 1995; van Dam *et al.*, 1995) und CREB (Iordanov *et al.*, 1997a). Ebenso erfolgt die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  und TPA sehr viel schneller als durch UV-

Strahlung. Dies ließ vermuten, daß sich die Mechanismen der UV-induzierten und der Zytokin-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung unterscheiden.

### **Die UV-induzierte Hemmung der Transkription oder Translation kann die UV-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B nicht erklären**

Das kurzlebige I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein hält den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B im Zytolplasma der Zelle zurück. Um diese Aufgabe erfüllen zu können, muß es ständig nachsynthetisiert werden. UV-Strahlung aktiviert NF- $\kappa$ B durch die Degradierung des inhibitorischen I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins, ebenso wie es Zytokine tun. Die meisten Induktoren von NF- $\kappa$ B wirken über eine induzierte Phosphorylierung der N-terminalen Serine des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins, was den schnellen Ubiquitin-abhängigen Abbau zur Folge hat (Brockman *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995; Traenckner *et al.*, 1995). Der UV-induzierte Abbau erfolgt jedoch viel langsamer. Da UV-Strahlung nicht nur die Replikation der Zelle, sondern auch die Transkription und Translation hemmen kann (Hackett und Sauerbier, 1975; Lehmann *et al.*, 1979; Mayne und Lehmann, 1982; Iordanov, pers. Mitteilung), würde eine Hemmung der Neusynthese des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins unweigerlich zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen. Dabei würde die Menge des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins nicht, wie beim induzierten Abbau schnell verschwinden, sondern langsam abnehmen.

Es zeigte sich, daß bei einer gleich starken Hemmung der Proteinsynthese durch UV-Strahlung und durch einen Translations-Inhibitor, der selbst keine Signaltransduktion auslöst (Iordanov *et al.*, 1997b), UV-Strahlung NF- $\kappa$ B viel stärker als der Proteinsynthese-Inhibitor aktivierte (Abb. 10B). Damit konnte die Induktion von NF- $\kappa$ B als Folge einer unspezifischen Hemmung der Proteinsynthese durch UV-Strahlung ausgeschlossen werden. Diese Folgerung wurde ergänzend durch die Beobachtung gestützt, daß einige der verwendeten I $\kappa$ B $\alpha$ -Mutanten nach UV-Bestrahlung der Zellen nicht abgebaut werden. Eine unspezifische Proteinsynthesehemmung durch UV sollte sich auch auf den Abbau dieser Mutanten auswirken. Dies stimmt aber nur dann, wenn sich die Lebensdauer der Mutanten gegenüber dem Wildtyp nicht unterscheidet. Tatsächlich wurden keine Unterschiede festgestellt (Aoki *et al.*, 1996; Beauparlant *et al.*, 1996; Krappmann *et al.*, 1996; Van Antwerp und Verma, 1996). Nachdem die Hemmung der Proteinsynthese als Ursache der UV-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung ausgeschlossen werden konnte, war die Frage, ob eine UV-induzierte Hemmung der Transkription die Aktivierung von NF- $\kappa$ B bewirkt.

Ein DNA-Schaden in aktiv transkribierten Genen führt effizienter zur Stabilisierung von p53 (Yamaizumi und Sugano, 1994; Blattner *et al.*, 1997) und zur Expression der Kollagenase I (Blattner *et al.*, 1997) als ein Schaden in nicht-transkribierten Genen (Yamaizumi und Sugano, 1994). Demnach scheint es ein System zu geben, welches DNA-Schäden in Abhängigkeit von der Transkription erkennt. Solch ein System könnte einen Faktor enthalten, der den arretierten Transkriptionskomplex erkennt und dann Signale erzeugt die u.a. zur Stabilisierung von p53 führen. Der Faktor der dabei eine Rolle spielen könnte ist der basale Transkriptionsfaktor TFIID, der sowohl für die Transkription als auch für die Exzisionsreparatur notwendig ist (Draphkin *et al.*, 1994; Roy *et al.*, 1994; Svejstrup *et al.*, 1995). In diesem TFIID-Komplex befindet sich eine Kinase (cdk7/MO15) die durch Phosphorylierung der RNA-Polymerase II die Transkription aktivieren soll (Roy *et al.*, 1994). Bestrahlung mit UVC verringert die Aktivität dieser Kinase (Adamczewski *et al.*, 1996). Diese Hemmung könnte einerseits die Transkriptionsrate beeinflussen und andererseits ein Signal erzeugen, welches in einer veränderten Genexpression und/oder p53-Stabilisierung endet. Der Transkriptions-Inhibitor DRB hemmt ebenfalls diese Kinase. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ , welche die Elongation der Transkription deutlich gehemmt (Yankulov *et al.*, 1995) wird jedoch weder p53 stabilisiert noch NF- $\kappa\text{B}$  aktiviert (nicht gezeigt). Erst bei einer höheren Konzentration (250  $\mu\text{M}$ ), die zu einer vollständigen Hemmung der cdk7/MO15 führt, erfolgt eine Stabilisierung von p53 (Blattner, pers. Mitteilung) und eine Aktivierung von NF- $\kappa\text{B}$ .

Die hohe Konzentration des Inhibitors bewirkt jedoch ebenso eine vollständige Hemmung der Transkription der kurzlebigen I $\kappa\text{B}\alpha$ -mRNA, was indirekt zur beobachteten Aktivierung von NF- $\kappa\text{B}$  führt. Somit läßt sich ein Signaltransduktionsweg ausgehend vom Transkriptionskomplex ausschließen.

Die Behandlung von HeLa-Zellen mit vollständig hemmenden Konzentrationen an DRB (250  $\mu\text{M}$ ) und eine Bestrahlung mit 100  $\text{J}/\text{m}^2$  UVC bewirken zwar vergleichbare Kinetiken der NF- $\kappa\text{B}$ -Aktivierung, jedoch unterscheidet sich der Einfluss beider Behandlungen auf die zelluläre mRNA-Menge von I $\kappa\text{B}\alpha$  deutlich (Abb. 8). Nach UV-Bestrahlung konnte keine starke Abnahme der I $\kappa\text{B}\alpha$ -mRNA nachgewiesen werden.

Diese Befunde haben gezeigt, daß weder die Hemmung der Translation noch die der Transkription für die UV-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa\text{B}$  relevant ist.

### **Membranrezeptoren tragen nicht zur UV-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung bei**

Wie ich gezeigt habe, ist der UV-vermittelte I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau nicht die Folge einer unspezifischen Hemmung der I $\kappa$ B $\alpha$ -Synthese, sondern ein induzierter Abbau des Proteins. Der Signalweg, der diese I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung steuert, kommt offensichtlich nicht aus dem Zellkern. Dies warf die Frage auf, ob die Aktivierung von Membran-Rezeptoren in die UV-induzierten Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  bzw. NF- $\kappa$ B-Aktivierung involviert ist.

Rezeptoren für EGF (Sachsenmaier *et al.*, 1994; Knebel *et al.*, 1996), für TNF $\alpha$  (Rosette und Karin, 1996) und für IL-1 $\alpha$  (Sachsenmaier *et al.*, 1994) werden durch UV-Strahlung aktiviert und führen über die Stimulation nachfolgender Protein-Kinasen zur schnellen UV-induzierten Genexpression. Diese UV-induzierte Genexpression ist durch den generellen Rezeptor-Inhibitor Suramin (Betsholtz *et al.*, 1986) oder durch Vorbehandlung mit entsprechenden Wachstumsfaktoren hemmbar (Sachsenmaier *et al.*, 1994).

Im Gegensatz zur Aktivierung durch das Medium UV-bestrahlter Zellen („EPIF-Medium“), welches sezernierte Zytokine und Wachstumsfaktoren enthält, ist Suramin nicht in der Lage, die UV-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu hemmen (Abb. 11A). Eine ähnliche Suramin-Resistenz findet sich für den UV-induzierten Signalweg, der zur p38-MAP-Kinase führt (Jordanov *et al.*, 1997a; diese Arbeit: Abb. 11B). Diese Kinase befindet sich jedoch nicht in der Signalkette der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch UVC. Denn der p38-spezifische Inhibitor SB 203580 (Cuenda *et al.*, 1995) ist nicht in der Lage den frühen I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau zu hemmen (nicht gezeigt). Die Hypothese der Rezeptor-unabhängige Aktivierung wird bekräftigt durch die Beobachtung, daß eine 2stündige Vorbehandlung mit IL-1 $\alpha$  (Abb. 12) oder TNF $\alpha$  (nicht gezeigt) nicht in der Lage ist, die frühe UV-vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu blockieren. Weshalb diese Zytokin-Rezeptoren, obwohl sie durch UV-Strahlung aktiviert werden (Rosette und Karin, 1996), nicht zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung führen, ist nicht bekannt.

Eine ähnliche Situation wurde jedoch auch bei der Induktion der Transkription eines stabil transfizierten HIV-CAT-Konstruktes in HeLa-Zellen gefunden. UVC-Strahlung und TNF $\alpha$  führen zu einer synergistischen Stimulation der HIV-Expression, jedoch nur zu einer additiven Induktion der Transkription des Oncogens *c-jun*. Die Autoren schlossen daraus, daß UV-Strahlung und TNF $\alpha$  nicht über denselben Mechanismus zur HIV-Expression führen, aber daß für die Induktion von *c-jun* teilweise überlappende Aktivierungsmechanismen für die beiden Induktoren bestehen (Valerie *et al.*, 1996).

### **Weder die N-terminalen Serine, noch eine Tyrosin-Phosphorylierung bestimmen den UV-induzierten Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$**

Die UV-induzierte Verringerung der zellulären I $\kappa$ B $\alpha$ -Menge war nicht durch eine UV-induzierte Hemmung der Neusynthese von I $\kappa$ B $\alpha$  zu erklären. Das I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein wird offensichtlich durch einen UV-spezifischen Mechanismus degradiert. Damit Komponenten des zellulären Proteinabbaus abzubauen Proteine erkennen können, müssen diese entsprechend markiert sein. Dies erfolgt in der Zelle häufig durch das Anhängen von Ubiquitinresten. Ein so gekennzeichnetes Protein wird anschließend durch das Proteasom degradiert. Das I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein wird für die Ubiquitinierung durch Phosphorylierung zweier Serine im N-Terminus markiert (Brockman *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995; Traenckner *et al.*, 1995).

In dieser Arbeit konnte ich nachweisen, daß UV durch einen anderen, bisher nicht bekannten Mechanismus, NF- $\kappa$ B aktiviert. Auch bei diesem Mechanismus kommt es zur I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung, die jedoch nicht von der Phosphorylierung der beiden Serine an den Positionen 32 und 36 abhängt. Demnach scheint weder die erst kürzlich klonierte I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase (DiDonato *et al.*, 1997; Régnier *et al.*, 1997) noch die zuvor isolierte Ubiquitin-abhängige I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase (Chen *et al.*, 1996) für den UV-vermittelten Abbau verantwortlich zu sein, da beide I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase das I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein an diesen N-terminalen Serinen phosphorylieren.

Ein weiterer Mechanismus aktiviert NF- $\kappa$ B unabhängig von der Degradierung des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins. So führt die Phosphorylierung des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins an einem Tyrosinrest zur Dissoziation des Komplexes von I $\kappa$ B $\alpha$  und NF- $\kappa$ B, aber nicht zum Abbau des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins (Imbert *et al.*, 1996). Die UV-induzierte Phosphorylierung des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins an einem Tyrosinrest konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Es ist im Gegenteil eher fraglich, ob nach UV-Bestrahlung überhaupt eine Modifikation des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins in Form einer Phosphorylierung erfolgt. In keinem der durchgeführten Experimente konnte nach UV-Bestrahlung ein verändertes Laufverhalten des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins in der SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen werden, das für ein phosphoryliertes I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein (z.B. nach Behandlung mit TNF $\alpha$ ) charakteristisch ist (Brockman *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1995; Traenckner *et al.*, 1995; diese Arbeit: Abb. 18). Endgültig ausschließen ließe sich dies durch Immunpräzipitation eines I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins, das nicht mehr konstitutiv durch die Casein

Kinase II (Barroga *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1996; McElhinny *et al.*, 1996; Schwarz *et al.*, 1996) phosphoryliert werden kann, aus UV-bestrahlten <sup>32</sup>P-Orthophosphat-markierten Zellen.

### **Im C-Terminus von IκBα befinden sich essentielle Sequenzen für den UV-vermittelten Abbau**

Die Ankyrin-Wiederholungen im mittleren Teil des IκBα-Proteins vermitteln die Bindung an die NF-κB-Proteine (Inoue *et al.*, 1992b; Hatada *et al.*, 1993) und sind für den konstitutiven Abbau des Proteins notwendig, für den induzierten Abbau aber entbehrlich (Krappmann *et al.*, 1996). Mit Ausnahme der beiden Lysine kommt dem N-Terminus von IκBα offensichtlich keine Aufgabe für den UV-induzierten Abbau zu. Die Rolle des C-Terminus bei der induzierten Degradierung des IκBα-Proteins wird jedoch unterschiedlich beurteilt (siehe Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit). Daher war es interessant zu sehen, ob dieser Bereich eventuell für den UV-vermittelten Abbau als regulatorische Domäne dient. Nach Überexpression C-terminaler Deletionsmutanten (siehe Abb. 16) in HeLa-Zellen wurde deren induzierter Abbau durch UV-Strahlung untersucht und mit dem Abbau durch TNFα verglichen. Es stellte sich heraus, daß eine Mutante mit einer Länge von 287 Aminosäuren in UV-bestrahlten Zellen abgebaut wird, eine nur um zehn Aminosäuren kürzere Mutante (HA-IκBα 1-277) aber nicht mehr. Dabei handelt es sich nicht um eine intrinsische Stabilität dieser Mutante, da diese nach TNFα-Behandlung abgebaut wird. Eine weitere Verkürzung dieses Bereiches (AS 277-287) um vier bzw. sechs Aminosäuren ergab eine Verringerung des Abbaus auf etwa die Hälfte. Eine für den UV-induzierten Abbau eventuell notwendige Phosphorylierungsstelle befindet sich nicht innerhalb dieses Bereiches. Dies konnte mittels Austausch der einzigen phosphorylierbaren Aminosäure (Serin 283) in diesem Bereich durch ein nicht phosphorylierbares Alanin nachgewiesen werden.

Wie hängt der beobachtete Abbau von IκBα von diesen zehn C-terminalen Aminosäuren ab?

Das Ubiquitin-System spielt eine wichtige Rolle beim induzierten Abbau von IκBα (Chen *et al.*, 1996). Die von Chen beschriebene IκBα-Kinase wird u.a. durch das Anhängen von Ubiquitin-Peptiden aktiviert. Dabei sind die E3-Enzyme (Ubiquitin-Ligasen), welche die Aktivierung der Kinase bzw. die Ubiquitinierung von IκBα durchführen, verschieden (siehe Einleitung dieser Arbeit). Es ist noch nicht geklärt ob und wie es zu einer induzierten Aktivierung des Ubiquitin-Systems kommt. In jüngster Zeit ist jedoch auch eine IκBα-Kinase kloniert worden deren Aktivität nicht durch Ubiquitinierung reguliert ist (DiDonato *et al.*,

1997; Régnier *et al.*, 1997). Das oben beschriebene Motiv von 10 Aminosäuren könnte als Erkennungs- und/oder Bindestelle einer Ubiquitin-Ligase dienen, welche sich von der des TNF $\alpha$ -induzierten Abbaus unterscheidet und demnach an einer anderen Stelle des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins binden könnte. Für die TNF $\alpha$ -induzierte Degradierung ist zusätzlich zur Phosphorylierung der beiden Serine und der Ubiquitinierung der Lysine im N-Terminus die QL-reiche Region im Anschluß an die sechste Ankyrin-Wiederholung essentiell. Die Bedeutung dieser Region ist noch nicht bekannt. Es wäre aber möglich, daß es sich um die Bindestelle einer Ubiquitin-Ligase handelt. Nach UV-Bestrahlung könnte eine andere Ubiquitin-Ligase, welche an der oben beschriebenen Aminosäuren-Sequenz bindet, die Ubiquitinierung von I $\kappa$ B $\alpha$  durchführen.

Es muß nun geklärt werden, welche funktionelle Rolle diese Sequenz von zehn Aminosäuren für die UV-induzierte Degradierung des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins hat.

Die *E. coli*  $\beta$ -Galaktosidase ist in eukaryontischen Zellen ein sehr stabiles Protein. Durch Fusion mit der  $\delta$ -Domäne des cJun-Proteins ist die  $\beta$ -Galaktosidase in ein kurzlebiges Fusionsprotein umwandelbar. Damit wurde nachgewiesen, daß diese  $\delta$ -Domäne alleine ausreichend ist um den Ubiquitin-abhängigen Abbau von cJun zu vermitteln (Treier *et al.*, 1994). Analog zu diesen Experimenten könnte man die Aminosäuren-Sequenz von 277-287 aus dem C-Terminus des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins an die  $\beta$ -Galaktosidase fusionieren und untersuchen, ob diese allein ausreicht, um den Abbau des Fusionsproteins zu induzieren. Parallel dazu müßte das gesamte I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein, der gesamte C-Terminus bzw. der C-Terminus mit einer Deletion dieser zehn Aminosäuren untersucht werden. Würde der fragliche Bereich den Abbau vermitteln, so könnte man davon ausgehen, daß keine weitere Modifikation des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins nach UV-Bestrahlung notwendig ist. Ein Ausbleiben des Abbaus würde bedeuten, daß I $\kappa$ B $\alpha$  nach UV-Bestrahlung zusätzlich markiert bzw. modifiziert wird. Durch die sukzessive Verlängerung des C-Terminus bzw. durch die Kombination unterschiedlicher Domänen des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins, als Fusionsproteine mit der  $\beta$ -Galaktosidase, könnten in diesem System die notwendigen Regionen der UV-induzierten I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung bestimmt werden.

## Mechanismus der späten UV-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung

### Das Zytokin IL-1 $\alpha$ vermittelt die späte Aktivierung von NF- $\kappa$ B

Nur in XPA-Fibroblasten war es möglich, die späte DNA-Schaden-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung, getrennt von der frühen DNA-Schaden-unabhängigen Aktivierung, zu untersuchen, da nur in diesen Zellen eine Aktivierung mit niedrigen UV-Dosen erfolgt. Bei Verwendung höherer UV-Dosen kommt es zur Überlappung der frühen und späten Aktivierungen, was die Interpretation erschwert.

Die DNA-Schaden-abhängige Aktivierung war frühestens 20 Stunden nach der Bestrahlung nachweisbar. UV-bestrahlte Zellen geben geringe Mengen an Wachstumsfaktoren und Zytokinen ins Medium ab (Schorpp *et al.*, 1984; Rotem *et al.*, 1987), die in unbestrahlten Zellen die gleichen Reaktionen wie Bestrahlung hervorrufen (Krämer *et al.*, 1993; Yarosh *et al.*, 1993). Durch Blockierung der Wirkung dieser nach UV-Bestrahlung sezernierten Zytokine mit spezifischen neutralisierenden Antikörpern war es möglich, IL-1 $\alpha$  als maßgeblichen Vermittler der späten NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu identifizieren. Offensichtlich wird IL-1 $\alpha$  mit einer zeitlichen Verzögerung aus UV-bestrahlten Fibroblasten freigesetzt und bewirkt autokrin und/oder parakrin über den für IL-1 $\alpha$  typischen Mechanismus den Abbau des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins.

Dieser Abbau ist von der Phosphorylierung der N-terminalen Serine des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins abhängig. Mit Hilfe der I $\kappa$ B $\alpha$ -Serin-Mutante (F-I $\kappa$ B $\alpha$  S32/36A) und der Bestrahlung mit niedrigen UV-Dosen (5 J/m<sup>2</sup>) konnte nochmals bestätigt werden, daß die späte NF- $\kappa$ B-Aktivierung über das Zytokin IL-1 $\alpha$  reguliert ist und daß es für die frühe und die späte Aktivierung zwei unterschiedliche Mechanismen gibt. Mit diesen Befunden lassen sich nun auch die scheinbar widersprüchlichen Interpretationen über die Abhängigkeit der NF- $\kappa$ B-Aktivierung von einem UV-induzierten DNA-Schaden verstehen. In allen Untersuchungen, die einen Membran- oder zytoplasmatischen Mechanismus postulieren, wurden die Experimente für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung bis zu fünf Stunden nach der Bestrahlung analysiert (Devary *et al.*, 1993; Simon *et al.*, 1994). Diese Daten entsprechen denen, die in dieser Arbeit für die frühe Aktivierung von NF- $\kappa$ B gemacht wurden. Experimente, die eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung infolge des durch UV-induzierten DNA-Schadens rechtfertigen, wurden frühestens 24 Stunden nach der Bestrahlung analysiert und entsprechen der späten Aktivierung, die in dieser Arbeit beschrieben wurde.

Um die lange Zeitspanne erklären zu können, die zwischen Bestrahlung und später NF- $\kappa$ B-Aktivierung liegt, wurde davon ausgegangen, daß sich das sezernierte IL-1 $\alpha$  erst im Medium anreichern muß, bis es durch Bindung an seinen Rezeptor zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt.

Interleukin 1 (IL-1) ist ein Polypeptid, welches hauptsächlich von aktivierten Makrophagen und Monozyten gebildet wird und ein breites Wirkungsspektrum bei immunologischen und inflammatorischen Reaktionen zeigt. IL-1 wird jedoch auch von Fibroblasten, Keratinozyten und endothelialen Zellen synthetisiert (Dinarello, 1996). Es gibt zwei Formen des IL-1, das IL-1 $\alpha$  und das IL-1 $\beta$ . Beide werden als 31-33 kD Vorläuferformen (preIL-1) synthetisiert und anschließend in eine „reife“ 17 kD Form gespalten. Obwohl beiden IL-1-Vorläufern ein typisches Signalpeptid fehlt, werden die 17 kD Formen von Zellen freigesetzt. Offensichtlich werden sie nicht über das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgiapparat freigesetzt (Rubartelli *et al.*, 1990). Tatsächlich können IL-1 Moleküle weder im ER noch im Golgi nachgewiesen werden. Stattdessen findet man sie im Zytoplasma, der Zellmembran und extrazellulär (Matsushima *et al.*, 1986; Singer *et al.*, 1988). Bei den Enzymen, die für die Reifespaltung von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  identifiziert worden sind, handelt es sich um Calpain für preIL-1 $\alpha$  (Kobayashi *et al.*, 1990; Carruth *et al.*, 1991; Kavita und Mizel, 1995), und um das „IL-1 $\beta$  converting enzyme“ für preIL-1 $\beta$  (ICE; heute als Caspase-1 bezeichnet) (Cerretti *et al.*, 1992; Thornberry *et al.*, 1992; Nicholson und Thornberry, 1997). Die Freisetzung von IL-1 $\alpha$  ist ein selektiver Prozess und ist direkt mit seiner proteolytischen Spaltung verbunden. Dagegen ist die gelegentliche Freisetzung der 33 kD Vorläuferform die Folge einer Zellschädigung und geht mit der Freisetzung von Laktat-Dehydrogenase (LDH) einher (Watanabe und Kobayashi, 1994).

UV-Bestrahlung führt in HeLa-Zellen zu einer Akkumulation der IL-1 $\alpha$ -mRNA und zu einer verstärkten Neusynthese des preIL-1 $\alpha$ -Proteins (Krämer, 1991). In den hier verwendeten Fibroblasten konnte im Gegensatz zu HeLa-Zellen weder eine Erhöhung der Menge an IL-1 $\alpha$ -mRNA noch eine verstärkte Neusynthese des preIL-1 $\alpha$ -Proteins nach UV-Bestrahlung nachgewiesen werden. Da dennoch die späte NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch IL-1 $\alpha$ -neutralisierende Antikörper gehemmt werden kann, muß UV-Strahlung in diesen Zellen die Freisetzung von IL-1 $\alpha$  durch Spaltung des Vorläufers bewirken. Es ist mir jedoch nicht gelungen, im Medium UV-bestrahlter Zellen IL-1 $\alpha$  mit Hilfe eines spezifischen ELISAs

nachzuweisen. Offensichtlich war der verwendete ELISA nicht empfindlich genug für den Nachweis geringer Mengen an IL-1 $\alpha$  in Kulturüberständen.

Die Spaltung des IL-1 $\alpha$ -Vorläufers konnte in UV-bestrahlten XPA-Fibroblasten, die ein exogenes preIL-1 $\alpha$  transient überexprimieren, erst 18 Stunden nach der Bestrahlung nachgewiesen werden. Demnach ist nicht, wie zunächst angenommen worden war, das Akkumulation des IL-1 $\alpha$  im Medium für die Verzögerung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung verantwortlich, sondern die späte Spaltung des Vorläuferproteins.

### **Die UV-induzierte Spaltung von preIL-1 $\alpha$ erfolgt durch Caspasen oder durch Calpain**

IL-1-Vorläuferpeptide werden durch Cystein-Proteasen prozessiert. Auch bei den Caspasen handelt es sich um Cystein-Proteasen, die wichtige Schlüsselfunktionen beim programmierten Zelltod, der sogenannten Apoptose, haben (Nicholson und Thornberrey, 1997). Durch Verwendung von Caspase-Inhibitoren war es möglich sowohl die Spaltung des preIL-1 $\alpha$  als auch die Freisetzung des „reifen“ IL-1 $\alpha$  zu unterdrücken. Dies deutete daraufhin, daß diese Enzyme oder ähnliche Enzyme, die ebenfalls durch diese Inhibitoren gehemmt werden, bei der UV-induzierten Sekretion von IL-1 $\alpha$  eine wichtige Rolle spielen. Ein möglicher Kandidat hierbei wäre Calpain, eine Kalzium-aktivierbare neutrale Protease (auch CANP) welche in der Zelle preIL-1 $\alpha$  spaltet (Kobayashi *et al.*, 1990; Carruth *et al.*, 1991; Kavita und Mizel, 1995). Dieses Enzym zählt ebenfalls zu den Cystein-Proteasen, die durch den verwendeten Inhibitor gehemmt werden könnten. Um den Einfluß dieses Enzyms für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu untersuchen wurde ein spezifischer Calpain-Inhibitor (E64-d) verwendet. Dabei zeigte sich, daß die späte UV-induzierte DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B durch E64-d ebensogut gehemmt wird, wie durch die Caspase-Inhibitoren. Keiner der Inhibitoren beeinflußt die frühe UV-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Caspase-Inhibitoren hemmen ebenfalls nicht die durch IL-1 $\alpha$  induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Der Calpain-Inhibitor hemmt jedoch die durch IL-1 $\alpha$  induzierte DNA-Bindung des p50<sub>2</sub>-Homodimers und verstärkte die DNA-Bindung des heterodimeren NF- $\kappa$ B-Komplexes. Die Hemmung der Prozessierung des inaktiven p105-Vorläuferproteins in seine aktive p50-Form durch den Calpain-Inhibitor widerspricht früheren Beobachtungen (Palombella *et al.*, 1994). Die Hemmung der DNA-Bindung des p50<sub>2</sub>-Homodimers und die gleichzeitige Verstärkung der DNA-Bindung des Heterodimers durch E64-d lassen vermuten, daß der Inhibitor möglicherweise nicht die Prozessierung von p105 hemmt, sondern nur das Gleichgewicht des Inhibitorabbaus vom C-Terminus des p105 (= I $\kappa$ B $\gamma$ ) in Richtung I $\kappa$ B $\alpha$  des I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B-Heterodimers verschiebt. Dies geht aus den

Untersuchungen von Palombella nicht hervor. Dort wurde nur der Einfluß von E64 auf die induzierte DNA-Bindung des p50/p65-Heterodimers in HeLa-Zellen analysiert, Zellen in denen keine Aktivierung des p50<sub>2</sub>-Homodimers mit den verwendeten Induktoren erfolgt, wie es in primären Fibroblasten der Fall ist. Der beobachtete Effekt könnte demnach Zelltyp-spezifisch sein.

Aufgrund des Vergleichs der Erkennungssequenzen der bekannten Caspasen mit den Aminosäuren-Sequenzen der Prozessierungsstelle des preIL-1 $\alpha$  kommen für die Spaltung von preIL-1 $\alpha$  nach UV-Bestrahlung nur die Caspasen 6, 8 und 9 (von den zehn bisher bekannten Caspasen) oder Calpain als mögliche Kandidaten in Betracht.

Da die Aktivierung von Caspasen Teil des Apoptose-Programms ist, wäre es denkbar, daß die späte UV-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung ihre Ursache in einer durch UV induzierten Apoptose hat.

In Extrakten aus UV-bestrahlten apoptotischen Zellen wurde ebenso die Aktivierung von Calpain nachgewiesen (Squier *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1995a). Diese Aktivierung ist jedoch nicht eine Voraussetzung, sondern eine Folge der Apoptose. Inhibitoren von Calpain I und II, einschließlich E64-d, sind nicht in der Lage, den Verlauf der Apoptose zu hemmen (Grimm *et al.*, 1996). E64-d hemmt nicht die Apoptose, aber die späte NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Im Gegensatz dazu hemmen Caspase-Inhibitoren sowohl die Apoptose als auch die späte NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Die Folgerung ist, daß offensichtlich nicht Caspasen, sondern Calpain die UV-induzierte Spaltung des preIL-1 $\alpha$  durchführt. Gibt es einen gemeinsamen Signalweg zur Aktivierung dieser Proteasen, muß die Aktivierung von Calpain der Aktivierung der Caspasen folgen. Dabei ist jedoch nicht klar, ob Calpain durch die Wirkung der Caspasen oder durch einen unabhängigen Mechanismus aktiviert wird. Der Nachweis, daß Calpain tatsächlich das preIL-1 $\alpha$ -spaltende Enzym während der UV-induzierten Prozessierung ist, steht noch aus.

Um zu untersuchen, ob die Spaltung von preIL-1 $\alpha$  eine Folge der Apoptose ist, könnte man preIL-1 $\alpha$  in XPA-Fibroblasten überexprimieren, die Zellen mit UV-bestrahlen und anschließend mit Hilfe einer Apoptose-spezifischen Annexin-Färbung (Martin *et al.*, 1995b) die apoptotischen Zellen markieren. Durch simultane Färbung von Zellen mit Annexin und Propidiumjodid können apoptotische, nekrotische und vitale Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie sortiert werden. Durch Isolieren des IL-1 $\alpha$ -Vorläufers mit Hilfe spezifischer Antikörper könnte durch anschließende Western-Blot-Analyse die Menge an preIL-1 $\alpha$  bestimmt werden. Desweiteren könnte die DNA-Bindeaktivität von NF- $\kappa$ B in einer

Gelretardationsanalyse untersucht werden. Würde eine Prozessierung von preIL-1 $\alpha$  auch in nicht-apoptotischen Zellen erfolgen, wäre dies ein deutlicher Hinweis, daß die Aktivierung der Spaltung von preIL-1 $\alpha$  über einen von der Apoptose unabhängigen Mechanismus gesteuert ist und somit die verwendeten Caspase-Inhibitoren Calpain „unspezifisch“ hemmen.

Eine weitere Möglichkeit wäre, daß nicht die Protease durch UV-Bestrahlung aktiviert wird, sondern daß das Substrat modifiziert wird.

Nach der Stimulation von menschlichen Monozyten mit LPS wird der intrazelluläre IL-1 $\alpha$ -Vorläufer phosphoryliert. Diese Phosphorylierung erfolgt nahe der Prozessierungsstelle (zwischen Phe-118 und Leu-119) an einem Serin an der Position 87 oder 107 des preIL-1 $\alpha$ . Sie ist im „reifen“ IL-1 $\alpha$  nicht mehr vorhanden. Diese Phosphorylierung soll die Spaltung durch Calpain erleichtern (Kobayashi *et al.*, 1988; Kobayashi *et al.*, 1990). Eine ähnliche Phosphorylierung eines 20 kD Proteins, welches an das Aktin des Zytoskeletts bindet, soll ebenfalls dessen Spaltung durch Calpain erleichtern (Pontremoli *et al.*, 1987). UV-Strahlung führt zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung vieler Protein-Kinasen in bekannten Signalwegen (siehe Einleitung der vorliegenden Arbeit). Ebenso könnte UV-Strahlung die Phosphorylierung des preIL-1 $\alpha$  bewirken indem sie eine bisher nicht bekannte Kinase aktiviert oder eine Phosphatase hemmt. Da Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsereignisse innerhalb von Minuten nach der Bestrahlung von Zellen ablaufen (Knebel *et al.*, 1996), dürfte die in Frage kommende Kinase oder Phosphatase kein direktes „Ziel“ der UV-Strahlung sein, sondern Teil einer Signalkette sein, die erst spät nach der Bestrahlung aktiviert wird. Ob UV-Bestrahlung eine Phosphorylierung des preIL-1 $\alpha$  erzeugt, könnte durch *in vivo* Markierung von UV-bestrahlten Zellen mit  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat und anschließender Immunpräzipitation des preIL-1 $\alpha$  beantwortet werden. Die Funktionalität einer Phosphorylierung könnte durch Austausch entsprechender Aminosäuren gegen nicht phosphorylierbare Aminosäuren getestet werden.

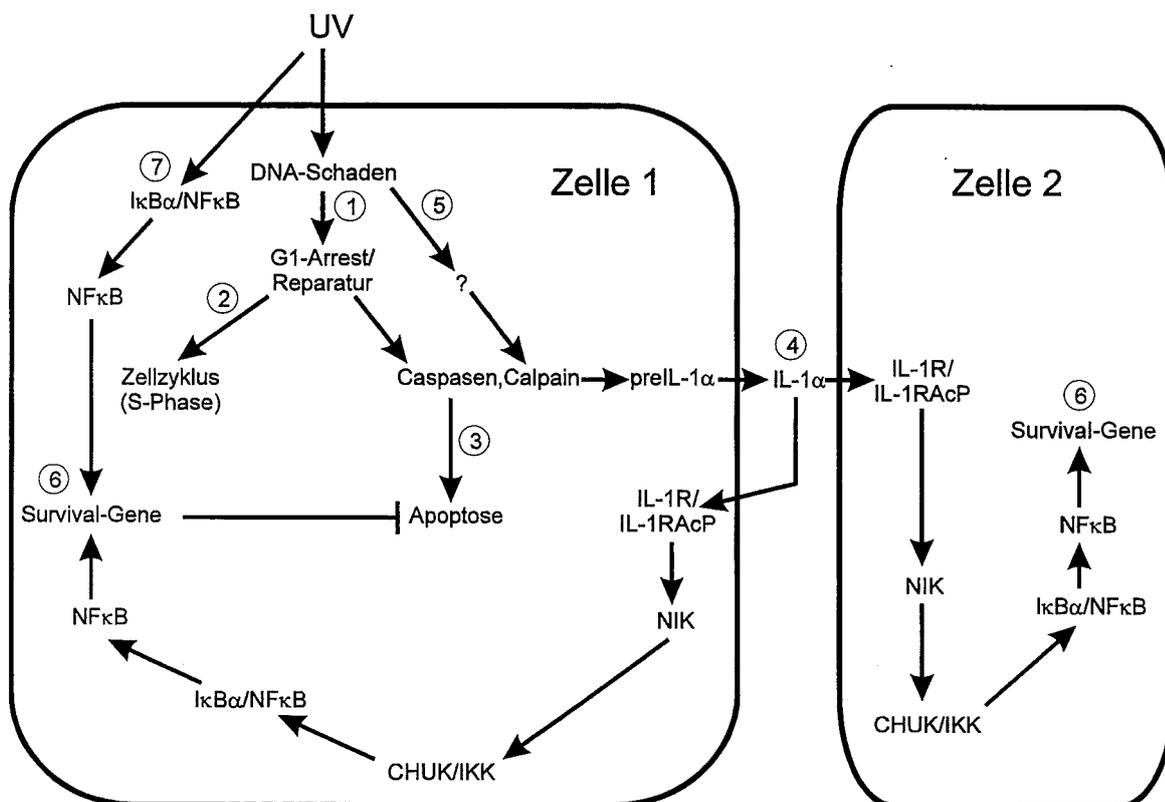
Calpain/CANP ist eine Protease, bei der die für die katalytische Aktivität essentielle SH-Gruppe eines Cysteins im Molekül verborgen ist. In Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  kommt es zu einer Konformationsänderung, durch die das katalytisch aktive Cystein exponiert wird. Die Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  ist sowohl für die Interaktion von Calpain mit seinem Substrat als auch mit Inhibitoren essentiell (Suzuki *et al.*, 1987). Die meisten Zellen exprimieren zwei Isoformen der Kalzium-aktivierten neutralen Protease. Diese unterscheiden sich deutlich in der für ihre enzymatische Aktivität benötigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Carruth *et al.*, 1991).

Während der Apoptose kommt es zu einem Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, die zur Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Proteine sowie z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ -/ $\text{Mg}^{2+}$ -abhängiger Endonukleasen (Wyllie, 1980) oder Calpain führen kann (Squier *et al.*, 1994; McConkey und Orrenius, 1996). Beide Calpain-Isoenzyme werden nach der Bindung an die Plasmamembran autokatalytisch gespalten, womit die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit beider Isoformen aufgehoben wird. Sie sind dann auch bei den sehr niedrigen, physiologischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ( $0,1 \mu\text{M}$ ) katalytisch aktiv. Die katalytische Aktivität von Calpain wird durch die beiden Isoformen Calpastatin I und II, den natürlichen Inhibitoren von Calpain, reguliert. Calpastatin I und II besitzen eine hohe Substratspezifität bezüglich den jeweiligen Calpain-Isoformen. Durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung kann die Substratspezifität der beiden Inhibitoren reversibel ineinander überführt werden (Salamino *et al.*, 1994). Makrophagen und Monozyten enthalten relativ große Mengen an aktivem Calpain. Aber auch HeLa-Zellen und NIH-3T3-Fibroblasten enthalten diese IL-1 $\alpha$ -spaltende Aktivität (Carruth *et al.*, 1991; Siders *et al.*, 1993). Es wäre möglich, daß UV-Strahlung durch einen bisher noch nicht bekannten Mechanismus zur Inaktivierung von Calpastatin I und II und damit zur Aktivierung von Calpain führt. Diese Hypothese kann überprüft werden, indem man in einer Zelllinie, die eine konstitutive Calpain-Aktivität aufweist (z.B. P333D1, U937, NIH-3T3; Carruth *et al.*, 1991), Calpastatin überexprimiert und damit Calpain hemmt. UV-Bestrahlung müßte dann die Wirkung des exogenen Calpastatin aufheben können.

### Ein Modell der UV-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung

Normal wachsende Zellen durchlaufen vier Phasen des Zellzyklus ( $G_1 / S / G_2 / M$ ). Innerhalb dieses Zykluses gibt es zwei Kontrollpunkte (engl. „checkpoints“), an denen der ordnungsgemäße Ablauf überwacht wird. Einer dieser Punkte liegt in der späten  $G_1$ -Phase und damit vor der Verdopplung der DNA ( $G_1/S$ -Kontrollpunkt), der zweite in der späten  $G_2$ -Phase vor dem Eintritt der Zelle in die Mitose ( $G_2/M$ -Kontrollpunkt). Am  $G_1/S$ -Kontrollpunkt wird die Integrität der DNA vor der Replikation kontrolliert. Wurde die DNA z.B. durch UV-Strahlung geschädigt, so wird der Eintritt in die S-Phase verzögert ( $G_1$ -Arrest), um eine Reparatur zu ermöglichen (siehe Abb. 27, 1). Ist die Reparatur erfolgt, tritt die Zelle wieder in die S-Phase des Zellzyklus ein (Abb. 27, 2). Ist die Reparatur jedoch nicht effizient genug oder findet überhaupt nicht statt (XPA-Fibroblasten), so kann die Zelle durch Apoptose eliminiert werden, um dadurch das Entstehen von Zellen mit mutiertem Erbgut zu verhindern (Abb. 27, 3) (Caelles *et al.*, 1994; Levine, 1997). Während der Apoptose kommt es durch die Aktivierung von Caspasen oder Calpain zur Spaltung von preIL-1 $\alpha$  und zur Sekretion von

„reifem“ IL-1 $\alpha$  (Abb. 27, 4). Sowohl der G<sub>1</sub>-Arrest als auch die Apoptose wird durch das Tumorsuppressorprotein p53 reguliert. Verschiedene DNA-schädigende Agenzien bewirken eine Stabilisierung des p53-Proteins und dessen Akkumulation in der Zelle (Maltzman und Czycyk, 1984, Fritsche *et al.*, 1993; Zhan *et al.*, 1993). Mehrere Untersuchungen belegen, daß das Signal welches zur UV-induzierten Stabilisierung von p53 führt, von einem DNA-Schaden im transkribierten Strang aktiver Gene ausgeht (Yamizumi und Sugano, 1994; Ljungman und Zhang, 1996; Blattner *et al.*, 1997). Der zugrundeliegende Mechanismus der p53-Stabilisierung durch die arretierte Transkription ist noch nicht aufgeklärt. Die DNA-Schaden-abhängige IL-1 $\alpha$ -Freisetzung könnte ebenfalls von dieser Transkriptionshemmung abhängen (Abb. 27, 5).



**Abb. 27: Modell der UV-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung.**

CHUK: „conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase; I $\kappa$ B $\alpha$ : Inhibitorprotein kappa B alpha; IKK: I $\kappa$ B-Kinase; IL-1 $\alpha$ : Interleukin 1 alpha; IL-1R: IL-1 $\alpha$ -Rezeptor; IL-1RAcP: „IL-1 receptor accessory protein“; NF- $\kappa$ B: Nukleärer Faktor-kappa B; NIK: „NF- $\kappa$ B-inducing kinase“; UV: Ultraviolett-Strahlung.

Das sezernierte IL-1 $\alpha$  kann entweder autokrin auf die Ursprungszelle (Zelle 1) oder parakrin auf Nachbarzellen (Zelle 2) wirken und dort den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktivieren.

Unter den Genen, die durch NF- $\kappa$ B angeschaltet werden, könnten sich auch solche befinden, deren Genprodukte die Zelle vor Apoptose schützen, sogenannte Überlebens-Gene („survival-genes“). Die Expression dieser Gene soll durch NF- $\kappa$ B induziert werden (Abb. 27, 6) (Beg und Baltimore, 1996; Van Antwerp *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996). Somit könnte IL-1 $\alpha$  als „Alarmbote“ wirken. Zwischen negativ wirkenden Signalen (Apoptose-Programm) und positiven Signalen (Überlebens-Gene, induziert durch NF- $\kappa$ B) herrscht in der Zelle ein Gleichgewicht, das sich je nach dem Zustand der Zelle in die eine oder die andere Richtung neigen kann. Aber auch zu einem frühen Zeitpunkt, nach der Bestrahlung, werden Signalwege angeschaltet die zur Aktivierung UV-induzierbarer Gene führen. Die frühe DNA-Schaden-unabhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B könnte hierbei ebenfalls zur Induktion von Überlebens-Genen führen und in Konkurrenz zur Apoptose der Zelle einen Wachstumsvorteil ermöglichen (Abb. 27, 7). Das Gleichgewicht zwischen der Apoptose und dem Überleben der Zelle wird jedoch nicht nur durch NF- $\kappa$ B bestimmt, sondern durch ein multiples Netzwerk verschiedener Signale. So bewirkt z.B. auch der Transkriptionsfaktor cFos, eine Komponente des AP-1-Komplexes, einen Schutz vor den Auswirkungen der UV-Strahlung. Fos<sup>-/-</sup>-Fibroblasten (fos „knock out“-Zellen) sind UV-hypersensitiv, d.h. die Zellen sterben nach Bestrahlung mit UVC schneller als vergleichbare Wildtyp-Fibroblasten (Schreiber *et al.*, 1995). Von Fuks wurde eine durch den basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor bFGF erzeugte Resistenz von Zellen gegen Röntgenstrahlung *in vitro* als auch *in vivo* beschrieben. Durch Behandlung von endothelialen Zellen mit bFGF bzw. durch intravenöse Verabreichung von bFGF an Mäuse, unmittelbar nach Röntgen-Bestrahlung, konnte der Anteil der Zellen, die in Apoptose gehen bzw. der Anteil apoptotischer Zellen in der Lunge bestrahlter Tiere signifikant reduziert werden (Fuks *et al.*, 1994). Andere sezernierte Zytokine regulieren positiv oder negativ die Reaktionen des Immunsystems und können für die UV-induzierte Unterdrückung des Immunsystems verantwortlich sein (Kripke *et al.*, 1992; Yarosh und Kripke, 1996). Es ist somit leicht vorstellbar, daß aufgrund der UV-induzierten Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen nicht nur die Zellen im Organismus, die von der UV-Strahlung direkt getroffen werden, beeinflußt sind, sondern auch Zellen und Organe, die vor der direkten UV-Strahlung geschützt sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß UV-Strahlung über zwei unterschiedliche Mechanismen zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt. Dabei ist der Mechanismus der frühen Aktivierung von einer Schädigung der DNA unabhängig. Der dieser Aktivierung zugrundeliegende Abbau des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins folgt einem anderen Mechanismus als dem

bekannter Aktivatoren, da anstelle der beiden Serine im N-Terminus des Proteins eine zehn Aminosäuren lange Sequenz im C-Terminus und die beiden Lysine im N-Terminus des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins notwendig sind. Ein zweiter, völlig anderer Mechanismus führt zu einer späten Aktivierung von NF- $\kappa$ B, der von der Schädigung der DNA abhängig ist. Diese Aktivierung wird durch das Zytokin IL-1 $\alpha$  vermittelt, dessen Vorläufer als Folge der UV-Bestrahlung zur „reifen“ IL-1 $\alpha$ -Form prozessiert wird. Dieses IL-1 $\alpha$  kann als „Alarmbote“ wirken und durch Aktivierung spezifischer Gene Zellen eine Anpassung an ungünstige Lebensbedingungen ermöglichen.

## Literatur

- Adamczewski, J.P., Rossignol, M., Tassan, J.-P., Nigg, E.A., Moncollin, V. und Egly, J.-M. (1996). MAT1, cdk7 and cyclin H form a kinase complex which is UV light-sensitive upon association with TFIIH. *EMBO J.* **15**: 1877-1884.
- Alkalay, I., Yaron, A., Hatzubai, A., Orian, A., Ciechanover, A. und Ben-Neriah, Y. (1995). Stimulation-dependent I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation marks the NF- $\kappa$ B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 10599-10603.
- Alwine, J.C., Kemp, D.J. und Stark, G.R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxy-methyl paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5350-5354.
- Ananthaswamy, H.N. und Pierceall, W.E. (1990). Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. *J. Photochem. Photobiol.* **52**: 1119-1136.
- Angel, P., Allegretto, E.A., Okino, S., Hattori, K., Boyle, W.J., Hunter, T. und Karin, M. (1988a). Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature* **332**: 166-171.
- Aoki, T., Sano, Y., Yamamoto, T. und Inoue, J.-I. (1996). The ankyrin repeats but not the PEST-like sequences are required for signal-dependent degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ . *Oncogene* **12**: 1159-1164.
- Arenzana-Seisdedos, F., Thompson, J., Rodriguez, M.S., Bachelierie, F., Thomas, D. und Hay, R.T. (1995). Inducible Nuclear Expression of Newly Synthesized I $\kappa$ B $\alpha$  Negatively Regulates DNA-Binding and Transcriptional Activities of NF $\kappa$ B. *Mol. Cell. Biol* **15**: 2689-2696.
- Atchinson, M.L. und Perry, R.P. (1987). The Role of the  $\kappa$  Enhancer and Its Binding Factor NF- $\kappa$ B in the Developmental Regulation of  $\kappa$  Gene Transcription. *Cell* **48**: 121-128.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (1989). Current Protocols in Molecular Biology. (New York: John Wiley and Sons, Inc.).
- Baeuerle, P.A. und Baltimore, D. (1996). NF- $\kappa$ B: ten Years After. *Cell* **87**: 13-20.
- Baeuerle, P. und Henkel, T. (1994). Function and Activation of NF- $\kappa$ B in the Immune System. *Annu. Rev. Immunol.* **12**: 141-179.
- Baeuerle, P.A. und Baltimore, D. (1989a). I $\kappa$ B: A Specific Inhibitor of the NF- $\kappa$ B Transcription Factor. *Science* **242**: 540-546.
- Baeuerle, P.A. und Baltimore, D. (1989b). A 65-kD subunit of active NF- $\kappa$ B is required for inhibition of NF- $\kappa$ B by I $\kappa$ B. *Genes & Dev.* **3**: 1689-1698.
- Baeuerle, P.A. und Baltimore, D. (1988). Activation of DNA-Binding Activity in an Apparently Cytoplasmic Precursor of the NF- $\kappa$ B Transcription Factor. *Cell* **53**: 211-217.
- Baeuerle, P.A., Lenardo, M., Pierce, J.W. und Baltimore, D. (1988). Phorbol-ester-induced activation of NF- $\kappa$ B transcription factor involves dissociation of an apparently cytoplasmic NF- $\kappa$ B/inhibitor complex. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **53**: 789-798.

- Baldwin Jr., A.S.** (1996). THE NF- $\kappa$ B AND I $\kappa$ B PROTEINS: New Discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 649-681.
- Baldwin Jr., A.S. und Sharp, P.A.** (1988). Two transcription factors, NF- $\kappa$ B and H2TF1, interact with a single regulatory sequence in the class I major histocompatibility complex promotor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 723-727.
- Ballard, D.W., Dixon, E.P., Peffer, N.J., Bogerd, H., Doerre, S., Stein, B. und Greene, W.C.** (1992). The 65-kDa subunit of human NF- $\kappa$ B functions as a potent transcriptional activator and a target for v-Rel-mediated repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1875-1879.
- Barroga, C.F., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M. und Verma, I.M.** (1995). Constitutive phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  by casein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 7637-7641.
- Beauparlant, P., Lin, R. und Hiscott, J.** (1996). The Role of the C-terminal Domain of I $\kappa$ B $\alpha$  in Protein Degradation and Stabilization. *J. Biol. Chem* **271**: 10690-10696.
- Beg, A.A. und Baltimore, D.** (1996). An Essential Role for NF- $\kappa$ B in Preventing TNF- $\alpha$ -Induced Cell Death. *Science* **274**: 782-784.
- Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., Ghosh, S. und Baltimore, D.** (1995). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF $\kappa$ B. *Nature* **376**: 167-170.
- Beg, A.A., Ruben, S.M., Scheinman, R.I., Haskill, S., Rosen, C.A. und Baldwin, A.S.** (1992). I $\kappa$ B interacts with the nuclear localization sequences of the subunit of NF- $\kappa$ B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes & Dev.* **6**: 1899-1913.
- Belvin, M.P., Jin, J. und Anderson, K.V.** (1995). Cactus protein degradation mediates Drosophila dorsal-ventral signaling. *Genes & Dev.* **9**: 783-793.
- Bender, K., Blattner, C., Knebel, A., Iordanov, M., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H.J.** (1997). UV-induced signal transduction. *J. Photochem. Photobiol.B* **37**: 1-17.
- Bennett, V. und Gilligan, D.M.** (1993). The spectrin-based membrane structure and micron-scale organization of the plasma membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**: 27-66.
- Bennett, V.** (1992). Ankyrins: Adaptors between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm. *J. Biol. Chem* **264**: 8703-8706.
- Bennett, V. und Stenbuck, P.J.** (1979). The membrane attachment protein for spectrin is associated with band 3 in human erythrocyte membranes. *Nature* **280**: 468-473.
- Betsholtz, C., Johnsson, A., Heldin, C.-H. und Westermark, B.** (1986). Efficient reversion of simian sarcoma virus-transformation and inhibition of growth factor-induced mitogenesis by suramin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6440-6444.
- Blanar, M.A., Burkly, L.C. und Flavell, R.A.** (1989). NF- $\kappa$ B Binds within a Region Required for B-Cell-Specific Expression of the Major Histocompatibility Complex Class II Gene E $\alpha$ <sup>d</sup>. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 844-846.
- Blank, V., Kourilsky, P. und Israël, A.** (1992). NF- $\kappa$ B and related proteins:Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. *Trends Biol. Sci.* **17**: 135-140.

- Blattner, C., Bender, K., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H.J.** (1997). UV induced photoproducts in transcriptionally active DNA generate signal transduction to several p53 independent genes. *In Vorbereitung*.
- Blumer, K.J. und Johnson, G.L.** (1994). Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *Trends Biol. Sci.* **19**: 236-240.
- Bours, V., Franzoso, G., Azarenko, V., Sun, P., Brown, K. und Siebenlist, U.** (1993). The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through  $\kappa$ B motifs via association with DNA-binding p50 Homodimers. *Cell* **72**: 729-739.
- Bours, V., Burd, P.R., Brown, K., Villalobos, J., Park, S., Ryseck, R.-P., Bravo, R., Kelly, K. und Siebenlist, U.** (1992). A Novel Mitogen-Inducible Gene Product Related to p50/p105-NF $\kappa$ B Participates in Transactivation through a  $\kappa$ B Site. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 685-695.
- Bours, V., Villalobos, J., Burd, P.R., Kelly, K. und Siebenlist, U.** (1990). Cloning of a mitogen-inducible gene encoding a  $\kappa$ B DNA-binding protein with homology to the *rel* oncogene and to cell-cycle motifs. *Nature* **348**: 76-80.
- Brennan, P. und O'Neill, L.A.J.** (1995). Effects of oxidants and antioxidants on nuclear factor  $\kappa$ B activation in three different cell lines: evidence against a universal hypothesis involving oxygen radicals. *Biochim. et Biophys. Acta* **1260**: 167-175.
- Brockman, J.A., Scherer, D.C., McKinsey, T.A., Hall, S.M., Qi, X., Lee, W.Y. und Ballard, D.W.** (1995). Coupling of a Signal Response Domain in I $\kappa$ B $\alpha$  to Multiple Pathways for NF $\kappa$ B Activation. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 2809-2818.
- Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G. und Siebenlist, U.** (1995). Control of I $\kappa$ B $\alpha$  Proteolysis by Site-Specific, Signal-Induced Phosphorylation. *Science* **267**: 1485-1488.
- Brown, M.S. und Goldstein, J.L.** (1997). The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell* **89**: 331-340.
- Caelles, C., Helmberg, A. und Karin, M.** (1994). p53-Dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* **370**: 220-223.
- Cano, E., Hazzalin, C.A. und Mahadevan, L.C.** (1994). Anisomycin-Activated Protein Kinases p45 and p55 but Not Mitogen-Activated Protein Kinases ERK-1 and -2 Are Implicated in the Induction of *c-fos* and *c-jun*. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 7352-7362.
- Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapelner, R. und Soltoff, S.** (1991). Oncogenes and signal transduction. *Cell* **64**: 281-302.
- Carruth, L.M., Demczuk, S. und Mizel, S.B.** (1991). Involvement of a Calpain-like Protease in the Processing of the Murine Interleukin 1 $\alpha$  Precursor. *J. Biol. Chem.* **266**: 12162-12167.
- Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Ness, K.V., Greenstreet, T.A., March, C.J., Kronheim, S.R., Druck, T., Cannizzaro, L.A., Huebner, K. und Black, R.A.** (1992). Molecular Cloning of the Interleukin-1 $\beta$  Converting Enzyme. *Science* **256**: 97-100.
- Chen, Z.J., Parent, L. und Maniatis, T.** (1996). Site-specific phosphorylation of I $\kappa$ B- $\alpha$  by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell* **84**: 853-862.

- Chen, Z. J., Hagler, J., Palombella, V.J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D. und Maniatis, T. (1995). Signal-induced site-specific phosphorylation targets I $\kappa$ B $\alpha$  to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes & Dev.* **9**: 1586-1597.
- Chu, G. und Myane, L. (1996). Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy: do the genes explain the diseases? *Trends Genet.* **12**: 187-192.
- Chu, Z.-L., McKinsey, T.A., Liu, L., Qi, X. und Ballard, D.W. (1996). Basal Phosphorylation of the PEST Domain in I $\kappa$ B $\beta$  Regulates Its Functional Interaction with the *c-rel* Proto-Oncogene Product. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 5974-5984.
- Ciechanover, A. (1994). The Ubiquitin-Mediated Proteolytic Pathway: Mechanisms of Action and Cellular Physiology. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **375**: 565-581.
- Cleaver, J.E. und Kraemer, K.H. (1994). Xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. and Valle, D., Autoren). 7. Auflage McGraw-Hill Buch Gesellschaft New York.
- Coffer, P.J., Burgering, B.M., Peppelenbosch, M.P., Bos, J.L. und Kruijer, W. (1995). UV activation of receptor tyrosine kinase activity. *Oncogene* **11**: 561-569.
- Collins, T., Read, M.A., Neish, A.S., Whitley, M.Z., Thanos, D. und Maniatis, T. (1995). Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules—NF- $\kappa$ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* **9**: 899-909.
- Connelly, M.A. und Marcu, K.B. (1995). CHUK, a new member of the helix-loop-helix and leucine zipper families of interacting proteins, contains a serine-threonine kinase catalytic domain. *Cell. Mol. Biol. Res.* **41**: 537-549.
- Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y.N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T.F., Young, P.R. und Lee, J.C. (1995). SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP Kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* **364**: 229-233.
- Davis, R. (1995). Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol. Rep. Dev.* **42**: 459-467.
- Denhardt, D.T. (1966). A membran filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**: 641-646.
- Devary, Y., Rosette, C., DiDonato, J.A. und Karin, M. (1993). NF $\kappa$ B Activation by Ultraviolet Light Not Dependent on a Nuclear Signal. *Science* **261**: 1442-1445.
- Devary, Y., Gottlieb, R.A., Smeal, T. und Karin, M. (1992). The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. *Cell* **71**: 1081-1091.
- Diaz-Meco, M.T., Dominguez, I., Sanz, L., Dent, P., Lozano, J., Municio, M.M., Berra, E., Hay, R.T., Sturgill, T.W. und Moscat, J. (1994).  $\zeta$ PKC induces phosphorylation and inactivation of I $\kappa$ B- $\alpha$  *in vitro*. *EMBO J.* **13**: 2842-2848.
- DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E. und Karin, M. (1997). A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature* **388**: 548-554.
- DiDonato, J.A., Mercurio, F. und Karin, M. (1995). Phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  Precedes but Is Not Sufficient for Its Dissociation from NF $\kappa$ B. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 1302-1311.
- Dinarello, C.A. (1996). Biological Basis for Interleukin-1 in Disease. *Blood* **87**: 2095-2147.

- Dobrzanski, P., Ryseck, R.-P. und Bravo, R. (1994).** Differential interactions of Rel-NF- $\kappa$ B complexes with I $\kappa$ B $\alpha$  determine pools of constitutive and inducible NF- $\kappa$ B activity. *EMBO J.* **13**: 4608-4616.
- Donahue, B.A., Yin, S., Taylor, J.-S., Reines, D. und Hanawalt, P.C. (1994).** Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8502-8506.
- Donald, R., Ballard, D.W. und Hawiger, J. (1995).** Proteolytic Processing of NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B in Human Monocytes. *J. Biol. Chem.* **270**: 9-12.
- Downing, J.R., Roussel, M.F. und Sherr, C.J. (1989).** Ligand and protein kinase C downregulate the colony-stimulating factor 1 receptor by independent mechanisms. *Mol. Cell. Biol* **9**: 2890-2896.
- Drapkin, R., Sancar, A. und Reinberg, D. (1994).** Where transcription meets repair. *Cell* **77**: 9-12.
- Druker, B.J., Neumann, M., Okuda, K., Franza Jr., B.R. und Griffi, J.D. (1994).** Rel is rapidly tyrosine phosphorylated following granulocyte-colony stimulating factor treatment of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **269**: 5387-5390.
- Fan, C.-M. und Maniatis, T. (1991).** Generation of p50 subunit of NF- $\kappa$ B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature* **354**: 395-398.
- Finco, T.S. und Baldwin Jr., A.S. (1995).** Mechanistic aspects of NF- $\kappa$ B regulation: the emerging role of phosphorylation and proteolysis. *Immunity* **3**: 263-272.
- Finco, T.S. und Baldwin Jr., A.S. (1993).**  $\kappa$ B Site-dependent Induction of Gene Expression by Diverse Inducers of Nuclear Factor  $\kappa$ B Requires Raf-1. *J. Biol. Chem.* **268**: 17676-17679.
- Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., El Saboutry, S., Dani, C., Jeanteur, P. und Blanchard, J.M. (1985).** Various rat adult tissues express only one major m-RNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.* **13**: 1431-1442.
- Fritsche, M., Haessler, C. und Brandner, G. (1993).** Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* **8**: 307-318.
- Fuks, Z., Persaud, R.S., Alfieri, A., McLoughlin, M., Ehleiter, D., Schwartz, J.L., Seddon, A.P., Cordon-Cardo, C. und Haimovitz-Friedman, A. (1994).** Basic Fibroblast Growth Factor Protects Endothelial Cells against Radiation-induced Programmed Cell Death *in Vitro* and *in Vivo*. *Cancer Res.* **54**: 2582-2590.
- Furutani, Y. (1994).** Molecular studies on interleukin-1 $\alpha$ . *Eur. Cytokine Netw.* **5**: 533-538.
- Furutani, Y., Notake, M., Fukui, T., Ohue, M., Nomura, H., Yamada, M. und Nakamura, S. (1986).** Complete nucleotide sequence of the gene for human interleukin 1 alpha. *Nucleic Acids Res.* **14**: 3167-3178.
- Ganchi, P.A., Sun, S.C., Greene, W.C. und Ballard, D.W. (1992).** I kappa B/MAD-3 masks the nuclear localization signal of NF- $\kappa$ B p65 and requires the transactivation domain to inhibit NF kappa B p65 DNA binding. *Mol. Biol. Cell* **3**: 1339-1352.

- Ghosh, S., Giford, A.M., Riviere, L.R., Tempst, P., Nolan, G.P. und Baltimore, D. (1990). Cloning of the p50 DNA Binding Subunit of NF- $\kappa$ B: Homology to *rel* and *dorsal*. *Cell* **62**: 1019-1029.
- Ghosh, S. und Baltimore, D. (1990). Activation in vitro of NF $\kappa$ B by phosphorylation of its inhibitor I $\kappa$ B. *Nature* **344**: 678-682.
- Grewe, M., Gyufko, K. und Krutmann, J. (1995). Interleukin-10 Production by Cultured Human Keratinocytes: Regulation by Ultraviolet B and Ultraviolet A1 Radiation. *J. Invest. Dermatol.* **104**: 3-6.
- Grilli, M., Chiu, J.J.-S. und Lenardo, M.J. (1993). NF- $\kappa$ B and Rel: Participants in a Multiform Transcriptional Regulatory System. *Int. Rev. Cytology* **143**: 1-62.
- Grimm, L.M., Goldberg, A.L., Poirier, G.G., Schwartz, L.M. und Osborne, B.A. (1996). Proteasomes play an essential role in thymocyte apoptosis. *EMBO J.* **15**: 3835-3844.
- Hacham, H., Freeman, S.E., Gange, R.W., Maytum, D.J., Sutherland, J.C. und Sutherland, B.M. (1990). Does exposure of human skin *in situ* to 385 or 405 nm UV induce pyrimidine dimers in DNA? *J. Photochem. Photobiol.* **52**: 893-896.
- Hackett, P.B. und Sauerbier, W. (1975). The transcriptional organization of the ribosomal RNA genes in mouse L cells. *J. Mol. Biol.* **91**: 235-256.
- Hanawalt, P.C. (1994). Transcription-coupled repair and human disease. *Science* **266**: 1957-1958.
- Haskill, S., Beg, A.A., Tompkins S.M., Morris, J.S., Yurochko, A.D., Sampson-Johannes, A., Mondal, K., Ralph, P. und Baldwin Jr. A.S. (1991). Characterization of an Immediate-Early Gene Induced in Adherent Monocytes That Encodes I $\kappa$ B-like Activity. *Cell* **65**: 1281-1289.
- Hatada, E.N., Naumann, M. und Scheidereit, C. (1993). Common structural constituents confer I $\kappa$ B activity to NF- $\kappa$ B p105 and I $\kappa$ B/MAD-3. *EMBO J.* **12**: 2781-2788.
- Hatada, E.N., Nieters, A., Wulczyn, F.G., Naumann, M., Meyer, R., Nucifora, G., McKeithan, T.W. und Scheidereit, C. (1992). The ankyrin repeat domains of the NF- $\kappa$ B precursor p105 and the protooncogene *bcl-3* act as specific inhibitors of NF- $\kappa$ B DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2489-2493.
- Henkel, T., Zabel, U., van Zee, K., Muller, J.M., Fanning, E. und Baeuerle, P.A. (1992). Intramolecular masking of the nuclear localization signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF- $\kappa$ B subunit. *Cell* **68**: 1121-1133.
- Herrero, J.A., Mathew, P. und Paya, C.V. (1995). LMP-1 activates NF $\kappa$ B by targeting the inhibitory molecule I $\kappa$ B $\alpha$ . *J. Virol.* **69**: 2168-2174.
- Herrlich, P., Ponta, H. und Rahmsdorf, H.J. (1992). DNA Damage-Induced Gene Expression: Signal Transduction and Relation to Growth Factor Signaling. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **119**: 187-223.
- Hill, C.S. und Treisman, R. (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* **80**: 199-211.
- Hirai, H., Suzuki, T., Fujisawa, J., Inoue, J. und Yoshida M. (1994). Tax protein of human T-cell leukemia virus type I binds to the ankyrin motifs of inhibitory factor  $\kappa$ B and induces nuclear

- translocation of transcription factor NF $\kappa$ B proteins for transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 3584-3588.
- Hirai, S., Izawa, M., Osada, S., Giannis, S. und Ohno, S. (1996). Activation of the JNK pathway by distantly regulated protein kinases, MEKK and MUK. *Oncogene* **12**: 641-650.
- Hochstrasser, M. (1996). Protein Degradation or Regulation: Ub the Judge. *Cell* **84**: 813-815.
- Hoeijmakers, J.H.J. (1993). Nucleotide excision repair II: from yeast to mammals. *Trends Genet.* **9**: 211-217.
- Holbrook, N.J. und Fornace Jr., A.J. (1991). Response to adversity: Molecular control of gene activation following genotoxic stress. *New Biol.* **3**:825-833.
- Hough, A.M. und Derwent, R.G. (1990). Changes in the global concentration of tropospheric ozone due to human activities. *Nature* **344**: 645-648.
- Huang, C., Ma, W.-Y. und Dong, Z. (1997). Signal transduction through atypical PKCs, but not the EGF receptor, is necessary for UVC-induced AP-1 activation in immortal murine cells. *Oncogene* **14**: 1945-1954.
- Huang, P.R., Wu, J.X., Fan, Y. und Adamson, E.D. (1996). UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates. *J. Cell Biol.* **133**: 211-220.
- Imbert, V., Rupec, R.A., Livosli, A., Pahl, H.L., Traenckner, E.B-M., Mueller-Dieckmann, C., Farahifar, D., Rossi, B., Auberger, P., Baeuerle, P.A. und Peyron, J.-F. (1996). Tyrosine Phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  Activates NF $\kappa$ B without Proteolytic Degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ . *Cell* **86**: 787-798.
- Inoue, J.-I., Kerr, L.D., Kakizuka, A. und Verma, I.M. (1992a). I $\kappa$ B $\gamma$ , a 70 kd Protein Identical to the C-Terminal Half of p110 NF- $\kappa$ B: A New Member of the I $\kappa$ B Family. *Cell* **68**: 1109-1120.
- Inoue, J.-I., Kerr, L.D., Rashid, D., Davis, N., Bose Jr., H.R. und Verma, I.M. (1992b). Direct association of pp40/I $\kappa$ B $\beta$  with rel/NF- $\kappa$ B transcription factors: Role of ankyrin repeats in the inhibition of DNA binding activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 4333-4337.
- Iordanov, M., Bender, K., Ade, T., Schmid, W., Sachsenmaier, C., Engel, K., Gaestel, M., Rahmsdorf, H.J. und Herrlich, P. (1997a). CREB is activated by UVC through a p38/HOG-1 dependent protein kinase. *EMBO J.* **16**: 1009-1022.
- Iordanov, M.S., Pribnow, D., Magun, J.L., Dinh, T.-H., Pearson, J.A., Chen, S.L. und Magun, B.E. (1997b). Ribotoxic Stress Response: Activation of the Stress-Activated Protein Kinase JNK1 by Inhibitors of the Peptidyl Transferase Reaction and by Sequence-Specific RNA Damage to the  $\alpha$ -Sarcin/Ricin Loop in the 28S rRNA. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 3373-3381.
- Israël, A., Le Bail, O., Hatat, D., Piette, J., Kieran, M., Logeat, F., Wallach, D., Fellous, M. und Kourilsky, P. (1989). TNF stimulates expression of mouse MHC class I genes by inducing an NF $\kappa$ B-like enhancer binding activity which displaces constitutive factors. *EMBO J.* **8**: 3793-3800.
- Ito, C.Y., Kazantsev, A.G. und Baldwin Jr., A.S. (1994). Three NF $\kappa$ B sites in the I $\kappa$ B $\alpha$  promoter are required for induction of gene expression by TNF $\alpha$ . *Nucleic Acids Res.* **22**: 3787-3792.
- Kanno, M., Fromental, C., Staub, A., Ruffenach, F., Davidson, I. und Chambon, O. (1989). The SV40 TC-II( $\kappa$ B) and the related H-2K<sup>B</sup> enhancers exhibit different cell type specific and

inducible proto-enhancer activities, but the SV40 core sequence and the AP-2 binding site have no enhancer properties. *EMBO J.* **13**: 4205-4214.

- Karin, M.** (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **270**, 16483-16486.
- Karin, M.** (1994). Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**: 415-424.
- Kavita, U. und Mizel, S.B.** (1995). Differential Sensitivity of Interleukin-1 $\alpha$  and - $\beta$  Precursor Proteins to Cleavage by Calpain, a Calcium-dependent Protease. *J. Biol. Chem* **270**: 27758-27765.
- Kawai, S. und Nishizawa, M.** (1987). New procedure for DNA transfection with polycation and dimethylsulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1172-1174.
- Kawakami, K., Scheidereit, C. und Roeder, R.G.** (1988). Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF- $\kappa$ B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 4700-4704.
- Kerr, J.B. und McElroy, C.T.** (1993). Evidence for Large Upward Trends of Ultraviolet-B Radiation Linked to Ozone Depletion. *Science* **262**: 1032-1034.
- Kerr, L.D., Inoue, J., Davis, N., Link, E., Baeuerle, P.A., Bose Jr., H.R. und Verma, I.M.** (1991). The Rel-associated pp40 protein prevents DNA binding of Rel and NF- $\kappa$ B: relationship with I $\kappa$ B $\beta$  and regulation by phosphorylation. *Genes. Dev.* **5**: 1464-1476.
- Klocker, H., Auer, B., Burtscher, H.J., Hirsch-Kauffmann, M. und Schweiger, M.** (1984). A synthetic hapten for induction of thymidin-dimer-specific antibodies. *Eur. J. Biochem.* **142**: 313-316.
- Knebel, A., Rahmsdorf, H.J., Ullrich, A. und Herrlich, P.** (1996). Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.* **19**: 5314-5325.
- Kobayashi, Y., Yamamoto, K., Saido, T., Kawasaki, H., Oppenheim, J.J. und Matsushima, K.** (1990). Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5548-5552.
- Kobayashi, Y., Appella, E., Yamada, M., Copeland, T.D., Oppenheim, J.J. und Matsushima, K.** (1988). Phosphorylation of intracellular precursors of human IL-1. *J. Immunol.* **140**: 2279-2287.
- Köck, A., Schwarz, T., Kirnbauer, R., Urbanski, A., Perry, P., Ansel, J.C. und Luger, T.A.** (1990). Human Keratinocytes Are a Source of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ : Evidence for Synthesis and Release upon Stimulation with Endotoxin or Ultraviolet Light. *J. Exp. Med.* **172**: 1609-1614.
- Koong, A.C., Chen, E.Y. und Giaccia, A.J.** (1994). Hypoxia Causes the Activation of Nuclear Factor  $\kappa$ B through the Phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  on Tyrosine Residues. *Cancer Res.* **54**: 1525-1430.
- Kopp, E.B. und Ghosh, S.** (1995). NF- $\kappa$ B and Rel proteins in innate immunity. *Adv. Immunol.* **58**: 1-27.

- Krämer, M.** (1991). Das Cytokin Interleukin-1 $\alpha$  und der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor: Zweie neue Komponenten der UV-induzierten Signalkette in Säugerzellen. Dissertation am Institut für Genetik (Forschungszentrum Karlsruhe) ISSN 0303-4003, KfK4937.
- Krämer, M., Sachsenmaier, C., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H.J.** (1993). UV Irradiation-induced Interleukin-1 and Basic Fibroblast Growth Factor Synthesis and Release Mediate Part of the UV Response. *J. Biol. Chem.* **268**: 6734-6741.
- Krappmann, D., Wulczyn, F.G. und Scheidereit, C.** (1996). Different mechanisms control signal-induced degradation and basal turnover of the NF $\kappa$ B inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  in vivo. *EMBO J.* **15**: 6716-6726.
- Kripke, M.L., Cox, P.A., Alas, L.G. und Yarosh, D.B.** (1992). Pyrimidine dimers in DNA initiate systemic immunosuppression in UV-irradiated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7516-7520.
- Krutmann, J. und Grewe, M.** (1995). Involvement of Cytokines, DNA Damage, and Reactive Oxygen Intermediates in Ultraviolet Radiation-Induced Modulation of Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression. *J. Invest. Dermatol.* **105**: 67S-70S.
- Kumar, A., Haque, J., Lacoste, J., Hiscott, J. und Williams, B.R.G.** (1994). Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF- $\kappa$ B by phosphorylating I $\kappa$ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 6288-6292.
- Kuno, K., Ishikawa, Y., Ernst, M.K., Ogata, M., Rice, N.R., Mukaida, N. und Matsushima, K.** (1995). Identification of an I $\kappa$ B $\alpha$ -associated Protein Kinase in a Human Monocytic Cell Line and Determination of Its Phosphorylation Sites on I $\kappa$ B $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **270**: 27914-27919.
- Kypta, R.M., Hemming, A. und Courtneidge, S.A.** (1988). Identification and characterization of p59<sup>l $\nu$ n</sup> (a src-like protein tyrosine kinase) in normal and polyoma virus transformed cells. *EMBO J.* **7**: 3837-3844.
- Kyriakis, J.M. und Avruch, J.** (1996). Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *BioEssays* **18**: 567-577.
- Laemmli, U.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lee, F.S., Hagler, J., Chen, Z.J. und Maniatis, T.** (1997). Activation of the I $\kappa$ B $\alpha$  Kinase Complex by MEKK1, a Kinase of the JNK Pathway. *Cell* **88**: 213-222.
- Lehmann, A.R.** (1979). The relationship between pyrimidine dimers and replicating DNA in UV-irradiated human fibroblasts. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1901-1912.
- Lehmann, A.R., Kirk-Bell, S. und Mayne, L.** (1979). Abnormal kinetics of DNA synthesis in ultraviolet light-irradiated cells from patients with Cockayne's syndrome. *Cancer Res.* **39**: 4237-4241.
- Lenardo, M.J., Fan, C.-M., Maniatis, T. und Baltimore, D.** (1989). The Involvement of NF- $\kappa$ B in  $\beta$ -Interferon Gene Regulation Reveals Its Role as Widely Inducible Mediator of Signal Transduction. *Cell* **57**: 287-294.
- Lenardo, M., Pierce, J.W. und Baltimore, D.** (1987). Protein-Binding Sites in Ig Gene Enhancers Determine Transcriptional Activity and Inducibility. *Science* **236**: 1573-1577.
- Levine, A.J.** (1997). p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* **88**: 323-331.

- Lin, R., Beuparlant, P., Markis, C., Meloche, S. und Hiscott, J.** (1996). Phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  in the C-Terminal PEST Domain by Casein Kinase II Affects Intrinsic Protein Stability. *Mol. Cell. Biol* **16**: 1401-1409.
- Lin, Y.-C., Brown, K. und Siebenlist, U.** (1995). Activation of NF $\kappa$ B requires proteolysis of the inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$ : Signal-induced phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  alone does not release active NF $\kappa$ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 552-556.
- Livingstone, C., Patel, G. und Jones, N.** (1995). ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J.* **14**:1785-1797.
- Ljungman, M. und Zhang, F.** (1996). Blockage of RNA polymerase as a possible trigger for u.v. light-induced apoptosis. *Oncogen* **13**: 823-831.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randell, R.J.** (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lücke-Huhle, C., Mai, S. und Herrlich, P.** (1989). UV-induced early-domain binding factor as the limiting component of Simian Virus 40 DNA amplification in rodent cells. *Mol. Cell. Biol* **9**: 4812-4818.
- Lücke-Huhle, C. und Herrlich, P.** (1986). Gene amplification in mammalian cells after exposure to ionizing radiation and UV. In "Radiation carcinogenesis and DNA alterations". (F.J. Burns et al., Ed.) Plenum Corp., New York, 405-411.
- Madronich, S.** (1993). The atmosphere and UV-B radiation at ground level. In: A.R. Young, L.O. Björn, J. Moan and W. Nuttsch, Environmental UV Photobiology, Plenum Press, New York. 1-39.
- Mahadevan, L.C. und Edwards, D.R.** (1991). Signalling and superinduction. *Nature* **349**: 747-748.
- Maltzman, W. und Czyzyk, L.** (1984). UV Irradiation Stimulates Levels of p53 Cellular Tumor Antigen in Nontransformed Mouse Cells. *Mol. Cell. Biol* **4**: 1689-1694.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J.** (1982). Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*
- March, C.J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D.P., Braedt, G., Price, V., Gillis, S., Henney, C.S., Kronheim, S.R., Grabstein, K., Conlon, P.J., Hopp, T.P. und Cosman, D.** (1985). Cloning, sequence and expression of two distinct human Interleukin1 complementary DNAs. *Nature* **315**: 641-647.
- Martin, S.J., O'Brien, G.A., Nishioka, W.K., McGahon, A.J., Mahboubi, A., Saido, T.C. und Green, D.R.** (1995a). Proteolysis of Fodrin (Non-erythroid Spectrin) during Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **270**: 6425-6428.
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P.M., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C.A.A., LaFace, D.M. und Green, D.R.** (1995b). Early Redistribution of Plasma Membrane Phosphatidylserine Is a General Feature of Apoptosis Regardless of the Initiating Stimulus: Inhibition by Overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* **182**: 1545-1556.
- Matsushima, K., Taguchi, M., Kovacs, E.J., Young, H.A. und Oppenheim, J.J.** (1986). Intracellular Localization of Human Monocyte associated Interleukin 1 (IL 1) Activity and Release of Biologically active IL 1 from Monocytes by Trypsin and Plasmin. *J. Immunol.* **136**: 2883-2891.

- Mayne, L.V. und Lehmann, A.R. (1982). Failure of RNA Synthesis to Recover after UV Irradiation: An Early Defect in Cells from Individuals with Cockayne's Syndrome and Xeroderma Pigmentosum. *Cancer Res.* **42**: 1473-1478.
- McConkey, D.J. und Orrenius, S. (1996). The role of calcium in the regulation of apoptosis. *J. Leukocyte Biol.* **59**: 775-783.
- McElhinny, J.A., Trushin, S.A., Bren, G.D., Chester, N. und Paya C.V. (1996). Casein Kinase II Phosphorylates I $\kappa$ B $\alpha$  at S-283, S-289, S-293, and T-291 and Is Required for Its Degradation. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 899-906.
- Mehdi, S. (1991). Cell-penetrating inhibitors of calpain. *Trends Biol. Sci.* **16**: 150-153.
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. und Green, M.R. (1984). Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* **12**: 7035-7056
- Mercurio, F., DiDonato, J.A., Rosette, C. und Karin, M. (1993). p105 and p98 precursor proteins play an active role in NF- $\kappa$ B-mediated signal transduction. *Genes & Dev.* **7**: 705-718.
- Mittleman, B., Zandomeni, R. und Weinmann, R. (1983). Mechanism of Action of 5,6 Dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole. II. A Resistant Human Cell Mutant with an Altered Transcriptional Machinery. *J. Mol. Biol.* **165**: 461-473.
- Miyamoto, S. und Verma, I.M. (1995). Rel/NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B story. *Adv. Cancer Res.* **66**: 255-292
- Miyamoto, S., Chiao, P.J. und Verma, I.M. (1994). Enhanced I $\kappa$ B $\alpha$  Degradation Is Responsible for Constitutive NF $\kappa$ B Activity in Mature Murine B-Cell Lines. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 3276-3282.
- Mohamadzadeh, M., Takashima, A., Dougherty, I., Knop, J., Bergstresser, P.R. und Cruz Jr., P.D. (1995). Ultraviolet B Radiation Up-Regulates the Expression of IL-15 in Human Skin. *J. Immunol.* **155**: 4492-4496.
- Nabel, G. und Baltimore, D. (1987). An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* **326**: 711-713.
- Naumann, M. und Scheidereit, C. (1994). Activation of NF- $\kappa$ B *in vivo* is regulated by multiple phosphorylations. *EMBO J.* **13**: 4597-4607.
- Naumann, M., Wulczyn, F.G. und Scheidereit, C. (1993). The NF- $\kappa$ B precursor p105 and the proto-oncogene product Bcl-3 are I $\kappa$ B molecules and control nuclear translocation of NF- $\kappa$ B. *EMBO J.* **12**: 213-222.
- Nicholson, D.W. und Thornberrey, N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biol. Sci.* **22**: 299-306.
- Nolan, G.P., Fujita, T., Bhatia, K., Huppi, C., Liou, H.C., Scott, M.L. und Baltimore, D. (1993). The Bcl-3 proto-oncogene encodes a nuclear I $\kappa$ B-like molecule that preferentially interacts with NF- $\kappa$ B p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 3557-3566.
- Nolan, G.P. und Baltimore, D. (1992). The inhibitory ankyrin and activator Rel proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2**: 211-220.

- Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L. und Maniatis, T.** (1994). The Ubiquitin-Proteasome Pathway Is Required for Processing the NF- $\kappa$ B1 Precursor Protein and the Activation of NF- $\kappa$ B. *Cell* **78**: 773-785.
- Papavassiliou, A.G., Treier, M. und Bohmann, D.** (1995). Intramolecular signal transduction in c-Jun. *EMBO J.* **14**: 2014-2019.
- Perkins, N.D., Schmid, R.M., Duckett, C.S., Leung, K., Rice, N.R. und Nabel, G.J.** (1992). Distinct combinations of NF- $\kappa$ B subunits determine the specificity of transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1529-1533.
- Pessara, U. und Koch, N.** (1990). Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Regulates Expression of the Major Histocompatibility Complex Class II-Associated Invariant Chain by Binding of an NF- $\kappa$ B-Like Factor to a Promotor Element. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 4146-4154.
- Pierce, J.W., Lenardo, M. und Baltimore, D.** (1988). Oligonucleotide that binds nuclear factor NF- $\kappa$ B acts as a lymphoid-specific and inducible enhancer element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 1482-1486.
- Pontremoli, S., Melloni, E., Michetti, M., Sparatore, B., Salamino, F., Sacco, O. und Horecker, B.L.** (1987). Phosphorylation by protein kinase C of a 20-kDa cytoskeletal polypeptide enhances its susceptibility to digestion by calpain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 398-401.
- Price, M.A., Cruzalegui, F.H. und Treisman, R.** (1996). The p38 and Erk Map kinase pathways cooperate to activate ternary complex factors and c-fos transcription in response to UV-light. *EMBO J.* **15**: 6552-6563.
- Prickett, K.S., Amberg, D.C. und Hopp, T.P.** (1989). A calcium-dependent antibody for identification and purification of recombinant proteins. *Biotechniques* **7**: 580-589.
- Radler-Pohl, A., Sachsenmaier, C., Gebel, S., Auer, H.-P., Bruder, J.T., Rapp, U., Angel, P., Rahmsdorf, H.J. und Herrlich, P.** (1993). UV-induced activation of AP-1 involves obligatory extranuclear steps including Raf-1 kinase. *EMBO J.* **12**: 1005-1012.
- Rechsteiner, M.** (1990). PEST sequences are signals for rapid intracellular proteolysis. *Semin. Cell Biol.* **1**: 433-440.
- Régnier, C.H., Song, H.Y., Gao, X., Goeddel, D.V., Cao, Z. und Rothe, M.** (1997). Identification and Characterization of an I $\kappa$ B Kinase. *Cell* **90**: 373-383.
- Rice, N.R. und Ernst, M.K.** (1993). *In vivo* control of NF $\kappa$ B activation by I $\kappa$ B $\alpha$ . *EMBO J.* **12**: 4685-4695.
- Rice, N.R., MacKichan, M.L. und Israël, A.** (1992). The Precursor of NF- $\kappa$ B p50 Has I $\kappa$ B-like Functions. *Cell* **71**: 243-253.
- Rivas, J.M. und Ullrich, S.E.** (1992). Systemic suppression of delayed-type hypersensitivity by supernatants from UV-irradiated keratinocytes. *J. Immunol.* **149**: 3865-3871.
- Rodriguez, M.S., Michalopoulos, I., Arenzana-Seisdedos, F. und Hay, R.T.** (1995). Inducible Degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  In Vitro and In Vivo Requires the Acidic C-Terminal Domain of the Protein. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 2413-2419.

- Roff, M., Thompson, J., Rodriguez, M.S., Jacque, J.-M., Baleux, F., Arenzana-Seisdedos, F. und Hay, R.T. (1996). Role of I $\kappa$ B $\alpha$  Ubiquitination in Signal-induced Activation of NF $\kappa$ B *in Vivo*. *J. Biol. Chem.* **271**: 7844-7850.
- Rogers, S., Wells, R. und Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**: 364-368.
- Rosette, C. und Karin, M. (1996). Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factors and cytokine receptors. *Science* **274**: 1194-1197.
- Rotem, N., Axelrod, J.H. und Miskin, R. (1987). Induction of urokinase-type plasminogen activator by UV light in human fetal fibroblasts is mediated through a UV-induced secreted protein. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 622-631.
- Roy, R., Adamczewski, J.P., Seroz, T., Vermeulen, W., Tassan, J.-P., Schaeffer, L., Nigg, E.A., Hoeijmakers, J.H.J. und Egly, J.-M. (1994). The MO15 Cell Cycle Kinase Is Associated with the TFIIH Transcription-DNA Repair Factor. *Cell* **79**: 1093-1101.
- Rubartelli, A., Cozzolino, F., Talio, M. und Sitia, R. (1990). A novel secretory pathway for interleukin-1 $\beta$ , a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.* **9**: 1503-1510.
- Ruben, S.M., Dillon, P.J., Schreck, R., Henkel, T., Chen, C.-H., Maher, M., Baeuerle, P.A. und Rosen, C.A. (1991). Isolation of a *rel*-Related Human cDNA That Potentially Encodes the p65-kD Subunit of NF- $\kappa$ B. *Science* **251**: 1490-1493.
- Ryseck, R.P., Bull, P., Takamiya, M., Bours, V., Siebenlist, U., Dobrzanski, P. und Bravo, R. (1992). RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF- $\kappa$ B. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 674-684.
- Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Zinck, R., Nordheim, A., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H.J. (1994). Involvement of growth factors in the mammalian UVC response. *Cell* **78**: 963-972.
- Sacklowski, A. (1973). Einheitenlexikon. *Dtsch. Verlags-Anstalt*, Stuttgart.
- Salamino, F., De Tullio, R., Michetti, M., Mengotti, P., Melloni, E. und Pontremoli, S. (1994). Modulation of calpastatin specificity in rat tissue by reversible phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**: 1326-1332.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Scherer, D.C., Brockman, J.A., Chen, Z., Maniatis, T. und Ballard, D.W. (1995). Signal-induced degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  requires site-specific ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 11259-11263.
- Schieven, G.L., Mittler, R.S., Nadler, S.G., Kirihara, J.M., Bolen, J.B., Kanner, S.B. und Ledbetter, J.A. (1994). ZAP-70 tyrosine kinase, CD45, and T-cell receptor involvement in UV and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* **269**: 20718-20726.
- Schimke, R.T. (1984). Gene amplification in cultured animal cells. *Cell* **37**: 705-713.
- Schorpp, M., Mallick, U., Rahmsdorf, H.J. und Herrlich, P. (1984). UV-induced extracellular factor from human fibroblasts communicates the UV response to nonirradiated cells. *Cell* **37**: 861-868.

- Schreck, R., Rieber, P. und Baeuerle, P.A.** (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* **10**: 2247-2258.
- Schreiber, M., Baumann, B., Cotten, M., Angel, P. und Wagner, E.F.** (1995). Fos is an essential component of the mammalian UV response. *EMBO J.* **14**: 5338-5349.
- Schwarz, A., Bhardwaj, R., Aragane, Y., Mahnke, K., Riemann, H., Metze, D., Luger, T.A. und Schwarz, T.** (1995). Ultraviolet-B-Induced Apoptosis of Keratinocytes: Evidence for Partial Involvement of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in the Formation of Sunburn Cells. *J. Invest. Dermatol.* **104**: 922-927.
- Schwarz, E.M., Van Antwerp, D. und Verma I.M.** (1996). Constitutive Phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  by Casein Kinase II Occurs Preferentially at Serine 293: Requirement for Degradation of Free I $\kappa$ B $\alpha$ . *Mol. Cell. Biol.* **16**: 3554-3559.
- Scott, M.L., Fujita, T., Liou, H.C., Nolan, G.P. und Baltimore, D.** (1993). The p65-subunit of NF $\kappa$ B regulates I $\kappa$ B by two distinct mechanisms. *Genes & Dev.* **7**: 1266-1276.
- Sen, R. und Baltimore, D.** (1986a). Multiple Nuclear Factors Interact with the Immunoglobulin Enhancer Sequences. *Cell* **46**: 705-716.
- Sen, R. und Baltimore, D.** (1986b). Inducibility of  $\kappa$  Immunoglobulin Enhancer-Binding Protein NF- $\kappa$ B by a Posttranslational Mechanism. *Cell* **47**: 921-928.
- Setlow, R.B.** (1974). The Wavelengths in Sunlight Effective in Producing Skin Cancer: A Theoretical Analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 3363-3366.
- Shirakawa, F. und Mizel, S.B.** (1989). In Vitro Activation and Nuclear Translocation of NF- $\kappa$ B Catalyzed by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase and Protein Kinase C. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 2424-2430.
- Siders, W.M., Klimovitz, J.C. und Mizel, S.B.** (1993). Characterization of the Structural Requirements and Cell Type Specificity of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  Secretion. *J. Biol. Chem.* **268**: 22170-22174.
- Simon, M.M., Aragane, Y., Schwarz, A., Luger, T.A. und Schwarz, T.** (1994). UVB Light Induces Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) Activity Independently from Chromosomal DNA Damage in Cell-Free Cytosolic Extracts. *J. Invest. Dermatol.* **102**: 422-427.
- Singer, I.I., Scott, S., Hall, G.L., Limjuco, G., Chin, J. und Schmidt, J.A.** (1988). Interleukin 1 $\beta$  is localized in the Cytoplasmic Ground Substance but is largely absent from the Golgi Apparatus and Plasma Membranes of stimulated Human Monocytes. *J. Exp. Med.* **167**: 389-407.
- Squier, M.K., Miller, A.C., Malkinson, A.M. und Cohen, J.J.** (1994). Calpain activation in apoptosis. *J. Cell Physiol.* **159**: 229-237.
- Stein, B., Krämer, M., Rahmsdorf, H.J., Ponta, H. und Herrlich, P.** (1989a). UV-Induced Transcription from the Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Long Terminal Repeat and UV-Induced Secretion of an Extracellular Factor That Induces HIV-1 Transcription in Nonirradiated Cells. *J. Virol.* **63**: 4540-4544.
- Stein, B., Rahmsdorf, H.J., Steffen, A., Litfin, M. und Herrlich, P.** (1989b). UV-induced DNA Damage Is an Intermediate Step in UV-induced Expression of Human Immunodeficiency Virus Type 1, Collagenase, *c-fos*, and Metallothionein. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 5169-5181.

- Stephens, R.M., Rice, N.R., Hiebsch, R.R., Bose Jr., H.R. und Gilden, R.V.** (1983). Nucleotide sequence of *v-rel*: The oncogene of reticuloendotheliosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 6229-6233.
- Steward, R.** (1987). *Dorsal*, an Embryonic Polarity Gene in *Drosophila*, Is Homologous to the Vertebrate Proto-oncogene, *c-rel*. *Science* **238**: 692-694.
- Stoscheck, C.M. und Carpenter, G.** (1984). Down regulation of epidermal growth factor receptors: Direct demonstration of receptor degradation in human fibroblasts. *J. Cell Biol.* **98**: 1048-1053.
- Sun, S.-C., Elwood, J. und Greene, W.C.** (1996). Both Amino- and Carboxyl-Terminal Sequences within I $\kappa$ B $\alpha$  Regulate Its Inducible Degradation. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 1058-1065.
- Sun, S.-C., Ganchi, P.A., Ballard, D.W. und Greene, W.C.** (1993). NF $\kappa$ B Controls Expression of Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$ : Evidence for an Inducible Autoregulatory Pathway. *Science* **259**: 1912-1915.
- Suzuki, K., Imajoh, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Minami, Y. und Ohno, S.** (1987). Calcium-activated neutral protease and its endogenous inhibitor. *FEBS Lett.* **220**: 271-277.
- Svejstrup, J.Q., Wang, Z., Feaver, W.J., Wu, X., Bushnell, D.A., Donahue, T.F., Friedberg, E.C. und Kornberg, R.D.** (1995). Different Forms of TFIIH for Transcription and DNA Repair: Holo-TFIIH and a Nucleotide Excision Repairosome. *Cell* **80**: 21-28.
- Thanos, D. und Maniatis, T.** (1995). NF- $\kappa$ B: a lesson in family values. *Cell* **80**: 529-532.
- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J., Elliston, K.O., Ayala, J.M., Casano, F.J., Chin, J., Ding, G.J.-F., Egger, L.A., Gaffney, E.P., Limjuco, G., Palyha, O.C., Raju, S.M., Rolando, A.M., Salley, J.P., Yamin, T.-T., Lee, T.D., Shively, J.E., MacCross, M., Mumford, R.A., Schmidt, J.A. und Tocci, M.J.** (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 $\beta$  processing in monocytes. *Nature* **356**: 768-774.
- Tibbles, L.A., Ing, Y.L., Kiefer, F., Chan, J., Iscove, N., Woodgett, J.R. und Lassam, N.J.** (1996). MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathway via SEK1 and MKK3/6. *EMBO J.* **15**: 7026-7035.
- Traenckner, E.B.-M., Pahl, H.L., Henkel, T., Schmidt, K.N., Wilk, S. und Baeuerle, P.A.** (1995). Phosphorylation of human I $\kappa$ B $\alpha$  on serines 32 and 36 controls I $\kappa$ B $\alpha$  proteolysis and NF $\kappa$ B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.* **14**: 2876-2883.
- Traenckner, E.B.-M., Wilk, S. und Baeuerle, P.A.** (1994). A proteasome inhibitor prevents activation of NF $\kappa$ B and stabilizes a newly phosphorylated form of I $\kappa$ B $\alpha$  that still bound to NF $\kappa$ B. *EMBO J.* **13**: 5433-5441.
- Treier, M., Staszewski, L.M. und Bohmann, D.** (1994). Ubiquitin-Dependent c-Jun Degradation In Vivo Is Mediated by the  $\delta$  Domain. *Cell* **78**: 787-798.
- Treisman, R.** (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**: 205-215.
- Tu, Y., Tornaletti, S. und Pfeifer, G.P.** (1996). DNA repair domains within a human gene: selective repair of sequences near the transcription initiation site. *EMBO J.* **15**: 675-683.

- Tzen, C.-Y., Cox, R.L. und Scott, R.E.** (1994). Coordinate Induction of I $\kappa$ B $\alpha$  and NF $\kappa$ B Genes. *Exp. Cell Res.* **211**: 12-16.
- Valerie, K., Laster, W.S., Cheng, L., Kirkham, J.C., Reavey, P. und Kuemmerle, N.B.** (1996). Signal Transduction and HIV Transcriptional Activation After Exposure to Ultraviolet Light and Other DNA-Damaging Agents. *J. Photochem. Photobiol.* **62**: 280-285.
- Van Antwerp, D.J. und Verma I.M.** (1996). Signal-Induced Degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ : Association with NF $\kappa$ B and the PEST Sequence in I $\kappa$ B $\alpha$  Are Not Required. *Mol. Cell. Biol* **16**: 6037-6045.
- Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.R. und Verma, I.M.** (1996). Suppression of TNF- $\alpha$ -Induced Apoptosis by NF- $\kappa$ B. *Science* **274**: 787-789.
- van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P. und Angel, P.** (1995). ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J.* **14**: 1798-1811.
- Van Hoffen, A., Venema, J., Meschini, R., van Zeeland, A.A. und Mullenders, L.H.F.** (1995). Transcription-coupled repair removes both cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts with equal efficiency and in a sequential way from transcribed DNA in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts. *EMBO J.* **14**: 360-367.
- Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp, D. und Miyamoto, S.** (1995). Rel/NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes & Dev.* **9**: 2723-2735.
- Wang, C.-Y., Mayo, M.W. und Baldwin Jr., A.S.** (1996). TNF- and Cancer Therapy-Induced Apoptosis: Potentiation by Inhibition of NF- $\kappa$ B. *Science* **274**: 784-787.
- Wang, X.D., Sato, R., Brown, M.S., Hua, X.X. und Goldstein, J.L.** (1994). SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* **77**: 53-62.
- Warmuth, I., Harth, Y., Matsui, M.S., Wang, N. und DeLeo, V.A.** (1994). Ultraviolet radiation induces phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* **54**: 374-376.
- Watanabe, N. und Kobayashi, Y.** (1994). Selective release of a processed form of interleukin 1 $\alpha$ . *Cytokine* **6**: 597-601.
- Wesselborg, S., Prüfer, U., Wild, M., Schraven, B., Meuer, S.C. und Kabelitz D.** (1993). Triggering via the alternative CD2 pathway induces apoptosis in activated human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **23**: 2707-2710.
- Whiteside, S.T., Epinat, J.-C., Rice, N.R. und Israël, A.** (1997). I kappa B epsilon, a novel member of the I $\kappa$ B family, controls RelA and cRel NF- $\kappa$ B activity. *EMBO J.* **16**: 1413-1426.
- Whiteside, S.T., Ernst, M.K., LeBail, O., Laurent-Winter, C., Rice, N. und Israël, A.** (1995). N- and C-Terminal Sequences Control Degradation of MAD3/I $\kappa$ B $\alpha$  in Response to Inducers of NF $\kappa$ B Activity. *Mol. Cell. Biol* **15**: 5339-5345.
- Whitley, M., Thanos, D., Read, M. Maniatis, T. und Collins, T.** (1994). A striking similarity in the organization of the E-selectin and  $\beta$  interferon gene promoters. *Mol. Cell. Biol* **14**: 6464-6475.
- Wilhelmsen, K.C., Eggleton, K. und Temin, H.M.** (1984). Nucleic Acid Sequences of the Oncogene *v-rel* in Reticuloendotheliosis Virus Strain T and Its Cellular Homolog, the Proto-Oncogene *c-rel*. *J. Virol.* **52**: 172-182.

- Williams, J.L., Garcia, J., Harrich, D., Pearson, L., Wu, F. und Gaynor, R.** (1990). Lymphoid specific gene expression of the adenovirus early region 3 promoter is mediated by NF- $\kappa$ B binding motifs. *EMBO J.* **9**: 4435-4442.
- Wirth, T. und Baltimore, D.** (1998). Nuclear factor NF- $\kappa$ B can interact functionally with its cognate binding site to provide lymphoid-specific promoter function. *EMBO J.* **10**: 3109-3113.
- Wright, K., White, L., Kelly, A., Beck, S., Trowsdale, J. und Ting, J.** (1995). Coordinate regulation of the human TAP1 and LMP2 genes from a shared bidirectional promoter. *J. Exp. Med.* **181**: 1459-1471.
- Wulczyn, F.G., Krappmann, D. und Scheidereit, C.** (1996). The NF- $\kappa$ B/Rel and I $\kappa$ B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J. Mol. Med.* **74**: 749-769.
- Wyllie, A.H.** (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**: 555-556.
- Yamaizumi, M. und Sugano, T.** (1994). U.v.-induced nuclear accumulation of p53 is evoked through DNA damage of actively transcribed genes independent of the cell cycle. *Oncogene* **9**: 2775-2784.
- Yankulov, K., Yamashita, K., Roy, R., Egly, J.-M. und Bentley, D.L.** (1995). The Transcriptional Elongation Inhibitor 5,6 Dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole Inhibits Transcription Factor IIIH-associated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* **270**: 23922-23925.
- Yarosh, D.B. und Kripke, M.L.** (1996). DNA repair and cytokines in antimutagenesis and anticarcinogenesis. *Mutat. Res.* **350**: 255-260.
- Yarosh, D.B., Alas, L., Kibitel, J., O'Conner, A., Carrier, F. und Fornace Jr., A.J.** (1993). Cyclobutane Pyrimidine Dimers in UV-DNA Induce Release of Soluble Mediators that Activate the Human Immunodeficiency Virus Promotor. *J. Invest. Dermatol.* **100**: 790-794.
- Zabel, U., Schreck, R. und Baeuerle, P.A.** (1991). DNA Binding of Purified Transcription Factor NF- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* **266**: 252-260.
- Zandomeni, R., Bunick, D., Ackerman, S., Mittleman, B. und Weinmann, R.** (1983). Mechanism of Action of DRB. III. Effect on Specific In Vitro Initiation of Transcription. *J. Mol. Biol.* **167**: 561-574.
- Zhan, Q., Carrier, F. und Fornace Jr., A.J.** (1993). Induction of Cellular p53 activity by DNA-Damaging Agents and Growth Arrest. *Mol. Cell. Biol* **13**: 4242-4250.
- Zhang, H., Hannon, G.J. und Beach, D.** (1994a). p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev.* **8**: 1750-1758.
- Zhang, Q., DiDonato, J., Karin, M. und McKeithan, T.** (1994b). BCL3 encodes a nuclear protein which can alter the subcellular location of NF- $\kappa$ B proteins. *Mol. Cell. Biol* **14**: 3915-3926.
- Zhu, H., Fearnhead, H.O. und Cohen, G.M.** (1995). An ICE-like protease is a common mediator of apoptosis induced by diverse stimuli in human monocytic THP.1 cells. *FEBS Lett.* **374**: 303-308.

- Zhu, L. und Jones, P.P.** (1990). Transcriptional Control of the Invariant Chain Gene Involves Promotor and Enhancer Elements Common to and Distinct from Major Histocompatibility Complex Class II Genes. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 3906-3916.
- Ziegler, A., Leffell, D.J., Kunala, S., Sharma, H.W., Gailani, M., Simon, J.A., Halperin, A.J., Baden, H.P., Shapiro, P.E., Bale, A.E. und Brash, D.E.** (1993). Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 4216-4220.
- Zölzer, F. und Kiefer, J.** (1984). Wavelength dependence of inactivation and mutation induction to 6-thioguanine-resistance in V79 chinese hamster fibroblasts. *J. Photochem. Photobiol.* **40**: 49-53.