

**Aus dem Pathologischen Institut**

**der Universität Würzburg**

**Vorstand: Professor Dr. med. Andreas Rosenwald**

**C/EBP $\beta$  und seine proapoptotische Wirkung in murinen T-Zellen**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Gabriele Marianne Scheuerlein, geb. Behr**

**aus Zellingen**

**Würzburg, Oktober 2014**

**Referent:** Prof. Dr. habil. Dr.sc. Dr. rer. nat. Edgar Serfling

**Korreferent:** Prof. Dr. med. Manfred Gessler

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 23. April 2015

**Die Promovendin ist Ärztin**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1	Gliederung und Bestandteile des Immunsystems .....	1
1.1.1	Die angeborene Immunantwort .....	2
1.1.2	Die erworbene Immunität.....	3
1.1.3	Die Differenzierung der T-Helferzellen.....	4
1.1.3.1	Entwicklung der T <sub>H</sub> 1-Zellen.....	5
1.1.3.2	Differenzierung der T <sub>H</sub> 2-Zellen.....	7
1.1.3.3	Weitere CD4 <sup>+</sup> Effektor T-Zellen .....	9
1.2	Die Familie der C/EBP – Transkriptionsfaktoren.....	10
1.2.1	Einteilung und Struktur .....	10
1.2.2	Funktionelle Aspekte.....	13
1.2.3	C/EBPβ .....	16
1.3	Zellzyklus und Apoptose .....	20
1.3.1	Zellzyklusregulation.....	20
1.3.2	Exkurs: Die Rolle von C/EBPβ bei Überexpression von Cyclin D1.....	22
1.3.3	Myc/Mad/Max Transkriptionsfaktoren.....	22
1.3.4	Apoptose: Morphologie und Abgrenzung .....	24
1.3.5	Caspasen.....	26
1.3.6	Bcl-2-Proteine .....	27
1.3.7	Signalwege zur Apoptose .....	29
1.3.8	Zelltod in T-Zellen .....	33
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	35
2.1	Material .....	35
2.1.1	Chemikalien und Reaktionssysteme .....	35
2.1.2	Geräte und Verbrauchsmaterial .....	38
2.1.3	Gewebekulturzellen und Bakterien.....	39
2.1.4	Nährmedien .....	40
2.1.5	Lösungen und Puffer .....	42

2.1.6	Enzyme.....	48
2.1.7	Peptide und Antikörper.....	48
2.1.8	Größenmarker.....	49
2.1.9	Plasmide und Vektoren.....	49
2.2	Methoden .....	51
2.2.1	Zellkultur und zellbiologische Methoden .....	51
2.2.1.1	Lagerung und Kultivierung der Zellen .....	51
2.2.1.2	Induktion der EL-4 Zellen .....	52
2.2.1.3	Herstellung rekombinanter Retroviren .....	52
2.2.1.4	Infektion von Zielzellen .....	53
2.2.1.5	Selektion transduzierter Zelllinien.....	54
2.2.1.6	BSA-Gradientenzentrifugation .....	54
2.2.1.7	Annexin V-PE- und 7-AAD-Färbung.....	55
2.2.1.8	Auswertung am FACScan .....	55
2.2.1.9	FACS-basierte Sortierung von Zellen.....	56
2.2.2	Molekularbiologische Methoden .....	56
2.2.2.1	Bakterienkulturen .....	56
2.2.2.2	Herstellung kompetenter Bakterien .....	57
2.2.2.3	Transformation kompetenter Bakterien .....	57
2.2.2.4	Plasmidisolierung in präparativen Mengen.....	57
2.2.2.5	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	58
2.2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese .....	59
2.2.2.7	RNA-Isolation .....	59
2.2.2.8	Ribonuklease-Protektionsanalyse .....	60
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	61
2.2.3.1	Präparation von Gesamtzellproteinextrakten .....	61
2.2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	61
2.2.3.3	Transfer auf eine Nitrocellulosemembran (NC) .....	62
2.2.3.4	Immundetektion .....	62
2.2.3.5	Entfernung gebundener Antikörper von NC-Membranen.....	63

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	64
3.1	C/EBP $\beta$ steigert die Apoptoserate in EL-4 Zellen .....	64
3.2	Z-VAD fmk verringert Apoptose in C/EBP $\beta$ -ER-Zellen.....	66
3.3	C/EBP $\beta$ verstärkt die Spaltproduktbildung aus PARP.....	68
3.4	Dominant-negative Caspase-3 beeinflusst das RNA-Expressionsmuster der EL-4 T-Zellen....	71
3.4.1	Dominant-negative Caspase-3 unterstützt die Unterdrückung von <i>Il2</i> und <i>Ifng</i> , schwächt aber auch die <i>Il4</i> -Induktion durch C/EBP $\beta$ . .....	73
3.4.2	Dominant-negative Caspase-3 beeinflusst die Unterdrückung von <i>Myc</i> durch C/EBP $\beta$ nicht, führt jedoch zu vermehrter Bildung von <i>Mad4</i> .....	78
3.4.3	Überexpression von C/EBP $\beta$ steigert die Expression der endogenen <i>Caspase3</i> und bei Blockade der Caspase-3 die der <i>Caspase11</i> . .....	82
3.5	Aktivierung von C/EBP $\beta$ und dominant-negative Caspase-3 wirken sich auf die Konzentration der endogenen Caspase-3 in EL-4 Zellen aus.....	86
3.5.1	Aktivierung von C/EBP $\beta$ und dominant-negative Caspase-3 steigern endogene Caspase-3.....	86
3.5.2	Die Expression der Caspase-7 ist auf Proteinebene unbeeinflusst von C/EBP $\beta$ und Hemmung der Caspase-3.....	87
3.6	Dominant-negative Caspase-3 vermag nicht, die Zellen vor einer durch C/EBP $\beta$ verstärkten Apoptose zu retten.....	88
3.7	Dominant-negative Caspase-9 beeinflusst das RNA-Expressionsmuster der EL-4 T-Zellen nur gering. ....	90
3.7.1	Dominant-negative Caspase-9 beeinflusst die <i>Il4</i> -Induktion durch C/EBP $\beta$ nicht, scheint jedoch die Suppression von <i>Il2</i> und <i>Ifng</i> leicht abzuschwächen. ....	91
3.7.2	Dominant-negative Caspase-9 steigert die Expression sowohl pro- als auch antiapoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie.....	95
3.8	Dominant-negative Caspase-9 vermag nicht, die Zellen vor einer durch C/EBP $\beta$ verstärkten Apoptose zu retten.....	97
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	99
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	106

# 1 Einleitung

## 1.1 Gliederung und Bestandteile des Immunsystems

Edward Jenner entwickelte 1796 die Methode der Vakzination. In seinem gewagten und umstrittenen Experiment gelang es ihm, einem achtjährigen Jungen durch Impfung mit dem Kuhpockenvirus Immunität gegen das menschliche Pockenvirus zu vermitteln. Jenners Arbeiten stehen am Anfang der Entwicklung der relativ jungen Wissenschaft der Immunologie, der Lehre über Struktur und Funktion des Immunsystems. [Janeway et al. 2002, Eckart 1998]

Um seine Integrität zu bewahren, muss sich der Organismus kontinuierlich mit exogenen Noxen wie Viren, Bakterien, Pilzen und Protozoen sowie endogenen Noxen wie Tumorzellen auseinandersetzen und diese abwehren. Diese Aufgaben leistet das Immunsystem. Es gliedert sich in eine angeborene und eine evolutionsgeschichtlich jüngere erworbene bzw. adaptive Immunabwehr. Beide sind jedoch sehr eng miteinander verwoben und bauen aufeinander auf.

Alle zellulären Bestandteile des Immunsystems entwickeln sich im Knochenmark aus den pluripotenten hämatologischen Stammzellen. Diese teilen sich in zwei Typen, die lymphoiden und die myeloiden Stammzellen. Die Zellen der erworbenen Immunität, die Lymphozyten, stammen von der gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle ab. Während die sich hieraus differenzierenden B-Zellen (*bone marrow*, ursprünglich von lat. *bursa fabricii* der Vögel) zur weiteren Reifung im Knochenmark verbleiben, wandern die T-Zellen (*thymus*) zur weiteren Ausdifferenzierung in den Thymus ein. Knochenmark und Thymus stellen die sogenannten primären oder zentralen lymphatischen Organe dar. Zu den sekundären oder peripheren lymphatischen Organen zählen die Lymphknoten, die Milz sowie die mucosaassoziierten lymphatischen Gewebe (MALT).

Die zellulären Träger der angeborenen Immunität stammen vorwiegend von der gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle ab. Aus dieser differenzieren sich einerseits die Megakaryozyten-Erythrozytenvorläuferzellen, Ausgangspunkt der Thrombozyten- und Erythrozytenentwicklung, sowie andererseits die Granulozyten-Makrophagenvorläuferzellen. Aus diesen gehen die sich im Färbeverhalten ihrer zytoplasmatischen Granula unterscheidenden polymorphkernigen Leukozyten, die neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten, sowie die Monozyten, die die im Blut zirkulierenden Vorläufer der

Gewebsmakrophagen darstellen, hervor. Ebenso entstehen in dieser Reihe die dendritischen Zellen sowie die noch unbekanntes Vorläufer der Mastzellen.

Die humoralen Bestandteile des Immunsystems stellen das Komplementsystem (vor allem) auf Seiten der angeborenen Immunität und die Antikörper auf Seiten der erworbenen Immunität dar. Diese Einteilung ist jedoch sehr vereinfachend. So zeigte die Arbeitsgruppe von Claudia Kemper, dass Komplementfaktoren entscheidende Rollen u.a. bei der Erhaltung der T-Zell-Homöostase und bei T-Zell-Effektormechanismen spielen [Liszewski et al. 2013, Ghannam et al. 2014].

### **1.1.1 Die angeborene Immunantwort**

Makrophagen und neutrophile Granulozyten stellen die Hauptzellen der angeborenen Immunität dar. Sie bilden die „erste Verteidigungslinie“ gegen zahlreiche in den Körper eindringende Mikroorganismen, insbesondere Bakterien. Über keimbahnkodierte Rezeptoren für häufig vorkommende Oberflächenmerkmale von Pathogenen (Mustererkennung) werden diese von den phagozytischen Zellen sehr rasch erkannt und in das Zellinnere aufgenommen. Durch Bildung und Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen entwickelt sich eine lokale Entzündungsreaktion. Hierbei spielt auch die humorale Komponente der angeborenen Immunität, das Komplementsystem, eine wichtige Rolle. Diese Gruppe von Plasmaproteinen verstärkt mit Hilfe von Antikörpern der erworbenen Immunantwort, aber auch ohne diese, die bakterizide Aktivität der Phagozyten. Um eine Infektion abzuwehren oder sie bis zum Einsetzen der adaptiven Immunantwort, die eine Latenz von vier bis sieben Tagen beansprucht, einzudämmen, löst die angeborene Immunantwort einige induzierte Effektormechanismen aus. Diese bestehen in der durch Zytokine und Chemokine ausgelösten Entzündungsreaktion. So werden weitere Phagozyten wie vor allem neutrophile Granulozyten zum Infektionsherd gelockt. Über Zytokine kann eine Fieberreaktion ausgelöst werden sowie die Bildung von Akut-Phase-Proteinen wie das C-reaktive-Protein (CRP) und mannanbindendes Protein, die an Pathogene binden können. Virale Infektionen können über die Produktion von Interferonen sowie die Aktivierung von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) bekämpft werden.

Die Brücke zur erworbenen Immunität bilden zwei der, zusammen mit den B-Zellen insgesamt drei Arten „professioneller“ antigenpräsentierender Zellen (APC), die Makrophagen und die dendritischen Zellen.

### 1.1.2 Die erworbene Immunität

Im Vergleich zu der angeborenen Immunantwort stellt die erworbene Immunität eine hoch antigenspezifische Abwehr dar, die flexibler ist und eine ausgeprägte Gedächtnisfunktion besitzt. Diese ermöglicht dem Organismus bei wiederholter Infektion eine rasche und effiziente Abwehr, die den erneuten Krankheitsausbruch verhindern kann. Voraussetzung der Aktivierung der adaptiven Immunantwort ist die Antigenpräsentation durch „professionelle“ antigenpräsentierende Zellen (APC), die Makrophagen, die dendritischen Zellen und die B-Lymphozyten, an T-Lymphozyten mit dem passenden antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR). Hierbei unterscheidet man die das Oberflächenmolekül CD8 tragenden zytotoxischen T-Zellen von den CD4 positiven T-Helferzellen. Nach ihren verschiedenartigen Funktionen, die u.a. aus ihrem unterschiedlichen Interleukinmuster resultieren, wurden neben inzwischen weiteren (s. 1.1.3.3) ursprünglich die  $T_H1$ - und die  $T_H2$ -Zellen definiert [Mosmann, Coffman 1989].

Evolutionsgeschichtlich baut die adaptive Immunantwort auf der angeborenen auf und nutzt deren Effektormechanismen. Grundlage der Einteilung zur adaptiven Immunität ist die Theorie der klonalen Selektion von Lymphozyten mit antigenspezifischen Rezeptoren. Durch somatische Rekombination der einzelnen Gensegmente entsteht eine ausgeprägte Diversität antigenspezifischer immunrezeptortragender Lymphozyten. Durch Elimination von autoreaktiven Lymphozyten und über Überlebenssignale an antigenrezeptortragende Lymphozyten erfolgen die Bereitstellung und Regulierung eines Lymphozytenreservoirs. Zudem unterliegen der B-Zell- (BCR) und T-Zell-Rezeptor (TCR) einer Affinitätsreifung, wodurch sie hochaffin für das jeweilige Antigen werden, was die hohe Antigenspezifität der erworbenen Immunantwort bewirkt. Zu Beginn der erworbenen Immunantwort steht das Aufeinandertreffen eines Lymphozyten auf sein spezifisches, durch die antigenpräsentierende Zelle präsentiertes Antigen. Neben der Bindung des Antigens an den spezifischen Rezeptor ist zur Aktivierung des T-Lymphozyten ein weiteres Signal seitens der APC erforderlich. Dies wird als Kostimulation bezeichnet. Im Rahmen seiner Aktivierung wird er zur Proliferation i.S. einer klonalen Expansion sowie zur Differenzierung zu Effektor- und Gedächtniszellen angeregt. [Janeway et al. 2002]



### 1.1.3 Die Differenzierung der T-Helferzellen

Wird der Organismus von einem intrazellulären oder einem extrazellulär sich vermehrenden Erreger befallen, erfordert dies jeweils unterschiedliche Reaktionen des Immunsystems, um eine effiziente Abwehr zu ermöglichen. So steht im Falle von intrazellulären Erregern wie Leishmanien oder *Toxoplasma gondii* die zytotoxische Immunantwort im Vordergrund, im Falle extrazellulärer Erreger wie Helminthen die humorale Reaktion. Dies wird über die verschiedenen Klassen von CD4 positiven T-Helferzellen gesteuert. Während einer Immunantwort können naive T-Helferzellen in mehrere funktionelle Klassen von Effektorzellen differenzieren, wobei an dieser Stelle etwas vereinfachend folgende zwei T-Helferzellsubtypen näher betrachtet werden sollen: Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) sezernierende  $T_H1$  Zellen und Interleukin 4 (IL-4) bildende  $T_H2$  Zellen [Murphy, Reiner 2002]. Sie unterscheiden sich in ihrem Zytokinmuster und ihrer Funktion.  $T_H1$  Zellen sezernieren IFN- $\gamma$ , Interleukin 2 (IL-2), TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) und Lymphotoxin (TNF- $\beta$ ) [Wan, Flavell 2009]. Sie dienen der Abwehr intrazellulärer Pathogene, indem sie u.a. Makrophagen aktivieren sowie die Bildung opsonisierender Antikörper vermitteln. Immunpathologisch sind sie an organspezifischen Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 1 oder entzündlichen Darmerkrankungen beteiligt. Die Vermittlung einer humoralen Immunantwort mit vorwiegend IgE-Bildung zur Abwehr großer extrazellulärer Pathogene wie Helminthen ist Resultat einer vorherrschenden  $T_H2$  Antwort. Das  $T_H2$  Zytokinmuster umfasst neben IL-4 die Interleukine 5, 10 und 13 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) [Wan, Flavell 2009]. Eine fehlregulierte überschießende  $T_H2$  Antwort ist Grundlage von Allergien und Asthma bronchiale. Entscheidend für Erfolg oder Misserfolg einer Immunabwehr, einer Entzündungsreaktion oder von autoimmunen Prozessen scheint die endgültige Zusammensetzung der T-Helferzellantwort zu sein. Die Differenzierung einer naiven  $T_H0$  Zelle in  $T_H1$  und  $T_H2$  Zellen stellt einen plastischen Prozess dar, an dem sehr viele verschiedene Faktoren beteiligt sind. Eine Schlüsselfunktion besitzen die induzierenden Interleukine IL-12 und IL-4, wobei jedoch auch die Expression der verschiedenen kostimulatorischen Moleküle, die Antigenpräsentation sowie epigenetische Modifikationen und weitere nichtzytokine Elemente wichtige Rollen zu spielen scheinen. [Murphy, Reiner 2002]

### 1.1.3.1 Entwicklung der T<sub>H</sub>1-Zellen

Eine zentrale Rolle bei der Differenzierung zu T<sub>H</sub>1 Zellen spielt der Transkriptionsfaktor T-bet (kodiert durch *Tbx21*), der von Szabo 2000 charakterisiert und kloniert wurde [Murphy, Reiner 2002, Szabo, Kim et al. 2000]. Er gehört der Familie der T-box Transkriptionsfaktoren an und wird durch STAT1 („signal transducer and activator of T cells 1“) über die IFN- $\gamma$  Signalkette und synergistisch dazu über Stimulation des TCR induziert [Afkarian et al. 2002, Lighvani et al. 2001, Schulz et al. 2009]. Es werden jedoch auch STAT-unabhängige Induktionswege diskutiert [Murphy, Reiner 2002]. T-bet fördert die Expression von IFN- $\gamma$ , öffnet den *Ifng*-Locus durch Chromatinmodifikationen für die Transkription, induziert die Bildung der  $\beta$ 2-Untereinheit des Interleukin-12-Rezeptors (IL-12R $\beta$ 2) und stabilisiert seine eigene Expression [Mullen et al. 2001, Afkarian et al. 2002]. Des Weiteren hemmt T-bet den die T<sub>H</sub>2-Entwicklung fördernden Transkriptionsfaktor GATA3 [Hwang et al. 2005]. Bei der Induktion von IFN- $\gamma$  interagiert es synergistisch mit den Transkriptionsfaktoren „H2.0-like homebox 1“ (Hlx) und Runx3 [Mullen et al. 2002, Djuretic et al. 2007, Schulz et al. 2009]. Zheng et al. bestätigten den Synergismus von T-bet und Hlx auch *in vivo* und zeigten, dass IFN- $\gamma$  durch Hlx positiv reguliert wird. Insbesondere in einem frühen Zeitfenster der T<sub>H</sub>1-Entwicklung kann Hlx alleine IFN- $\gamma$  induzieren, was ein Hinweis auf einen epigenetischen Status sein könnte, der Hlx den Zugang zum Promotor erlaubt. Zu einem späteren Zeitpunkt von sich entwickelnden T<sub>H</sub>2-Zellen benötigt Hlx T-bet, das chromatinmodifizierend wirken kann, um mit diesem gemeinsam die Zahl IFN- $\gamma$  produzierender Zellen weiter zu steigern. [Zheng et al. 2004] Sowohl T-bet als auch Hlx korrelieren mit hohen Raten von Dimethylierungen von Histon H3 K4 (H3K4me<sub>2</sub>) am *Ifng*-Gen, was einem Aktivierungsstatus des Gens entspricht [Hamalainen-Laanaya et al. 2007]. Diese Untersuchungen der Kinetik der Histondimethylierungen verdeutlichen die wichtige Rolle epigenetischer Effekte bei der Zytokinregulation und der T<sub>H</sub> Differenzierung.

IFN- $\gamma$  kann über verschiedene Wege induziert werden. Zum einen über den TCR, zum anderen über die Zytokinrezeptoren für IL-12 und IL-18 [Yang et al. 1999]. IL-12 und IL-18 scheinen synergistisch die IFN- $\gamma$ -Produktion zu fördern [Takeda et al. 1998, Neighbors et al. 2001]. IFN- $\gamma$  kann als Leitzytokin der T<sub>H</sub>1-Zellen bezeichnet werden, doch ist das Ausmaß seiner Bedeutung für die T<sub>H</sub>1-Differenzierung umstritten, da dies auch sehr von der jeweiligen untersuchten Mauslinie abhängig ist [Wan, Flavell 2009]. Obgleich IFN- $\gamma$  ein starker Aktivator

von T-bet ist, kann es ohne IL-12 die T<sub>H</sub>1-Differenzierung nicht initiieren [Schulz et al. 2009, Macatonia et al. 1993, Seder et al. 1993]. Indessen fördert IL-12 die T<sub>H</sub>1-Differenzierung stark [Manetti et al. 1993], was in vielen sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*- Untersuchungen gezeigt werden konnte [Wan, Flavell 2009]. Das aus zwei Untereinheiten, p35 und p40, bestehende Zytokin wird von Zellen der angeborenen Immunität nach Aktivierung und Stimulation mit IFN- $\gamma$  produziert [Wan, Flavell 2009]. Nach Bindung an seinen Rezeptor folgt Signalweiterleitung über Januskinase 2 (Jak2) oder Tyrosinkinase 2 (Tyk2), STAT1 und STAT4 [Gately et al 1998], woraufhin unter anderem eine Induktion des IL-18 Rezeptors IL-18R $\alpha$  ausgelöst wird. IL-18 wiederum fördert als Cofaktor von IL-12 die IFN- $\gamma$  Produktion [Robinson et al. 1997]. Der IL-12- und IL-18-Signalweg der IFN- $\gamma$ -Induktion korreliert mit Expression der GADD-Familienmitglieder („growth arrest and DNA-damage-inducible“) GADD45 $\beta$  und GADD45 $\gamma$  [Yang et al. 2001, Lu et al 2001], die an den MAPK-Signalwegen (mitogenaktivierte Proteinkinase) beteiligt sind, und ist stark abhängig von STAT4 [Afkarian et al. 2002]. STAT4 stellt insbesondere durch seine Rolle im IL-12-Signalweg neben T-bet, Hlx und Runx3 einen für die T<sub>H</sub>1-Entwicklung sehr wichtigen Transkriptionsfaktor dar [Wan, Flavell 2009, Schulz et al. 2009]. Die Arbeitsgruppe um Thomas Höfer beschäftigte sich näher mit den Expressionskinetiken von T-bet, IFN- $\gamma$  und der IL-12-Rezeptor  $\beta$ 2-Kette (IL-12R $\beta$ 2). Schulz et al. konnten zeigen, dass T-bet biphasisch mit Maxima 24 Stunden und 120 Stunden nach TCR-Stimulation exprimiert wird. Während die erste Phase IFN- $\gamma$ -Signale benötigt, ist die zweite Expressionswelle direkt abhängig von IL-12 und STAT4. Die zeitliche Abfolge scheint durch die TCR-Aktivierung gegeben zu sein, da diese die Expression von IL-12R $\beta$ 2 hemmt. Nach Wegfall dieser Hemmung mit dem Ende der Antigenstimulation bewirkt IL-12 den Wiederanstieg von T-bet. Es konnte gezeigt werden, dass diese späte durch IL-12 vermittelte Expressionswelle von T-bet verantwortlich ist für das *Priming* der T<sub>H</sub>1-Zellen für die rasche IFN- $\gamma$ -Produktion nach Reexposition mit dem Antigen. [Schulz et al. 2009]

Das etwas später entdeckte Interleukin 27 (IL-27) scheint in der frühen Differenzierungsphase eine wichtige Rolle zu spielen [Yoshida et al. 2001]. Das mit IL-12, IL-23 und IL-35 zur IL-12-Zytokinfamilie gehörende heterodimere Protein besteht aus den Untereinheiten EBI 3 („Ebstein Barr virus-induced gene 3“) und p28, die jeweils mit der p40 bzw. p35 Untereinheit von IL-12 verwandt sind [Pflanz et al. 2002]. Von antigenpräsentierenden Zellen in deren früher Aktivierungsphase synthetisiert, wirkt es als Ligand des IL-27-Rezeptors, der aus WSX-1 (IL-27R $\alpha$ -Kette oder T Zell Zytokinrezeptor) und dem Glykoprotein 130 (gp130), der signaltransduzierenden Untereinheit des IL-6 Rezeptors (IL-6R), besteht. So werden weiter

STAT1 und STAT3 aktiviert, was schließlich u.a. die Expression von IL12R $\beta$ 2 fördert und so die IFN- $\gamma$ -Produktion über den IL-12-Signalweg. [Yoshida et al. 2009, Pflanz et al. 2004] Auch wurde eine mögliche Suppression von GATA3 durch IL-27 diskutiert [Yoshida et al. 2009]. Des Weiteren besitzt IL-27 auch immunsuppressive Wirkung durch Unterdrückung von IL-2, Hemmung der Entwicklung von T<sub>H</sub>17-Zellen und Induktion von IL-10 [Yoshida et al. 2009].

### 1.1.3.2 Differenzierung der T<sub>H</sub>2-Zellen

Während die Entwicklung der T<sub>H</sub>1-Zellen sehr von Signalen ausgehend von Zellen des angeborenen Immunsystems abhängig ist, scheint die T<sub>H</sub>2-Differenzierung durch das Wegfallen hemmender Signale der angeborenen Immunität zu erfolgen [Murphy, Reiner 2002]. Da die Ziele der T<sub>H</sub>2-Antwort im Vergleich zur T<sub>H</sub>1-Reaktion phylogenetisch jüngere Organismen sind, könnte man vermuten, dass sich in Vertebraten die T<sub>H</sub>2-Antwort nach der T<sub>H</sub>1-Immunität entwickelt hat [Wan, Flavell 2002]. Die Entwicklung der T<sub>H</sub>2 Zellen ist ein Prozess, der fast ausschließlich von einem Zytokin, dem Interleukin 4 (IL-4), abhängig ist [Le Gros et al. 1990, Swain et al. 1990]. Rezeptorbindung an IL-4R $\alpha$  (IL-4-Rezeptor  $\alpha$ ) führt zu Aktivierung von STAT6, das *in vitro* den Hauptsignaltransduktor von IL-4 darstellt, wohingegen sich *in vivo* auch STAT6-unabhängige Signalwege zur T<sub>H</sub>2-Entwicklung finden [Wan, Flavell 2009]. Aktivierung von STAT6 hat insbesondere Hochregulation des Transkriptionsfaktors GATA3 zur Folge. Dieser bewirkt Transkription der T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, [Zheng, Flavell 1997] wobei er direkt an die Promotoren von *Ii5* und *Ii13* bindet [Zhu et al. 2004], hingegen den Promotor von *Ii4* über Chromatinmodifikationen im Cluster für die Transkription öffnet [Ouyang et al. 2000, Takemoto et al. 2000].

Ouyang et al. zeigten, dass sich in IL-4 produzierenden STAT6<sup>-/-</sup>defizienten T-Zellen GATA3 und ein T<sub>H</sub>2-Phänotyp findet, was für eine STAT6-unabhängige GATA3-Induktion spricht. Doch gelang es erst durch Einführung von GATA3 in diese STAT6<sup>-/-</sup>defizienten Zellen, die T<sub>H</sub>2-Entwicklung komplett wiederherzustellen. So zeigte sich eine Induktion des T<sub>H</sub>2-spezifischen Transkriptionsfaktors c-MAF und es entwickelten sich die typischen DNase I hypersensitiven Stellen im *Ii4*-Locus, was zu einer vollständigen Expression der T<sub>H</sub>2-Zytokine führte.

Des Weiteren scheint GATA3 über eine STAT6-unabhängige Autoaktivierungsschleife zur Stabilisierung des eingeschlagenen T<sub>H</sub>2-Weges zu verfügen. [Ouyang et al. 2000] Takemoto et

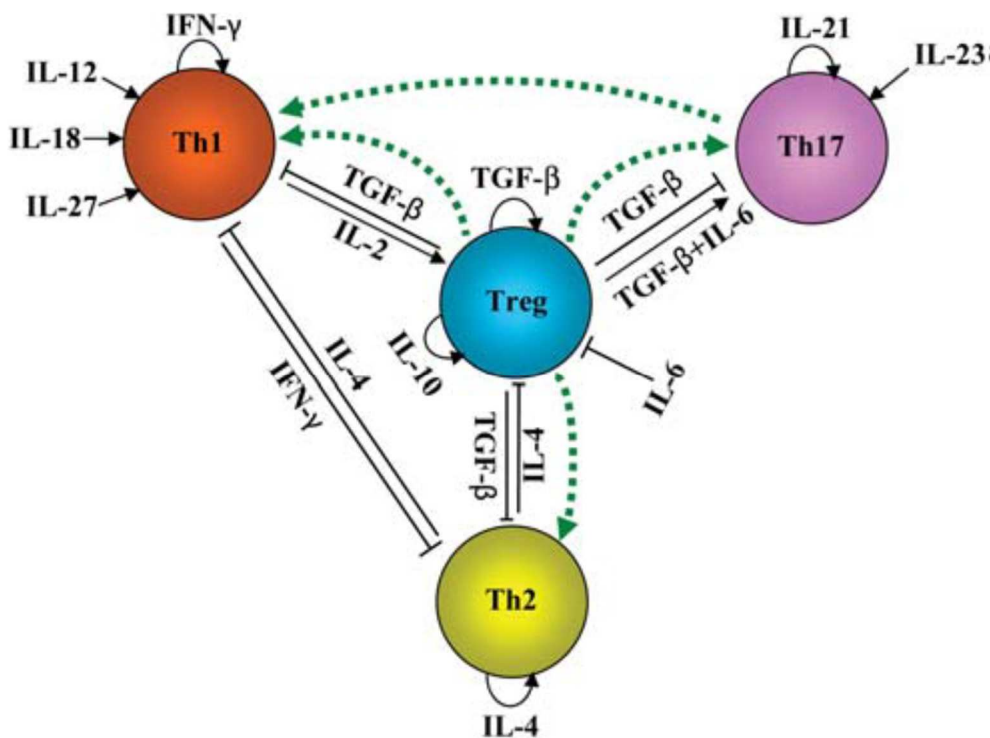
al. konnten zeigen, dass STAT6 und GATA3 nicht nur in den die Gene *Il4* und *Il13* flankierenden Regionen Veränderungen der Chromatinkonfiguration bewirken, sondern auch in der zwischen den beiden Genen liegenden regulatorischen Region, die für die Expression der gesamten Gruppe der T<sub>H</sub>2-Zytokine verantwortlich zu sein scheint. [Takemoto et al. 2000] Auch dies weist neben zahlreichen weiteren Ergebnissen [Murphy, Reiner 2002] auf die zentrale Rolle von GATA3 bei der Differenzierung zu T<sub>H</sub>2-Zellen hin. Die Expression von GATA3 scheint wie die von STAT6 durch MEL18, ein Protein der Polycomb-Gruppe, positiv reguliert zu sein, wobei u.a. die Zinkfingerproteine FOG1 („friend of GATA1“) und ROG („repressor of GATA“) Regulatoren auf posttranskriptioneller Ebene darstellen [Murphy, Reiner 2002].

C-Maf, ein Transkriptionsfaktor der AP-1-Familie, wird spezifisch in T<sub>H</sub>2-Zellen exprimiert. Er ist der erste identifizierte Faktor, der an der Regulierung der IL-4-Bildung direkt beteiligt ist [Murphy, Reiner 2002]. Weitere für die IL-4-Expression und die T<sub>H</sub>2-Differenzierung bedeutsame Transkriptionsfaktoren sind IRF-4 („interferon regulatory factor 4“) und Gfi-1 („growth-factor independent 1“) [Wan, Flavell 2009]. IRF-4, der auch bei der T<sub>H</sub>1-Antwort eine wichtige Rolle spielt, scheint GATA3 hochzuregulieren [Lohoff et al. 2002]. Gfi-1, der selektiv durch STAT6 induziert wird, scheint in Synergie mit GATA3 die klonale Expansion von T<sub>H</sub>2-Zellen zu fördern, indem er Proliferation zu steigern und Apoptose zu verhindern vermag [Zhu et al. 2002]. Auch die nicht T<sub>H</sub>2-spezifischen Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie („nuclear factor of activated T cells“) sind bei der Differenzierung dieser Zellen von Bedeutung, wobei sie sowohl positive als auch negative Effekte bei komplexen Interaktionsmustern zeigen [Murphy, Reiner 2002]. Während NFATc1-defiziente T-Zellen weniger IL-4 exprimieren [Ranger et al. 1998, Yoshida et al. 1998, Serfling et al. 2000], führt der Verlust von NFATc2 und dies besonders beim gleichzeitigen Verlust von NFATc3 zu einer verstärkten und lang anhaltenden Ausschüttung von IL-4, IL-5 und IL-13. Allerdings zeigte sich dies nicht unter starken T<sub>H</sub>1-induzierenden Bedingungen, wonach eine Repolarisierung durch Inhibition von NFATc2 und NFATc3 allein nicht erreicht werden kann [Kiani et al. 1997, Rengarajan et al. 2002].

Berberich-Siebelt et al. zeigten, dass der Transkriptionsfaktor C/EBP $\beta$ , auf den in den folgenden Kapiteln näher eingegangen werden soll, die Expression von IL-4 fördert, hingegen die Bildung von IFN- $\gamma$  und IL-2 vermindert. So scheint dieser ebenfalls bei der Differenzierung von T<sub>H</sub>2-Zellen eine wichtige Rolle zu spielen. [Berberich-Siebelt et al. 2000]

### 1.1.3.3 Weitere CD4<sup>+</sup> Effektor T-Zellen

Grundlage des sogenannten Th1-Th2-Paradigmas der 90er Jahre stellten die Arbeiten um Mosmann, Coffman und Carty 1986 dar. Ihnen gelang es, zwei Arten CD4 positiver T-Zellen, Th1- und Th2-Zellen, anhand ihres Zytokinmusters und ihrer unterschiedlichen Auswirkungen auf antikörperproduzierende B-Zellen zu unterscheiden [Mosmann et al. 1986, Coffman, Carty 1986]. Intensive Forschung auf diesem Gebiet führte zur Identifizierung zahlreicher weiterer CD4<sup>+</sup> T-Zellarten mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften. So sind neben den Th1- und Th2-Zellen noch Th17, Th9 und die folliculären Helfer-T-Zellen (T<sub>FH</sub>) an Entzündungsreaktionen beteiligt, wohingegen die regulatorischen T-Zellen (Treg), darunter die sog. natürlich vorkommenden nTreg, die induzierten iTreg und die Klasse 1 – Treg Zellen (Tr1) an immunsupprimierenden Vorgängen bzw. der Toleranzentwicklung mitwirken. [Wan, Flavell 2009]



**Abbildung 1.1: Überblick über die für die Differenzierung der T-Helferzellen wichtigen Zytokine [aus Wan, Flavell 2009].** Zwecks Erhaltung einer Immun-Homöostase balancieren sich die Zellarten gegeneinander durch die jeweiligen Zytokinwirkungen aus. Die gepunkteten grünen Linien zeigen an, dass unter bestimmten Erfordernissen der Immunabwehr ein Übergang von einer Zellart in die jeweils andere möglich ist. [Wan, Flavell 2009]

## 1.2 Die Familie der C/EBP – Transkriptionsfaktoren

Den Mittelpunkt dieser Arbeit bildet der Transkriptionsfaktor C/EBP $\beta$ , der ein Mitglied der Familie der „CCAAT-Enhancer binding proteins“ (C/EBPs) ist. Daher soll nach einem kurzen Überblick über die einzelnen Mitglieder dieser Familie von Transkriptionsfaktoren, über ihre Struktur und einige funktionellen Aspekte näher auf C/EBP $\beta$  im Speziellen eingegangen werden.

### 1.2.1 Einteilung und Struktur

Die C/EBP Familie ist eine Gruppe von basische-Leucinzipper-Transkriptionsfaktoren (bZIP-Faktoren). Im komplexen Regulationsnetzwerk der eukaryotischen Genexpression stellen sie wichtige Einflussfaktoren dar, die an der Regulation essentieller Organismusfunktionen wie Zellzyklus, Hämatopoese, Skelettentwicklung, Stoffwechsel sowie Immunantworten beteiligt sind. [Tsukada et al. 2011] Im Labor von Steve McKnight wurde Ende der 1980er Jahre das erste Mitglied dieser Familie als hitzestabiles Protein aus Zellkernen von Rattenhepatozyten isoliert. Es konnte mit dem CCAAT-Motiv verschiedener Promotoren sowie einer *core homology* – Sequenz bestimmter viraler Enhancer interagieren. [Ramji, Foka 2002] Dessen Gen wurde 1988 kloniert, was nach zahlreichen Untersuchungen zur Entdeckung der Gruppe der basische-Leucinzipper (bZIP)-Transkriptionsfaktoren führte. [Ramji, Foka 2002, Landschulz et al. 1988] Bisher wurden fünf weitere Mitglieder der C/EBP-Familie entdeckt, die in der Literatur unterschiedlich benannt wurden. Cao et al. führten eine systematische Nomenklatur ein, C/EBP $\alpha$  bis  $\zeta$ , gemäß der chronologischen Abfolge ihrer jeweiligen Entdeckung. [Cao et al. 1991] Folgende Tabelle (Tab. 1.1) soll diesbezüglich einen Überblick geben:

<b>Name:</b>	<b>Alternative Benennungen:</b>
C/EBP $\alpha$	C/EBP, R $\alpha$ C/EBP-1, p42, p30
C/EBP $\beta$	NF-IL6, LAP*, LAP, LIP, CRP2, IL6-DBP, C/EBP $\beta$ -1, C/EBP $\beta$ -2, NF-M, AGP/EBP, ApC/EBP
C/EBP $\gamma$	Ig/EBP, Ig/EBP-1

C/EBP $\delta$	NF-IL6 $\beta$ , CRP3, CELF, R $\alpha$ C/EBP2
C/EBP $\epsilon$	CRP1
C/EBP $\zeta$	CHOP, CHOP-10, GADD153, DDIT 3

**Tabelle 1.1: Nomenklatur der C/EBP-Familie.** [Tsukada et al. 2011, Ramji, Foka 2002]

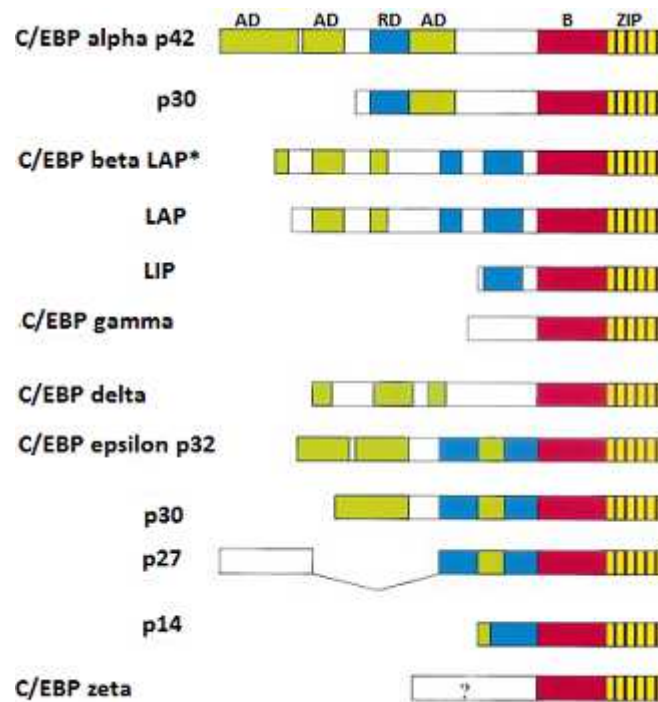
Allen gemeinsam ist die insgesamt 55-65 Aminosäuren umfassende Region „basische Domäne/Leucinzipper“ am C-terminalen Ende. Diese besteht aus einem alpha-helikalen Abschnitt, der viele basische Aminosäuren enthält, die die DNA-Bindung vermitteln sowie aus dem nachfolgenden sogenannten Leucinzipper, der als Dimerisierungsdomäne wirkt. [Landschulz et al. 1989] Er setzt sich aus einer siebenfachen Wiederholung von vier bis fünf Leucinen zusammen, was eine alpha-helikale Struktur ergibt. Zwei solcher Strukturen können sich vereinigen, indem sie sich ineinander verdrehen. Hierbei bestimmen elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren die Spezifität der Dimerbildung. [Ramji, Foka 2002] Wegen der ausgeprägten Homologie des basischen Leucinzippers können die C/EBPs untereinander in verschiedenen Kombinationen dimerisieren. Eine Dimerisierung ist auch mit anderen Leucinzipper- und Nicht-Leucinzipperproteinen, wie beispielsweise Mitgliedern der CREB/ATF-Familie [Vallejo et al. 1993], NF- $\kappa$ B [LeClair et al. 1992] und Fos und Jun [Hsu et al. 1994] möglich.

Außer C/EBP $\zeta$ , dessen basische Region eine andere Struktur aufweist [Ron, Habener 1992], können diese Dimere mit der gleichen Erkennungssequenz auf der DNA interagieren [Ramji, Foka 2002]. Mit Hilfe von PCR-Untersuchungen konnte das Motiv 5`-RTTGCGYAAAY -3` (R = A oder G, Y = C oder T) als Konsensus-Bindestelle für C/EBP $\alpha$ , - $\beta$  und - $\delta$  gefunden werden [Osada et al. 1996]. An dieser Stelle ist noch zu ergänzen, dass für die bZIP-Faktoren die Dimerisierung Voraussetzung für die DNA-Bindung ist [Vinson et al. 1989].

Die DNA-bindende Domäne (DBD), d.h. die basische Region, enthält auch ein Kernlokalisierungssignal (NLS: *nuclear localisation signal*), wobei Untersuchungen darauf hinweisen, dass pro Dimer ein intaktes NLS für den nukleären Transport genügt [Williams et al. 1997]. Im aminoterminalen Bereich der Proteine finden sich - außer in C/EBP $\gamma$  - Aktivator- (AD – Aktivierungsdomäne) und Repressordomänen (RD – Negative Regulationsdomäne), die ebenfalls unter den Mitgliedern ähnliche Strukturen aufweisen und jeweils Transaktivierung oder Repression vermitteln [Tsukada et al. 2011, Ramji, Foka 2002]. Erst in späterer Zeit wurde



in anderen Leucinzipperproteinen eine weitere Domäne entdeckt [Petosa et al. 2006], die sich carboxyterminal an den Leucinzipper anschließt. Diese bZIP *Tail* – Sequenz ist in allen C/EBP Proteinen präsent [Tsukada et al. 2011] und ist beteiligt an Protein–Protein–Wechselwirkungen. [Tsukada et al. 2011, Listman et al. 2005, Tahirov et al. 2002] Folgende Abbildung aus dem Übersichtsartikel von Ramji und Foka gibt einen schematischen Überblick über den Aufbau der C/EBPs.



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Aufbaus der C/EBPs [aus Ramji, Foka 2002].** Dargestellt C-terminal in gelb mit schwarzen vertikalen Linien (die Leucinreste symbolisierend) ist der Leucinzipper, davor in rot die basische Region bzw. die DNA-bindende Region (DBD). Aminoterminal finden sich Aktivierungsdomänen (gelbe Kästen) und Negative Regulatorische Domänen (blaue Kästen). Im Bild nicht gezeigt werden die kurzen, sich an den Leucinzipper anschließenden carboxyterminalen Abschnitte.

Die Gene für C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$  besitzen keine Introns. Das kürzeste Protein der Gruppe, C/EBP $\gamma$ , weist im Gen ein Intron im 5' untranslatierten Bereich (5' UTR) auf, während das Gen von C/EBP $\epsilon$  ein Intron in der kodierenden Region besitzt. Ebenso befindet sich eines der insgesamt drei Introns des Gens von C/EBP $\zeta$  im kodierenden Bereich. [Tsukada et al. 2011].

Vergleicht man die Strukturen der einzelnen C/EBPs untereinander, so finden sich bei C/EBP $\gamma$  und C/EBP $\zeta$  außer dem basischen Leucinzipper keine Ähnlichkeiten zu den jeweils anderen Familienmitgliedern. Auch besitzt, wie oben bereits erwähnt, C/EBP $\zeta$  eine anders strukturierte

basische Region, so dass eine Bindung an die gemeinsame C/EBP-Bindesequenz nicht möglich ist. Eine Heterodimerbildung mit C/EBP $\alpha$  oder C/EBP $\beta$  LAP verhindert deren DNA-Bindung, wodurch C/EBP $\zeta$  vermutlich als negativer Regulator von Genexpression wirkt [Ron, Habener 1992]. Jedoch kann es auch als Heterodimer bei zellulärem Stress an eine andere DNA-Sequenz bestimmter Gene binden und diese transaktivieren [Ubeda et al. 1996].

Die weiteren Mitglieder der C/EBP Familie, C/EBP $\alpha$ , - $\beta$ , - $\delta$  und - $\epsilon$ , weisen strukturell sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede auf. Durch unterschiedliche translationale Regulationsmechanismen existieren von C/EBP $\alpha$  und C/EBP $\beta$  mehrere Isoformen, die weitere Variationen hinsichtlich ihrer Funktionen ermöglichen [Tsukada et al. 2011]. Ebenso gibt es mehrere Isoformen von C/EBP $\epsilon$  durch Verwendung unterschiedlicher Promotoren, differentielles Splicing und durch unterschiedliche Translationsstartpunkte [Bedi et al. 2009].

### 1.2.2 Funktionelle Aspekte

In Form eines kurzen überblickartigen Exkurses sollen einige der biologischen Rollen der einzelnen C/EBP Transkriptionsfaktoren beleuchtet werden, um die Vielgestaltigkeit und Wichtigkeit dieser Proteine ansatzweise aufzuzeigen. Hierbei berufe ich mich insbesondere auf die Übersichtsarbeiten von Lekstrom-Himes und Xanthopoulos sowie Ramji und Foka. Die funktionelle Vielgestaltigkeit dieser Transkriptionsfaktoren ist bedingt durch die gewebe- und stadienspezifische Expression der einzelnen Isoformen, durch ungenaue ribosomale Lesarten, unterschiedliche posttranslationale Modifikationen sowie auch durch unterschiedliche DNA-Bindesepezifitäten der einzelnen Dimerkombinationen. Die unterschiedlichen Mengen an den einzelnen Isoformen beeinflusst die Art der Dimerbildung. [Lekstrom-Himes, Xanthopoulos 1998] Verschiedene *Knock-out* Tiermodelle verweisen auf die jeweiligen biologischen Funktionen der C/EBP Proteine.

**C/EBP $\alpha$**  findet sich vor allem in der Leber, im Fettgewebe, im Darm, in der Lunge, der Nebenniere sowie in den mononukleären Zellen des Blutes und in der Plazenta. In Leber und Fettgewebe zeigen sich die höchsten Mengen nur in ausdifferenziertem Gewebe. [Lekstrom-Himes, Xanthopoulos 1998] Tiefgreifende hepatische Struktur- und Funktionsstörungen sowie eine erhöhte hepatozelluläre Proliferationsrate in C/EBP $\alpha$  – defizienten Mäusen, die kurz nach der Geburt an schwerer Hypoglykämie versterben, verweisen auf die funktionelle Rolle des Proteins bei der Leberzellendifferenzierung und bei Stoffwechselfvorgängen [Flodby et al. 1996,

Wang et al. 1995]. So war es den neugeborenen Mäusen nicht möglich, Glykogen zu speichern und Lipide zu akkumulieren. Auffallen waren ein verminderter Gehalt an Glykogensynthase-mRNA sowie eine verspätete Induktion von zwei Enzymen der Glukoneogenese. [Wang et al. 1995]

Im Fettgewebe verhindert Unterdrückung von C/EBP $\alpha$  die terminale Adipozytendifferenzierung [Lin et al. 1993]. Hinsichtlich der Zellzyklusregulation vermag C/EBP $\alpha$  die Expression von p21 (WAF-1/CIP-1/SDI-1), einem Inhibitor der zyklinabhängigen Kinase, zu steigern, das Protein zu stabilisieren und so einen Proliferationsstopp zu erwirken [Timchenko et al. 1996]. Freytag und Geddes fanden in 3T3-L1 Adipoblasten eine reziproke Regulation von C/EBP $\alpha$  und c-Myc, jeweils entweder Wachstumsstopp und Differenzierung oder Proliferation vermittelnd [Freytag, Geddes 1992]. Hierbei transaktiviert C/EBP $\alpha$  das gadd45-Gen („growth arrest- and DNA damage-inducible gene 45“), ein Zielgen von Tumorsuppressor p53 in der G1 Phase des Zellzyklus. Myc hingegen kann die Transaktivierung von gadd45 durch C/EBP $\alpha$  aufheben. [Constance et al. 1996]

Eine frühe Störung der Granulozytenreifung bei C/EBP $\alpha$ -defizienten Mäusen steht im Einklang mit Untersuchungsergebnissen, dass dieser Transkriptionsfaktor an der gewebespezifischen Expression von G-CSF- („granulocyte colony-stimulating factor“) und GM-CSF- („granulocyte macrophage colony-stimulating factor“) Rezeptoren sowie Neutrophilenelastase beteiligt ist [Smith et al. 1996, Zhang et al. 1996, Nuchprayoon et al. 1997]. Auch in zahlreichen anderen Organsystemen, wie bei der Surfactant-Produktion in den Typ 2 Pneumozyten und bei der Ovulation spielt C/EBP $\alpha$  eine wichtige Rolle [Lekstrom-Himes, Xanthopoulos 1998].

**C/EBP $\gamma$**  findet sich ubiquitär, insbesondere in undifferenzierten Progenitorzellen [Lekstrom-Himes, Xanthopoulos 1998]. Heterodimerisation mit C/EBP $\alpha$  und C/EBP $\beta$  schwächt deren Transaktivierungsfähigkeit bei den Zielgenen. Vermutlich wirkt C/EBP $\gamma$  so als dominant-negativer Regulator der C/EBP-Transaktivierung in nicht induzierten und undifferenzierten Zellen [Cooper et al. 1995]. Hierbei ähnelt er der C/EBP $\beta$ -Isoform LIP und C/EBP $\zeta$ . So dient C/EBP $\gamma$  vermutlich als allgemeiner Puffer der C/EBP Funktion [Cooper et al. 1995]. Ein Maus *Knock-out*-Modell weist auf eine wichtige Rolle von C/EBP $\gamma$  bei der Reifung und der Funktion von Natürlichen Killerzellen hin [Kaisho et al. 1999].

**C/EBP $\delta$**  tritt im Fettgewebe, in der Lunge, im Darm, im Knochen [Ramji, Foka 2002] sowie auch im Zentralen Nervensystem auf, insbesondere in den hippocampalen Neuronen [Sterneck et al. 1998]. Es bildet meist Heterodimere mit C/EBP $\alpha$  und  $-\beta$  und besitzt eine mit diesen

vergleichbare Transaktivierungsaktivität bei jedoch geringerer DNA-Bindeaffinität [Lekstrom-Himes, Xanthopoulos 1998]. Im *Knock-out* Tiermodell zeigen sich hier weder hepatische noch hämatologische Defekte, jedoch fallen eine defekte Lipidspeicherung im Braunen Fettgewebe sowie auch neurologische Auffälligkeiten auf [Lekstrom-Himes 1998, Ramji, Foka 2002]. In einer frühen Phase der Adipozytendifferenzierung zeigen sich auf Glucokortikoide und cAMP-erhöhende Substanzen hin hohe mRNA-Mengen an *C/EBP $\beta$*  und  $-\delta$  [Cao et al. 1991]. Diese scheinen das *C/EBP $\alpha$* -Gen zu transaktivieren ebenso wie das Gen von PPAR $\gamma$  („peroxisome-proliferator-activated receptor- $\gamma$ “), der in Form einer positiven Rückkopplungsschleife die *C/EBP $\alpha$* -Expression beeinflusst [Lane et al. 1999, Darlington et al. 1998, Rosen et al. 2000]. Dies führt zu weiterer Differenzierung der Adipozyten. Interessant ist auch, dass *C/EBP $\delta$* -defiziente Mäuse trotz unauffälliger basaler neurologischer Funktionen eine selektiv verstärkte kontextuelle Angstreaktion zeigen. Dies kann ein Hinweis auf die Beteiligung von *C/EBP $\delta$*  bei bestimmten Lernvorgängen und Gedächtnisfunktionen sein. [Sterneck et al. 1998]

***C/EBP $\epsilon$***  findet sich in myeloischen und lymphoiden Zellen. *C/EBP $\epsilon$* -defiziente Mäuse sterben drei bis fünf Monate nach Geburt aufgrund opportunistischer Infektionen, vor allem mit *Pseudomonas aeruginosa*, und wegen myelodysplastischer Gewebedestruktion [Yamanaka et al. 1997]. Sie können keine reifen, funktionell intakten neutrophilen und eosinophilen Granulozyten produzieren. Untersuchungen weisen auf eine essentielle Rolle von *C/EBP $\epsilon$*  bei der terminalen Differenzierung dieser Zellen *downstream* von *C/EBP $\alpha$*  hin. [Yamanaka et al. 1997] Die neutrophilen Granulozyten dieser Mäuse besitzen deutlich eingeschränkte phagozytotische und bakteriozide Eigenschaften, auch erscheint ihre Migrationsfähigkeit gestört. Auffällig sind auch Veränderungen der Zytokinexpression dieser Zellen auf Entzündungsreize hin, wie beispielsweise verminderte Expression von Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist (IL-1Ra) und vermehrte Bildung von Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). [Lekstrom-Himes, Xanthopoulos 1999]

***C/EBP $\zeta$***  wird ubiquitär exprimiert. Wie oben bereits erwähnt wirkt es einerseits als negativer Regulator der Transaktivierungsaktivität von *C/EBP $\alpha$*  und *C/EBP $\beta$* , jedoch besitzt es eine eigene Funktion unter den Bedingungen von zellulärem Stress [Ron, Habener 1992, Ubeda et al. 1996]. Interessant sind die Untersuchungen zu seinen Funktionen bei Wachstumsstopp und Apoptose. So zeigen *C/EBP $\zeta$* -defiziente Mäuse eine verminderte Apoptose auf ER-Stress hin [Zinszner et al. 1998]. In diesem Zusammenhang scheint *C/EBP $\zeta$*  auch an der Zerstörung der pankreatischen Betazellen bei der Entwicklung von Diabetes mellitus beteiligt zu sein. [Oyadomari et al. 2002]. Die Studien von Qiao et al. über die onkogenen Eigenschaften von

Gallensäuren, insbesondere Desoxycholsäure (DCA) zeigen, dass C/EBP $\zeta$  an der durch DCA induzierten Apoptose beteiligt ist. So stimuliert DCA in einer menschlichen Colocarzinom-Zelllinie die Expression von C/EBP $\zeta$ . Ektopes C/EBP $\zeta$  kann Apoptose verstärken, wohingegen ein Antisense-Transkript von C/EBP $\zeta$  dies verhindern kann. Bei der durch DCA mediierten Expression von C/EBP $\zeta$  scheinen verschiedene Transkriptionsfaktoren, darunter AP-1 (Aktivatorprotein 1) und C/EBPs beteiligt zu sein. [Qiao et al. 2002]

### 1.2.3 C/EBP $\beta$

C/EBP $\beta$  wird besonders in der Leber, im Darm, in der Lunge, im Fettgewebe, in der Milz, der Niere und in den myelomonozytären Zellen exprimiert [Ramji, Foka 2002]. Ursprünglich wurde das Protein als Faktor entdeckt, der an das „IL1-responsive element“ (IRE) des IL6-Gens bindet und dieses sequenzspezifisch aktiviert [Akira et al. 1990]. Da NF-IL6 („nuclear factor of IL-6“ = C/EBP $\beta$ ) durch IL-1, IL-6 und LPS induzierbar ist und an regulatorische Regionen für Akutphaseproteine sowie Zytokine wie TNF, IL-8 und G-CSF bindet, vermutete man eine wichtige Rolle dieses Proteins für die Akutphasereaktion, für Entzündungsreaktionen und für die Hämatopoese. Dies konnte durch weitere Untersuchungen bestätigt und vertieft werden [Akira et al. 1990]. Akira beschrieb auch die scheinbar reziproke Expression von C/EBP $\alpha$  und C/EBP $\beta$  [Akira et al. 1990]. Descombes et al. gelang bei der Untersuchung von an die D-Region des Albuminpromotors bindenden Faktoren die Isolation und Klonierung von LAP („liver-enriched transcriptional activator protein“) aus Rattenhepatozyten [Descombes et al. 1990]. Chang et al. isolierten und klonierten AGP/EBP, das Mäusehomolog von NF-IL6 bei der Untersuchung des Alphaglykoproteingens, einem Akutphaseprotein [Chang et al. 1990].

Von C/EBP $\beta$  existieren drei Isoformen, LAP („liver-activating protein“) mit 35 kD, LAP\* mit 38 kD und LIP („liver-inactivating protein“), 20 kD (Größen für murines C/EBP $\beta$ ). Wie in Abb. 2 ersichtlich besteht C/EBP $\beta$  aus der C-terminalen basischen Region und dem Leucinzipper, N-terminalen Aktivierungsdomänen sowie dazwischen aus einer zweigeteilten negativen regulatorischen Domäne, RD1 und RD2, die zellspezifisch DNA-Bindung hemmen kann [Williams et al. 1995]. LIP, dem die Aktivierungsdomänen fehlen, wirkt als dominant-negativer Repressor der C/EBP-Funktion, indem er mit anderen C/EBPs Heterodimere bildet und so deren Transaktivierungsaktivität vermindert [Descombes, Schibler 1991]. Dass auch LAP Transkription reprimieren kann, darauf weist ein stark erhöhtes IL-6 in C/EBP $\beta$ -defizienten Zellen hin [Berberich-Siebelt et al. 2006, Screpanti et al. 1995]. Auf Grund ihrer

unterschiedlichen Struktur besitzen die einzelnen Isoformen, die von einer einzigen mRNA translatiert werden [Descombes, Schibler 1991], verschiedene Funktionen, insbesondere bei der Kontrolle von Differenzierung und Proliferation sowie der Genregulation im Allgemeinen. So konnten Isoformenwechsel bei verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen beobachtet werden, wie bei der Leberregeneration, der Akutphasereaktion, der Laktation und der Carcinogenese u.a. [Calkhoven et al. 2000]. Calkhoven, Müller und Leutz konnten zeigen, dass die regulierte, von verschiedenen Stellen ausgehende Initiation der Translation den Hauptmechanismus für die Produktion der verschiedenen Isoformen darstellt [Calkhoven et al. 2000]. Hierbei spielt ein evolutionär konserviertes stromaufwärts gelegenes offenes Leseraster (uORF, *upstream open reading frame*) eine wichtige Rolle. Die Isoformenexpression wird über PKR („RNA-dependent protein kinase“)- und mTOR („mammalian target of rapamycin“)-Signalwege, die über die eukaryontischen Translationsinitiationsfaktoren, eIF-2 $\alpha$  und eIF-4E, wirken, reguliert. Hohe Konzentrationen dieser Faktoren begünstigen eine Bildung der kürzeren Isoformen, geringere Mengen eher die der langen Isoformen. [Calkhoven et al. 2000] Anhand von Beobachtungen an differenzierten 3T3-L1-Adipozyten konnten die Autoren sehr anschaulich zeigen, dass das Isoformenverhältnis entscheidend ist für das Schicksal dieser Zellen zwischen Wachstumsstopp mit Differenzierung oder Mitose mit partieller Entdifferenzierung und Verlust der Zell-Zell-Kontakte. Letzteres zeigt sich bei Überexpression der kürzeren Isoformen. [Calkhoven et al. 2000]

Wie aus den verschiedenen, oben erwähnten Wegen der Entdeckung von C/EBP $\beta$  sowie der Vielfalt der Orte seiner Expression erahnbar, spielt es bei vielen Organismusfunktionen wichtige Rollen. C/EBP $\beta$ -defiziente Mäuse zeigen keine hepatischen Auffälligkeiten, obgleich C/EBP $\beta$  bei der Leberregeneration und lebermetabolischen Vorgängen von Bedeutung ist. So verändert sich das Expressionsmuster von C/EBP $\alpha$  weg zu mehr C/EBP $\beta$  und - $\delta$  nach partieller Hepatektomie. [Lekstrom-Himes, Xanthopoulos 1998] Jedoch finden sich in den *Knock-out* Mäusen Störungen im Zuckerstoffwechsel und der Lipidspeicherung. Weibliche C/EBP $\beta$ -defiziente Tiere bleiben steril wegen einer defekten Signaltransduktion von Luteinisierendem Hormon (LH). [Lekstrom-Himes, Xanthopoulos 1998]

Aufgrund defekter Phagosomen der Makrophagen sind diese Mäuse anfällig für Infektionen mit *Candida albicans*, *Listeria monocytogenes* und *Salmonella typhi* [Tanaka et al. 1995, Screpanti et al. 1995]. Des Weiteren zeigt sich eine abgeschwächte T<sub>H</sub>1-Immunantwort mit niedrigem IL-12 und verminderter Spättyphypersensitivität [Screpanti et al. 1995]. Außerdem

entwickeln die C/EBP $\beta$ -defizienten Mäuse Symptome der Castleman-Krankheit des Menschen: In Zusammenhang mit einem erhöhtem IL-6-Serumspiegel finden sich Splenomegalie, periphere Lymphadenopathie und gesteigerte Hämatopoese mit extramedullärer Blutbildung auch in der Leber und in Lymphknoten [Screpanti et al. 1995].

Berberich-Siebelt et al. konnten zeigen, dass C/EBP $\beta$  in CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird und übereinstimmend mit einer Dominanz in Zellen des T<sub>H</sub>2-Phänotyps das IL-4 Gen transaktiviert [Berberich-Siebelt et al. 2000]. So kann retrovirale Überexpression von C/EBP $\beta$  in murinen EL-4 T-Lymphomzellen das endogene IL-4 stark induzieren bei gleichzeitiger Reduktion der T<sub>H</sub>1-Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$ . Die Induktion von IL-4 konnte auch in primären murinen T-Zellen und eine Reduktion von *Ii2*-RNA in humanen Jurkat T-Zellen beobachtet werden [Berberich-Siebelt et al. 2000]. C/EBP $\beta$  kann sowohl an die Pu-b<sub>B</sub> (Purin reiche Box B) als auch an die Pu-b<sub>D</sub> des *Ii4*-Promotors binden. An Pu-b<sub>D</sub> überlappen sich NFAT- und C/EBP-Bindemotive, während diese an der Pu-b<sub>B</sub> voneinander getrennt sind. [Berberich-Siebelt et al. 2000] Untersuchungen zeigen, dass NFAT und C/EBP $\beta$  an die Pu-b<sub>B</sub> binden können, hingegen um die Pu-b<sub>D</sub> konkurrieren. Aber es scheint zwischen beiden Transkriptionsfaktoren bei der Transaktivierung des *Ii4*-Promotors kein Synergismus zu bestehen. [Berberich-Siebelt et al. 2000] Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass C/EBP $\beta$  bei der Differenzierung von T<sub>H</sub>0- zu T<sub>H</sub>2-Zellen eine positive Rolle spielt, was jedoch zu den oben beschriebenen Veränderungen in C/EBP $\beta$ -defizienten Mäusen mit abgeschwächter T<sub>H</sub>1-Immunantwort in Kontrast zu stehen scheint [Berberich-Siebelt et al. 2000, Screpanti et al. 1995]. Allerdings scheinen in dem *Knock-out* Modell noch weitere Lymphokine und Mediatoren der T-Zelldifferenzierung beeinflusst zu sein, wobei die verringerte IL-12-Expression der dendritischen Zellen in der konventionellen *Cebpb*<sup>-/-</sup> einen Defekt der T<sub>H</sub>1-Differenzierung erklären kann [Berberich-Siebelt et al. 2000].

Die Erkenntnis, dass C/EBP $\beta$  c-Myc reprimiert und so Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert [Berberich-Siebelt et al. 2006], verweist darauf, dass C/EBP $\beta$  für die Differenzierung von T<sub>H</sub> 2-Zellen endogen von Bedeutung ist. Für den repressiven Effekt ist hierbei eine intakte N-terminale Transaktivierungsdomäne notwendig, während auf die zentrale regulatorische Domäne verzichtet werden kann [Berberich-Siebelt et al. 2006]. Berberich-Siebelt et al. konnten nachweisen, dass letztere jedoch *in vivo* sumoyliert werden kann. Dies ist eine Proteinmodifikation, bei der SUMO („small ubiquitin-related modifier“), von dem vier Varianten (SUMO-1 bis SUMO-4) bei Säugern bekannt sind, an Lysinreste eines – häufig – bestimmten Konsensusmotivs gebunden ist. Bindung von SUMO-1 beeinflusst die

Aktivierungseigenschaften von C/EBP $\beta$ . So zeigt es zwar keinen Einfluss auf seine oben beschriebene Wirkung auf das *Il4*-Gen, jedoch vermindert es seinen negativen Effekt auf die Expression von c-Myc und damit verbunden steigert es die Zellproliferation. Mittels immunofluoreszierender Konfokalmikroskopie konnte gezeigt werden, dass Sumoylierung das nukleäre C/EBP $\beta$  in das perizentrische Heterochromatin leitet. [Berberich-Siebelt et al. 2006] Möglicherweise agiert C/EBP $\beta$  auf diese Weise als feinregulierter Tumorsuppressor [Berberich-Siebelt et al. 2006].

Berberich-Siebelt et al. führten diese Untersuchungen weiter, indem sie Mausmodelle analysierten, bei denen C/EBP $\beta$  gezielt in allen T-Zellen, in Foxp3 exprimierenden regulatorischen T-Zellen oder in der frühen Hämatopoese ausgeschaltet wurde. In all diesen Modellen produzierten die C/EBP $\beta$ -defizienten Zellen viel IFN- $\gamma$ , regulierten aber auch in bestimmten CD4<sup>+</sup> T-Zell Untergruppen IL-2, IL-10 und IL-17 hoch. [Berberich-Siebelt, persönliche Mitteilung] C/EBP $\beta$  bindet erstaunlicherweise nicht nur an regulatorische Elemente von Lymphokinpromotoren, sondern fördert auch die Expression einiger subtypenspezifischer Transkriptionsfaktoren. Mit diesen kann es wiederum interagieren, um die Transkription bestimmter Zielgene zu fördern oder zu reprimieren. So spielt dereguliertes C/EBP $\beta$  möglicherweise auch bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen eine Rolle [Berberich-Siebelt, persönliche Mitteilung]. Posttranslationale Modifikationen wie z. B. die Sumoylierung spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit anderen Faktoren. So konnte C/EBP $\beta$  LAP, nicht aber LIP oder C/EBP $\beta$  $\Delta$ SUMO mit Smad3 kopräzipitiert werden [Berberich-Siebelt, unveröffentlichte Daten].

Am deutlichsten war in Analysen der konditionellen *Cebpb*<sup>fl/fl</sup> x *Cd4cre* Maus die IFN- $\gamma$ -Induktion in Th17 und iTregs [Berberich-Siebelt, unveröffentlichte Daten]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Isoformen LAP und LAP\* die IFN- $\gamma$ -Expression hemmen können. Im Gegensatz zu ihrer direkten Wirkung am *Il4*-Promotor scheint der negative Effekt auf das *Ifng*-Gen über Mediatoren wie Blimp-1 vermittelt zu sein [Berberich-Siebelt, unveröffentlichte Daten]. So fand sich, dass C/EBP $\beta$  LAP das *Prdm1* („PR domain containing 1“-Gen, das Blimp-1 kodiert, substantiell transaktiviert [Berberich-Siebelt, unveröffentlichte Daten]. Blimp-1, zunächst bekannt als transkriptioneller Repressor in terminal differenzierenden B-Zellen, supprimiert IFN- $\gamma$  und verstärkt Expression von IL-10 in T-Zellen [Kallies et al. 2006, Martins et al. 2006]. Smad3 konnte als positiver, NFATc1 als negativer Kofaktor von C/EBP $\beta$  bei der Regulation von Blimp-1 identifiziert werden [Berberich-Siebelt, unveröffentlichte Daten]. Überraschenderweise war bei Defizienz von C/EBP $\beta$  dennoch IL-10 in T-Zellen,



insbesondere unter  $T_H0$ - und iTreg-Wachstumsbedingungen, hochreguliert [Berberich-Siebelt, unveröffentlichte Daten].

Untersuchungen anhand zweier Krankheitsmodelle, einer autoimmunen Colitis und der Experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE), eines Tiermodells der Multiplen Sklerose des Menschen, konnten die Rolle von C/EBP $\beta$  bei Autoimmunerkrankungen beleuchten. Berberich-Siebelt et al. fanden heraus, dass die Colitis bei Transfer von C/EBP $\beta$ -defizienten CD4<sup>+</sup>-Zellen in lymphopenen Rezipienten schwerer verlief und sich mehr IFN- $\gamma$  und IL-17-Produzenten in Milz und mesenterialen Lymphknoten fanden [Berberich-Siebelt, unveröffentlichte Daten]. Hingegen konnten C/EBP $\beta$ -defiziente Tregs den Ausbruch der EAE dämpfen. So scheint intrinsische Abwesenheit von C/EBP $\beta$  in den Tregs ihre immunsuppressive Kapazität oder die Anzahl Foxp3<sup>+</sup> IL-10 produzierender Tregs zu steigern. [Berberich-Siebelt, unveröffentlichte Daten]

### **1.3 Zellzyklus und Apoptose**

#### **1.3.1 Zellzyklusregulation**

Der Teilungszyklus der meisten Körperzellen umfasst vier Phasen: Die G1-Phase des Zellwachstums, darauffolgend die S-Phase der DNA-Replikation. In der anschließenden G2-Phase erfolgt die Vorbereitung der Zelle auf die eigentliche Mitose, die M-Phase. Mittels verschiedener Kontrollpunkte, dem G1/S-, dem G2/M- und dem Spindel-Kontrollpunkt, wird der geordnete und korrekte Ablauf des Teilungszyklus gewährleistet. So kann die folgende Phase nur bei fehlerlosem Abschließen des vorherigen Abschnitts begonnen werden. Bei Auftreten von Fehlern kommt es an diesen Punkten zu einer Verzögerung des Zellzyklus, während dieser entweder eine Behebung des Fehlers möglich ist oder die Zelle in die Apoptose eintritt. Nach Abschluss des Teilungszyklus ist in der G1-Phase ein Übergang der Zelle in die Ruhephase, G0, möglich. Aus dieser kann die Zelle bis hin zu einem gewissen Differenzierungsgrad wieder zurück in den G1-Abschnitt gehen. Der Ablauf des Zellzyklus wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) reguliert, im besonderen CDK1, 2, 4, 5 und 6. [Wagener 1999, Morgan 1997] Die Kinaseaktivität ist nur aktiv, wenn die CDK mit einer regulatorischen Untereinheit, einem Cyclin, verbunden ist. Hierbei sind vor allem die Cycline A, B1, B2, D1 bis D3 und E relevant, die außer den D-Cyclinen nur in bestimmten Phasen des

Zellzyklus vorkommen. Daraufhin werden sie mittels ubiquitinvermittelter Proteolyse schnell abgebaut. [Wagener 1999] In der G1-Phase sind D-Cycline in Verbindung mit CDK4 und 6 relevant, am Übergang von später G1- zur S-Phase der Komplex aus E-Cyclin mit CDK2. Im weiteren Verlauf wird E-Cyclin gegen A-Cyclin ausgetauscht, wonach in der G2- und M-Phase vor allem CDK1 mit A- oder B-Cyclin von Bedeutung ist. Die Aktivität der CDKs im Laufe des Zellzyklus spiegelt sich in der zunehmenden Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (RB) wider. [Wagener 1999] Die Aktivierung der meisten CDK-Komplexe erfolgt durch Phosphorylierung an einem definierten Threoninrest. Durch Phosphorylierung an einem zweiten Threonin- und einem Tyrosinrest, durch proteolytischen Abbau des assoziierten Cyclins oder durch Bindung mit CDK-Inhibitoren (CKIs, „cyclin dependent kinase inhibitors“) können die CDKs inaktiviert werden. Bei Säugern unterscheiden sich zwei Klassen CKIs, die der CIP-Familie („CDK interacting protein“) (auch: KIP oder WAF genannt) und die der INK-4-Familie („polypeptide inhibitors of CDK4 and CDK6“). Zusammenfassend bewirken CDKs, Cycline und CKIs eine Integration verschiedener extrazellulärer Signale zu dem Phosphorylierungsstatus des RB-Proteins, der wiederum für das Schicksal der Zelle, Proliferation, Differenzierung oder Apoptose entscheidend ist. [Wagener 1999] Im Laufe der G1-Phase wird das RB-Protein zunehmend an Serin- und Threoninresten durch CDKs im Komplex mit Cyclinen, insbesondere E- und D-Cyclinen, phosphoryliert. Während der Mitose erfolgt wiederum eine Dephosphorylierung durch Phosphatasen. Nur im hypophosphorylierten Zustand kann das RB-Protein mit seinen Bindungspartnern interagieren. [Wagener 1999, Weinberg 1995] Zu diesen gehören zahlreiche Transkriptionsfaktoren, unter anderem C/EBP $\alpha$  und MyoD1, die an Differenzierungsvorgängen beteiligt sind sowie die Transkriptionsfaktoren E2F1-3. Freies, nicht an das RB-Protein gebundenes E2F1 transaktiviert Gene, die für den Beginn der S-Phase und die DNA-Replikation notwendig sind, wie zum Beispiel *Myc*, Thymidinkinase, Dihydrofolatreduktase und DNA-Polymerase  $\alpha$ . [Wagener 1999] Zahlreiche Untersuchungen belegen die zentrale Rolle des Tumorsuppressors RB-Protein bei der Regulation von Zellzyklus, Differenzierung und Apoptose. So finden sich in den meisten menschlichen Tumoren Veränderungen in afferenten Signalwegen, die letztendlich zu Phosphorylierung und somit Inaktivierung des RB-Proteins führen. Mutationen im RB-Protein selbst finden sich in einer geringeren Zahl von Tumoren wie dem Retinoblastom, in Osteosarkomen und kleinzelligen Lungenkarzinomen. [Wagener 1999]

### **1.3.2 Exkurs: Die Rolle von C/EBP $\beta$ bei Überexpression von Cyclin D1**

Die Arbeitsgruppe um Lamb befasste sich mit der Wirkung einer Überexpression von Cyclin D1 auf die Genexpression in Tumoren [Lamb et al. 2003]. Überexpression von Cyclin D1 findet sich in zahlreichen Tumorarten. Die physiologischen Funktionen von Cyclin D1 umfassen einerseits die Aktivierung von CDK4 und CDK6, die die initiale Phosphorylierung und Inaktivierung von RB-Protein katalysieren. Dies führt wie oben beschrieben zu einer Derepression von E2F-Zielgenen, die Proliferation ermöglichen. [Weinberg 1995, Lamb et al. 2003] Andererseits besitzt Cyclin D1 eine nichtkatalytische Funktion, indem es die CDK-Inhibitoren p21 und p27 abfängt, so dass der Komplex Cyclin E-CDK2 aktiv werden kann. Dies führt zu weiterer Inaktivierung des RB-Proteins. [Lamb et al. 2003] Auch kann Cyclin D1 verschiedene Transkriptionsfaktoren ohne Beteiligung von CDKs aktivieren, wie in mehreren Transfektionsanalysen gezeigt werden konnte [Lamb et al. 2003]. In Zellkulturexperimenten fanden Lamb et al. 21 Gene, die bei Überexpression von Cyclin D1 aktiviert werden. Mittels einer statistischen Kolmogorov-Smirnov-Analyse von Genexpressionsprofilen 190 menschlicher Tumore aus der „Global Cancer Map“ (GCM) konnte gezeigt werden, dass die D1-Expression mit der Expression der 21 zuvor ermittelten Gene signifikant korreliert. Auffällig ist, dass sich unter diesen Genen keine E2F-Zielgene befinden. [Lamb et al. 2003] In mehr als 500 Tumorarten und Zelllinien verschiedener Datenbanken fand sich eine Coexpression von C/EBP $\beta$  und Cyclin D1. Promotor- und Immunoblotanalysen zeigten, dass C/EBP $\beta$  die Promotoren der Cyclin D1-Zielgene konstitutiv reprimiert. Durch direkte Interaktion mit C/EBP $\beta$  kann Cyclin D1 dies antagonisieren. Aus Untersuchungen verschiedener Tumoren geht hervor, dass die tumorigene Wirkung der Cyclin D1-Überexpression eher nicht über E2F-Transkriptionsfaktoren oder CDK-Wirkung vermittelt wird, sondern vermutlich in einer Modulation der Funktion von C/EBP $\beta$  besteht. [Lamb et al. 2003]

### **1.3.3 Myc/Mad/Max Transkriptionsfaktoren**

An dieser Stelle soll kurz auf die Transkriptionsfaktoren Max („Myc interacting factor X“), Mad (beziehungsweise „Max-dimerizing“, Mxd, nach neuer Nomenklatur) und besonders Myc eingegangen werden [Diolaiti et al. 2014]. Sie sind die Mitglieder einer Familie von basischen *Helix-Loop-Helix* Leucinezipper (bHLHLZ) Transkriptionsfaktoren, die Homo- und

Heterodimere bilden können und je nach spezifischer Wechselwirkung Gene aktivieren oder reprimieren können, indem sie sog. E-Boxen in regulatorischen Sequenzen binden. Es handelt sich um ein umfassendes Netzwerk von Transkriptionsfaktoren, auch als Max/Mlx (nach dem 1999 entdeckten „Max-like protein x“) Netzwerk bezeichnet [Diolaiti et al. 2014, Billin et al. 1999]. Sie stellen auf diese Weise eine Art funktionelles Modul dar, das Informationen über verschiedene Signalwege in genregulatorische Programme umsetzt. Sie sind an der Regulation zahlreicher biologischer Prozesse wie Proliferation und Regeneration, Wachstumsstop, Differenzierung und Zelltod sowie auch an der Steuerung metabolischer Vorgänge (insbesondere auf Seiten des Mlx-Netzwerkes) beteiligt. [Grandori et al. 2000, Diolaiti et al. 2014] Zu Beginn der Entdeckung des Netzwerkes standen Erkenntnisse über die Myc-Onkogen-Familie. Die in den späten 1970er Jahren entdeckten Myc-Proteine befinden sich vor allem im Zellkern und ihre Expression korreliert mit Proliferation, Zellwachstum, Verlust von Differenzierung und auch Apoptose je nach Zellart und Kontext. [Pelengaris et al. 2002, Diolaiti et al. 2014] Eine Deregulation von Myc-Proteinen mit Überexpression ist an der Entstehung zahlreicher Tumore wie beispielsweise dem Burkitt-Lymphom, dem Neuroblastom und dem kleinzelligen Lungenkarzinom beteiligt [Diolaiti et al. 2014]. Myc gehört zu dem Teil des Netzwerkes, in dessen Zentrum Max liegt. Parallel hierzu existiert das Netzwerk um Mlx, einem Gegenspieler von Max, das ebenfalls mit Mxd-Proteinen (Mxd1 und Mxd4) sowie mit MondoA- und MondoB-Proteinen interagiert [Diolaiti et al. 2014, Billin et al. 1999]. Die Mitglieder des Max-Netzwerkes können über ihre basischen *Helix-Loop-Helix*-Motive mit Max dimerisieren, wobei sie spezifische DNA-Bindfähigkeit und transkriptionelle Aktivität erhalten. Max-Homodimere scheinen dies hingegen nicht zu besitzen. [Grandori et al. 2000] Genregulation durch das c-Myc-Max-Heterodimer wird über Chromatinmodifikationen wie Histonacetylierungen vermittelt. Beispiele für die zahlreichen Zielgene von c-Myc, die aktiviert werden, sind Cyclin D2 und CDK2 sowie die Translationsinitiationsfaktoren eIF4 und eIF2. [Pelengaris et al. 2002] Allerdings wird heute die Theorie vertreten, dass c-Myc eher ein Amplifizierer statt eines Spezifiziers für Genexpression ist [Littlewood et al. 2012, Lin et al. 2012, Nie et al. 2012]. Bei dereguliertem Myc, wie es in Tumorzellen typisch ist, sind allerdings durchaus differentielle Genexpressionsprofile erkennbar [Walz et al. 2014]. Dies wird über Affinitätsunterschiede der verschiedenen Erkennungssequenzen erklärt. Mad-Max-Dimere wirken gegensätzlich zu Myc, indem sie die durch Myc aktivierbaren Gene über Assoziation mit Corepressoren wie SIN3 und Histondeacetylasen hemmen. Ihre Expression korreliert mit terminaler Differenzierung. [Grandori et al. 2000] Interessanterweise kann c-Myc über Regulation der Bcl-2-Familie und Cytochrom c-Freisetzung mit nachfolgender Formierung des

Apoptosoms aus Apaf-1 und Procaspase-9 Zellen für zahlreiche apoptoische Stimuli wie Mangel an Überlebensfaktoren, Hypoxie, DNA-Schädigung oder auch Aktivierung der Apoptoserezeptoren wie CD95 sensitivieren [Partanen et al. 2009, Pelengaris et al. 2002]. C-Myc vermittelter Apoptose wird zumindest in T-Lymphozyten und Lymphomen vor allem durch das später charakterisierte Protein Mnt entgegengewirkt [Link, Hurlin 2014]. Auch Mnt ist ein Max-Interaktionspartner, wird ubiquitär exprimiert, zusätzlich in aktivierten Lmphyozyten hochreguliert und ist essentiell für die pro-proliferative Funktion von c-Myc [Link, Hurlin 2014].

Innerhalb des p53-Signalweges nach DNA-Schädigung wird c-Myc über das DNA-bindende Protein Miz-1 an den Promotor des CDK-Inhibitors p21cip rekrutiert. Hierdurch wird der Promotor für Aktivatoren wie p53 geblockt. Über diese Hemmung der zytostatischen p53-Antwort auf DNA-Schädigung kommt es zu einer Aktivierung der Apoptosereaktion. So kann c-Myc das Resultat der p53-Reaktion beeinflussen. [Seoane et al. 2002] Eine weitere große Anzahl an Genen wird entweder über Miz- oder c-Myc-DNA-Erkennung durch den c-Myc-(Max)-Miz-1-Komplex reprimiert [Walz et al. 2014].

#### **1.3.4 Apoptose: Morphologie und Abgrenzung**

In ihrer nun als klassisch geltenden Veröffentlichung beschrieben Kerr, Wyllie und Currie 1972 erstmals auf elektronenmikroskopischer Ebene die morphologischen Charakteristika einer bestimmten Art von Zelluntergang, die sie als Apoptose bezeichneten [Kerr et al. 1972]. Apoptose (von griechisch *απο*, weg, ab, herunter und *πτειν*, fallen, wie z.B. das Herabfallen des Laubs im Herbst) bedeutet einen streng geregelten, energieabhängigen aktiven Vorgang, der in einer Elimination der betroffenen Zelle mündet. Dies erfolgt ohne begleitende Entzündungsreaktion; die Integrität des Gesamtorganismus wird nicht beeinträchtigt. Dieser Prozess dient der Aufrechterhaltung einer Zellhomöostase in vielen Geweben, spielt eine sehr wichtige Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von Organen und ist beteiligt an der Abwehr schädigender Einflüsse. Nach Ellis et al. lassen sich die von Apoptose betroffenen Zellen wie folgt einteilen: Zellen ohne Funktion, die beispielsweise im Rahmen der Embryonalentwicklung entstehen, im Überschuss produzierte Zellen, wie Blutzellen oder Spermien, fehlentwickelte Zellen, Zellen, die ihre Aufgabe erfüllt haben, wie Endometriumzellen und Zellen mit schädigender Wirkung wie z.B. autoreaktive T-Lymphozyten und Tumorzellen [Ellis et al. 1991, Wagener 1999]. Viele Erkenntnisse über

Apoptose wurden anhand von Untersuchungen des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* gewonnen, bei dem das Schicksal der einzelnen Zellen genau beobachtet werden kann. So gehen von seinen insgesamt 1090 somatischen Zellen 131 an genau definierten Zeitpunkten im Laufe seiner Entwicklung durch programmierten Zelltod zugrunde. Dieser Prozess ist zwischen Würmern weitgehend identisch und die Parallelen zum Ablauf der Apoptose in Säugern zeigen, dass es sich hierbei um einen in der Evolutionsgeschichte hochkonservierten und streng regulierten Vorgang handelt. [Elmore 2007]

Morphologisch kommt es in der frühen Apoptose zunächst zu einer Zellschrumpfung und Pyknose, der eine Kondensation und Fragmentierung des Chromatins mit peripherer Ablagerung unter der Kernmembran zugrunde liegt. Die Zelle löst sich aus ihrem Zellverband heraus. Des Weiteren zeigen sich blasige Veränderungen der Plasma- und Kernmembran (*blebbing*). Schließlich führt der Prozess zur Fragmentierung der Zelle in sog. Apoptotische Körper, die von umgebenden Makrophagen und anderen Zellen aufgenommen werden. Während des apoptotischen Vorgangs bleiben die Zellorganellen weitgehend morphologisch intakt und insbesondere kommt es zu keinem Austritt von Zellflüssigkeit in das umliegende Gewebe, was eine Entzündungsreaktion zur Folge hätte. [Wagener 1999, Elmore 2007] Aktivierung von Proteinasen, den sogenannten Caspasen sowie endogenen, kalzium- und magnesiumabhängigen Nucleasen führt zu einer Degradation der Zell-DNA zu charakteristischen Fragmenten von 50-300 kb, die sich elektrophoretisch als apoptosetypische DNA-Leitern nachweisen lassen. Aktivierung von Transglutaminase führt zu Proteinquervernetzungen. Um eine frühzeitige Phagozytose der betroffenen Zellen zu ermöglichen, finden sich außen an der Plasmamembran apoptosetypische Marker. Diese umfassen vor allem die Verlagerung des normalerweise innenliegenden Phosphatidylserins an die Membranaußenseite oder die Exposition bestimmter Proteine wie Annexin V und Calreticulin [Elmore 2007, Wagener 1999]. An dieser Stelle muss noch erwähnt werden, dass neben der „klassischen“ Apoptose noch andere Formen des programmierten Zelltodes existieren [Elmore 2007].

Deutlich unterscheidet sich Apoptose von der Nekrose, einem relativ unregulierten, passiven und energieunabhängigen Prozess des Zelluntergangs. Während im Zellverband meist nur einzelne oder kleine Gruppen von Zellen von Apoptose betroffen sind, können auch größere Zellmengen nekrotisch werden. Die Zellen schwellen an, die Organellen, der Zellkern und die Zellmembran werden zerstört, wobei der Zellinhalt freigesetzt wird. Dies hat eine Entzündungsreaktion zur Folge. [Elmore 2007] Zwar sind die beiden Vorgänge, Apoptose und

Nekrose sehr verschieden, doch scheinen sie bezüglich ihrer Mechanismen Gemeinsamkeiten und Überlappungen aufzuweisen, was Zeiss als „Apoptose-Nekrose-Kontinuum“ beschreibt [Zeiss 2003]. So wurde beispielsweise beobachtet, dass apoptotische Zellen bei intrazellulärem ATP-Mangel oder bei abnehmender Verfügbarkeit von Caspasen nekrotisch werden [Zeiss 2003, Elmore 2007]. Die Ursachen von Nekrose wirken entweder über einen Zusammenbruch des zellulären Energiehaushalts oder über direkte Schädigungen der Zellmembranen [Elmore 2007].

### 1.3.5 Caspasen

Die Proteinfamilie der Caspasen ist für den Ablauf der Apoptose von zentraler Bedeutung. Es handelt sich um Cysteinproteasen, die spezifisch Substrate nach einem Aspartatrest spalten, daher die Bezeichnung „Caspase“ („cystein-dependent **asp**artate specific protease“)[Stennicke, Salvesen 2000, Alnemri et al. 1996]. Die zuerst identifizierte Caspase war das „Interleukin-1 $\beta$ -converting Enzyme“ (ICE), das für die IL-1 $\beta$  Reifung verantwortlich ist und somit einen wichtigen Entzündungsmediator darstellt [Black et al. 1989, Kostura et al. 1989, Cohen 1997]. Die strukturelle Ähnlichkeit mit dem Produkt des *ced-3*-Gens von *C. elegans* sowie die Beobachtung einer erhöhten, durch Bcl-2 oder CrmA hemmbaren Apoptoserate bei ICE-Überexpression wiesen auf dessen wichtige Bedeutung für den programmierten Zelltod hin [Cohen 1997, Miura et al. 1993]. Es folgten zahlreiche Identifikationen neuer Mitglieder dieser Proteinfamilie, die in einer einheitlichen Nomenklatur in der Reihenfolge ihrer Entdeckung zusammengefasst wurden [Alnemri et al. 1996]. Heute sind insgesamt 15 Caspasen in Säugern bekannt [Chowdhury et al. 2008]. Diese können in drei Gruppen eingeteilt werden: Die Gruppe-I Caspasen bezeichnen die inflammatorischen Caspasen, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sind. Sie umfassen Caspase-1, -4, -5, -11, -12, -13 und Caspase-14, die jeweils eine große Prodomäne besitzen. Gruppe-II beinhalten die Apoptose-Initiator-Caspasen, nämlich Caspase-8 und -10, die DED (*death effector domain*) Domänen besitzen und die CARD (*caspase-recruitment domain*) Domänen tragenden Caspase-2 und -9. Ihre Prodomänen weisen eine Größe von mehr als 90 Aminosäuren auf. Die Apoptose-Effektorcaspasen, Caspase-3, -6, und -7 gehören zu der Gruppe-III. Sie besitzen kurze Prodomänen. [Chowdhury et al. 2008] Die proapoptotische Caspase-15 enthält DED- und CARD-ähnliche Domänen, existiert jedoch nicht im murinen oder humanen Genom [Eckhart et al. 2005, Chowdhury et al. 2008]. Diese Einteilung der Caspasen stellt jedoch nur eine Vereinfachung bzw. lediglich ein orientierendes

Schema dar. So finden sich zahlreiche funktionelle Überschneidungen zwischen inflammatorischen und proapoptotischen Caspasen (z.B. Caspase-11) sowie auch verschiedene Funktionen der einzelnen Proteine in unterschiedlichen Zellarten [Chowdhury et al. 2008].

Caspasen werden zunächst als inaktive Zymogene synthetisiert. Strukturell bestehen sie in diesem Zustand als einzelne Polypeptidketten von 32-35 kD aus insgesamt drei Anteilen: Die 17-21 kD schwere zentrale Domäne (p20) enthält die große katalytische Untereinheit. C-terminal befindet sich die 10-13 kD schwere sog. kleine katalytische Untereinheit (p10). An der N-terminalen Seite liegt eine 3-24 kD schwere Prodomäne, die als Todesdomäne (*death domain*, DD) bezeichnet wird. Sie kann aus 22 bis über 200 Aminosäuren bestehen und enthält je nach Caspase die DED und die CARD Domänen. Hierbei dienen die nur in Caspase-8 und -10 enthaltenen DED Domänen dazu, die Caspasen über Adaptormoleküle wie FADD („Fas-associated death domain“) an intrazelluläre Rezeptoranteile zu rekrutieren und so ihre Aktivierung zu ermöglichen [Eberstadt et al. 1998]. Auch die CARD Domänen vermitteln Protein-Protein Interaktionen, hier insbesondere zwischen Caspase-9 und Apaf-1 [Qin et al. 1999]. Bei einigen Caspasen befindet sich zwischen der p20- und der p10-Untereinheit ein kleines Verbindungsstück [Chowdhury et al. 2008]. Die Caspasen werden normalerweise durch Spaltung im Bereich dieser Verbindungsregion aktiviert, wobei in manchen Fällen ein kleines Verbindungssegment freigesetzt wird [Stennicke, Salvesen 2000]. Hierdurch entsteht ein heterodimeres Enzym, das mit einem weiteren Heterodimer die aktive tetramere Formation bildet [Stennicke, Salvesen 2000]. Die Mechanismen der Caspaseaktivierung, die Homo- und die Heteroaktivierung, sowie die verschiedenen Signalwege und Aktivierungskaskaden mit einigen Inhibitoren sollen im übernächsten Unterkapitel näher betrachtet werden.

### **1.3.6 Bcl-2-Proteine**

Die Mitglieder der Bcl-2-Familie stellen wichtige Regulatoren der Apoptose dar. Besonders sind sie im sog. intrinsischen Signalweg beteiligt, besitzen jedoch auch im extrinsischen Weg wichtige Funktionen. Namensgeber der Gruppe ist das *BCL2*-Gen (BCL, „B-Cell-Lymphoma“), das als Onkogen der t(14; 18)-Translokation in folliculären Non-Hodgkin-Lymphomen entdeckt wurde. Durch die Translokation gerät das Gen von Chromosom 18 unter die Kontrolle eines Enhancers im Immunglobulin-Schwerekettenloкус auf Chromosom 14, wodurch seine Transkription aktiviert wird. [Wagener 1999]



Die Proteinfamilie besteht aus mindestens 20 Mitgliedern, die sich strukturell und auch funktionell in insgesamt drei Klassen einteilen lassen [Cory, Adams 2002]. Allen gemeinsam ist, dass sie mindestens eine der vier konservierten Bcl-2-Homologiedomänen (BH1-BH4) enthalten. Die Bcl-2-Proteine wirken entweder apoptosefördernd oder -hemmend. Die antiapoptotischen Mitglieder, unter ihnen Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Bfl-1/A1 und Mcl1 enthalten alle – obwohl mit unterschiedlich guter Ausprägung – vier Bcl-2-Homologiedomänen sowie eine Transmembrandomäne. Die proapoptotischen Proteine umfassen die beiden anderen Gruppen: die Bax-Familie, die BH1, BH2 und BH3 enthalten und die BH3-Gruppe, deren Mitglieder nur die BH3-Domäne besitzen. Außer dem BH3-Protein Bid weisen all diese auch einen Membrananker auf. Die Bax-Familie umfasst die Mitglieder Bax, Bad und Bok. Unter den BH3-Proteinen befinden sich Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa und Puma. [Cory, Adams 2002] Grob orientierend kann man sagen, dass die BH3-Proteine als intrazelluläre Apoptoseliganden proximal der Bcl-2-Multidomänenproteine agieren und mit proximalen Signaltransduktionswegen in Verbindung treten können [Ranger et al. 2001]. Sie scheinen als Störungssensoren zu dienen und (mit möglicher Ausnahme von Bid) die antiapoptotischen Proteine direkt antagonisieren zu können [Cory, Adams 2002].

Die Aufgabe der meisten Multidomänenproteine hingegen scheint in der Aufrechterhaltung oder Zerstörung der mitochondrialen Integrität zu bestehen [Ranger et al. 2001]. Bcl-2 befindet sich auch in gesunden Zellen auf der zytoplasmatischen Seite der äußeren Mitochondrienmembran, des endoplasmatischen Retikulums und der Kernmembran, während die anderen antiapoptotischen Proteine nur bei einem zytotoxischen Signal mit den Membranen verbunden sind [Cory, Adams 2002]. Sie erhalten die Membranintegrität und verhindern so direkt oder indirekt die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, das zu einer Aktivierung der Caspasekaskade führen würde [Wagner 1999]. Deletionsstudien zeigen die essentielle Rolle von Bcl-2 bei der Nierenentwicklung und der Aufrechterhaltung der Lymphozytenhomöostase, wo es insbesondere für das Überleben reifer T- und B-Lymphozyten notwendig ist [Ranger et al. 2001]. Vermindertes Überleben von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Thymozyten in Abwesenheit von Bcl-x<sub>L</sub> bei unbeeinflussten reifen T-Zellen stimmt mit einer hohen Bcl-x<sub>L</sub>-Expression und niedrigem Bcl-2 in diesen Thymozyten und umgekehrtem Verhältnis in reifen Lymphozyten überein [Ranger et al. 2001]. Das frühe CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Stadium der Thymozyten wiederum ist Bcl-2-abhängig. Generell ist die Bcl-2-Expression in der T-Zelllinie essentiell für die Homöostase und wird über IL-7-Rezeptor-vermittelte Signale reguliert, während Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl2A1 TCR-, also aktivierungsabhängig sind. [Patra et al. 2013, Koenen et al. 2013].

Da die BH3 Proteine ohne Bax und Bad keinen Zelltod auslösen können, müssen sie stromaufwärts von diesen agieren. Die Anwesenheit von entweder Bax oder Bad scheint für den Zelltod der meisten Zellen notwendig zu sein. Über Porenbildung scheinen sie für die Membranpermeabilität der Mitochondrien für Cytochrom c verantwortlich zu sein [Cory, Adams 2002]. Bad sei auch in der Lage, über Heterodimerisation mit Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> deren antiapoptotische Wirkung aufzuheben [Elmore 2007, Yang 1995].

Das BH3-Protein Bid stellt eine Brücke zwischen dem rezeptorvermittelten extrinsischen und dem intrinsischen mitochondrialen Signalweg zur Apoptose dar. Durch Spaltung durch Caspase-8 kann es aktiviert werden und führt zu Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien mit nachfolgender Aktivierung der Caspasekaskade [Ranger et al. 2001]. Sowohl intaktes als auch gespaltenes Bid können von Bfl-1/A1 über die BH3-Domäne gebunden werden. Bfl-1/A1 kann damit eine Interaktion von Bid mit Bak oder Bax an der äußeren Mitochondrienmembran verhindern. So vermag es die Zelle vor rezeptorvermittelter Apoptose zu schützen. [Werner et al. 2002]

Die BH3-Proteine Puma und Noxa, die beide durch p53 induziert werden, stellen wichtige Vermittler der durch p53 vermittelten Apoptose dar [Elmore 2007]. P53 wird nach David Lane als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, da es insbesondere durch DNA-Schädigungen induziert bzw. aktiviert wird [Lane 1992]. Dies geht mit einem Stopp der Zelle in der späten G1-Phase des Zellzyklus oder mit Apoptose einher [Wagener 1999]. Hierbei scheint Puma über verstärkte Expression von Bax zu wirken und Noxa an den Mitochondrien mit antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen zu interagieren [Elmore 2007].

### **1.3.7 Signalwege zur Apoptose**

Die wichtigsten Signalwege zur Apoptose sind der rezeptorvermittelte oder extrinsische Weg, der mitochondriale oder intrinsische Signalweg und der Perforin/Granzym Signalweg. Ausgenommen des Granzym A-Weges münden alle diese Wege in den *Execution Pathway*, in die gemeinsame Endstrecke mit Aktivierung der Effektorcaspasen und Auslösen der zytomorphologischen Veränderungen in der apoptotischen Zelle. [Elmore 2007]

Der extrinsische Signalweg wird über Ligandenbindung an Transmembranrezeptoren der Familie der TNF-Rezeptorfamilie (TNF: Tumornekrosefaktor) initiiert. Diese besitzen strukturell ähnliche cysteinreiche extrazelluläre Domänen und homologe zytoplasmatische

Domänen, die auch als D-Domänen (*death domains*) bezeichnet werden. Am besten charakterisiert sind CD95 (auch Fas oder Apo1 genannt) und der TNF-Rezeptor 1 (TNFR1). [Ashkenazi, Dixit 1998] Man unterscheidet zwei verschiedene Mechanismen der Aktivierung der Caspasen, die Homoaktivierung und die Heteroaktivierung [Stennicke, Salvesen 2000]. Homoaktivierung, d.h. die Fähigkeit, sich selbst zu prozessieren, scheint ein Mechanismus der Aktivierung der Initiatorcaspasen zu sein. Insbesondere Caspase-8 scheint eine hohe autokatalytische Aktivität zu besitzen [Stennicke, Salvesen 2000]. Beispielhaft für den extrinsischen Weg soll die Aktivierung über CD95 kurz dargestellt werden. Der trimere Ligand CD95L (CDXXX) bindet drei CD95-Monomere, wodurch sich deren zytoplasmatische D-Domänen aneinander lagern. An die D-Domänen bindet daraufhin das Adaptormolekül FADD („FAS-associated death domain“), das eine DED-Domäne trägt, die mit einer DED-Domäne der Procaspase-8 assoziiert. Durch die räumliche Nähe der Procaspase-8-Moleküle wird deren Autokatalysierung im Sinne einer Homoaktivierung ermöglicht, was in einer Aktivierung der Caspase-8 mit nachfolgender Aktivierung der Effektorcaspasekaskade resultiert. [Wagener 1999, Stennicke, Salvesen 2000] Auf ähnliche Weise erfolgt Aktivierung von Caspase-10. Das Protein c-FLIP, das ebenfalls eine DED-Domäne trägt, scheint als kompetitiver Inhibitor von Caspase-8 und -10 zu wirken, indem es mit FADD assoziiert und so die Bindung der Procaspasen an FADD verhindert. [Stennicke, Salvesen 2000] Ein weiterer negativer Regulator, der die Prozessierung von Caspase-8 zu verhindern scheint, ist das Protein Toso [Elmore 2007]. Der extrinsische Signalweg über CD95 ist für die Deletion aktivierter T-Zellen am Ende einer Immunantwort, für die Beseitigung virusinfizierter oder maligner Zellen durch zytotoxische T-Zellen oder Natürliche Killerzellen und für die Elimination von Entzündungszellen in bestimmten Geweben wie dem Auge von großer Wichtigkeit [Ashkenazi, Dixit 1998].

Ein ähnlicher Mechanismus der Homoaktivierung liegt im Zentrum des intrinsischen Signalweges. Während die apoptotischen Signale, die den extrinsischen Weg aktivieren, von außerhalb der Zelle über Rezeptoren vermittelt werden, wird der intrinsische Weg über intrazelluläre Signale vermittelt. Diese können sowohl auf eine negative Art und Weise als auch positiv wirken. Die negativ wirkenden Signale stellen ein Wegfallen von Apoptosehemmung dar, wie es beispielsweise durch die Abwesenheit von bestimmten Wachstumsfaktoren, Hormonen oder Zytokinen vermittelt werden kann. Positiv wirkende Ursachen des intrinsischen Apoptoseweges sind unter anderem Chemotherapeutika, Bestrahlung, freie Radikale oder auch virale Infektionen. [Elmore 2007] Hierbei spielen die Mitochondrien sowie die im vorigen Kapitel beschriebenen Mitglieder der Bcl-2-Familie eine essentielle Rolle. Freisetzung von

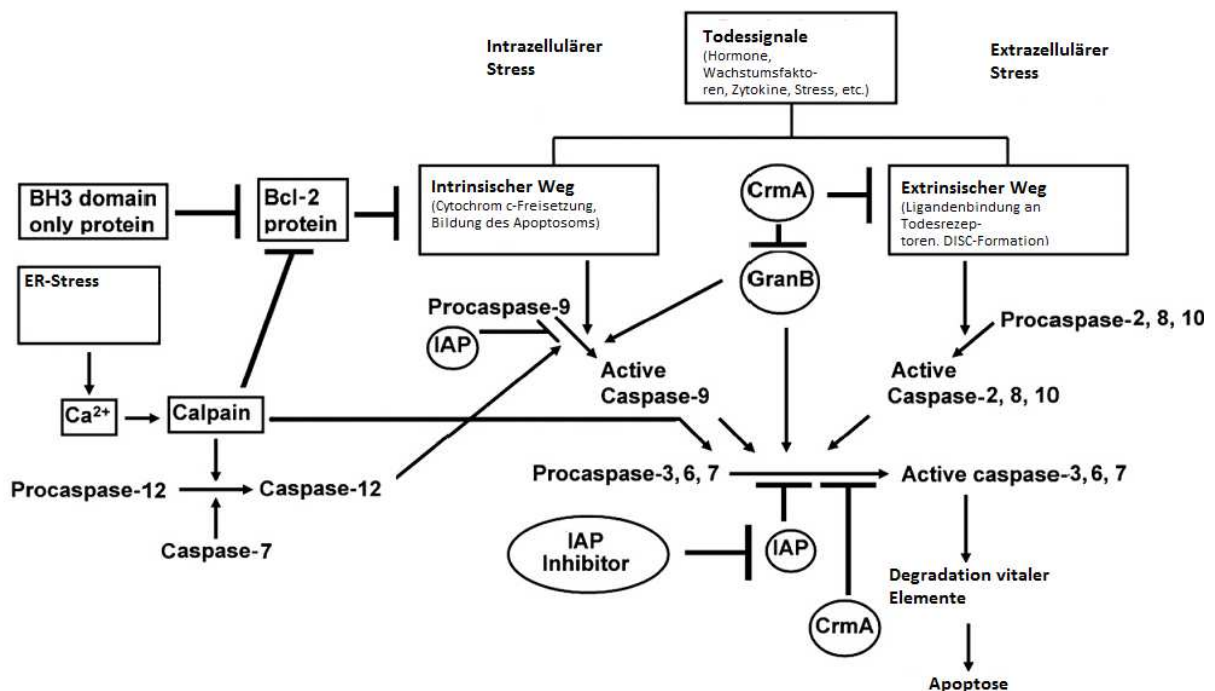
Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien führt zu Aktivierung und Oligomerisierung des Adaptormoleküls Apaf-1 („Apoptosis activating factor 1“), wodurch CARD-Domänen freigelegt werden, mit der Procaspase-9 über ihre CARD-Domäne interagieren kann. [Wagener 1999] Die Formation aus oligomerisierten Apaf-1-Proteinen, Cytochrom c und Caspase-9 wird auch als Apoptosom bezeichnet [Zou et al. 1999]. In dieser Formation kommt es zur Homoaktivierung von Caspase-9 mit nachfolgender Aktivierung der Effektorcaspasen. Neben Cytochrom c werden auch Smac/Diablo und die Serinprotease HtrA2/Omi aus den Mitochondrien freigesetzt, die über eine Hemmung der Apoptoseinhibitoren IAPs („inhibitors of apoptosis“) proapoptotisch wirken [Elmore 2007]. Bcl-2 wirkt als Inhibitor dieses Apoptoseweges, indem es die äußere Mitochondrienmembran stabilisiert und so die Freisetzung von Cytochrom c verhindert. Spätere Untersuchungen fanden heraus, dass jedoch die Bildung des Apoptosoms aus Apaf-1, Cytochrom c und Caspase-9 für die Durchführung der Apoptose auf dem intrinsischen, durch Bcl-2 kontrollierten Weg nicht essentiell notwendig ist. Es scheint sich vielmehr um eine Amplifizierungsschleife der apoptotischen Signale zu handeln als um einen Initiator der Caspasekaskade selbst. [Marsden et al. 2002] Dies verweist darauf, dass Bcl-2 neben seiner Rolle an der mitochondrialen Membran weitere Funktionen besitzt. So scheint es auch Caspaseaktivitäten zu regulieren, denn Apoptose unabhängig von der Bildung des Apoptosoms scheint auf Caspaseaktivität zu beruhen, wobei möglicherweise Caspase-7 eine wichtige Effektorrolle spielen könnte. [Marsden et al. 2002]

Untersuchungen verweisen in diesem Zusammenhang auf eine zentrale Rolle der Caspase-2, die aufgrund des unscheinbaren Phänotyps der entsprechenden *Knockout*-Tiere auch als „Cinderella-Caspase“ bezeichnet wird [Kumar, Vaux 2002]. So scheint sie für durch DNA-Schädigung induzierten Zelltod in zahlreichen Zellen essentiell. Sie zeigte sich für die Translokation von Bax zu den Mitochondrien sowie die Freisetzung von Cytochrom c und Smac/Diablo verantwortlich [Lassus et al. 2002]. Zahlreiche weitere Untersuchungen stützen die These, Caspase-2 stelle mehr als Caspase-9 eine apikale Caspase dar, aber für beide Caspasen gilt, dass sie als Amplifikationsschleife dienen können. [Kumar 2009, Kumar, Vaux 2002]

Eine Variante der T-Zell-Zytotoxizität stellt der Perforin/Granzym-Signalweg zur Apoptose dar [Elmore 2007]. Hierbei können Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen zunächst durch Freisetzung porenbildender Moleküle wie Perforin attackiert werden. Durch diese Poren erfolgt dann eine Freisetzung zytoplasmatischer Granula, die die Serinproteasen Granzym A oder

Granzym B enthalten, in die Zielzelle. Granzym B kann einerseits direkt Moleküle spalten und aktivieren, wie beispielsweise Procaspase-10 oder ICAD („Inhibitor of Caspase-Activated DNase“), durch Spaltung von Bid den mitochondrialen Weg mit Cytochrom c-Freisetzung aktivieren oder auch direkt die Effektorcaspase-3 aktivieren. [Elmore 2007] Granzym A wirkt über Aktivierung caspaseunabhängiger Signalwege wie insbesondere über Desinhibition der DNase NM23-H1, was zu apoptotischer DNA-Degradation führt [Elmore 2007].

Die Effektorcaspasen dienen dazu, durch die Kaskade ihrer Aktivierung die Apoptosesignale zu amplifizieren und über Aktivierung von weiteren Proteasen und Endonucleasen die morphologischen Veränderungen der Apoptose auszulösen. Ihr Aktivierungsmodus ist der der sogenannten Heteroaktivierung. Sie sind somit von den Initiatorcaspasen oder anderen Proteasen abhängig. So konnte am besten gezeigt werden, dass Caspase-8, Caspase-10 und Granzym B die Caspasen-3 und -7 durch Spaltung aktivieren können. [Stennicke, Salvesen 2000] Neben diesen beiden wird auch Caspase-6 zu den Effektorcaspasen gezählt. Die Substrate der Effektorcaspasen umfassen u.a. zelluläre Strukturproteine wie Actin und Lamine, das DNA-Reparaturenzym PARP (Poly-ADP-ribose-Polymerase) und ICAD, den Inhibitor der Endonuclease CAD. Dieser wird insbesondere durch Caspase-3 gespalten, wodurch CAD aktiviert wird, was zu apoptotischer DNA-Degradation und Chromatinkondensation führt. [Elmore 2007]



**Abbildung 1.3: Schema der Caspasekaskade [aus Chowdhury et al. 2008].** Überblickartig dargestellt sind der intrinsische und der extrinsische Signalweg sowie der im Text nicht erwähnte Weg über das endoplasmatische Retikulum mit Ca-Freisetzung und Aktivierung der Protease Calpain. IAP („inhibitor of apoptosis proteins“) sind eine Familie zellulärer Proteine mit apoptoseinhibitorischer Wirkung. CrmA ist ein Serpin des Vacciniavirus, ein starker Inhibitor von Caspase-1 und Caspase-8. GranB (Granzym B). DISC („death inducing signaling complex“) meint den Komplex aus trimerisiertem aktivierten Rezeptor, z.B. CD95, dem Adapterprotein FADD und Caspase-8. Nicht dargestellt ist die im Text erwähnte Verbindung zwischen rezeptorvermitteltem und intrinsischem Weg über das BH3-Protein Bid. [Chowdhury et al. 2008]

### 1.3.8 Zelltod in T-Zellen

Täglich werden aus dem Thymus der Maus ungefähr  $10^6$  Zellen in einen T-Zell-Pool von  $8 \cdot 10^7$  Zellen freigesetzt [Khaled, Durum 2002]. Dies bedeutet, dass pro Tag  $10^6$  T-Zellen differenzieren oder sterben müssen, damit die Gesamtzellzahl stabil bleibt. Die Regulation dieser Zahl geschieht nicht über die Vorläuferzellen, sondern über das Gleichgewicht von Proliferation und Zelltod in der Peripherie. [Khaled, Durum 2002] Apoptose der T-Zellen dient somit dem Erhalt einer Homöostase und der Selbsttoleranz. Während der positiven Selektion werden Zellen, die keinen funktionellen T-Zell-Rezeptor (TCR) ausgebildet haben, aufgrund eines Mangels an Überlebenssignalen bzw. an Apoptoseinhibition einen sogenannten Tod durch Vernachlässigung (*death by neglect*) erleiden. Im Rahmen der negativen Selektion dient Apoptose der Beseitigung selbstreaktiver Thymozyten. Pathologische Apoptose, d.h. ein zu viel oder ein zu wenig, resultiert in Immundefizienz, Autoimmunität und Krebserkrankungen. [Opferman, Korsmeyer 2003] Eine Immunantwort verläuft in verschiedenen Phasen: Zunächst kommt es zu einer Expansion, einer starken Vermehrung antigenspezifischer Lymphozyten. Dies ist stark von kostimulatorischen Molekülen wie CD28 auf T-Zellen abhängig, mit deren Hilfe Zytokine und antiapoptotische Moleküle induziert werden. [Opferman, Korsmeyer 2003] So scheint Kostimulation mit CD28 den Caspase-8-Inhibitor FLIP und Bcl- $x_L$  zu induzieren und die Expression von CD95L (Fas-Ligand) zu verhindern [Kirchhoff et al. 2000]. In der am Ende der Immunantwort stattfindenden Phase der Kontraktion führen Signaltransduktion über CD95 (Fas) und abnehmende Aktivierung über den TCR und die kostimulatorischen Moleküle, was über eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen wirkt, zur Apoptose des Großteils der aktivierten antigenspezifischen Lymphozyten. Die dritte Phase der Immunantwort betrifft die Ausbildung von langlebenden Gedächtniszellen, wobei

insbesondere IL-7 und IL-15 wichtige Rollen spielen. [Opferman, Korsmeyer 2003] Bei der Apoptose von T-Zellen sind sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Signalweg beteiligt. Während eine verzögerte Form des Zelltodes über intrinsische Signalwege in T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen gleich verläuft, scheinen T<sub>H</sub>2-Effektorzellen gegenüber einer schnellen CD95-medierten Apoptose unempfindlicher zu sein als T<sub>H</sub>1-Zellen. Grund hierfür mag eine erhöhte Produktion von FAP-1, einer Fas-assoziierten Phosphatase in T<sub>H</sub>2-Zellen sein, die den rezeptorvermittelten Weg zu hemmen vermag. [Zhang et al. 1997] Insgesamt ist die Apoptose aber ein wichtiger Bestandteil der T-Zellregulation während Entwicklung, Homöostase und Aktivierung, so dass ihr detailliertes Verständnis Ziel immunologischer Forschung ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reaktionssysteme

- Acrylamid	Carl Roth
- AEBSF (Pefabloc SC)	Roche
- Agar-Agar	Carl Roth
- Agarose	Sigma-Aldrich
- Ampicillin	Hoechst
- Annexin V-PE	BD PharMingen
- APS (Ammoniumpersulfat)	Merck Eurolab
- $\beta$ -Glycerophosphat	Carl Roth
- $\beta$ -Mercaptoethanol	Carl Roth
- Bacto-Trypton™	BD PharMingen
- BioRad Protein Assay (5 x Bradford Reagenz)	BioRad
- Borsäure	Merck Eurolab
- Bromphenol Blau	Merck Eurolab
- BSA Fraktion V (Rinderserumalbumin)	Carl Roth
- Chloroform	Carl Roth
- DEPC (Diethylpyrokarbonat)	Carl Roth
- Dinatriumhydrogenphosphat	Merck Eurolab
- D-Luziferin	AppliChem
- DMEM (Dulbecco´s modifiziertes Eagle-Medium)	Gibco BRL
- DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth
- dNTPs (desoxy-Nukleosid-Triphosphate)	MBI-Fermentas
- DTT (1,4-Dithiothreitol)	Carl Roth
- ECL Western blotting analysis system	Amersham
- EDTA	Carl Roth
- EGTA	Sigma-Aldrich
- Essigsäure	Carl Roth
- Ethanol	Carl Roth



- Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma-Aldrich
- FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco BRL
- Ficoll	Amersham Pharmacia
- Gelextraktionskit jetsorb	Genomed
- Glycin	Merck Eurolab
- Glyzerin (87%)	Carl Roth
- G418	Hoechst
- Harnstoff	Carl Roth
- Hefeextrakt	
- Hepes (N-(2-Hydroxyethyl) Piperazin-N`-(3-Propansulfonsäure))	Carl Roth
- Ionomycin	Sigma-Aldrich
- Isoamylalkohol	Carl Roth
- Isopropanol (2-Propanol)	Carl Roth
- Kaliumazetat	Carl Roth
- Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich
- Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich
- Kaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich
- Kaliumhydroxid	Carl Roth
- Kalziumchlorid	Carl Roth
- L-Glutamin	Gibco BRL
- Leupeptin Hydrochlorid	Roche Applied Science
- Magermilchpulver	diverse Hersteller
- Magnesiumazetat	Sigma-Aldrich
- Magnesiumchlorid	Carl Roth
- Magnesiumsulfat	Carl Roth
- Manganchlorid	Fluka
- MES (2-N-Morpholinoethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich
- MOPS (4-Morpholinpropansulfonsäure)	Carl Roth
- Natriumazetat	Merck Eurolab
- Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck Eurolab
- Natriumchlorid	Carl Roth
- Natriumfluorid	Sigma-Aldrich
- Natriumhydrogenphosphat	Merck Eurolab

- Natriumhydroxid	Carl Roth
- Natriumpyruvat	Gibco BRL
- Nucleobond™-kit zur Plasmidisolation	Quiagen
- PEG (Polyethylenglykol) 4000	NEB
- Penicillin	Hoechst
- Phenol (mit TE äquilibriert)	Carl Roth
- Plasmid-DNA Isolationskit (Maxi)	Quiagen
- Plasmid-DNA Isolationskit (Mini)	Genomed
- PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Serva
- Ponceaurot	Sigma-Aldrich
- Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma-Aldrich
- poly dI/dC	Boehringer-Ingelheim
- Polyfect™	Quiagen
- Protease-Inhibitor-Tabletten (“complete Mini”)	Roche Applied Science
- radioaktive Nukleotide ( $\gamma^{32}$ -P-ATP, $\alpha^{32}$ -P-dCTP, $\alpha^{32}$ -P-UTP)	Amersham Pharmacia
- RNase – Protektions-Analyse-Kit (RiboQuant™)	BD PharMingen
- RPMI 1640	Gibco BRL
- Rubidiumchlorid	Carl Roth
- Salzsäure	Merck Eurolab
- SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth
- Sephadex G50	Amersham Pharmacia
- 7-AAD (7-Amino-actinomycin D) ( $C_{62}H_{87}N_{13}O_{16}$ )	BD PharMingen
- Streptomycinsulfat	Hoechst
- Sulfosalicylsäure	Sigma-Aldrich
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth
- TPA (12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat)	Sigma-Aldrich
- Transfektionsreagenzien (SuperFect™)	Quiagen
- Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich
- Tris(2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3-Propandiol)	Carl Roth
- Triton X-100 (Alkylphenylolyethylenglykol)	Sigma-Aldrich
- Trizol-Reagenz	Gibco BRL
- Trypanblau 0,1%	Gibco BRL
- Tween 20	Carl Roth

- 4-Hydroxytamoxifen (C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich
- Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Carl Roth
- Xylencyanol	Serva
- Zeocin	InvitroGen

### 2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

- Autoklav	Stiefenhofer
- Brutschränke	Nunc, Heraeus
- Eismaschine	Genheimer
- FACScan (Durchflusszytometer)	Becton Dickinson
- Gefrierschränke (-20°C; -70°C)	Privileg, Bosch
- Gelkammern	Stratagene, Hoefer
- Gel Trockner	BioRad, Hartenstein
- Heizblöcke	Hartenstein
- Kühlzentrifugen	Heraeus
- Lichtmikroskope	Olympus, Leica
- Mikroliter Pipetten	Eppendorf, Brand
- Mikrozentrifugen	Eppendorf
- pH-Meter	Hartenstein
- Phospho-Imager	Molecular Dynamics
- Rotoren (JA-10, JA-14)	Beckman
- Schüttelinkubator	Hartenstein
- Szintillations-Meßgerät	Canberra Packard
- Spannungsquelle	Amersham Pharmacia
	Biotech
- Spektralphotometer	Amersham
	Biotech
- Sterilbank	Heraeus, Gelaire
- Stickstoff-Tanks	tec-lab
- Ultrazentrifuge	Beckman
- UV-Stimulationsgerät UVT-20M	Herolab
- Vortexer	Hartenstein
- Waage Precisa 300 MC	Sartorius, Hartenstein

- Wasserbäder	Hartenstein
- Wasser-Entsalzungsanlage (MilliQ-Plus)	Millipore
- Zählkammer (Neubauer improved)	Brand
- Reagiergefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
- Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Nunc
- 2 ml Kryotubes	Greiner bio-one
- Einmalkanülen (26G <sub>3/8</sub> ; 0,45x10 mm)	Hartenstein
- Einmalküvetten	Hartenstein
- Einmalspritzen (1 ml, 10 ml, 20 ml)	Hartenstein
- Gewebekulturflaschen (50 ml, 250 ml)	Greiner bio-one
- Gewebekulturschalen (60 mm, 90 mm)	Falcon, Greiner bio-one
- Glaswaren	Schott
- Parafilm	Hartenstein
- Pipettenspitzen	Eppendorf
- Röntgenfilme (13x18 cm)	Kodak
- Sterilfilter (0,2 µM, 0,45 µM)	Schleicher & Schuell
- Whatman Papier	Hartenstein

### 2.1.3 Gewebekulturzellen und Bakterien

**EL-4 T-Zellen** entstammen einem murinen, mittels 9,10-dimethyl-1,2-benzanthrazen induzierten T-Zell-Lymphom. Nach einer Stimulation mit Phorbol ester sezerniert diese Zelllinie Zytokine wie IL-2, IL-3, IL-4 und IL-10 sowie den Granulozyten-Makrophagen Koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF). Sie wurden bezogen von der American Type Culture Collection (ATCC), ATCC Nr. TIB-39.

**293-Zellen** sind durch einen Adenovirus des Typs 5 (Ad 5) transformierte primäre humane embryonale Nierenzellen [Graham et al., 1977]. Diese Zelllinie wächst sowohl adhärent als auch in Suspensionskulturen. Sie ist auch unter den Bezeichnungen HEK 293 oder nach Einfügung des SV40-T-Antigens als 293T bekannt. Sie wurden bezogen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), DSMZ Nr. ACC 305.

Die **Bakterien** zur Vermehrung der Plasmid-DNA wurden von Stratagene bezogen. Bei dem verwendeten **Escherichia coli** (E.coli) Stamm **DH5α** wird durch eine Mutation im recA-Gen

die genetische Rekombination unterdrückt. Zur Vermehrung der retroviralen Expressionsvektoren und von Plasmiden mit einer Größe ab 9 Kilobasenpaare (kB) und größer wurde der hochkompetente Stamm **XL10-Gold™** verwendet.

#### **2.1.4 Nährmedien**

##### Suspensionszellmedium für EL-4 Zellen

RPMI 1640 Fertigmedium	1 l
FCS	5 %
FCS (für U-937, WEHI-231)	10 %
L-Glutamin (200 mM)	5 ml
Penicillin (10.000 IU/ ml), Streptomycinsulfat (10 mg/ ml)	6 ml
β-Mercaptoethanol (50 mM)	1 ml

##### Einfriermedium

DMSO	10 %
------	------

in RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin und 10 % FCS

##### Medium für adhärente 293T Zellen

DMEM Fertigmedium (Dulbecco´s modifiziertes Eagle-Medium)	500 ml
FCS	10 %
L-Glutamin (200 mM)	5 ml
Penicillin (10.000 IU/ ml), Streptomycinsulfat (10 mg/ ml)	3 ml
β-Mercaptoethanol (50 mM)	500 µl
Natrium-Pyruvat (100 mM)	5 ml
Hepes (1 M)	5 ml

##### LB-Medium für Bakterienkultur

Bacto-Trypton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	10 g

pH-Wert mit 10 M NaOH (~ 200 µl) auf 7,0 einstellen, auf 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen, nach dem Autoklavieren sowie Abkühlen auf ca. 60°C eventuelle Zugabe von Antibiotika.

#### LB-Agarplatten

Bacto-Trypton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	10 g
Agar-Agar	12 g

pH-Wert mit 10 M NaOH (~ 200 µl) auf 7,0 einstellen, auf 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen, nach dem Autoklavieren sowie Abkühlen auf ca. 60°C eventuelle Zugabe von Antibiotika.

#### SOB-Medium für Bakterienkultur

Bacto-Trypton	20 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	0,5 g

pH-Wert mit 10 M NaOH (~ 100 µl) auf 7,0 einstellen, auf 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen, nach dem Autoklavieren und vor Verwendung Zugabe von:

MgCl <sub>2</sub> (1 M)	10 ml
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O (1 M)	10 ml

#### SOB-Agarplatten

Bacto-Trypton	20 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	0,5 g
Agar-Agar	12 g

pH-Wert mit 10 M NaOH (~ 100 µl) auf 7,0 einstellen, auf 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen, nach dem Autoklavieren und vor Verwendung Zugabe von:

MgCl <sub>2</sub> (1 M)	10 ml
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O (1 M)	10 ml

### 2.1.5 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden mit durch Millipore-Filter gereinigtem Wasser angesetzt und anschließend entweder autoklaviert oder sterilisiert.

#### Tris/ HCl (1,5 M)

Tris            181,7 g/ l

pH-Wert mit 1 N HCl auf 6,8/ 7,5/ 7,8/ 8,0/ 8,8 einstellen

#### Tris – NaCl

NaCl           8,1 g/l

Tris            0,6 g/l

pH-Wert mit 1 N HCl auf 7,4 einstellen

#### 20 x Tween

Tween 20      10 g/l

#### TBS (20x)

Tris            121,0 g/ l

NaCl           175,2 g/ l

KCl            7,5 g/ l

pH-Wert mit 1M HCl (~ 10,2 ml) auf 7,6 einstellen

#### TBS/Tween (TBST)

TBS (20x)     50 ml/ l

Tween 20      1 ml/ l

#### Reagenzien für Western Blot

##### 4 x Lower Buffer

Tris            1,5 M

SDS            0,4 %

pH 8,8

8 x Upper Buffer

Tris 1,5 M

SDS 0,4 %

pH 6,8

10 x Laufpuffer (nach Laemmli)

SDS 10%

Glycin 114,13 g/l

Tris 30,3 g/l

2 x Ladepuffer (nach Laemmli)

Tris pH 6,8 100 mM

SDS 4 %

Bromphenolblau 0,2 %

Glycerin 20 %

DTT 0,5 %

10 x Transfer-Puffer für Proteine unter 80 kD

Tris 25 mM

Glycin 190 mM

Methanol 20 %

10 x Transfer-Puffer für Proteine zwischen 20 und 400 kD

Tris 50 mM

Glycin 380 mM

SDS 0,1 %

Methanol 20 %

Stripping Buffer

1,5 M Tris/HCl (pH6,8) 41,7 ml/l

10 % SDS 200 ml/l

Vor Gebrauch Zugabe von 700 µl β-Mercaptoethanol je 100 ml Puffer



KLBM-Puffer (Kyriakis Lysis Buffer Modified) für Gesamtzellproteinextrakte

1 M HEPES/KOH (pH 7,4)	20 ml/l
0,25 M EGTA (pH 8,0)	8 ml/l
Natriumfluorid	2,1 g/l
β-Glycerophosphat	10,8 g/l
Glycerin (87 %)	115 ml/l
Triton X-100	10 ml/l
Natriumazid-Stammlösung (10 %)	4 ml/l

Lagerung bei 4 °C, vor Verwendung Zugabe pro 10 ml Puffer von 10 µl DTT-Stammlösung (1 M) und Protease-Inhibitoren, wie z.B. 1 Tablette „complete mini“ von Roche.

Ponceau-Färbelösung

Ponceau-Rot	2 g/ 100 ml
Trichloressigsäure	30 g/ 100 ml
Sulfosalicylsäure	30 g/ 100 ml

PAA-Gellösungen für Western Blot

Sammelgel (ein Ansatz)

H <sub>2</sub> O	3400 µl
Acrylamid-Lösung	850 µl
Upper 8 x	700 µl

Zum Starten der Polymerisierung Zugabe von:

APS 10 %	50 µl
TEMED	5 µl

12 % Trenngel (ein Ansatz)

H <sub>2</sub> O	2050 µl
Acrylamid-Lösung	2500 µl
Lower 4 x	1600 µl

Zum Starten der Polymerisierung Zugabe von:

APS 10 %	60 µl
TEMED	2,5 µl

### 8 % Trenngel

H<sub>2</sub>O 2250 µl

Acrylamid-Lösung 2007 µl

Lower 4 x 2475 µl

Zum Starten der Polymerisierung Zugabe von:

APS 10 % 56,25 µl

TEMED 7,5 µl

### Puffer zur Herstellung kompetenter Bakterien

#### RF1-Puffer

Kaliumazetat (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>KO<sub>2</sub>) 2,9 g/ l

RbCl 12,1 g/ l

MnCl<sub>2</sub> 6,3 g/ l

1 M CaCl<sub>2</sub> 10 ml/ l

Glyzerin (87 %) 150 ml/ l

pH-Wert mit 0,2 N Essigsäure auf 5,8 einstellen, sterilfiltrieren

#### RF2-Puffer

RbCl 1,2 g/ l

MOPS 2,1 g/ l

1 M CaCl<sub>2</sub> 75 ml/ l

Glyzerin (87 %) 150 ml/ l

pH-Wert mit 0,2 M NaOH auf 6,8 einstellen, sterilfiltrieren

### DNA-Extraktionslösung

Phenol 25 Teile

Chloroform 24 Teile

Isoamylalkohol 1 Teil

kurz vor Verwendung frisch hergestellt

### TE-Puffer (Tris/EDTA; Aufnehmen, Lösen von DNA) pH 8,0

1,5 M Tris/HCl (pH 8,0) 6,7 ml/ l

0,5 M EDTA (pH 8,0) 0,2 ml/ l

EB-Puffer (Aufnehmen, Lösen von DNA) pH 8,5

1,5 M Tris/HCl (pH 8,5)                      6,7 ml/ l

6x „Gel loading“ - Probenpuffer (Bluejuice) von MBI Fermentas

Glyzerin    60 %  
EDTA    60 mM  
Bromphenolblau                              0,09 %  
Xylenzanol FF                                 0,09 %

TAE-Puffer (Tris/Azetat/EDTA; 50x)

Tris    242 g/ l  
0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA • 2 H<sub>2</sub>O (pH 8,0)    100 ml/ l  
konzentrierte Essigsäure                    57,1 ml/ l

TAE-Puffer (1x, DNA-Elektrophorese-Laufpuffer)

TAE-Puffer (50x)                              20 ml/ l

Zugabe von 0,1 ml EtBr-Stammlösung pro Liter für Elektrophorese

TAE-Agarosegele (DNA-Elektrophorese)

TAE (50x) 20 ml/ l Gel [%]	Agarose [g/l]	Auftrennung [bp]
0,5    5    1.000 -	30.000	
1,0    10   500 -	10.000	
1,4    14   200 -	4.000	

Zugabe von 0,25 ml EtBr-Stammlösung pro Liter Gellösung. Zum Lösen der Agarose aufkochen (Vorsicht, Siedeverzug).

DEPC-behandeltes ddH<sub>2</sub>O

(RNase-frei, Handschuhe tragen!)

DEPC    2 ml/ l

gut vermischen und über Nacht (~ 16 h) unterm Abzug inkubieren, autoklavieren und bei RT lagern; alle Lösungen und Puffer beim Arbeiten mit RNA in DEPC-ddH<sub>2</sub>O ansetzen.

TBE-Puffer (10x, Tris/Borat/EDTA)

Tris 108 g/l

Borsäure 55 g/l

0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA • 2 H<sub>2</sub>O (pH 8,0) 40 ml/l

Denaturierendes PAA-Gel für RNase-Protektionsanalyse (5 %-ige Gellösung)

Harnstoff 35,82 g

30 %-ige Acryl-Bisacrylamidlösung 12,42 ml

10x TBE-Puffer 7,45 ml

mit ddH<sub>2</sub>O auf 74,5 ml auffüllen;

zum Starten der Polymerisierung (Polymerisationszeit 0,5-1 h) Zugabe von:

APS 10% 450 µl

TEMED 60 µl

Protease Inhibitoren (Stammlösungen, eingesetzte Endkonzentrationen)

Aprotinin (Stammlösung (0,3 M): 2 mg/ ml ddH<sub>2</sub>O) 0,3 µM

Leupeptin (Stammlösung (2 mM): 1 mg/ ml ddH<sub>2</sub>O) 2 µM

AEBSF (Stammlösung (0,2 M): 50 mg/ ml ddH<sub>2</sub>O) 1 mM

Annexin V-Bindepuffer (pH 7,4)

1 M Hepes (pH 7,4) 10 ml/l

5 M NaCl 28 ml/l

1 M KCl 5 ml/l

1 M MgCl<sub>2</sub> 1 ml/l

1 M CaCl<sub>2</sub> 2,5 ml/l

PBS (10x)

NaCl 80 g/l

KCl 2 g/l

CaCl<sub>2</sub> 1 g/l

MgCl<sub>2</sub> 1 g/l

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O 26,8 g/l

KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 2,4 g/l

pH-Wert auf 7,4 mit 1 N HCl einstellen

### PBS –Ca<sup>2+</sup>/-Mg<sup>2+</sup> (10x)

NaCl	80 g/l
KCl	2 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	26,8 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g/l

pH-Wert auf 7,4 mit 1 N HCl einstellen

### FACS-Waschpuffer (pH 7,4)

PBS (1x, pH 7,4)	500 ml
BSA Fraktion V	0,5 g
FCS	25 ml
NaN <sub>3</sub> (10 %)	1 ml

## **2.1.6 Enzyme**

Alle Enzyme wurden mit den entsprechenden, meist 10-fach konzentrierten Reaktionspuffern bei den angegebenen Herstellern bezogen und wenn nicht anders angegeben, nach den Hersteller-Protokollen verwendet.

- Restriktionsendonukleasen	MBI-Fermentas, NEB
- T7 RNA-Polymerase	BD PharMingen*
- RNasin <sup>TM</sup> (RNase-Inhibitor)	BD PharMingen*
- RNase-freie DNase	BD PharMingen*
- Proteinase K	BD PharMingen*

\* enthalten im „Transcription Kit“ bzw. im „RPA Kit“ von RiboQuant<sup>TM</sup> von BD PharMingen

## **2.1.7 Peptide und Antikörper**

FACS-Färbungen mittels Annexin V-PE (an Phycoerythrin (PE) gekoppelt) zum Nachweis der Translokation von Phosphatidylserin und 7-AAD (7- Aminoactinomycin) als Avitalfarbstoff, beide von BD PharMingen.

Verwendung des Pancaspaseinhibitors Z-VAD fmk (*N*-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketon) 100  $\mu$ M in DMSO von Sigma-Aldrich.

<b>Antigen</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Klonalität</b>
HA (HA.11)	Maus	BAbCO	monoklonal
ER (Östrogenrezeptor)	Kaninchen	Santa Cruz	polyklonal
FLAG (M2)	Maus	Sigma-Aldrich	monoklonal
$\beta$ -Aktin (AC-15)	Maus	Sigma-Aldrich	monoklonal
Caspase-7	Kaninchen	New England Biolabs (NEB)	polyklonal
Caspase-3	Kaninchen	NEB	polyklonal
PARP	Maus	Oncogene	monoklonal
Maus IgG	Schaf	Amersham Pharmacia	Gekoppelt an HRP*
Kaninchen IgG	Esel	Amersham Pharmacia	Gekoppelt an HRP*

\* HRP "horse radish peroxidase": Meerrettichperoxidase

### 2.1.8 Größenmarker

Verwendet wurden die DNA-Größenmarker GeneRuler<sup>TM</sup> 100 bp sowie 1 kb der Firma MBI-Fermentas und der Protein-Größenmarker BenchMark<sup>TM</sup> von Gibco BRL.

BenchMark<sup>TM</sup>: Bandengrößen in Kilodalton (kDa) (zwischen einzelnen Chargen z.T. variierend): 173, 111, 80, 61\*, 49, 36, 25, 19, 13 sowie 9. Die mit \* gekennzeichnete, pinkfarbene Bande dient zur Orientierung auf dem SDS-PAA-Gel bzw. dem Immunoblot, während alle anderen Banden blau sind.

### 2.1.9 Plasmide und Vektoren

Die hier verwendeten retroviralen Verpackungs- und Genexpressions-Vektoren **pHIT 60** und **pHIT 456** sowie **pEGZ/MCS** und **pEGZ-cEBP $\beta$ -ER<sup>TM</sup>** wurden freundlicherweise von Priv.-Doz. Dr. Ingolf Berberich (Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Sie sind Derivate des Murinen Leukämie Virus (MLV) [Soneoka et al. 1995] und so konstruiert, dass die cDNA's unter der Kontrolle des Zytomegalievirus-(CMV)

Promotors transkribiert werden. Außerdem enthalten die Plasmide einen SV40-“Origin of Replication”, eine PolyA-Anfügestelle und ein Ampicillin-Resistenzgen.

Das retrovirale Verpackungsplasmid **pHIT 60** kodiert für interne retrovirale Strukturproteine (gag) sowie für die reverse Transkriptase und Integrase (pol). Ursprünglich wurde es von Kingsman Labor (Oxford) bezogen.

Das retrovirale Verpackungsplasmid **pHIT 456** kodiert für das amphotrophe Hüllprotein (env) und erlaubt die Transduktion von Zellen verschiedener Spezies (Maus, Hund, Katze, Huhn, Mensch). Ursprünglich wurde es von Kingsman Labor (Oxford) bezogen.

Das retrovirale Expressionsplasmid **pEGZ/MCS** wurde von Priv.-Doz. Dr. Dirk Lindemann (Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg) konstruiert. Es ist ein Derivat des bicistronischen Vektors pczCFG2 hCD8 EGZ [Lindemann et al. 1997]. Es ermöglicht über eine interne ribosomale Bindestelle (IRES) aus dem Enzephalo-Myokarditis-Virus die koordinierte Expression einer gewünschten cDNA mit einem Grünfluoreszenzprotein (EGFP: enhanced green fluorescent protein). Die multiple Klonierungsstelle (MCS) setzt sich aus folgenden Restriktionsschnittstellen zusammen: EcoRI, SmaI und BamHI. Der Vektor enthält außerdem ein Zeocin-Resistenzgen sowie die retrovirale Verpackungssequenz  $\psi+$  [Knodel et al. 1999].

**pEGZ/MCS-HA** (hier als EGZ-HA bezeichnet) ist ein Derivat von pEGZ/MCS, bei dem Dr. Schulze-Lührmann (dieses Labor) ein Oligonucleotid mit einer Erkennungssequenz aus *Haemophilus aureus* (HA-tag) in die EcoRI-Schnittstelle kloniert hatte. So kann nach Einsetzen einer cDNA im korrekten Leseraster ein HA-tag-Fusionsprotein und das EGF-Protein unter der Kontrolle des CMV-Promotors transkribiert werden.

**pEYZ/MCS-HA** enthält stattdessen das gelbe Fluoreszenzprotein (EYFP: enhanced yellow fluorescent protein).

Für **pEGZ-cEBP $\beta$ -ER<sup>TM</sup>** (hier C/EBP $\beta$ -ER genannt) wurde die C/EBP $\beta$ -cDNA mittels PCR aus dem Konstrukt pMEXCRP2 [Williams et al. 1991] gewonnen und mit dem modifizierten Östrogenrezeptor fusioniert wie für die Generierung des chimeren c-MycER<sup>TM</sup>-Konstruktes beschrieben [Littlewood et al. 1995, Berberich-Siebelt et al. 2000]. **pEGZ-LIP-ER<sup>TM</sup>** (hier C/EBP $\beta$ dn-ER genannt) mit LIP =  $\beta$ 152n wurde ebenso kloniert. C/EBP $\delta$  entstammt pMEXCRP3 [Williams et al. 1991], wurde mit ER<sup>TM</sup> verbunden und in **pEYZ/MZS** (hier als EYZ-HA bezeichnet) als **pEYZ-cEBP $\delta$ -ER<sup>TM</sup>** (hier als C/EBP $\delta$ -ER bezeichnet) kloniert [Berberich-Siebelt et al. 2006].

Fusionsproteine aus hormonbindenden Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren ermöglichen das gezielte An- und Ausschalten der jeweiligen interessierenden Transkriptionsfaktoren. So

sind sie bei Abwesenheit des spezifischen Liganden im Zytoplasma an verschiedene intrazelluläre Polypeptide wie Hitzeschockproteine, darunter Hsp90 gebunden. Ist der Ligand jedoch anwesend, verdrängt er die inhibitorischen Proteine, bindet an den Rezeptor und ermöglicht so die nukleäre Translokation und Aktivierung des jeweiligen Transkriptionsfaktors. [Littlewood et al. 1995] Vorteil des modifizierten Östrogenrezeptors **ER<sup>TM</sup>** ist seine Spezifität für das synthetische 4-Hydroxytamoxifen, so dass keine Interaktionen mit natürlich vorkommenden Östrogenen auftreten können [Littlewood et al. 1995].

Die anstelle des HA-tags das Flag-Markerprotein tragenden Vektoren für die Caspase-mutanten **pEGN/mCasp3MutF** und **pEYZ/mCasp9MutF** sowie die Kontrollvektoren **pEYZ/MCS-F** und **pEGN/MCS-F** (hier als Vektorbezeichnung kurz als Caspase3F, Caspase9F und EYZ bzw. EGN bezeichnet) wurden ebenfalls freundlicherweise von Priv.-Doz. Dr. Ingolf Berberich (Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Bei der Caspase-3-Mutante wurde das Cystein im aktiven Zentrum zu Serin mutiert, bei der Caspase-9-Mutante das Cystein zu Phenylalanin. Die Caspase-3-Mutante trägt anstelle der Zeocin-Resistenz eine Neomycinresistenz.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur und zellbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Lagerung und Kultivierung der Zellen**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank ausgeführt. Die in 2 ml-Kryotubes in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zellen ( $6,0 \times 10^6$  ml<sup>-1</sup> Einfriermedium) wurden in 37 °C warmen Wasser aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein mit 10 ml Komplettmedium gefülltes 15 ml-Polypropylenröhrchen pipettiert. Nach der Zentrifugation (200 g, 8 min, RT) wurden die Zellen in Komplettmedium resuspendiert, gezählt und in Gewebekulturgefäße überführt. Die Zellen wurden mit der Neubauer-Zählkammer nach der Trypanblau-Ausschlussmethode mit Hilfe eines Lichtmikroskops gezählt. Hierbei wurden 20 µl der auszuzählenden Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt und 16 Felder der Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl wurde gemäß  $(\text{Mittelwert gezählter Zellen/Quadrant}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$  berechnet.

Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, in 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und bei 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank. Das komplette Zellkulturmedium wurde wachstumsabhängig alle 2 bis 4



Tage erneuert. Die adhärenen 293T-Zellen wurden nach Waschen mit PBS durch Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA pro 90 mm Gewebekulturschale nach 3-minütiger Einwirkzeit von den Kulturgefäßen gelöst und nach einmaligem Waschen mit Komplettmedium (200 µl, 8 min, 37 °C) in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 neu ausgesät.

### 2.2.1.2 Induktion der EL-4 Zellen

TPA	20 ng/ ml
Ionomycin	1 mM/ ml
4-Hydroxy-Tamoxifen	200 ng/ml

Die Zellen wurden zwischen 2-24 Stunden mit den angegebenen Induktoren inkubiert.

### 2.2.1.3 Herstellung rekombinanter Retroviren

Alle Schritte zur Herstellung rekombinanter Retroviren und Infektion von Zielzellen [Kuss et al., 1999] erfolgten unter sterilen Bedingungen.

#### Kotransfektion in 293T-Zellen

Am Vortag gesplittete (12-18 h) und zu 50-60 % konfluente 293T-Zellen wurden in 90 mm Gewebekulturschalen mit SuperFect™ oder PolyFect™ nach einem leicht modifiziertem Herstellerprotokoll transfiziert. Dazu wurden pro Schale in ein 15 ml-Polypropylenröhrchen folgende Volumina pipettiert:

9 µg pHIT 60 (retrovirales Verpackungsplasmid; kodiert für gag, pol)

9 µg pHIT 456 (retrovirales Verpackungsplasmid; kodiert für env)

15 µg retroviraler Expressionsvektor (z.B. pEGZ-c/EBPβ-ER™)

Dies wurde mit RPMI 1640 (ohne FKS!) auf 700 µl aufgefüllt und resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von 55 µl SuperFect™- oder PolyFect™-Reagenz mit anschließendem kurzen Vortexen, Zur Komplexbildung wurde alles 10 Minuten bei RT inkubiert, dann 4 ml komplettes DMEM hinzugefügt. Anschließend wurde das komplette DMEM vorsichtig aus den 293T-Gewebekulturschalen entfernt und die Zellen mit dem Transfektionsansatz überschichtet. Nach einer Inkubation von 6 bis 12 Stunden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit) wurde der Transfektionsansatz verworfen und 6 ml komplettes Zellkulturmedium zu den Zellen gegeben.

### Ernte und Lagerung der retroviralen Überstände

Jeweils 24 h, 48 h und 72 h nach der Transfektion mit den zwei retroviralen Verpackungs- und dem retroviralen Expressionsplasmid konnten die Retroviren enthaltenden Zellkulturüberstände abgenommen werden. Der Zellkulturüberstand wurde hierbei mit einer 10 ml Einmalspritze entfernt und in 15 ml-Polypropylenröhrchen sterilfiltriert (0,45 µM), um Kontaminationen mit 293T-Zellen zu vermeiden. In dieser Arbeit wurden die Zielzellen mit den frisch gewonnenen Überständen der 293T-Zellen direkt infiziert. Alternativ kann man die Überstände nach Zugabe von Polybren in einer Endkonzentration von 10 µg/ml und vorsichtigem Mischen in 2 ml-Reagiergefäßen aliquotieren und bei -70 °C für eine spätere Infektion lagern. Vor der weiteren Inkubation wurde 6 ml neues, komplettes DMEM auf die Zellen gegeben. Die Transfektionseffizienz konnte 48 h nach der Transfektion unter dem Fluoreszenzmikroskop durch die Expression des EGFP überprüft werden. Sie sollte mindestens 60 % der 293T-Zellen betragen.

#### **2.2.1.4 Infektion von Zielzellen**

Die Zielzellen (EL-4 Zellen) wurden mit den frisch gewonnenen Überständen infiziert. Dazu wurden  $1 \times 10^5$  EL-4 Zellen in einem Volumen von 1 ml Medium in die 15 ml-Polypropylenröhrchen mit den frischen sterilfiltrierten retroviralen Überständen gegeben. Danach erfolgte die Zugabe von Polybren ca. 1:1000 oder etwas mehr (z.B. auf 5 ml Volumen 7µl Polybren oder auf 10 ml 12 µl Polybren). Anschließend wurde gemischt und alles über 3-4 Stunden zentrifugiert (2200 rpm, 32°C). Danach wurde das Zellsediment in 2 ml komplettem Kulturmedium resuspendiert, in eine 12-well-Gewebekulturplatte gegeben und im Brutschrank inkubiert. Einen Tag später erfolgte eine erneute Infektion der Zielzellen, bei den mit zwei Plasmiden zu infizierenden Zellen nach jeweiligem Schema mit den entsprechenden retroviralen Überständen. Hierzu wurden zunächst die EL-4 Zellen abgezogen und in ein neues 15 ml-Polypropylenröhrchen gegeben. Nach Zentrifugation (1200 rpm, 3 Minuten) wurden die Überstände abgekippt und das Zellpellet aufgeschüttelt. Auf diese Zellen wurden erneut die Retroviren enthaltenden Überstände der 293T-Zellen sterilfiltriert. Die weiteren Schritte erfolgten wie am Vortag. Eine nach 36 h folgende FACS-Analyse der EGFP-Expression (FL1-Height) gab Aufschluss über die Anzahl infizierter Zielzellen.

### **2.2.1.5 Selektion transduzierter Zelllinien**

Die Expression des Zeocin- und des Neomycin-Resistenzgens durch die retroviralen Expressionsplasmide vermittelt den doppelt infizierten Zellen Resistenz gegenüber Zeocin und Neomycin, während nicht-infizierte oder nur mit einem der beiden Plasmide infizierte Zellen durch diese Antibiotika abgetötet werden. Es verbleibt eine transduzierte Zelllinie, die beide rekombinante Proteine exprimiert. Zwei Tage nach der Infektion wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in 2 ml komplettem Zellkulturmedium suspendiert, dem Zeocin (250  $\mu\text{g/ml}$ ) und G418 (1 mg/ml bei Neomycinresistenz) zugesetzt war. Jeden zweiten Tag wurde ca. 75 % des G418 und Zeocin-enthaltenden Mediums erneuert. Aliquote der Zellen wurden eingefroren (Lagerung in flüssigem Stickstoff), die Zellen ohne Antibiotika weiter kultiviert. Bei den Caspase-9F Zellen erfolgte alleinige Selektion mit Zeocin. Die Sortierung der doppelt infizierten Zellen erfolgte in diesem Fall mittels Durchflußzytometrie, basierend auf der Fluoreszenz des transduzierten Markerproteins. Die beide Fluoreszenzproteine (gelb und grün) exprimierenden Zellen wurden aussortiert und in Selektionsmedium weiterkultiviert.

### **2.2.1.6 BSA-Gradientenzentrifugation**

Nach Selektion der gesorteten Zellen mit Zeocin war eine BSA-Gradientenzentrifugation notwendig, um totes Zellmaterial aus den Ansätzen zu entfernen. Hierfür wurde BSA 1:5 mit Medium (ohne FCS) gemischt. Die Zellen wurden in 15 ml-Polypropylenröhrchen aufgenommen, die Kulturplatten mit je 1 ml Medium nachgespült, das ebenfalls mit in das Röhrchen gegeben wurde. Nach Zentrifugation (1200 rpm, 5 Minuten) und Entfernen der Überstände wurden die Zellpellets in 1 ml BSA 1:5 (Dichte  $\delta$  1,08) aufgenommen und in 2 ml-Eppendorfcaps überführt. Nach vorsichtiger Übersichtung mit 1 ml Medium wurden die Ansätze 30 Minuten bei maximaler Drehzahl und Raumtemperatur zentrifugiert. Bei sichtbarer weißer Interphase (lebende Zellen) wurde diese vorsichtig aufgenommen. War diese nicht sichtbar, wurde von der Interphase ausgehend Medium und BSA über dem Pellet (totes Zellmaterial) abgezogen und in 10 ml Medium gewaschen (Zentrifuge 1200 rpm, 5 Minuten). Nach Absaugen der Überstände wurden die Pellets in 1 ml Medium gelöst und in eine 48-well-Kulturplatte gegeben. Unter dem Lichtmikroskop konnten die enthaltenen Zellen überprüft werden.

### **2.2.1.7 Annexin V-PE- und 7-AAD-Färbung**

Annexin V ist ein vaskulärer Gerinnungshemmer und bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an Phospholipide mit höchster Affinität für Phosphatidylserin [Andree et al. 1990]. Während des apoptotischen Zelltodes wird dieses aktiv von der Innen- zur Außenseite der Zellmembran transloziert und kann so durch das mit einer PE-Fluoreszenz gekoppelte Annexin V nachgewiesen werden. [Fadok et al. 1992, Koopman et al. 1994] 7-Aminoactinomycin ist eine fluoreszierende DNA-Färbung. Es bindet an GC-Regionen der DNA und kann jedoch nur über permeable Membranen dorthin gelangen. [Lecoeur et al. 2002] Die simultane Färbung der Zellen mit 7-AAD dient somit dem Nachweis einer Störung der Membranpermeabilität und markiert daher spätapoptotische und nekrotische Zellen.

Die Zellen (ca.  $2\text{-}5 \times 10^5$ ) wurden je einmal mit PBS und Annexin V-Bindepuffer gewaschen (200 g, 8 min, 4 °C). Die Pellets wurden in 100 µl Annexin V-Bindepuffer aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Danach wurden die Proben mit 3 µl Annexin V-PE und 3 µl 7-AAD inkubiert (20 min, RT, im Dunkeln). Nach Zugabe von 200 µl Bindepuffer wurde im FACScan gemessen. Von 5.000 Zellen wurden logarithmisch die Grün- und Orange-fluoreszenz (FL1-Height, FL2-Height, kompensiert) aufgenommen und im Dot Plot der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt.

### **2.2.1.8 Auswertung am FACScan**

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) können lebende Zellen nach Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften, aber auch nach ihrer intrazellulären Zusammensetzung differenziert werden. Viele dieser Anwendungen setzen hierbei eine Markierung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern voraus. Die Messung in einem Durchflusszytometer beruht auf dem optischen Verhalten einer so markierten Zelle. Wenn die Zellen das Gerät passieren, werden sie mit einem Laserstrahl angeregt. Daraufhin lassen sich anhand von Fluoreszenzemission und Streuung bestimmte zelluläre Parameter bestimmen.

Die Proben wurden in einem FACScan<sup>TM</sup> (Becton Dickinson) gemessen und mit Hilfe der Software Cellquest<sup>TM</sup> ausgewertet. Das verwendete Gerät kann bis zu drei verschiedene Farbstoffe gleichzeitig detektieren. Zum Beispiel können die Farbstoffe Fluorescein-Isothiocyanat, Phycoerythrin und Red 670 zusammen bestimmt werden. Zusätzlich zu den drei Fluoreszenzen gibt das Laserlicht, welches direkt an die Zellen gestreut wird, Aufschluss über

deren Größe („forward scatter“) und Granularität („side scatter“). Diese Parameter können Anhaltspunkte zum Überlebenszustand der Zellen geben.

### **2.2.1.9 FACS-basierte Sortierung von Zellen**

Die Funktionsweise eines FACS-Zellsorters entspricht im Wesentlichen der eines normalen Durchflusszytometers. Hierbei werden die Zellen jedoch in kleine Flüssigkeitströpfchen vereinzelt, die, elektrisch aufgeladen, in einem Magnetfeld voneinander separiert werden können. Die Software-gesteuerte Sortierung von definierten Zellfraktionen wird durch sog. gates gesteuert, welche die Zellpopulationen in den korrespondierenden Punktwolkendiagrammen vollautomatisch voneinander in verschiedene Auffangbehälter trennt. Da diese Methode einige Spezialkenntnisse und Erfahrung voraussetzt, sollte eine FACS-basierte Sortierung von Zellen nur mit fachmännischer Unterstützung durchgeführt werden. Die Zellsortierungen in dieser Arbeit wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Christian Linden am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

## **2.2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.2.1 Bakterienkulturen**

#### Übernachtskulturen

Bei den Übernachtskulturen wurden Bakterien in Flüssigmedien vermehrt. Sie dienten als Vorkultur zur Plasmid-Maxipräparation. In einem Reagenzglas wurden 3 ml Flüssigmedium (LB oder SOB) mit einem geeigneten Antibiotikum (Selektion transformierter Klone) versehen und entweder mit einer Einzelkolonie oder mit 5-10 µl einer Erhaltungskultur (s.u.) angeimpft. Danach wurde die Kultur 8-16 Stunden bei 37 °C und 220 U/min in einem Schüttler inkubiert.

#### Erhaltungskulturen

Die Erhaltungskultur diente zur dauerhaften Aufbewahrung von Bakterienstämmen bzw. -klonen. Dafür wurden in einem 2 ml Kryotube 800 µl einer dichtgewachsenen Übernachtskultur (s.o.) mit 200 µl steriler 75 %-iger Glycerinlösung gut vermischt, eingefroren und bei -70 °C gelagert.

### **2.2.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien**

Auf einer SOB-Agarplatte (ohne Antibiotika) wurden Bakterien (E.coli XL10-Gold™ oder DH5α) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit einer Impföse wurde ein Teil der gewachsenen Bakterien in 500 ml SOB-Medium überführt. Diese Flüssigkultur wurde bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,5 bis 0,55 bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde sie 30 Minuten auf Eis abgekühlt. Die Bakterien wurden sedimentiert (250 g, 10 min, 4 °C), vorsichtig in 40 ml RF1-Puffer resuspendiert, 15 Minuten auf Eis inkubiert und erneut sedimentiert (250 g, 10 min, 4 °C). Die Zellen wurden danach vorsichtig in 7 ml RF2-Puffer resuspendiert und für weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 220 µl Aliquote in 1,5 ml Reagiergefäßen in einem Trockeneis/Ethanol-Bad eingefroren. Die Aufbewahrung der nun kompetenten Zellen erfolgte bei -70 °C.

### **2.2.2.3 Transformation kompetenter Bakterien**

Zur DNA-Klonierung und Vermehrung von Plasmid-DNA wurden kompetente Bakterien mit Vektoren transformiert. Dazu wurden 100 µl kompetente Bakterien in einem 1,5 ml Reagiergefäß auf Eis mit der einzubringenden DNA (vorhandenes Plasmid) vermischt und 30-45 min inkubiert. Durch Hitzeschock (90 s bei 42 °C im Wasserbad) und nachfolgender Inkubation auf Eis (2 min) wurde die DNA in die kompetenten Zellen aufgenommen. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit 900 µl LB-Medium auf einem Schüttler 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Bakterienkultur wurde dann entweder auf Agarplatten ausplattiert oder als Flüssigkultur angesetzt. In beiden Fällen wurde ein geeignetes Antibiotikum (z.B. Ampicillin) zur Selektion der mit dem Plasmid transformierten Bakterien verwendet.

### **2.2.2.4 Plasmidisolierung in präparativen Mengen**

Bei der Maxipräparation von bekannter Plasmid-DNA (100 µg bis 1 mg) wurde die Methode der alkalischen Lyse angewandt. Hierzu wurden 500 µl Übernacht- oder Erhaltungskultur in 100-500 ml antibiotikahaltigem Medium (LB) 12-16 Stunden bei 37 °C und 220 U/ min in einem Schüttler inkubiert. Es wurde das Protokoll und Reaktionssystem Nucleobond™ der Firma Quiagen verwendet. Nach Sedimentation (250 g, 10 min, 4 °C) wurden die Bakterien in 11 ml einer RNase-enthaltenden Lösung (S1) resuspendiert. Durch Zugabe von 11 ml einer stark alkalischen Lösung (S2), vorsichtigem Mischen und 5-minütiger Inkubation bei RT

wurden die Bakterien lysiert, wobei die DNA-Moleküle denaturiert wurden. Anschließend erfolgte durch die Zugabe von 11 ml saurer Lösung (S3) die Neutralisation mit Renaturierung der DNA. Dabei fiel die bakterielle DNA aus und wurde von der in Lösung befindlichen Plasmid-DNA durch Zentrifugation (1200 g, 45 min, 4 °C) abgetrennt. Der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde auf eine äquilibrierte Säule gegeben (DEAE-Kügelchen). An diese bindet die Plasmid-DNA unter Hochsalz-Bedingungen. Verunreinigungen wurden mit 2 x 16 ml Waschpuffer entfernt. Die DNA wurde schließlich unter Niedrigsalz-Bedingungen (16 ml M2) aus der Säule eluiert. Die Plasmid-DNA wurde durch die Zugabe von 11 ml Isopropanol ausgefällt (1200 g, 45 min, 18 °C), das Pellet mit 20 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen (1200 g, 20 min, 18 °C) und anschließend für 10 min bei 37 °C getrocknet. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde in 200 µl bis 1 ml EB-Puffer (oder TE-Puffer) gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

#### **2.2.2.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

In dieser Arbeit wurde die Spaltung von DNA durch sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen bei der Charakterisierung von der mit Hilfe der Maxi-Präparation isolierten Plasmid-DNA angewandt. Die Reaktionsbedingungen, wie Temperatur und Art des Restriktionspuffers (Salzkonzentration) sowie Zeitdauer der Reaktion, variierten dabei für das jeweilige Restriktionsenzym und bezüglich dessen, ob das Plasmid teilweise oder vollständig mit diesem Enzym geschnitten werden sollte. Die Reaktionsbedingungen wurden den Empfehlungen des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Reaktionspuffer angepasst, wobei ein typischer Reaktionsansatz mit kleinem Volumen (15 µl) folgendermaßen aussah:

1,5 µl 10-fach Reaktionspuffer

1-7 µl in EB gelöste Plasmid-DNA (300 ng bis 1,5 µg)

1 µl Restriktionsenzym (5-10 U/ µl)

mit ddH<sub>2</sub>O auf 15 µl auffüllen.

Dieser Ansatz wurde 1 bis 2 Stunden bei 37 °C bzw. der vom Hersteller empfohlenen Reaktionstemperatur inkubiert. Nach der Spaltung wurde dem Ansatz 6-fach „Gel loading“-Probenpuffer zugegeben und die DNA-Fragmente auf einem Agarosegel getrennt.

### 2.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können je nach ihrer Größe in 0,7-2,5%-igen Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt werden. So ist es möglich, konstruierte Vektoren und amplifizierte Plasmid-DNA nach der Spaltung mit spezifischen Restriktionsendonukleasen sowie PCR-Produkte zu überprüfen. Dazu wurde die Agarose in Laufpuffer (1 x TAE mit 1 µg/ml Ethidiumbromid) durch kurzes Aufkochen gelöst, wobei 0,75%-ige Gele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 0,5 bis 12 kB und 2%-ige Agarose-Gele zur Auftrennung von kleineren Fragmenten (50 bp bis 2 kB) verwendet wurden. Nach dem Erhitzen in einer entsprechenden Form bzw. auf einer Glasplatte wurde der Probenkamm entfernt und das Gel in einer Elektrophorese-Kammer mit Laufpuffer überschichtet. Die DNA wurde mit 1/6 Vol. „Gel loading“ - Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 50-100 V (20-80 mA) parallel zu DNA-Markern bekannter Größe. Unter UV-Bestrahlung kann die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA anschließend dargestellt und fotografiert werden.

### 2.2.2.7 RNA-Isolation

Dieses Protokoll beruht auf der Guanidinium-Thiozyanat / sauren Phenol-Methode [Chomczynski, Sacchi 1987]. Zur Isolation von RNA aus den Gewebekulturzellen ( $5 \times 10^6$ ) wurden diese mit eiskaltem PBS  $-Ca^{2+}/-Mg^{2+}$  gewaschen (250 g, 5 min, 4 °C), dann in 1 ml Trizol-Reagenz durch mehrfaches Pipettieren lysiert und in 1,5 ml Reagiergefäße überführt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurden 200 µl Chloroform zugegeben, kurz gevortext und der Ansatz für weitere 5 bis 10 Minuten inkubiert. Nach der Zentrifugation (16.000 g, 5 min, 4°C) wurde alleine die wässrige Oberphase vorsichtig in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Die RNA wurde durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und 10-minütiger Inkubation bei RT ausgefällt. Nach Abzentrifugation (16.000 g, 10 min, 4°C) und Waschen des Pellets in 1ml 80% Ethanol (16.000 g, 10 min, RT) wurde der Alkohol vorsichtig abgesaugt und das Pellet ca. 10 Minuten luftgetrocknet oder eine Minute im Heizblock bei 60°C. Daraufhin wurde die gewonnene RNA in 22 µl DEPC-behandeltem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) (Vortex) für 5 Minuten bei 60 °C gelöst. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei 260 nm. Die Reinheit wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft und die RNA bei -70 °C gelagert.



### 2.2.2.8 Ribonuklease-Protektionsanalyse

Diese Methode ermöglicht die quantitative Analyse spezifischer RNA-Transkripte. Dabei ist doppelsträngige RNA, die aus der Hybridisierung der isolierten Gesamt-RNA mit spezifischer radioaktiv markierter, komplementärer mRNA hervorgeht, vor einem Abbau durch Einzelstrang-spezifische RNasen geschützt. Nach Auftrennung der Ansätze auf einem 5%-igen denaturierendem PAA-Gel kann die geschützte, protektierte RNA mit Hilfe des Phosphoimagers oder mittels Schwärzegradbestimmung des belichteten Röntgenfilms quantifiziert werden. Für die RNase-Protektions-Analyse wurden das Reaktionssystem RiboQuant™ sowie das Protokoll der Firma BD PharMingen verwendet. Dabei befanden sich in sogenannten „Multi-probe template sets“ mehrere unterschiedlich lange und spezifische cDNA-Fragmente, die als Matrizen für eine in vitro Transkription von komplementären mRNA's mit radioaktivem [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP dienten. Verwendet wurden die Sets mCK-1 für murine Zytokine, mMyc für Mitglieder der Myc/Mad/Max-Familie, mAPO1 für murine Caspasen sowie mAPO2 für Mitglieder der Bcl-2-Familie. Im ersten Schritt erfolgte eine Synthese der radioaktiven Proben. In ein 1,5 ml Reagiergefäß wurde zunächst 1  $\mu$ l des Template sets gegeben, dann 1  $\mu$ l RNasin, 1  $\mu$ l GACU-Pool, 2  $\mu$ l DTT, 4  $\mu$ l 5x Transkriptionspuffer an den Rand pipettiert und mit 10  $\mu$ l [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP in das Gefäß hinuntergenommen. Nach Zugabe von 1  $\mu$ l T7 RNA-Polymerase wurde die Mischung kurz anzentrifugiert und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Durch Hinzufügen von 2  $\mu$ l DNase und weitere Inkubation über 30 Minuten wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurde der Mischung mit den synthetisierten komplementären radioaktiven Proben 26  $\mu$ l 20 mM EDTA, 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O dest., 50  $\mu$ l Tris-gesättigtes Phenol, 50  $\mu$ l Chloroform:Isoamylalkohol (50:1) sowie 2  $\mu$ l Yeast tRNA zugegeben und alles nach Vortexen 5 Minuten bei RT zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde vorsichtig in ein neues Reagiergefäß überführt. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l Chloroform-Isoamylalkohol (50:1) wurde erneut 2 Minuten bei RT zentrifugiert. Die Oberphase wurde danach in ein Reagiergefäß mit 500  $\mu$ l Ethanol überführt und mit 100  $\mu$ l 4M Ammoniumacetat versetzt, das im Gegensatz zu Natriumacetat keine Nucleotide ausfällt. Das Gefäß inkubierte 2 Minuten auf Trockeneis und wurde 30 Minuten bei RT zentrifugiert. Nach vorsichtiger und vollständiger Abnahme des Überstandes trocknete das Pellet 5 bis 10 Minuten an der Luft. Anschließend wurden 100  $\mu$ l Hybridisationspuffer zugegeben, leicht gevortext und anzentrifugiert. Die Radioaktivität von 1  $\mu$ l der gereinigten Probe wurde anschließend gemessen. Sie sollte zwischen  $3 \times 10^5$  und  $3 \times 10^6$  Cherenkov counts/ $\mu$ l liegen. Die Proben wurden bei -20°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Für die Hybridisierungsreaktion wurden 5-10 µg der zu untersuchenden Gesamt-RNA mit der entsprechend verdünnten radioaktiven Probe nach Denaturierung (5 min, 95 °C) über Nacht bei 56 °C in jeweils 8 µl Hybridisationspuffer inkubiert. Die nicht hybridisierte RNA wurde anschließend durch RNase-Behandlung, d.h. RNase A + T1 mix in RNase-Puffer (45 min, 30 °C) verdaut. Mit Proteinase K (in Proteinase K-Puffer mit Yeast tRNA) (20 min, 37 °C) wurde daraufhin die RNase abgebaut. Die verbleibende RNA wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und mit Ammoniumazetat gefällt. Nach der Denaturierung im Probenpuffer (5 min, 95 °C) erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in einem 5 %-igen harnstoffhaltigen PAA-Gel bei ca. 30 W. Dieses Gel wurde zwischen zwei 30 cm langen Glasplatten in einem Abstand von 0,5 mm gegossen. Nach der Auftrennung wurde das Gel unter Vakuum getrocknet, auf einem Röntgenfilm exponiert (Belichtung bei -70°C über Nacht) und die Transkription der RNA mit Hilfe des Phosphoimagers oder einer Bestimmung des Schwärzegrades quantifiziert.

### **2.2.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **2.2.3.1 Präparation von Gesamtzellproteinextrakten**

Zur Isolation von Gesamtproteinextrakten aus Gewebekulturzellen wurden die Zellen mit eiskaltem PBS  $-Ca^{2+}$   $-Mg^{2+}$  gewaschen (250 g, 5 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 1 ml PBS  $-Ca^{2+}$   $-Mg^{2+}$  in 1,5 ml Reagiergefäße überführt und erneut zentrifugiert (1.600 g, 1 min, RT). Das Sediment wurde in einem geeigneten Volumen (100 µl pro  $1 \times 10^7$  Zellen) eiskalten KLBM-Puffers mit Protease- sowie eventuell Phosphatase-Inhibitoren (KLBM+) resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch 30-minütige Inkubation auf Eis in diesem Puffer. Anschließend wurden die Lysate durch eine 30-minütige Zentrifugation (16.000 g, 4 °C) geklärt, der Überstand in ein neues Reagiergefäß überführt und bei -70 °C gelagert.

#### **2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Immunoblot- oder **Western Blot-Analyse** dient dem Nachweis und der Quantifizierung von Proteinen. Sie umfasst den Westernblot, der die Auftrennung der Proteine in einer SDS-Gelelektrophorese und den Transfer auf eine Nitrocellulosemembran bezeichnet und den eigentlichen Nachweis der Proteine durch die Immundetektion.

Mittels denaturierender Polyacrylamidgele können Proteine oder Polypeptide entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Zunächst wurden hierfür die Gelkammern vorbereitet, montiert und auf Dichtigkeit geprüft. Zuerst wurde das Trenngel gegossen und gleich mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet, um eine homogene Polymerisation sowie eine gerade Trennfläche zu erreichen. Nach vollständiger Polymerisierung (ca. 1 Stunde) wurde das Butanol verworfen und das Sammelgel darüber gegossen. In dieses wurde sofort ein für die zu ladenden Proben geeigneter Kamm eingeführt. Nach ca. 15 Minuten war die Polymerisation abgeschlossen. Die jeweiligen Proben wurden mit 4 x Lämmli-Puffer gemischt, denaturiert (100 °C für 5 min) und in die vorher mit Laufpuffer ausgewaschenen Taschen des Gels pipettiert, wobei ein nicht denaturierter Größenstandard bekannter Proteine mit geladen wurde. Der Gellauf erfolgte bei 25 mA/ Gel in einer mit Laufpuffer gefüllten SDS-Gelapparatur für ca. 2-4 Stunden.

#### **2.2.3.3 Transfer auf eine Nitrocellulosemembran (NC)**

Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Trenngel vorsichtig entnommen und mit Transferpuffer gewaschen. Für den elektrophoretischen Transfer der Proteine auf eine NC-Membran wurden in einer Transferkassette von Katode zu Anode folgende in Transferpuffer getränkte Komponenten übereinander geschichtet: 3 Lagen Whatman-Papier, das Gel, die NC-Membran und wieder 3 Lagen Whatman-Papier. Dabei müssen Luftblasen vermieden bzw. entfernt werden. Der Transfer erfolgte bei 450 mA und 4 °C über 16 Stunden in einer Transferkammer. Durch eine Inkubation der Membran in Ponceaurot-Lösung (5 min) und teilweiser Entfärbung mit ddH<sub>2</sub>O kann der Transfer und die gleichmäßige Beladung des SDS-PAA-Gels überprüft werden, bevor die Membran mit TBS/Tween vollständig entfärbt wird.

#### **2.2.3.4 Immundetektion**

Der Proteinnachweis auf der Nitrocellulosemembran geschieht mit Hilfe spezifischer Antikörper, die eine hohe Affinität für das gewünschte Protein besitzen. Der primäre Antikörper wird in einem weiteren Schritt von einem sekundären Antikörper gebunden, der mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt ist. Bei Substratumsetzung durch die Peroxidase wird Licht emittiert, das mittels Exposition eines Röntgenfilms detektiert und dokumentiert werden kann. Die Inkubationen erfolgten alle auf einem Schüttelinkubator. Nach dem Transferieren der Proteine auf die Membran wurde diese mit 5 % Magermilchlösung in 1 x TBST 1 Stunde bei

Raumtemperatur (RT) geblockt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Die Membran wurde anschließend mit dem ersten (primären) Antikörper, der verdünnt in 5% Magermilch 1:1000 – 1:3000 in insgesamt 6ml Volumen vorlag, 1 Stunde bei RT oder 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen mit TBST (2 x 5 min und 3 x 10 min) wurde die Membran mit dem zweiten (sekundären) Antikörper, der an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt und 1:2000 in TBST verdünnt war, über 1 Stunde bei RT inkubiert. Daraufhin wurde die Membran wie zuvor beschrieben mit TBST gewaschen. Die Detektion des HRP-gekoppelten Antikörpers erfolgte mit Hilfe des ECL-Detektionskits nach Angaben des Herstellers. So wurde die Membran für eine Minute in der vorbereiteten Substratlösung (1 ml Lösung A und 1 ml Lösung B, ECL-Detektionskit) geschwenkt, dann nach Abtropfen der Lösung in einer transparenten Kunststoffhülle oder in Haushaltsfolie blasenfrei verpackt, in einer Röntgenkassette fixiert und mit Röntgenfilm belegt. Die Expositionsdauer richtete sich nach der jeweiligen Signalstärke. Nach erfolgter Belichtung wurde der Film in der Dunkelkammer entnommen, in eine Rahmenhalterung gespannt, dann für 2 Minuten in Entwicklerlösung getaucht, anschließend kurz gewässert, für 5-10 Minuten in Fixierlösung belassen und nach erneutem kurzen Wässern zum Trocknen aufgehängt. Die Nitrocellulosemembran kann anschließend in Folie gewickelt bei 4°C aufbewahrt werden.

#### **2.2.3.5 Entfernung gebundener Antikörper von NC-Membranen**

Um eine NC-Membran für eine weitere Immundetektion erneut verwenden zu können, wurden die gebundenen Antikörper von der Membran entfernt. Dazu wurde die Membran mit „Stripping“-Puffer im Schüttel-Wasserbad (30 Minuten, 60 °C) inkubiert. Anschließend wurde die Membran einmal mit ddH<sub>2</sub>O und dreimal mit TBST für je 5 Minuten gewaschen. Danach konnte das obige Protokoll für die Immundetektion erneut angewendet werden.

### 3 Ergebnisse

Ausgangspunkt der Untersuchungen dieser Arbeit ist das Ergebnis einer Zellzyklusanalyse mittels Propidiumjodidfärbung von mit *Cebpb* retroviral transduzierten EL-4 Zellen [Berberich-Siebelt et al. 2006]. Hierbei zeigte sich bei den C/EBP $\beta$  überexprimierenden im Vergleich zu mit Kontrollvektor infizierten EL-4 Zellen im DNA-Histogramm ein sogenannter „SubG1-Peak“, ein *Peak* mit vermindertem DNA-Gehalt, welcher typischerweise von einer apoptotischen Zellpopulation gebildet wird.

Angesichts der vielfältigen Funktionen von C/EBP $\beta$  bei der Regulation von Proliferations- und Differenzierungsvorgängen sowie seiner Auswirkungen auf die Interleukinexpression in EL-4 Zellen [Berberich-Siebelt et al. 2000] stellte sich die Frage, ob ein solcher vermutlich apoptosefördernder Effekt spezifisch ist, und welche Apoptosewege dabei favorisiert werden.

#### 3.1 C/EBP $\beta$ steigert die Apoptoserate in EL-4 Zellen.

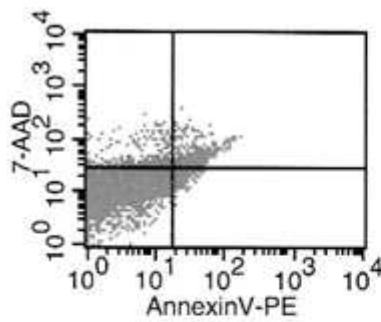
Um die Auswirkung einer Überexpression und Aktivierung von C/EBP $\beta$  auf die Apoptoserate von EL-4 Zellen zu quantifizieren, wurde eine Annexin V-PE-Färbung durchgeführt.

Hierfür wurden mit dem Kontrollvektor EGZ-HA sowie mit C/EBP $\beta$ -ER transduzierte Zellen verwendet. Nach Färbung der Zellen mit Annexin V-PE sowie mit 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) als Marker für spätapoptotische oder nekrotische Zellen wurden sie mittels FACScan durchflusszytometrisch analysiert. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches während der Apoptose von der Innenseite der Zellmembran nach außen lokalisiert wird. [Fadok et al. 1992, Koopman et al. 1994] 7-AAD interkaliert Cytosine und Guanine der DNA, wodurch deren Fluoreszenzmuster verändert wird. Da es nur durch durchlässige Zellmembranen in die Zellen eindringen kann, dient es als Avitalfarbstoff nekrotischer oder spätapoptotischer Zellen. [Lecoeur et al. 2002]

Nach Stimulation der Zellen mit 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OH-Tm), das die nukleäre Translokation und Aktivierung von C/EBP $\beta$  ermöglicht, zeigte sich bei den C/EBP $\beta$ -ER-Zellen eine Steigerung der Apoptoserate. So waren nach zehnstündiger Stimulation mit 4-OH-Tm nur

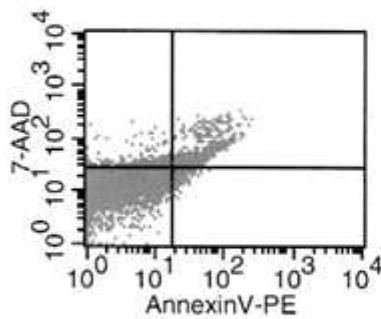
4.95 % der betrachteten Zellen Annexin V-PE-positiv und 10,03 % doppelt-positiv. Nach 24 Stunden stiegen diese Werte auf 15.6 % und 29,98 %.

Auf die Kontrollzelllinie konnten hingegen keine Auswirkungen der Stimulation beobachtet werden. Der Anteil Annexin V-PE-positiver Zellen bewegte sich hier zwischen 3,77 % und 4,61 %, der auch 7-AAD – positiver Zellen zwischen 5,94 und 10,95 %.



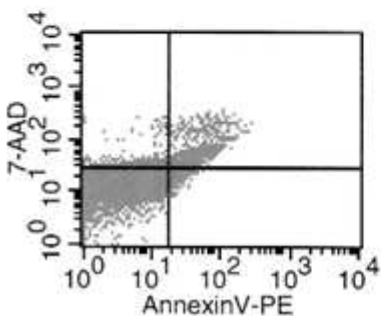
**EGZ-HA -**

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	514	3.95	3.45
UR	772	5.94	5.19
LL	11211	86.20	75.32
LR	509	3.91	3.42



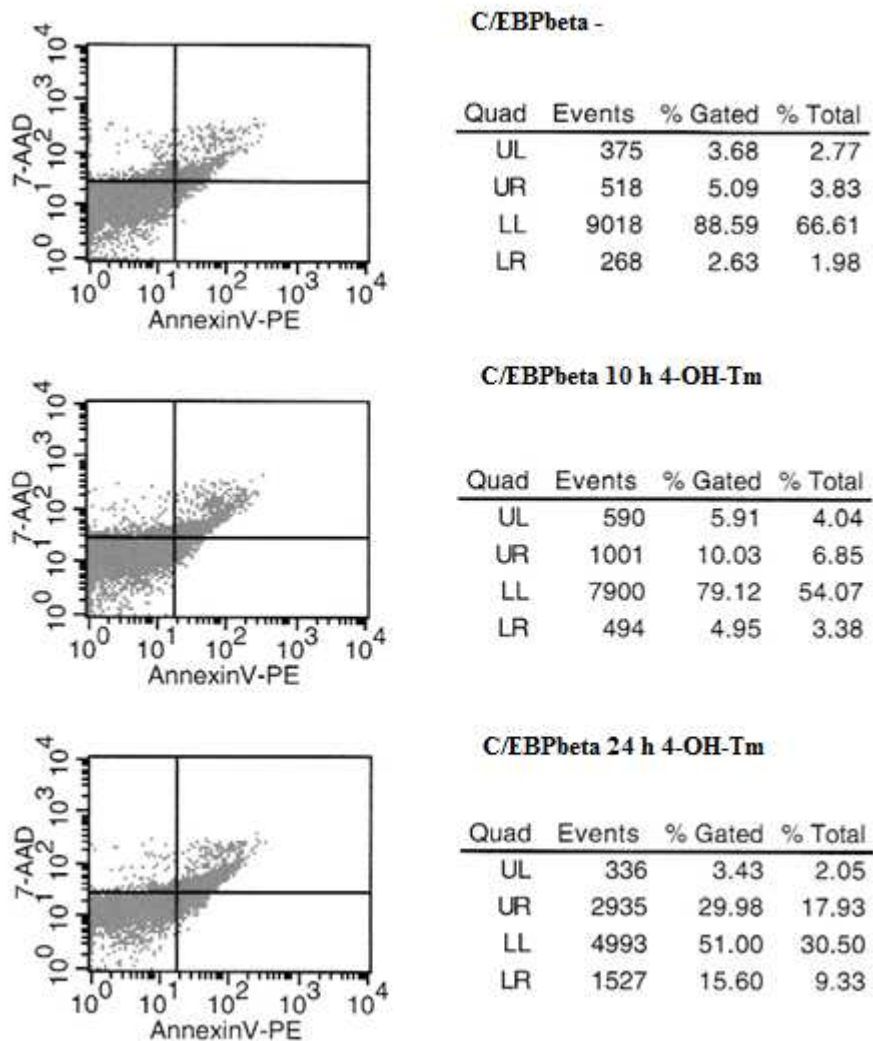
**EGZ-HA 10 h 4-OH-Tm**

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	486	4.49	3.42
UR	808	7.46	5.68
LL	9128	84.28	64.18
LR	408	3.77	2.87



**EGZ-HA 24 h 4-OH-Tm**

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	524	4.71	3.69
UR	1218	10.95	8.57
LL	8864	79.72	62.34
LR	513	4.61	3.61



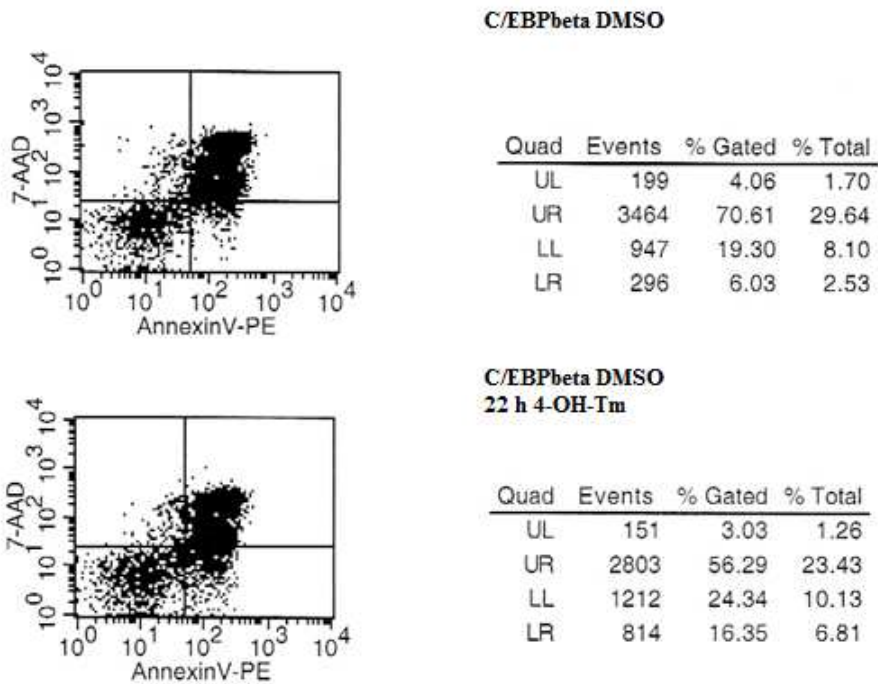
**Abbildung 3.1: Überexpression und Aktivierung von C/EBP $\beta$  erhöht die Apoptoserate in EL-4 Zellen.** Annexin V-PE- und 7-AAD-Färbung von EL-4 T-Zellen mit retroviraler Expression von EGZ-HA-Kontrollvektor sowie C/EBP $\beta$ -ER, unstimuliert (-) und stimuliert mit 4-OH-Tm 200 ng/ml für 10 und 24 Stunden.

### 3.2 Z-VAD fmk verringert Apoptose in C/EBP $\beta$ -ER-Zellen.

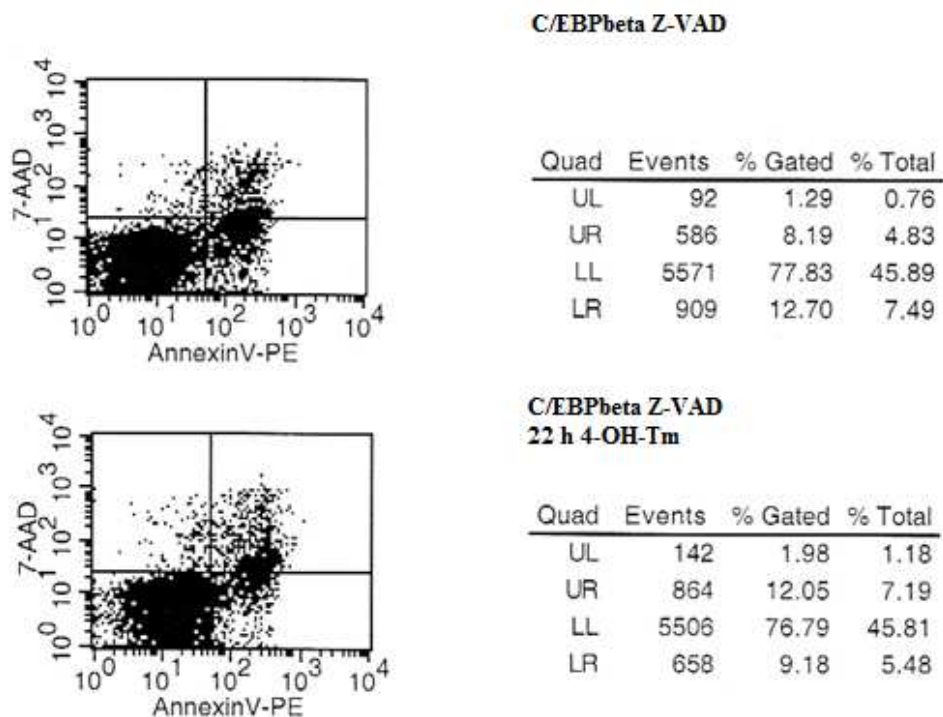
Um die Art des Zelltodes angesichts des relativ hohen Anteils 7-AAD-positiver, d.h. spätapoptotischer, oder auch nekrotischer Zellen bei der Bestimmung der Apoptoserate unter Überexpression von C/EBP $\beta$  näher bestimmen zu können, erfolgte eine Behandlung der den Expressionsvektor C/EBP $\beta$ -ER tragenden Zellen mit dem Pancaspaseinhibitor Z-VAD fmk.

Zwei der Ansätze inkubierten 24 Stunden lang in 100  $\mu$ M Z-VAD fmk (aus einer 4 mM Stocklösung in DMSO), die anderen beiden als Kontrollen mit dem gleichen Volumenanteil

DMSO ohne Z-VAD fmk. Aus beiden Gruppen wurde jeweils ein Ansatz für 22 Stunden mit 4-OH-Tm stimuliert. Die Untersuchung des Apoptoseverhaltens erfolgte mittels Annexin V-PE- und 7-AAD-Färbung mit nachfolgender durchflusszytometrischer FACScan-Analyse. Schon die unstimulierten Kontrollzellen C/EBP $\beta$ -ER mit DMSO zeigten einen Anteil Annexin V-PE- und gleichzeitig 7-AAD-positiver Zellen von 70,61 % und doppelt-negativer Zellen von 19,3 %. Nur 6,03 % der Zellen waren alleine Annexin V-PE-positiv, d.h. apoptotisch. Ähnliche Verhältnisse fanden sich in der mit Tamoxifen stimulierten Kontrolle. Hier jedoch betrug der lediglich Annexin V-PE-positiv Anteil 16,35 %, wobei 56,29 % doppelt-positiv und 24,34 % für beide Färbungen negativ gewertet wurden. Insgesamt induzierte demnach schon die Zugabe von DMSO Apoptose, die aber durch Z-VAD hemmbar war. Eine Reduktion der Apoptoserate ließ sich sowohl bei den unstimulierten, als auch bei den mit 4-OH-Tm behandelten Zellen, in denen C/EBP $\beta$  aktiviert war, beobachten. Die Verteilung der einfach- und doppelt-positiven Zellen war in beiden Ansätzen ähnlich, wobei der Anteil spätapoptotischer bzw. nekrotischer Zellen unter Aktivierung von C/EBP $\beta$  etwas höher war (12,05 % vs. 8,19 %). Trotz des starken DMSO-Effekts konnte im Vergleich zu dem Versuch der vorherigen Abbildung eine Hemmbarkeit der C/EBP $\beta$  vermittelten Apoptoseinduktion durch Z-VAD ausgemacht werden, was auf eine Beteiligung von Caspasen hinweist.







**Abbildung 3.2: Der Caspaseinhibitor Z-VAD fmk verringert die Apoptoserate in C/EBP $\beta$ -überexprimierenden EL-4 T-Zellen.** Annexin V-PE- und 7-AAD-Färbung von EL-4 Zellen mit retroviralem C/EBP $\beta$ -ER-Vektor. Kontrollen DMSO 1:40 24 Stunden lang, unstimuliert und stimuliert mit 4-OH-Tm 200 ng/ml über 22 Stunden. Z-VAD fmk 100  $\mu$ M 24 Stunden lang, ebenfalls unstimuliert und stimuliert mit 4-OH-Tm über 22 Stunden.

### 3.3 C/EBP $\beta$ verstärkt die Spaltproduktbildung aus PARP.

Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), ein im Zellkern lokalisiertes Enzym, das an der Regulation von DNA-Reparaturvorgängen und Transkription beteiligt ist, stellt in der Endphase der Apoptose neben anderen Proteinen ein Substrat der Effektorcaspase-3 dar [Chaitanya et al. 2010]. Das intakte Enzym von 116 kD wird in 24 kD und 89 kD große Fragmente gespalten, die der N-terminalen DNA-Bindedomäne und der C-terminalen katalytischen Einheit entsprechen [Chaitanya et al. 2010]. Ein qualitativer oder quantitativer Nachweis der Spaltprodukte eignet sich somit als ein Maß für abgelaufene Apoptosevorgänge bzw. als Korrelat der aktivierten Effektorcaspasen.

Um den bei den Annexin V-PE-Färbungen beobachteten proapoptotischen Effekt einer Überexpression und Aktivierung von C/EBP $\beta$  weiter zu spezifizieren, wurde versucht, in Proteinextrakten von verschiedenen EL-4 Zelllinien mittels Western Blot-Analyse

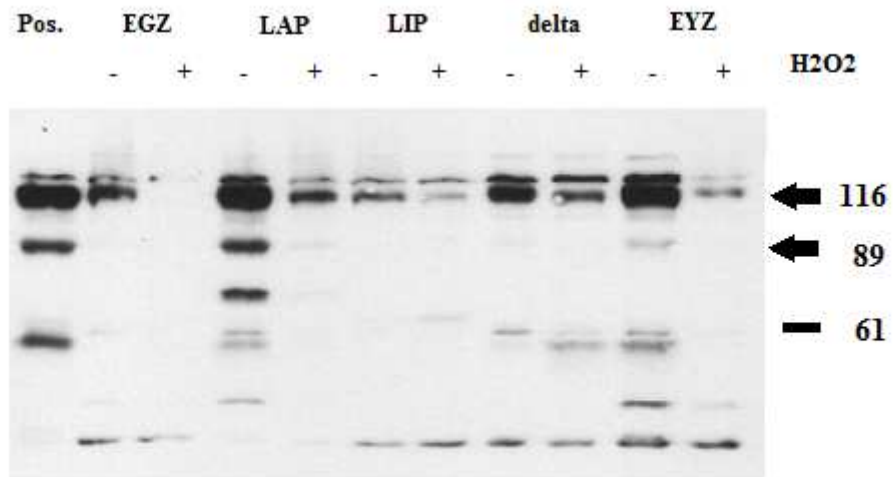
Spaltprodukte von PARP nachzuweisen. Verwendet wurden EL-4 Zellen, die folgende Konstrukte retroviral überexprimierten: die Kontrollvektoren EGZ-HA und EYZ-HA, C/EBP $\delta$ -ER, C/EBP $\beta$ -ER, das der LAP-Isoform entspricht, sowie die dominant-negative Form C/EBP $\beta$ dn-ER, LIP, welche im Gegensatz zu LAP keine Aktivierungsdomäne enthält. Als Positivkontrolle diente eine mit Etoposid aktivierte Makrophagenzelllinie.

Pro Zelllinie wurden zwei Ansätze mit 4-OH-Tm über Nacht stimuliert. Zwei Stunden vor der geplanten Zellernte wurde zur Apoptoseinduktion jeweils einem der Ansätze Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in einer Endkonzentration von 1mM hinzugefügt.

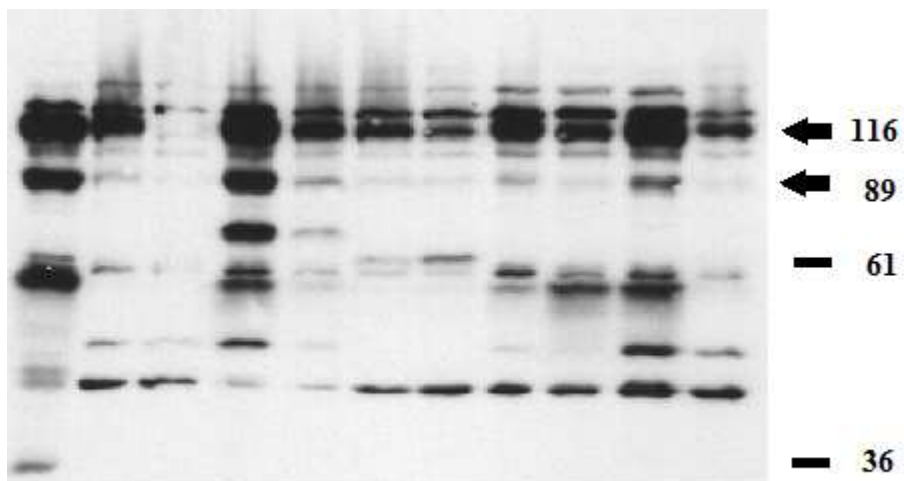
Nach Lyse der Zellen und Gewinnung eines Gesamtzellproteinextrakts wurde dieser mit Hilfe eines Western Blots analysiert. Durch Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen PARP konnten diese und deren Spaltprodukte nachgewiesen werden. Als Ladekontrolle diente eine Färbung des Blots mit einem Antikörper gegen das konstitutiv in den Zellen exprimierte  $\beta$ -Aktin.

Als Maß der Apoptoserate diente die Betrachtung des Verhältnisses des 89 kD-Spaltprodukts zur ungespalteten PARP (p89/p116). Der Blot zeigte bei den C/EBP $\beta$  überexprimierenden, jedoch nicht mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Zellen, ein im Vergleich zu den Kontrollzelllinien, den C/EBP $\delta$  und LIP überexprimierenden Zellen, ein deutlich höheres Verhältnis von p89 zu p116 in Übereinstimmung mit der Positivkontrolle apoptotischer Zellen. Dies ließ sich jedoch nicht – oder wahrscheinlich nicht mehr, wenn man den generellen Verlust von PARP in allen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Ansätzen zugrunde legt - bei den mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten C/EBP $\beta$ -Zellen beobachten. Bei einer reduzierten Wasserstoffperoxidkonzentration von 0,7 mM waren die Auswirkungen ähnlich. Vor allem aber war nach wie vor bei den nicht mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulierten, C/EBP $\beta$  überexprimierenden EL-4 Zellen das Verhältnis des p89-Spaltproduktes zu der ungespaltenen PARP (p116) am größten. Obwohl auch bei den C/EBP $\delta$ -Zellen das Spaltprodukt nachzuweisen war, fand sich eine größere Menge ungespaltenen PARPs, so dass das Verhältnis p89/p116 niedriger eingestuft werden konnte. Beide Versuche zeigten, dass eine Überexpression und Aktivierung von C/EBP $\beta$  im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der C/EBP-Familie, so auch der dominant negativen Form von C/EBP $\beta$  (LIP), die spezifische Spaltproduktbildung aus PARP verstärkt. Im Western Blot zeigten sich noch weitere prominente Banden, so bei der Positivkontrolle und C/EBP $\beta$  eine Bande von ca. 55 kD, sowie von ca. 70 kD und ca. 61 kD in den C/EBP $\beta$ -Zellen, die auf zusätzliche Spaltprodukte

hinwiesen. Zusammengefasst deutete alles stark auf eine Beteiligung der EffektorCaspase-3 bei der C/EBP $\beta$  induzierten Apoptose hin.



Belichtung 10 Minuten



Belichtung ca. 2 Stunden



**Abbildung 3.3:** Eine Überexpression und Aktivierung von C/EBP $\beta$  erhöht die Spaltproduktbildung aus PARP. Western Blot von EL-4 T-Zellen, welche jeweils die Kontrollvektoren

EGZ-HA, EYZ-HA, sowie C/EBP $\beta$  (LAP) C/EBP $\beta$ dn (LIP) und C/EBP $\delta$  retroviral überexprimieren. Alle Zellen wurden 14 Stunden mit 4-OH-Tm 200 ng/ml stimuliert. Ein Ansatz pro Zelllinie wurde zwei Stunden mit 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt (+). Eingesetzt wurden jeweils 35  $\mu$ g Gesamtzellproteinextrakt.  $\beta$ -Aktin und PARP wurden mittels spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Positivkontrolle war eine apoptotische Makrophagenzelllinie. Die Abbildung zeigt zwei unterschiedliche Belichtungen desselben Blots, oben 10 Minuten, unten ca. 2 Stunden.

### 3.4 Dominant-negative Caspase-3 beeinflusst das RNA-Expressionsmuster der EL-4 T-Zellen.

Da PARP ein Hauptsubstrat der aktivierten Caspase-3 darstellt [Elmore 2007] und sich in C/EBP $\beta$  exprimierenden Zellen eine höhere Konzentration des Spaltproduktes p89 im Vergleich zur ungespaltenen Form fand, sollte im nächsten Schritt über eine Hemmung der Caspase-3 ein solcher Zusammenhang näher untersucht werden.

Um die Caspase-3 in der untersuchten Zelllinie zu hemmen, sollte mittels retroviraler Infektion eine mutierte Form der Caspase-3, Caspase-3F, welche aufgrund eines Aminosäureaustausches nicht durch Spaltung aktiviert werden kann, in den Zellen überexprimiert werden und so eine kompetitive Inhibition der endogenen Caspase-3 bewirken.

In diesem Fall erfolgte eine simultane Infektion von EL-4 T-Zellen mit den Expressionsvektoren C/EBP $\beta$ -ER, dem Leervektor EGZ-HA sowie pEGN/MCS-FlagC und pEGN/Caspase3F.

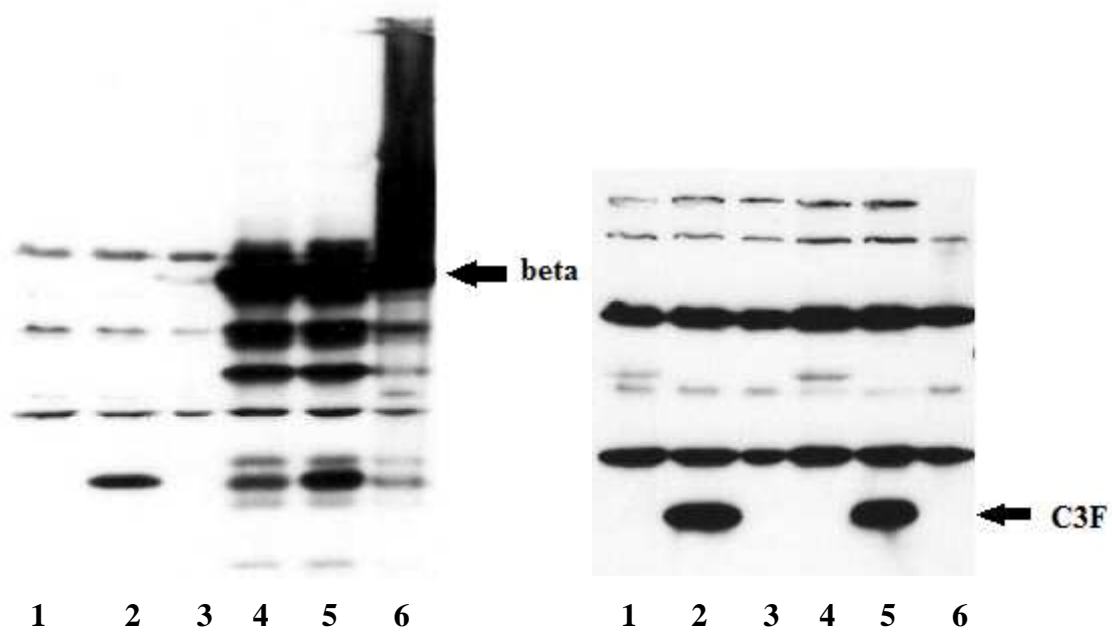
Plasmide	EGZ-HA	C/EBP $\beta$ -ER
pEGN/MCS-FlagC	EGZ/EGN	C/EBP $\beta$ /EGN
pEGN/Caspase3F	EGZ/Caspase3F	C/EBP $\beta$ /Caspase3F

**Tabelle 3.1: Infektionsschema.** Ansätze der doppelt infizierten Zellen abgekürzt dargestellt.

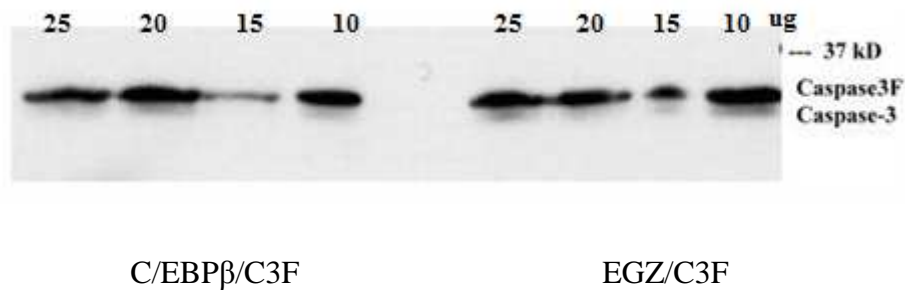
Die Selektion der doppeltinfizierten Zellen erfolgte wie im Methodenteil beschrieben über die Zugabe von G418 und Zeocin in das Medium mit nachfolgender Aufreinigung der beide Resistenzen tragenden, also beide Plasmide exprimierenden Zellen über BSA-Gradientenzentrifugation. Der Expressionsnachweis von C/EBP $\beta$  und Caspase-3F erfolgte

durch Western Blotting der jeweiligen Gesamtzellproteinextrakte mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen ER und Flag.

Die gewonnenen Zelllinien waren die Grundlage weiterer Untersuchungen über den vermuteten Zusammenhang einer Aktivierung von C/EBP $\beta$  mit verstärkter Apoptose sowie Zelldifferenzierung und Proliferationshemmung.



**Abbildung 3.4: Nachweis der Expression von C/EBP $\beta$ -ER und Caspase-3F in zweifach infizierten EL-4 Zellen.** Western Blot aus Gesamtzellproteinextrakten der EL-4 T-Zellen, doppelt retroviral infiziert mit den Expressionsplasmiden EGZ-HA, C/EBP $\beta$ -ER, pEGN/MCS-FlagC und pEGN/Caspase3F. Ansätze (abgekürzt) von li. n. re.: **1** (EGZ/Caspase8F); **2** EGZ/Caspase3F; **3** EGZ/EGN; **4** (C/EBP $\beta$ /Caspase8F); **5** C/EBP $\beta$ /Caspase3F; **6** C/EBP $\beta$ /EGN. Auftrag von jeweils 20  $\mu$ g Proteinextrakt auf ein 8%-PAA-Gel. Mittels Anti-Flag-Antikörper konnte in den Ansätzen EGZ/Caspase3F und C/EBP $\beta$ /Caspase3F die mutierte Form der Caspase-3 als 30 kD schweres Protein nachgewiesen werden („C3F“), ebenso C/EBP $\beta$ -ER („beta“) mit Hilfe des Anti-ER-Antikörpers in den Zellextrakten C/EBP $\beta$ /Caspase3F und C/EBP $\beta$ /EGN.



**Abbildung 3.5: Die dominant-negative Caspase-3 wird in den untersuchten EL4 Zellen im Vergleich zu endogener Caspase-3 überexprimiert.** Western Blot der Zellen C/EBPβ/Caspase3F und EGZ/Caspase3F in abgestufter Proteinkonzentration von 25-20-15-10 μg Gesamtzellproteinextrakt. Nachweis von Caspase-3 und Caspase-3F mit anti-Casp3.

An dieser Stelle sollte die exprimierte Menge an endogener Caspase-3 mit der an Caspase-3F verglichen werden. Dies geschah, um zu sehen, ob die Menge an dominant-negativer Caspase-3 die der endogenen übersteigt, so dass eine kompetitive Hemmung überhaupt möglich erscheint. Es erfolgte hierzu eine Western Blot Analyse mit abgestuften Proteinmengen von 10, 15, 20 und 25 μg Gesamtzellproteinextrakt der vier Zellreihen EGZ/EGN, C/EBPβ/EGN, EGZ/Caspase3F und C/EBPβ/Caspase3F. Im Ergebnis zeigte sich eine deutliche Überexpression der dominant-negativen Caspase-3. Eine genaue elektronische Quantifizierung war bei diesen Mengenunterschied nicht nötig.

### **3.4.1 Dominant-negative Caspase-3 unterstützt die Unterdrückung von *Il2* und *Ifng*, schwächt aber auch die *Il4*-Induktion durch C/EBPβ.**

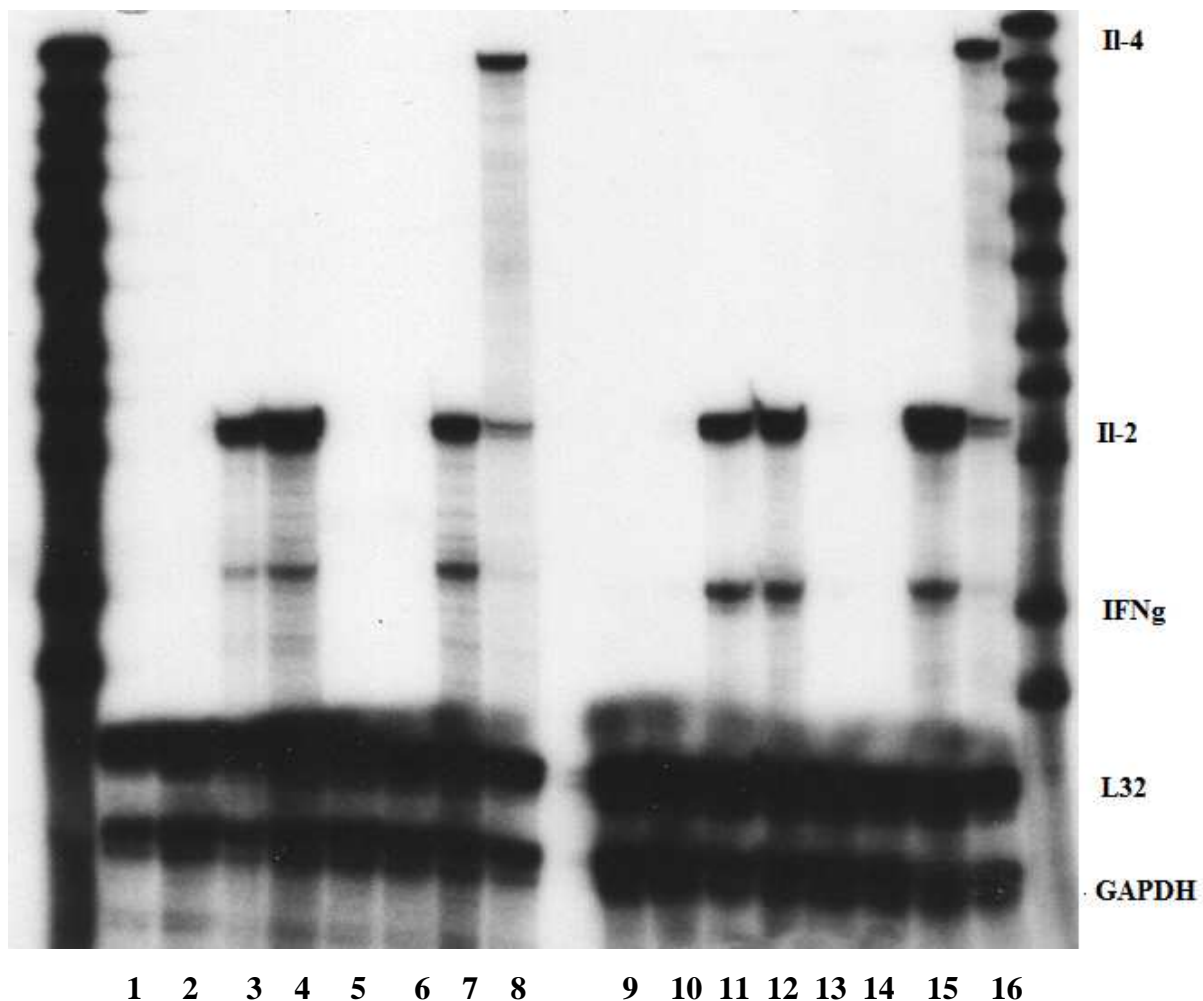
Die Effektorcaspase-3 nimmt bei Apoptosevorgängen eine zentrale Rolle ein. Dies ließ sich auch in diesem Falle bei den C/EBPβ-überexprimierenden Zellen aufgrund der beobachteten verstärkten PARP-Spaltung vermuten. Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob eine Inhibition dieser Caspase auf Proteinebene Auswirkungen auf die von C/EBPβ beeinflussten Signalwege hat, schließlich werden Caspasen auch für viele weitere zelluläre Prozesse benötigt [Garrido, Kroemer 2004]. Zunächst wurde die Regulation des Zytokinmusters von C/EBPβ in An- und

Abwesenheit von dominant-negativer Caspase-3 untersucht und eine Analyse der Gesamt-RNA der oben beschriebenen Zelllinien mittels RNase-Protektionsanalyse durchgeführt

Die doppelt infizierten Zellen EGZ/EGN, EGZ/Caspase3F, C/EBP $\beta$ /EGN, C/EBP $\beta$ /Caspase3F wurden am Vortag der Zellernte mit 4-OH-Tm oder TPA und Ionomycin (T/I), was eine Aktivierung über den TCR und Kostimulation simuliert, sowie mit allen drei Substanzen über insgesamt 16 Stunden stimuliert. Ein unstimulierter Ansatz diente als Kontrolle.

Die Ribonuklease-Protektionsanalyse wurde mit dem RiboQuant<sup>TM</sup>-System unter Verwendung des Probensets mCK-1 für murine Zytokine durchgeführt. Dieses Set erfasst die Interleukine IL-4, -5, -10, -13, -15, -9, sowie IL-2, IL-6 und IFN $\gamma$ , außerdem die „Haushalts-Gene“ L32 und GAPDH, welche einen Vergleich der Proben und eine Auswertung der Daten ermöglichen.

Die Analyse der auf dem PAA-Gel aufgetrennten protektierten Proben erfolgte mittels Autoradiographie über Nacht bei  $-70^{\circ}\text{C}$  und Phosphorimaging.



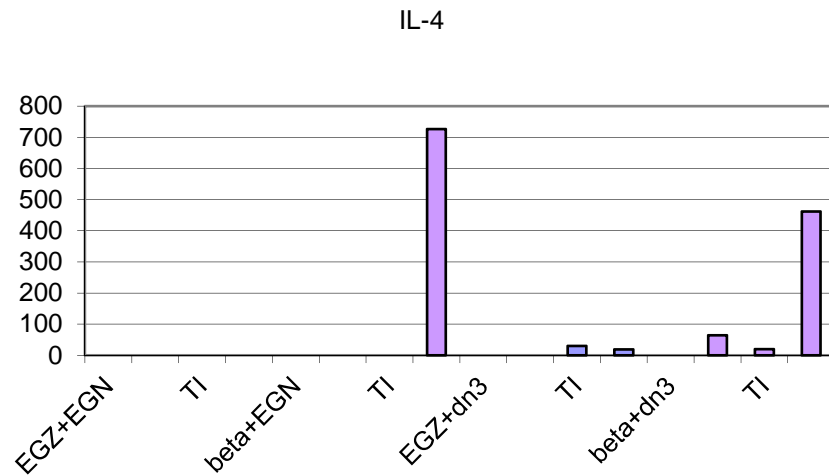
	EGZ/EGN				C/EBP $\beta$ /EGN				EGZ/C3F				C/EBP $\beta$ /C3F			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
-	X				X				X				X			
4-OH-Tm		X				X				X				X		
T/I			X				X				X				X	
4-OH-Tm +T/I				X				X				X				X

**Abbildung 3.6: Dominant-negative Caspase-3 unterstützt Reduktion von *Il2* und *Ifng*, vermindert aber die *Il4*-Induktion durch C/EBP $\beta$ .** Ribonuklease-Protektionsanalyse mCK-1 der doppelt infizierten Zellen EGZ/EGN, C/EBP $\beta$ /EGN, EGZ/Caspase3F, C/EBP $\beta$ /Caspase3F. Eingesetzt wurden 10  $\mu$ g RNA pro Ansatz der nach dem dargestellten Schema über 16 Stunden stimulierten Zellen. Nach Hybridisierung über Nacht und Aufreinigung der Proben wurde jeweils die Hälfte des Volumens auf ein denaturierendes 5% PAA-Gel aufgetragen und bei 60 W elektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt eine Autoradiographie mit einer Belichtungszeit von drei Stunden.

Deutlich wurden *Il4*-, *Il2*- und *Ifng*-RNA detektiert. Das Ergebnis der Autoradiographie gab die bekannten Effekte einer Aktivierung von C/EBP $\beta$  wieder [Berberich-Siebelt et al. 2000]. Unter Stimulation der Zellen mit T/I kam es bei der Aktivierung von C/EBP $\beta$ -ER durch die Zugabe von 4-OH-Tm, welches dessen Translokation in den Zellkern ermöglicht, zu einem deutlichen Anstieg der Expression von *Il4* im Vergleich zu den lediglich mit T/I stimulierten Zellen. Ebenso ließ sich eine Minderung der RNA von *Il2* und *Ifng* nach Aktivierung von C/EBP $\beta$  (4-OH-Tm) beobachten.

Unter Expression der dominant negativen Form der Caspase-3 schienen auf dem ersten Blick diese Effekte von C/EBP $\beta$  nur kaum beeinflusst. So fanden sich auch in den C/EBP $\beta$ /Caspase3F-Zellen unter 4-OH-Tm und T/I ein Expressionsanstieg von *Il4* im Vergleich zu den EGZ/Caspase3F-Zellen sowie eine Verminderung von *Il2* und *Ifng*.

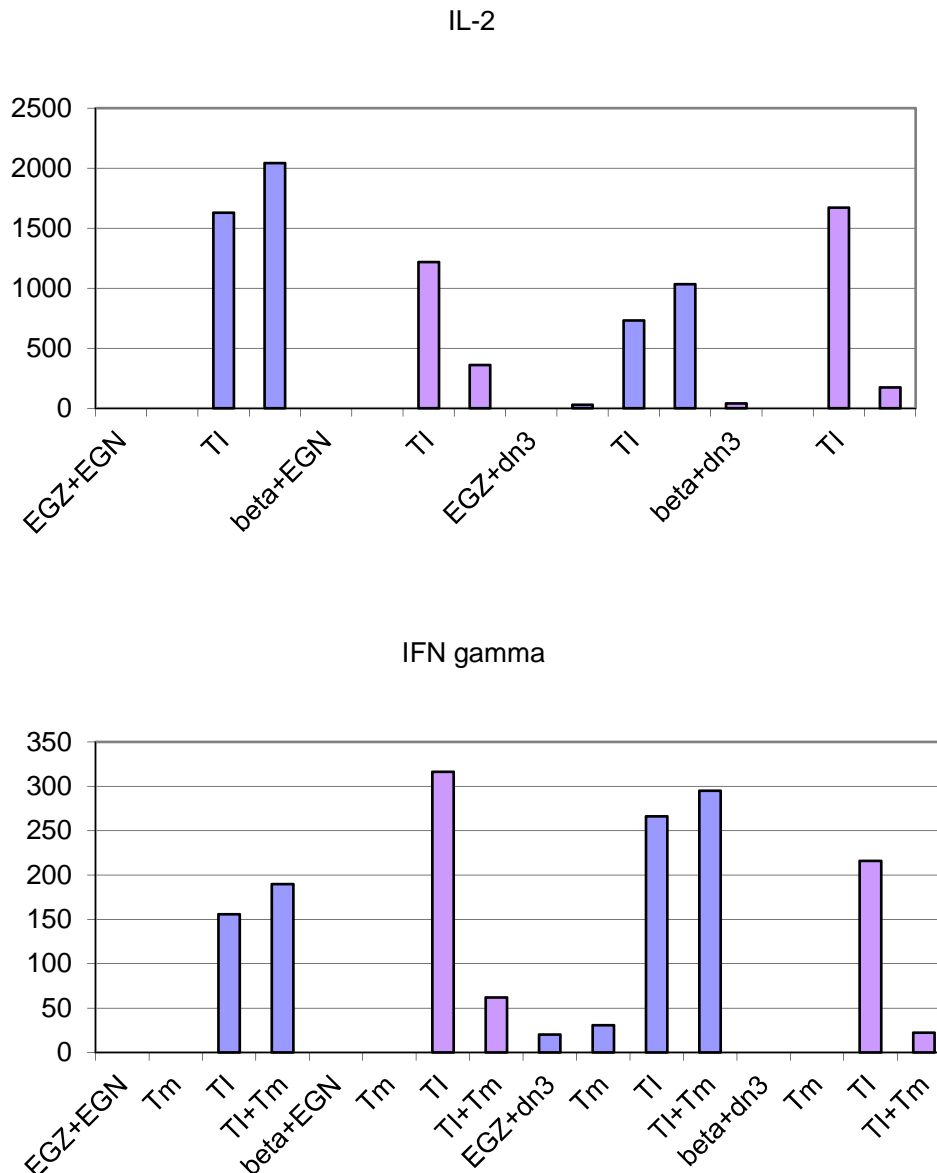




**Abbildung 3.7: Dominant-negative Caspase-3 vermindert die *IL4*-Induktion durch C/EBP $\beta$ .** Phosphoimager-Analyse der Ribonuklease-Protektionsanalyse mCK-1, Interleukin-4.

Eine Analyse unter Berücksichtigung der unterschiedlichen RNA-Mengen pro Ansatz mit Hilfe des Phosphoimagers ermöglichte eine genauere Betrachtung der gewonnenen Ergebnisse. Die gemessene Intensität einer RNA-Bande wurde hierbei quantifiziert und schließlich rechnerisch in Beziehung zu den jeweiligen Haushaltsgenen *L32* und *GAPDH* gesetzt. Dadurch ließen sich die unterschiedlichen RNA-Mengen extrapolieren, was einen Vergleich der gemessenen RNA-Banden untereinander erleichterte.

Zunächst soll die Expression von *IL4* betrachtet werden. Die Filmaufnahme (Abb.3.6) zeigte bei den C/EBP $\beta$ /Caspase3F im Vergleich zu den alleine C/EBP $\beta$  exprimierenden Zellen nach Stimulation mit 4-OH-Tm und T/I eine stärkere Bande in Höhe des *IL4* bei jedoch auch leicht stärkeren Banden bei *L32* und *GAPDH*, welche ein Maß für die insgesamt eingesetzte RNA-Menge in dieser Laufspur sind. Zwei unabhängig voneinander durchgeführte Analysen zeigten eine Umkehrung dieses Verhältnisses. Unter der Berücksichtigung der unterschiedlichen RNA-Mengen der Laufspuren ergab sich hier rechnerisch eine Verminderung der *IL4*-Expression bei den C/EBP $\beta$ /Caspase3F-Zellen im Vergleich zu C/EBP $\beta$ /EGN. Das Verhältnis zwischen beiden Werten, *IL4* (C/EBP $\beta$ /Caspase3F) zu *IL4* (C/EBP $\beta$ /EGN), betrug im Mittel aus beiden Analysen 0,59. Die Phosphoimager-Analyse zeigte somit eine Reduktion der *IL4*-RNA um ca. 40 % bei den C/EBP $\beta$  und die dominant negative Form der Caspase-3 exprimierenden EL-4 T-Zellen im Vergleich zu den alleine aktiviertes C/EBP $\beta$  enthaltenden Zellen.



**Abbildung 3.8: Dominant-negative Caspase-3 scheint die Unterdrückung von *Il2* und *Ifng* zu verstärken.** Phosphoimager-Analysen der Ribonuklease-Protektionsanalyse mCK-1, IL-2 und IFN- $\gamma$ .

Ebenso zeigte sich in diesem Experiment die bereits beschriebene Reduktion der *Il2*- und *Ifng*-RNA-Expression unter der Aktivierung von C/EBP $\beta$  [Berberich-Siebelt et al. 2000]. So fand sich in der Autoradiographie eine Steigerung der *Il2*-Expression in den mit T/I aktivierten Leervektor tragenden Zellen. Im Vergleich dazu bewirkte eine Expression der dominant-negativen Caspase-3 keine Änderung dieser Verhältnisse. Eine Aktivierung von C/EBP $\beta$  über Zugabe von 4-OH-Tm führte in beiden Zellpopulationen, in den lediglich EGN tragenden ebenso wie in den die dominant negative Form der Caspase-3 exprimierenden Zellen zu der bekannten Reduktion der RNA sowohl von *Il2* als auch von *Ifng*. Betrachtet man die

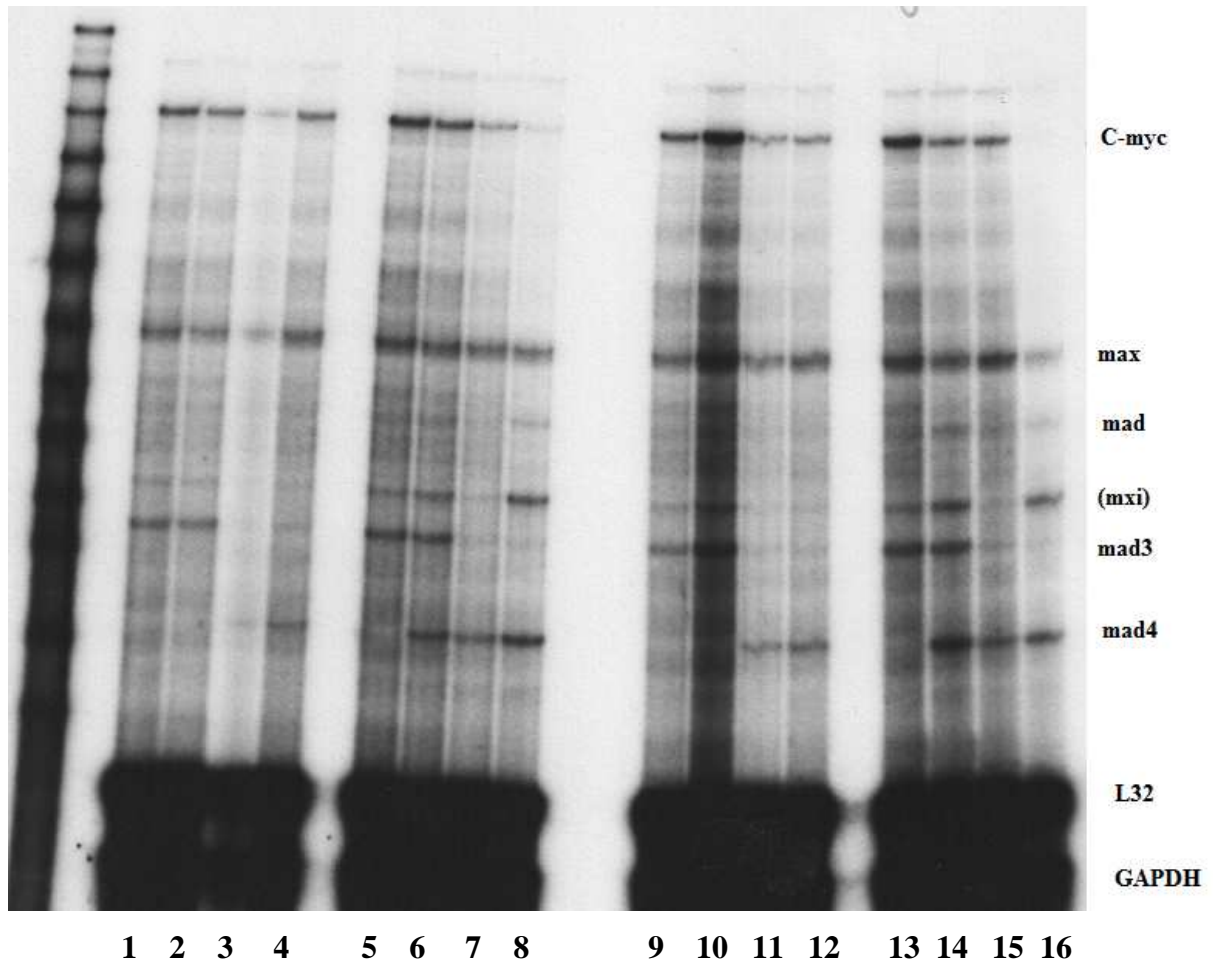
prozentualen Verhältnisse, so ergab sich als Mittelwert zwischen beiden Phosphoimageranalysen eine Reduktion der *Ifng*-RNA in den C/EBP $\beta$ /EGN-Zellen nach Zugabe von 4-OH-Tm um insgesamt 83,2%, in den C/EBP $\beta$ /Caspase3F-Zellen um 85,5%, was vergleichbar war. Die Berechnung der Reduktion der *Il2*-RNA ergab einen Mittelwert von 69,8% bei den C/EBP $\beta$ /EGN-Zellen. Bei den zusätzlich mit dominant-negativer Caspase-3 infizierten Zellen bewirkte eine Aktivierung von C/EBP $\beta$  über 4-OH-Tm eine Reduktion der *Il2*-RNA rechnerisch im Phosphoimager um 89,8%.

Die Ergebnisse der Ribonuklease-Protektionsanalyse mit Hilfe des Probensets mCK 1 lassen sich wie folgt zusammenfassen: In der Autoradiographie zeigten sich die bekannten Effekte einer Überexpression und Aktivierung von C/EBP $\beta$  in EL-4 T-Lymphomzellen, eine Steigerung der *Il4*-Expression mit Reduktion der *Il2*- und *Ifng*-RNA [Berberich-Siebelt et al. 2000]. Eine Expression der dominant-negativen Caspase-3 beeinflusste die Auswirkung von C/EBP $\beta$  auf die T-Zelldifferenzierung qualitativ nicht. Aus der Berechnung der Daten einer Phosphoimager-Analyse allerdings konnten eine Abschwächung der durch C/EBP $\beta$  gesteigerten *Il4*-Expression sowie eine verstärkte Suppression der *Il2*- und *Ifng*-Expression bei zusätzlicher Expression der dominant-negativen Form der Caspase-3 angenommen werden. Eine grundsätzlich hemmende Wirkung der dominant-negativen Caspase-3 auf die analysierten Interleukine erschien durch Betrachtung der einfach-infizierten Zellen unwahrscheinlich. Vielmehr fördert dominant-negative Caspase-3 die Expression der Effektorlymphokine IL-4 und IFN- $\gamma$ , während es die von Il-2 abschwächt. Aus diesem Blickwinkel gesehen, wurde das durch C/EBP $\beta$  verursachte Lymphokinmuster genau gegenteilig beeinflusst, obwohl – wie bereits ausgeführt – der grundsätzliche Phänotyp durch C/EBP $\beta$  dominiert war.

### **3.4.2 Dominant-negative Caspase-3 beeinflusst die Unterdrückung von *Myc* durch C/EBP $\beta$ nicht, führt jedoch zu vermehrter Bildung von *Mad4*.**

In der Einleitung wurde die Rolle der Myc-Mad-Max-Familie von Transkriptionsfaktoren bei der Regulation von Zellzyklus, Proliferation, Differenzierung und Zelltod beschrieben. Aufgrund dieser zentralen Rolle sowie des bekannten repressiven Einflusses von C/EBP $\beta$  auf die Expression von c-Myc [Berberich-Siebelt et al. 2006] wurde im Folgenden untersucht, ob die Expression der dominant-negativen Caspase-3 in C/EBP $\beta$ -ER tragenden Zellen die Expression der Myc-Familie beeinflusst. Dies erfolgte mit Hilfe einer Ribonuklease-

Protektionsanalyse unter Verwendung des Probensets mMyc der Firma RiboQuant™. Es wurden die RNA-Ansätze der doppelt infizierten Zellen des im vorherigen Kapitel beschriebenen Versuches eingesetzt. Die Vorgehensweise der RNase-Protektionsanalyse entspricht ebenfalls dem des vorherigen Versuches.



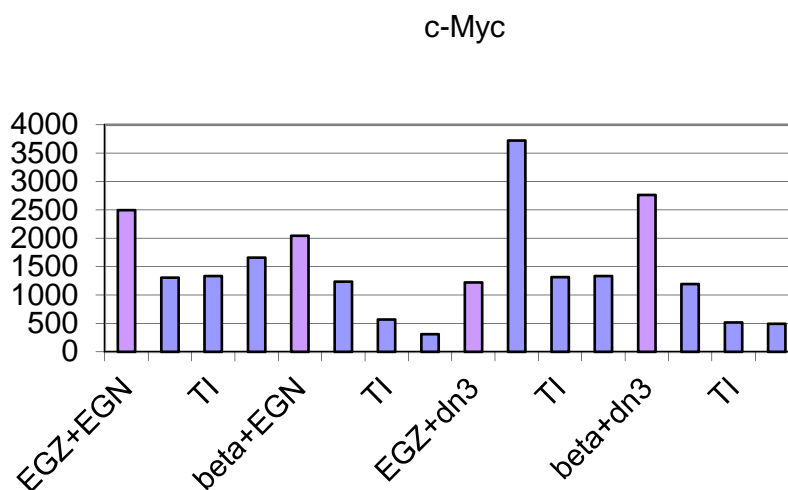
	EGZ/EGN				C/EBPβ/EGN				EGZ/C3F				C/EBPβ/C3F			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
-	X				X				X				X			
4-OH-Tm		X				X				X				X		
T/I			X				X				X				X	
4-OH-Tm+T/I				X				X				X				X

**Abbildung 3.9: Dominant-negative Caspase-3 beeinflusst die Suppression von *Myc* durch *C/EBPβ* nicht, steigert jedoch die *Mad4*-Expression.** Ribonuklease-Protektionsanalyse mMyc der doppelt infizierten Zellen EGZ/EGN, C/EBPβ/EGN, EGZ/Caspase3F, C/EBPβ/Caspase3F. Eingesetzt wurden 10

µg RNA pro Ansatz der nach dem dargestellten Schema über 16 Stunden stimulierten Zellen. Nach Hybridisierung über Nacht und Aufreinigung der Proben wurde jeweils die Hälfte des Volumens auf ein denaturierendes 5% PAA-Gel aufgetragen und bei 60 W elektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt eine Autoradiographie mit einer Belichtungszeit von ca. 16 Stunden.

Der beschriebene Effekt einer negativen Regulierung von *Myc* durch C/EBPβ [Berberich-Siebelt et al. 2006] zeigte sich in diesem Experiment deutlich bei der dreifachen Stimulation der Zellen mit T/I und 4-OH-Tm, welches zu einer Aktivierung von C/EBPβ im Kontext einer nachgeahmten T-Zellstimulation führt. Aktivierung von C/EBPβ durch 4-OH-Tm führte zu der gesteigerten Expression von *Mad4*, welches durch c-Myc reprimiert wird [Kime, Wright 2003], und demnach ein indirekter Effekt sein könnte. Beide Effekte erschienen in der Autoradiographie durch zusätzliche Expression der dominant-negativen Form der Caspase-3 verstärkt.

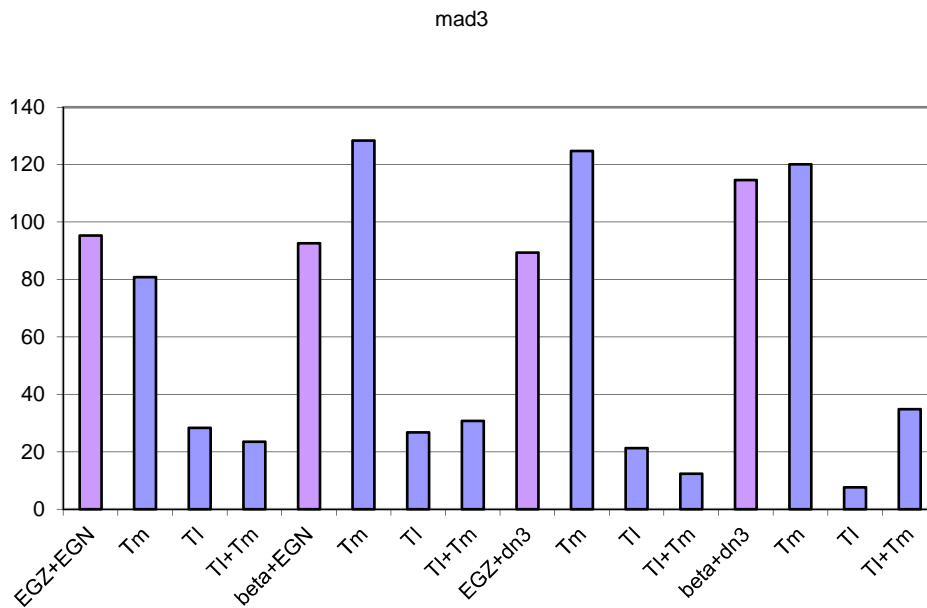
Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Phosphoimageranalyse mit rechnerischer Einbeziehung und Extrapolation der eingesetzten unterschiedlichen RNA-Mengen betrachtet werden.



**Abbildung 3.10: Dominant-negative Caspase-3 beeinflusst die Unterdrückung von *Myc* durch C/EBPβ nicht.** Phosphoimager-Analyse der RNase-Protektionsanalyse mMyc, c-Myc.

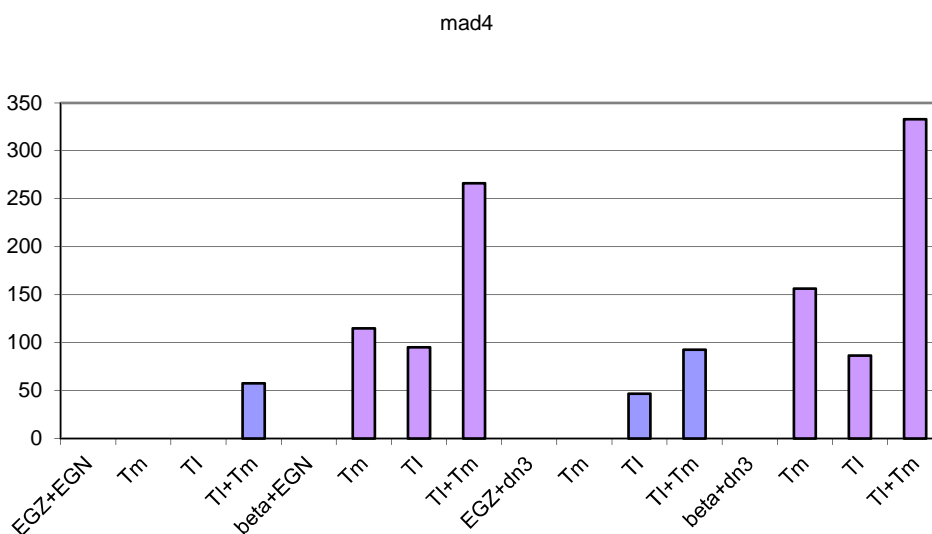
In der Phosphoimager-Analyse fand sich bei den C/EBPβ/EGN-Zellen eine Verminderung der *Myc*-RNA bei den mit T/I und 4-OH-Tm stimulierten Zellen. Dies zeigte sich ebenfalls bei zusätzlicher Infektion mit dominant-negativer Caspase-3. Diese schien die Wirkung von C/EBPβ auf *Myc* nicht zu beeinflussen.

Betrachtet man die Expression von *Mad3*, so fanden sich keine richtungsweisenden Veränderungen durch C/EBPβ oder die dominant-negativen Form der Caspase-3.



**Abbildung 3.11: C/EBP $\beta$  und dominant-negative Caspase-3 beeinflussen die *Mad3*-Expression nicht.** Phosphoimager-Analyse der RNase-Protektionsanalyse mMyC, Mad3.

In der Analyse der *Mad4*-RNA zeigte sich der bekannte Effekt einer gesteigerten Expression unter Aktivierung von C/EBP $\beta$  [Berberich-Siebelt et al. 2006]. Zusätzliche Stimulation der Zellansätze mit T/I neben 4-OH-Tm führten noch zu einer Verstärkung dieser Tendenz. In dieser Phosphoimager-Analyse fand sich in den die dominant-negative Caspase-3 exprimierenden Zellen eine Intensivierung dieses Effektes.



**Abbildung 3.12: Dominant-negative Caspase-3 verstärkt *Mad4*-Induktion durch C/EBP $\beta$ .** Phosphoimager-Analyse der RNase-Protektionsanalyse mMyC, Mad4.

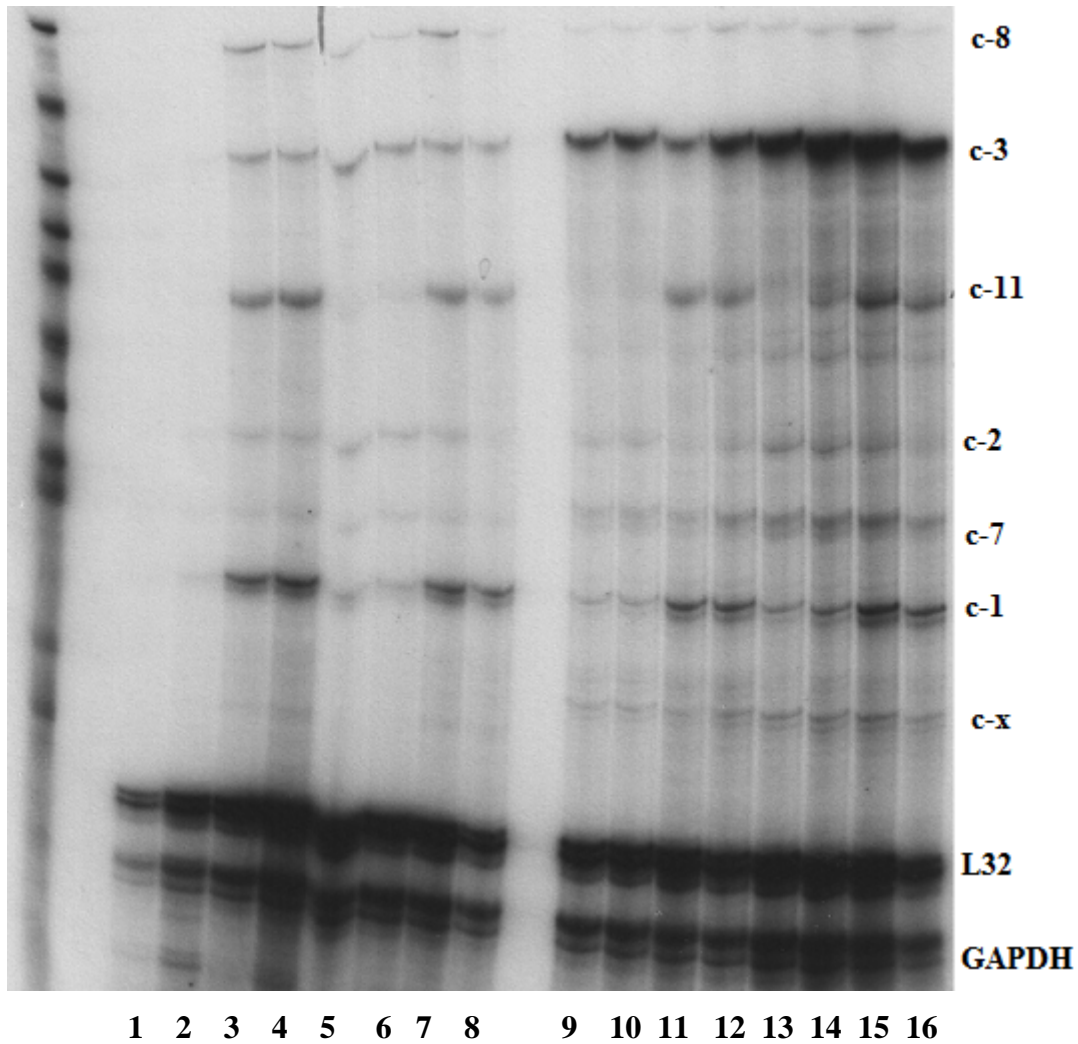
Zusammenfassend fand sich in der Ribonuklease Protektionsanalyse der Myc-Familie eine nur geringe Beeinflussung der C/EBP $\beta$ -Wirkungen durch die zusätzliche Expression der dominant-negativen Caspase-3. Auffällig war die Verstärkung des positiven Effektes der Aktivierung von C/EBP $\beta$  auf die Expression von *Mad4* in den C/EBP $\beta$ /Casp3F-Zellen.

### **3.4.3 Überexpression von C/EBP $\beta$ steigert die Expression der endogenen *Caspase3* und bei Blockade der Caspase-3 die der *Caspase11*.**

Im Folgenden sollten Auswirkungen einer Aktivierung von C/EBP $\beta$  und zusätzlicher Expression der dominant-negativen Caspase-3 auf das Expressionsmuster der endogenen Caspasen untersucht werden. Zu diesem Zweck erfolgte eine Ribonuklease-Protektionsanalyse der bereits in den vorherigen Versuchen eingesetzten RNA-Extrakte der doppelt infizierten EL-4 Zellen EGZ/EGN, EGZ/Caspase3F, C/EBP $\beta$ /EGN, C/EBP $\beta$ /Caspase3F mit Hilfe des Probensets mApo1 für die Familie der Caspasen.

Betrachtet man die Expression der *Caspase3*-RNA, so fand sich autoradiographisch bei den mit C/EBP $\beta$ /EGN infizierten Zellen nur durch Überexpression wie unter Stimulation mit 4-OH-Tm (Abb.3.13, Spalte 5 + 6) im Vergleich zu der Vektorkontrolle (Spalte 1 + 2) eine schwache Induktion der Expression. Ebenso ließ sich bei den mit T/I sowie den dreifach stimulierten Ansätzen bei den C/EBP $\beta$  tragenden Zellen unter Berücksichtigung der unterschiedlichen eingesetzten RNA-Mengen ein Expressionsanstieg der *Caspase3*-RNA zeigen.

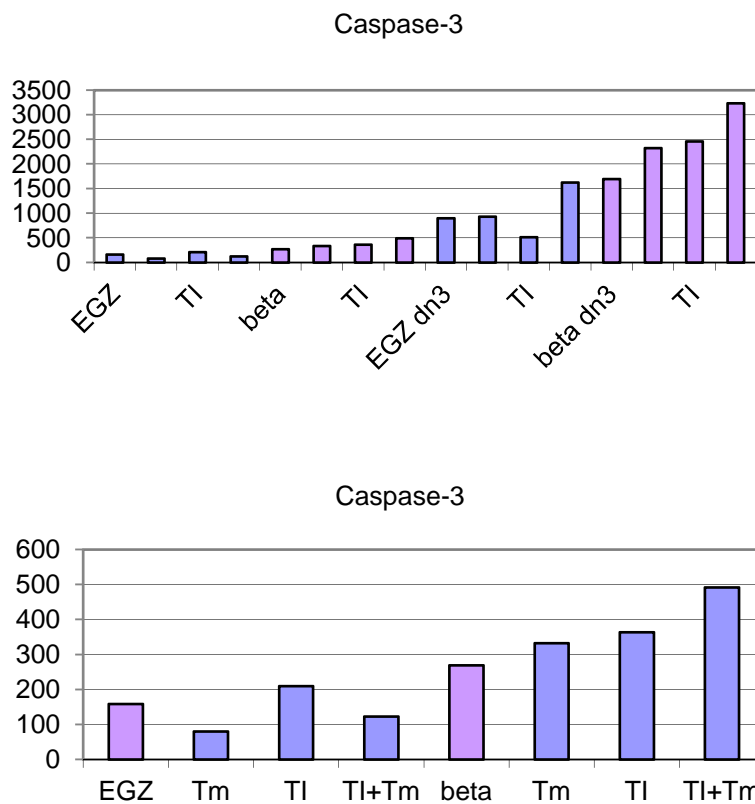
Die Werte der mit der dominant-negativen Form der Caspase-3 infizierten Zellen waren aufgrund einer Detektion beider Formen nur bedingt auswertbar, doch zeigten sich auch hier noch höhere Expressionswerte in Form stärkerer Banden der *Caspase3* in den C/EBP $\beta$  exprimierenden Zellen.



	EGZ/EGN				C/EBPβ/EGN				EGZ/C3F				C/EBPβ/C3F			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
-	X				X				X				X			
4-OH-Tm		X				X				X				X		
T/I			X				X				X				X	
4-OH-Tm+T/I				X				X				X				X

**Abbildung 3.13: C/EBPβ verstärkt die Caspase3-Expression und bei Hemmung von Caspase-3 die Expression von Caspase11.** Ribonuklease-Protektionsanalyse mApo1 der doppelt infizierten Zellen EGZ/EGN, C/EBPβ/EGN, EGZ/Caspase3F, C/EBPβ/Caspase3F. Eingesetzt wurden 10 µg RNA pro Ansatz der nach dem dargestellten Schema über 16 Stunden stimulierten EL-4 T-Zellen. Nach Hybridisierung über Nacht und Aufreinigung der Proben wurde jeweils die Hälfte des Volumens auf ein denaturierendes 5% PAA-Gel aufgetragen und bei 60 W elektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt eine Autoradiographie mit einer Belichtungszeit von ca. 16 Stunden. Detektiert wurden die RNA-Banden der Caspasen-8, -3, -11, -2, -7 und -1. Die sehr starken Banden in Höhe der Caspase-3 der mit Caspase-3F infizierten Zellen sind auf eine zusätzliche Detektion exogener RNA zurückzuführen.



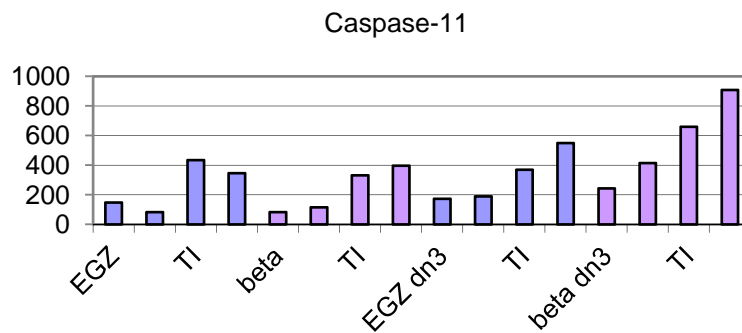


**Abbildung 3.14: C/EBP $\beta$  steigert die Expression der endogenen Caspase3.** Phosphoimager-Analyse der RNase-Protektionsanalyse mAp01, Caspase-3. Die untere Graphik stellt einen vergrößerten Ausschnitt aus der oberen dar.

In der Phosphoimager-Analyse des Versuches bestätigte sich dies. So fand sich schon ein im Vergleich zu der Kontrolle erhöhter Ausgangswert der C/EBP $\beta$ /EGN-Zellen, doch unter Stimulation mit 4-OH-Tm sowie insbesondere der zusätzlichen Stimulation mit T/I konnte ein weiterer Anstieg der Caspase3-RNA im Vergleich zu den Kontrollansätzen nachgewiesen werden. Ebenso zeigten sich in den rechnerischen Analysen in den zusätzlich mit C/EBP $\beta$  und dominant-negative Caspase-3 infizierten im Vergleich zu den alleine die dominant-negative Caspase-3 tragenden Zellen ein weiterer Anstieg der detektierten Caspase3-RNA. In diesem Experiment ergab sich somit eine Induktion der Effektorcaspase-3 unter der Überexpression und Aktivierung von C/EBP $\beta$ .

In der autoradiographischen Darstellung wurden in Bezug auf die Expression der Caspase11-RNA nur wenige Veränderungen in den einzelnen Ansätzen sichtbar. Jedoch konnte auch hier

bei Berücksichtigung der unterschiedlichen eingesetzten RNA-Mengen eine Induktion in den C/EBP $\beta$ /EGN-Zellen im Vergleich zu den Kontrollansätzen angenommen werden (Abbildung 3.13, Spalten 4 und 8). Auch in den mit der dominant-negativen Caspase-3 infizierten Zellen fand sich mit C/EBP $\beta$  eine verstärkte Expression der endogenen *Caspase11* (Spalten 12 und 16).



**Abbildung 3.15:** Mit dominant-negativer Caspase-3 steigert C/EBP $\beta$  die Expression der *Caspase11*. Phosphoimager-Analyse der RNase-Protektionsanalyse mApo1, Caspase-11.

In der Phosphoimager-Analyse zeigte sich unter Aktivierung von C/EBP $\beta$  allenfalls eine geringe Induktion der *Caspase11*-RNA (Abbildung 3.15, Spalten 5 und 6), wobei bei den mit dominant-negativer Caspase-3 infizierten Zellen unter Aktivierung von C/EBP $\beta$  ein deutlicher Anstieg der Expression der endogenen *Caspase11* nachzuweisen war (Spalten 14 und 16).

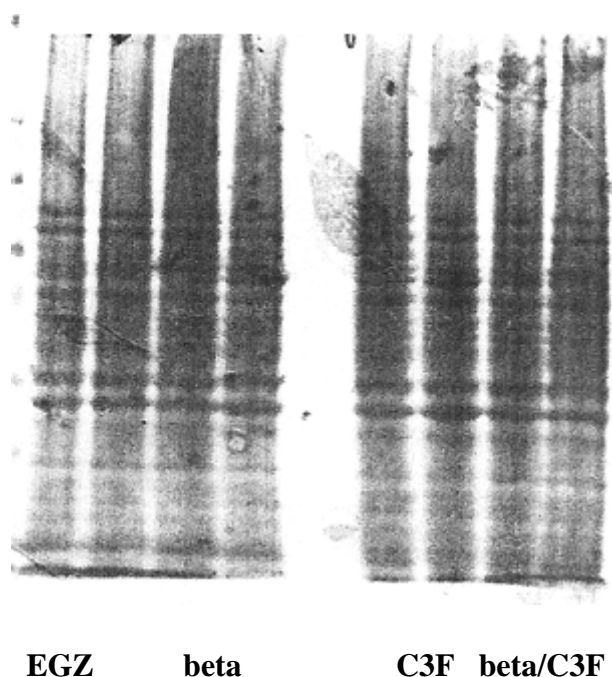
Zusammenfassend kann man sagen, dass sich unter Aktivierung von C/EBP $\beta$  eine leichte Expressionssteigerung der endogenen *Caspase3*-RNA fand. Der Effekt einer Hemmung der Caspase-3 auf die RNA-Expression der endogenen *Caspase3* konnte aufgrund der Doppeldetektion beider Formen nur eingeschränkt beurteilt werden. Jedoch schien hier unter C/EBP $\beta$  die *Caspase3*-Expression im Vergleich zu den EGZ/Caspase3F-Zellen noch mehr gesteigert. Ähnlich schien eine funktionelle Hemmung der Caspase-3 die Transaktivierung der *Caspase11* durch C/EBP $\beta$  zu unterstützen.

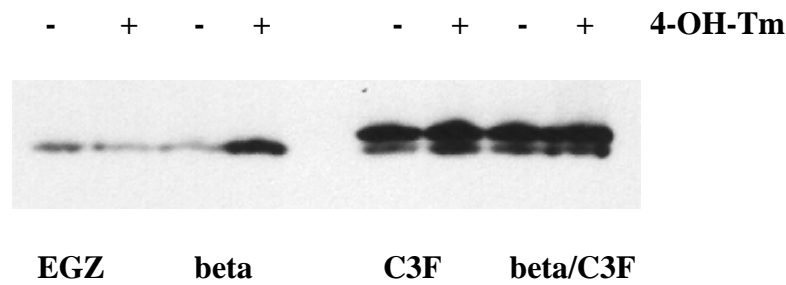
### 3.5 Aktivierung von C/EBP $\beta$ und dominant-negative Caspase-3 wirken sich auf die Konzentration der endogenen Caspase-3 in EL-4 Zellen aus.

Nun sollten einige der auf RNA-Ebene bereits untersuchten Faktoren auf Proteinebene betrachtet werden. Untersucht wurden Gesamtzellproteinextrakte einiger der in den vorherigen Ribonuklease-Protektionsanalysen eingesetzten EL-4-Zellreihen.

#### 3.5.1 Aktivierung von C/EBP $\beta$ und dominant-negative Caspase-3 steigern endogene Caspase-3.

Untersucht wurden Gesamtzellproteinextrakte aus den EL-4 Zellen EGZ/EGN, C/EBP $\beta$ /EGN, EGZ/Caspase3F und C/EBP $\beta$ /Caspase3F jeweils mit und ohne Stimulation mit Tamoxifen (4-OH-Tm) über 24 Stunden. Es erfolgte eine Analyse mittels Western Blot. Zur Färbung wurde ein Antikörper gegen Caspase-3 eingesetzt, welcher die endogene und die aufgrund der Flag-Markierung größere Caspase3F-Form detektiert. Im Ergebnis fand sich bei den mit 4-OH-Tm stimulierten C/EBP $\beta$ /EGN-Zellen eine im Vergleich zu den unstimulierten Zellen und der Leervektor-Kontrolle EGZ/EGN eine deutliche Zunahme der Caspase-3. In den die dominant-negative Form der Caspase-3 tragenden Zellen konnte durch die hohe Intensität der Bande der dominant-negativen exogenen Form eine Variation der endogenen Caspase-3 nicht befriedigend analysiert werden.

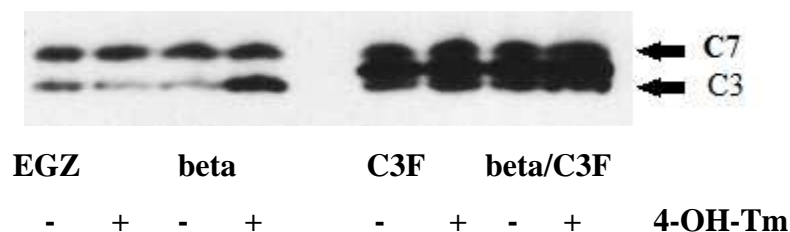




**Abbildung 3.16: Aktivierung von C/EBP $\beta$  und Expression von dominant-negativer Caspase-3 steigern die Proteinexpression von endogener Caspase-3.** Western Blot-Analyse der EL-4 Zellreihen EGZ/EGN („EGZ“), C/EBP $\beta$ /EGN („beta“), EGZ/Caspase3F („C3F“) und C/EBP $\beta$ /Caspase3F („beta/C3F“) jeweils mit und ohne Stimulation mit 4-OH-Tm 200 ng/ml über 24 Stunden. Eingesetzt wurden jeweils 35  $\mu$ g Gesamtzellproteinextrakt. Ladekontrolle mittels oben stehender Ponceaurotfärbung. Der Nachweis von Caspase-3 und Caspase-3F erfolgte durch einen spezifischen Antikörper.

### 3.5.2 Die Expression der Caspase-7 ist auf Proteinebene unbeeinflusst von C/EBP $\beta$ und Hemmung der Caspase-3.

Neben der Caspase-3 ist die Caspase-7 eine Effektorcaspase, welche insbesondere an der Spaltung von PARP beteiligt ist [Elmore 2007]. Aus diesem Grund wurde mittels Western Blot untersucht, ob durch eine Aktivierung von C/EBP $\beta$  oder auch durch ein Eingreifen in die Funktion der Caspase-3 mittels Expression deren dominant-negativer Form die Expression der Caspase-7 beeinflusst wird. Dies war nicht der Fall, denn in allen untersuchten Ansätzen, EGZ/EGN, C/EBP $\beta$ /EGN, EGZ/Caspase3F und C/EBP $\beta$ /Caspase3F jeweils mit und ohne Stimulation mit 4-OH-Tm über 24 Stunden, zeigte sich eine konstante Expression der Caspase-7.

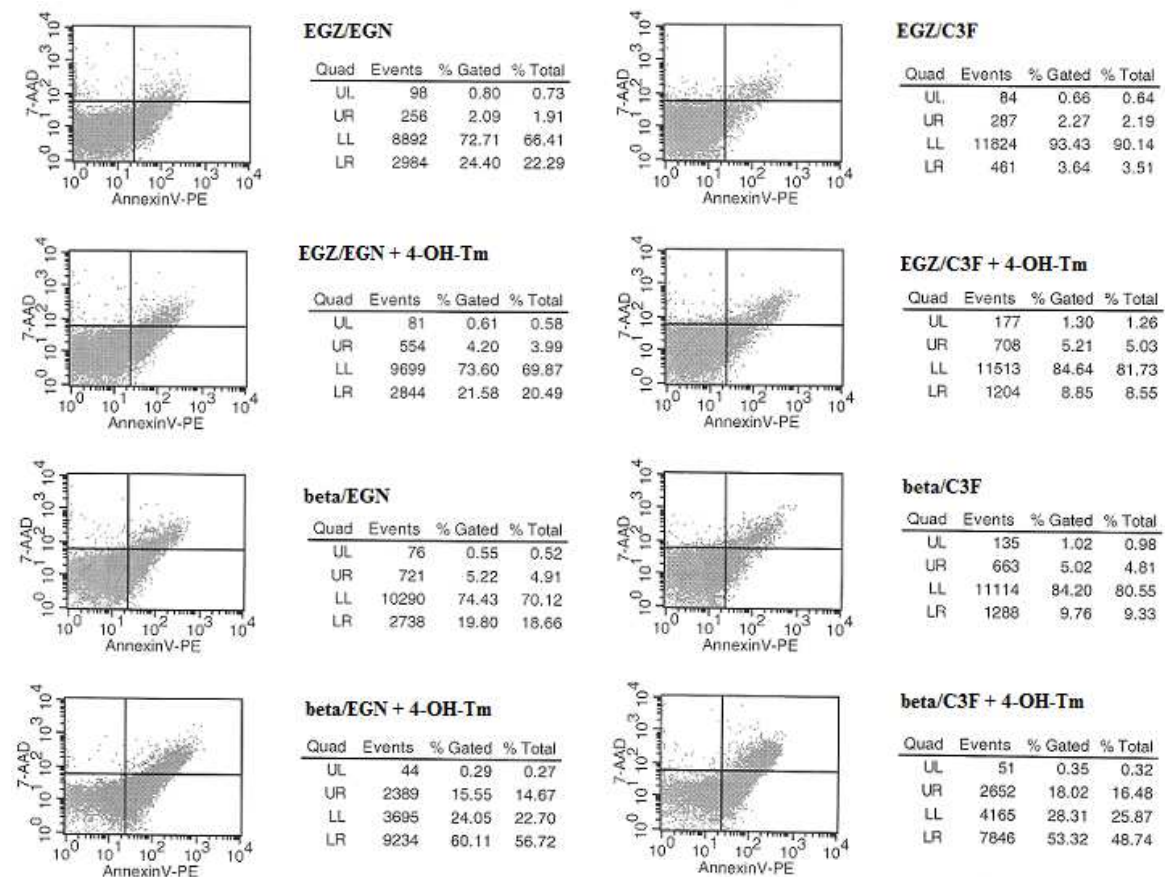


**Abbildung 3.17: Weder eine Aktivierung von C/EBP $\beta$  noch dominant-negative Caspase-3 beeinflussen die Expression der endogenen Caspase-7 in den untersuchten EL-4 Zellen.** Western Blot-Analyse der EL-4 Zellreihen EGZ/EGN („EGZ“), C/EBP $\beta$ /EGN („beta“), EGZ/Caspase3F („C3F“) und C/EBP $\beta$ /Caspase3F („beta/C3F“) jeweils mit und ohne Stimulation mit 4-OH-Tm 200 ng/ml über 24 Stunden. Eingesetzt wurden jeweils 35  $\mu$ g Gesamtzellproteinextrakt. Der Nachweis von Caspase-7 erfolgte durch spezifischen Antikörper. Ladekontrolle mittels Ponceaurotfärbung siehe Abbildung 3.16.

### **3.6 Dominant-negative Caspase-3 vermag nicht, die Zellen vor einer durch C/EBP $\beta$ verstärkten Apoptose zu retten.**

Um die funktionelle Bedeutung einer Hemmung der endogenen Caspase-3 durch Überexpression einer nicht aktivierbaren, dominant-negativen Form dieser Caspase zu untersuchen, wurden Experimente, die den am Anfang des Kapitels beschriebenen Versuchen mit Annexin V- und 7-Amino-Actinomycin- (7-AAD) Färbung der kultivierten Zellen analog sind, mit den doppelt transduzierten EL-4 T-Zellen durchgeführt. Eingesetzt wurden  $5 \times 10^5$  Zellen pro Ansatz und zwei Ansätze von jeder Zelllinie, EGZ/EGN, C/EBP $\beta$ /EGN, EGZ/Caspase3F und C/EBP $\beta$ /Caspase3F. Jeweils einer der beiden Ansätze wurde über 20 Stunden mit Tamoxifen (4-OH-Tm) stimuliert. Die Proben wurden mittels FACScan durchflusszytometrisch analysiert. Der Effekt der Aktivierung von C/EBP $\beta$ , die Apoptoserate der Zellen zu verstärken, zeigte sich wiederum deutlich. So waren in der unstimulierten Kontrolle der C/EBP $\beta$ /EGN-Zellen 19,8 % der betrachteten Zellen Annexin V-PE positiv und 5,22 % sowohl Annexin V-PE-, als auch 7-AAD-positiv. Bei letzteren handelt es sich um spätapoptotische und nekrotische Zellen. Nach Behandlung der Zellen mit 4-OH-Tm, was eine Translokation von C/EBP $\beta$  in den Zellkern bewirkt, fanden sich 60,11 % apoptotische und 15,55 % spätapoptotische bzw. nekrotische Zellen. In den Kontrollansätzen mit den EGZ/EGN EL4-Zellen zeigte sich ein den C/EBP $\beta$ /EGN-Zellen vergleichbar hoher Anteil apoptotischer Zellen von 24,4 % bzw. 21,58 % mit 2,09 % bzw. 4,2 % doppelt-positiver Zellen. In den Caspase-3F exprimierenden Zellen hingegen fand sich eine verminderte Rate apoptotischer Zellen von nur 3,64% im unstimulierten und 8,85% im stimulierten Ansatz. Die Anteile doppelt-positiver Zellen betragen 2,27% bzw. 5,21%. In den sowohl Caspase-3F als auch C/EBP $\beta$  tragenden Zellen fand sich unstimuliert eine Hemmung der Apoptose, also ein Anteil Annexin V-positiver Zellen von 9,76% und 5,02% doppelt positive Zellen. Nach Stimulation mit 4-OH-Tm aber stieg der Anteil apoptotischer Zellen wieder auf 53,32% mit 18% spätapoptotischen bzw. nekrotischen Zellen. Diese Werte waren mit denen der Ansätze C/EBP $\beta$ /EGN vergleichbar, allenfalls zeigte sich eine geringe Tendenz zu weniger Apoptose. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Rettung der Zellen vor Apoptose in den Kontrollen durch Expression der dominant-negativen Form der Caspase-3 bedingt möglich war.

Die durch Aktivierung von C/EBP $\beta$  induzierte Apoptose konnte allein durch eine Hemmung von Caspase-3 nicht verhindert werden.



**Abbildung 3.18:** Die durch Überexpression und Aktivierung von C/EBP $\beta$  verstärkte Apoptose kann durch Hemmung der Caspase-3 nicht vermindert werden. Annexin V-PE und 7-AAD-Färbung von EL-4 Zellen mit retroviraler Expression der Vektoren EGZ/EGN, C/EBP $\beta$ /EGN, EGZ/Caspase3F und C/EBP $\beta$ /Caspase3F, 5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Ansatz, unstimuliert und stimuliert mit 4-OH-Tm über 20 Stunden.

Auch bei Experimenten über einen längeren Zeitraum ließ sich allenfalls ein transientscher Schutz der dominant-negativen Caspase-3 für die durch C/EBP $\beta$  verursachte Apoptose feststellen (nicht gezeigt).

### 3.7 Dominant-negative Caspase-9 beeinflusst das RNA-Expressionsmuster der EL-4 T-Zellen nur gering.

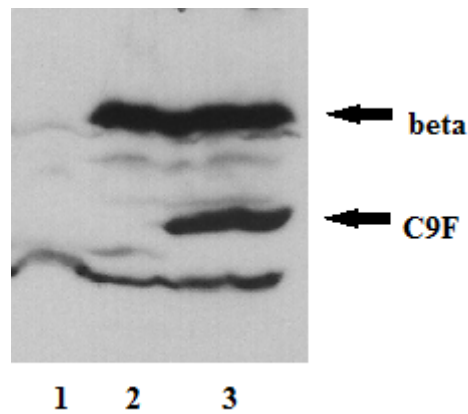
Die Procaspase-9 zählt zu den Initiatorcaspasen. Sie steht im Zentrum des intrinsischen mitochondrialen Signalwegs. Um einen möglichen Einfluss einer Überexpression des Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$  auf die Expression oder Aktivierung von Caspase-9 näher zu untersuchen, wurde auch hier durch Überexpression einer dominant-negativen Caspase-9, Caspase-9F, eine Hemmung der endogenen Caspase-9 angestrebt und deren Auswirkungen u.a. auf die Expression der Zytokine untersucht.

Ähnlich wie zuvor bei der Untersuchung einer Hemmung der Caspase-3 sollte auch hier mittels retroviraler Infektion eine mutierte Form der Caspase-9, welche im Gegensatz zu der endogenen Caspase durch einen Aminosäureaustausch nicht durch Spaltung aktiviert werden kann, in der eingesetzten Zelllinie, den EL-4 T-Lymphomzellen, überexprimiert werden. Verwendet wurde ein Plasmid, das ein mit EYZ und Flag markiertes Protein kodiert. Es erfolgte eine simultane Infektion der EL-4 Zellen mit C/EBP $\beta$ -ER, dem Leervektor EGZ-HA sowie pEYZ/MCS-FlagC und pEYZ/mCaspase9F nach folgendem Schema:

Plasmide	EGZ-HA	C/EBP $\beta$ -ER
pEYZ/MCS-FlagC	EGZ/EYZ	C/EBP $\beta$ /EYZ
pEYZ/Caspase9F	EGZ/Caspase9F	C/EBP $\beta$ /Caspase9F

**Tabelle 3.2: Infektionsschema.** Ansätze der doppelt infizierten Zellen abgekürzt dargestellt.

Eine Selektion der Zellen erfolgte bei diesem Versuchsaufbau durch eine fluoreszenzgesteuerte Sortierung der doppelt infizierten, d.h. sowohl die grün (EGZ) als auch die gelb (EYZ) fluoreszierenden Zellen mittels fluoreszenzaktivierter Durchflusszytometrie. In einer Western Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen ER und Flag konnte die Expression der Proteine überprüft werden. Auf den Ansatz EGZ/Caspase9F wurde aufgrund einer Kontamination in den folgenden Untersuchungen zunächst verzichtet.



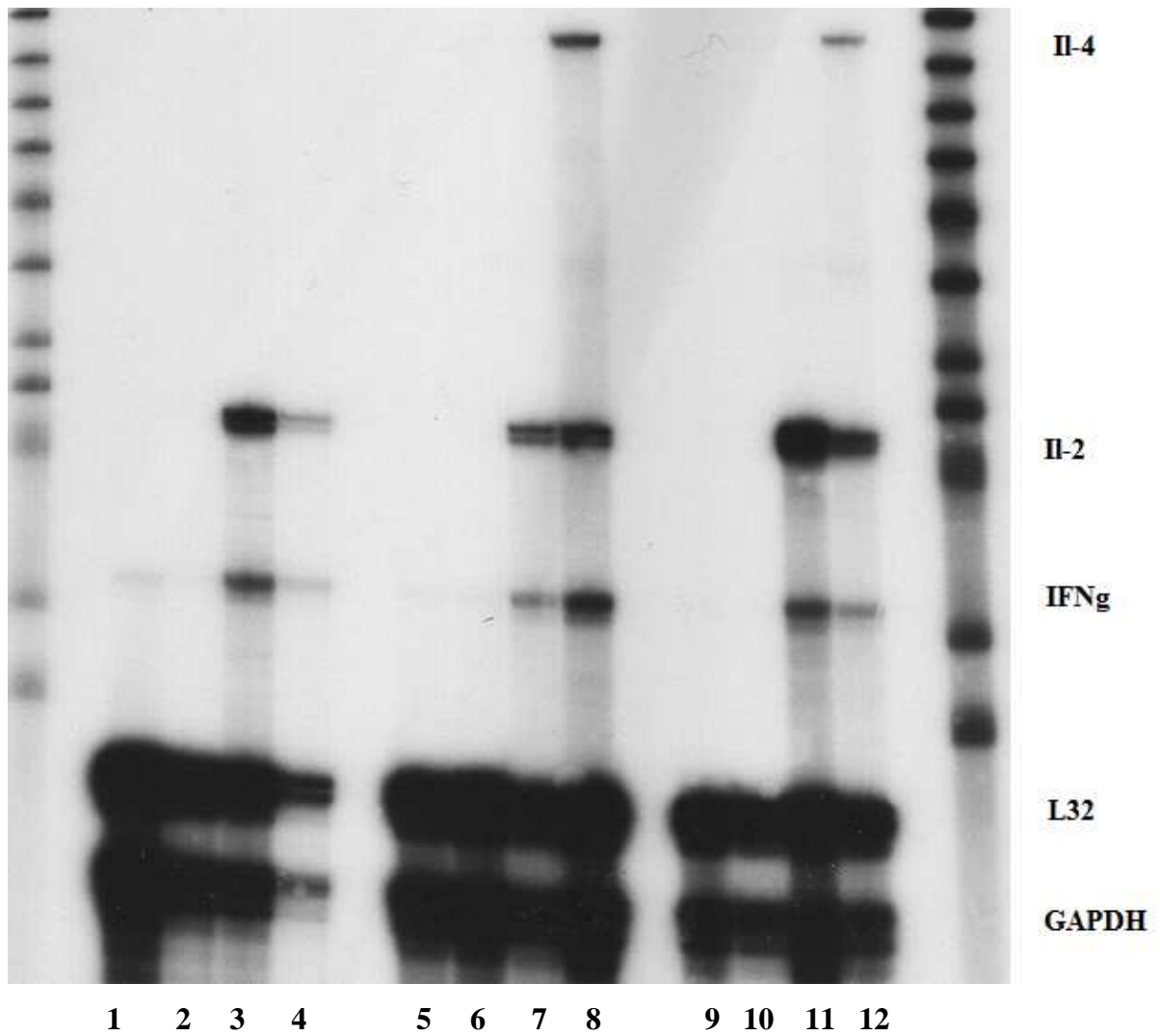
**Abbildung 3.19: Nachweis der Expression von C/EBP $\beta$ -ER und Caspase-9F in zweifach infizierten EL-4 Zellen.** Western Blot aus Gesamtzellproteinextrakten der EL-4 Zellen, doppelt retroviral infiziert mit den Expressionsplasmiden EGZ-HA, C/EBP $\beta$ -ER, pEYZ/MCS-FlagC und pEYZ/Caspase9F. Ansätze (abgekürzt) von li. n. re.: **1** EGZ/EYZ; **2** C/EBP $\beta$ /EYZ; **3** C/EBP $\beta$ /Caspase9F. Auftrag von jeweils 20  $\mu$ g Proteinextrakten auf ein 8%-PAA-Gel. Nachweis von Caspase-9F bei 40-45 kD mittels Anti-Flag-Antikörper, von C/EBP $\beta$  mittels Anti-ER-Antikörper.

### **3.7.1 Dominant-negative Caspase-9 beeinflusst die *Il4*-Induktion durch C/EBP $\beta$ nicht, scheint jedoch die Suppression von *Il2* und *Ifng* leicht abzuschwächen.**

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob eine Blockade der Caspase-9 in den C/EBP $\beta$ -überexprimierenden EL-4 Zellen eine Änderung des Zytokinexpressionsmusters bewirken kann. Untersucht wurde dies durch Isolierung der Zell-RNA und anschließender Analyse der Proben mittels Ribonuklease-Protektionsanalyse.

Wie in 3.4.1 beschrieben wurden pro Zelllinie drei von vier Ansätzen mit Tamoxifen (4-OH-Tm), TPA und Ionomycin (T/I) sowie mit 4-OH-Tm plus T/I stimuliert. Je ein Ansatz wurde unstimuliert belassen. Nach 16-stündiger Inkubation wurde die RNA mittels Trizol-Phenol-Methode gewonnen. Die RNase-Protektionsanalyse wurde mit Hilfe des RiboQuant<sup>TM</sup>-Systems unter Verwendung des Probensets mCK-1 durchgeführt.



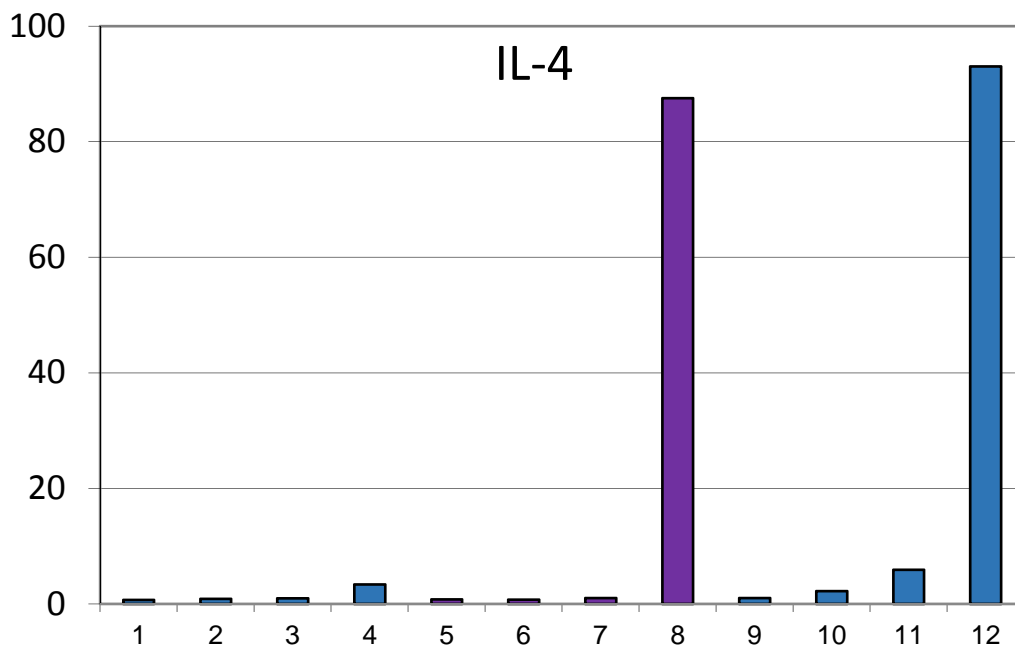


	EGZ/EYZ				C/EBPβ/EYZ				C/EBPβ/Caspase9F			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
-	X				X				X			
4-OH-Tm		X				X				X		
T/I			X				X				X	
T/I + 4-OH-Tm				X				X				X

**Abbildung 3.20: Dominant-negative Caspase-9 beeinflusst die *Il4*-Induktion durch C/EBPβ nicht, scheint aber die Suppression von *Il2* und *Ifng* abzuschwächen.** RNase-Protektionsanalyse mCK-1 der doppelt infizierten Zellen EGZ/EYZ, C/EBPβ/EYZ, C/EBPβ/Caspase9F. Eingesetzt wurden 10 µg RNA pro Ansatz der nach dem dargestellten Schema über 16 Stunden stimulierten Zellen. Nach Hybridisierung über Nacht und Aufreinigung der Proben wurde jeweils die Hälfte des Volumens auf ein denaturierendes 5% PAA-Gel aufgetragen und bei 60 W elektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt eine Autoradiographie mit einer Belichtungszeit von ca. 16 Stunden.

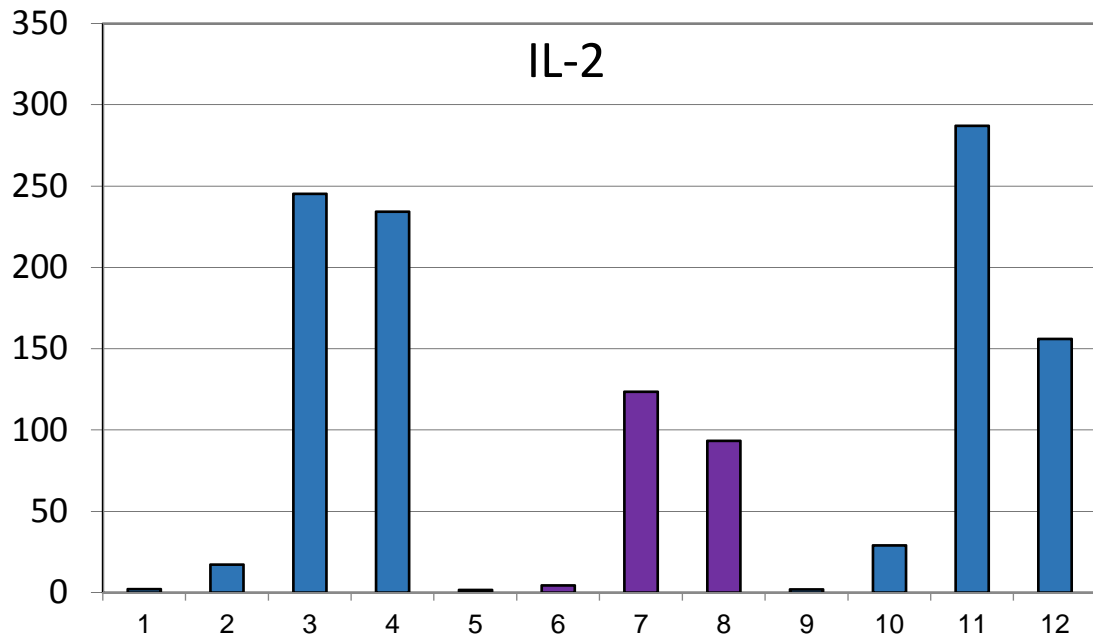
In der Autoradiographie zeigte sich wie in 3.4.1 beschrieben ein Anstieg der *Il4*-RNA in den C/EBPβ/EYZ-Zellen mit der Dreifach-Stimulation mit T/I und 4-OH-Tm. Bei insgesamt

geringerer eingesetzter RNA-Menge in Spur 12 der C/EBP $\beta$ /Caspase9F-Zellen konnte trotz schwächerer *Il4*-Bande eine ähnliche Menge angenommen werden. In einer genaueren Analyse des Films mittels Schwärzegradbestimmung unter Berücksichtigung der Haushaltsgene und somit der unterschiedlichen RNA-Mengen konnte dies bestätigt werden. Expression der dominant-negativen Caspase-9 beeinflusste die Induktion von *Il4* durch C/EBP $\beta$  nicht.



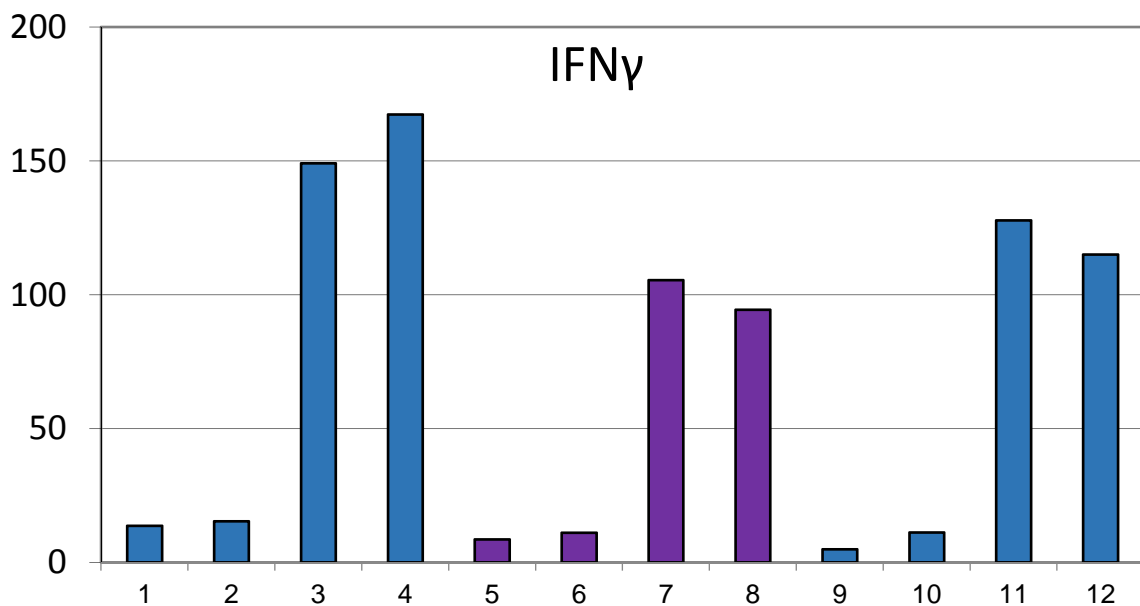
**Abbildung 3.21: Dominant-negative Caspase-9 beeinflusst die *Il4*-Induktion durch C/EBP $\beta$  nicht.** Schwärzegradbestimmung von Abb. 3.20 in Bezug auf L32 und GAPDH, Ribonuklease-Protektionsanalyse mCK-1, IL-4.

Eine Beurteilung der *Il2*- und der *Ifng*-Expression anhand der Autoradiographie alleine gestaltete sich aufgrund der unterschiedlichen RNA-Mengen der Laufspuren als schwierig. In einer Schwärzegradbestimmung unter Berücksichtigung dieser Unterschiede zeigte sich auch in diesem Experiment die beschriebene Reduktion der *Il2*-Expression unter Aktivierung von C/EBP $\beta$  [Berberich-Siebelt et al. 2000]. Unter Vorhandensein der dominant-negativen Caspase-9 fand sich nach Stimulation mit 4-OH-Tm und T/I eine etwas höhere *Il2*-Expression als in den allein C/EBP $\beta$  exprimierenden Zellen (Spuren 8 und 12).



**Abbildung 3.22: Caspase-9F scheint die Reduktion von *I12* durch C/EBP $\beta$  etwas abzuschwächen.** Schwärzegradbestimmung von Abb. 3.20 in Bezug auf L32 und GAPDH, Ribonuklease-Protektionsanalyse mCK-1, IL-4.

Bei der Messung der *Ifng*-RNA ließ sich hier der Effekt einer Aktivierung von C/EBP $\beta$  nicht so deutlich zeigen wie im obigen Experiment. Am ehesten schien es sich um einen Artefakt aufgrund deutlich höherer RNA-Menge in Spur 8 zu handeln. Unter zusätzlicher Überexprimierung von Caspase-9F fand sich hier eher eine Abschwächung der *Ifng*-Suppression durch C/EBP $\beta$ .



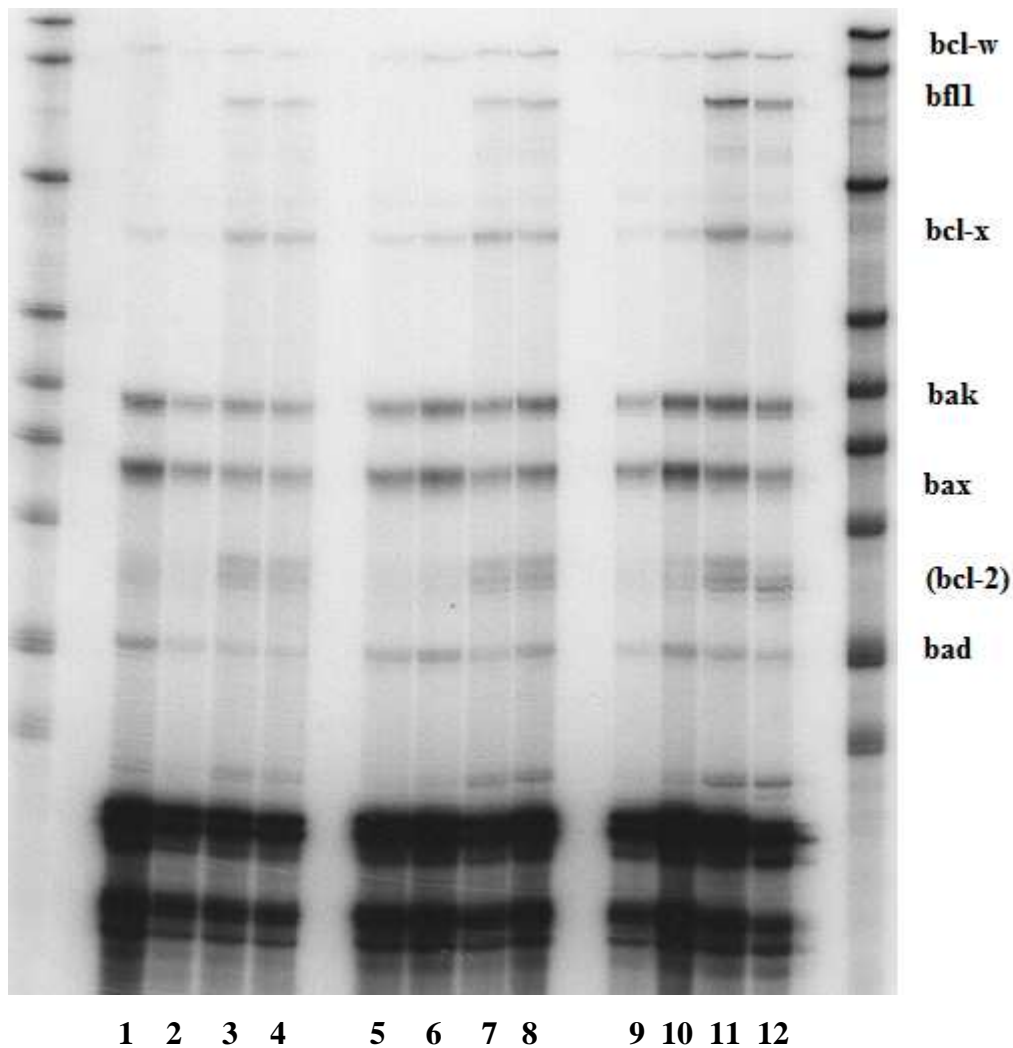
**Abbildung 3.23: Caspase-9F scheint die Suppression von *Ifng* durch C/EBP $\beta$  leicht abzuschwächen.** Schwärzegradbestimmung von Abb. 3.20 in Bezug auf L32 und GAPDH, Ribonuklease-Protektionsanalyse mCK-1, IL-4.

Zusammenfassend zeigte sich in dieser Ribonuklease-Protektionsanalyse, dass zusätzliche Expression der dominant-negativen Caspase-9 nur geringe Auswirkungen auf die durch C/EBP $\beta$  vermittelten Veränderungen des Interleukinmusters [Berberich-Siebelt et al. 2000] besitzt. Die Induktion von *Il4* durch C/EBP $\beta$  war hier nicht beeinträchtigt, wohingegen die Suppression von *Il2* und *Ifng* leicht abgeschwächt erschien.

### 3.7.2 Dominant-negative Caspase-9 steigert die Expression sowohl pro- als auch antiapoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie.

Im Folgenden sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine Überexpression und Aktivierung von C/EBP $\beta$  die Expression der pro- und antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie beeinflusst und ob dies durch kompetitive Hemmung der Caspase-9 verändert werden kann. Mit den bereits im obigen Versuch verwendeten RNA-Extrakten der mit C/EBP $\beta$  und Caspase-9F doppelt infizierten EL-4 Zellen wurde dies in einer Ribonuklease-Protektionsanalyse untersucht. Verwendet wurde hierfür das Probenet mApo2 von RiboQuant™ nach obigem Protokoll für die oben genannten Ansätze.

	EGZ/EYZ				C/EBP $\beta$ /EYZ				C/EBP $\beta$ /Caspase9F			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
-	X				X				X			
4-OH-Tm		X				X				X		
T/I			X				X				X	
T/I + 4-OH-Tm				X				X				X



**Abbildung 3.24: Dominant-negative Caspase-9 steigert die Expression pro- und antiapoptotischer Bcl-2-Mitglieder.** Ribonuklease-Protektionsanalyse mApo2 der doppelt infizierten Zellen EGZ/EYZ, C/EBP $\beta$ /EYZ, C/EBP $\beta$ /Caspase9F. Detektiert wurden die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl2-Familie bcl-w, bfl1 (A1), bcl-x und die proapoptotischen bak, bax und bad. Die Unterschiede der eingesetzten RNA-Mengen sind größtenteils ausgeglichen, nur in Spur 1 und 10 wurde eine größere RNA-Menge eingesetzt.

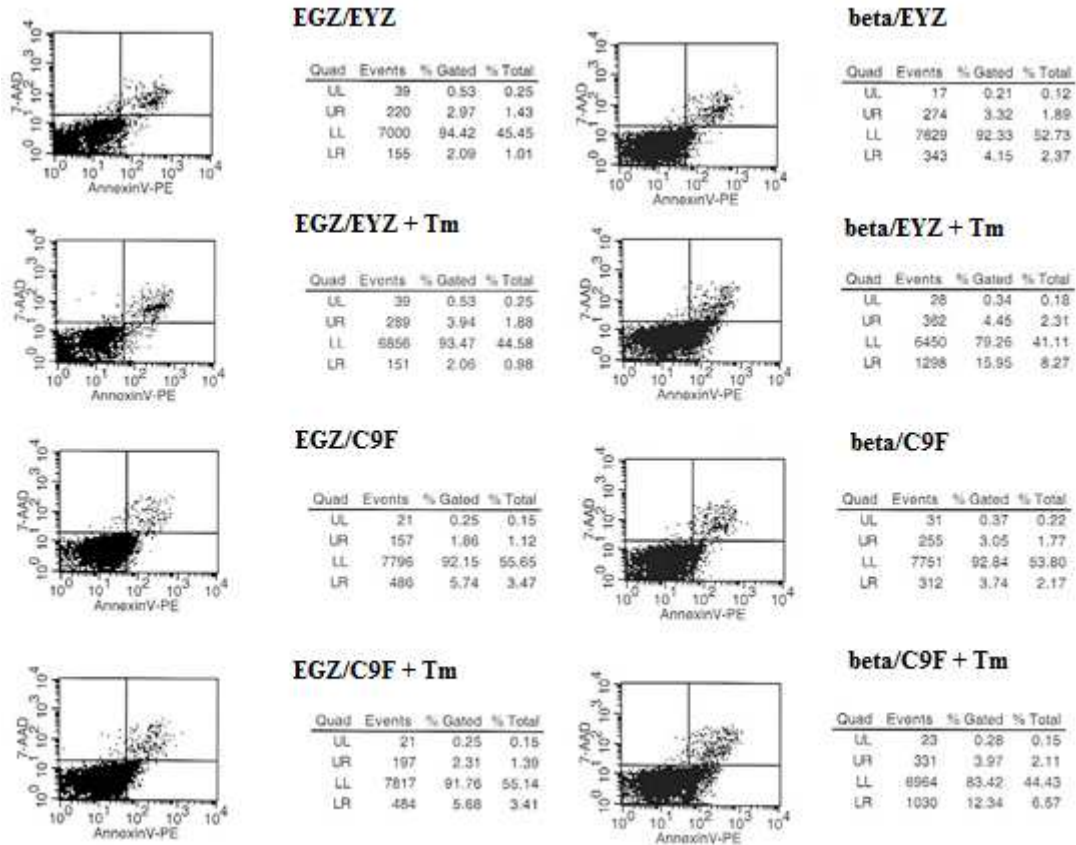
Sowohl die augenoptische Betrachtung des Autoradiogramms wie detaillierte Phosphoimager-Auswertungen (nicht gezeigt) ergaben keine qualitative Veränderung der Bcl2-Familie. Allenfalls konnte ein leichter und gleichzeitiger Anstieg der pro- und anti-apoptotischen Mitglieder durch C/EBP $\beta$  und mehr noch in Anwesenheit von dominant-negativer Caspase-9 festgestellt werden. Das Gleichgewicht war nicht verschoben.

### **3.8 Dominant-negative Caspase-9 vermag nicht, die Zellen vor einer durch C/EBP $\beta$ verstärkten Apoptose zu retten.**

Auch für die mit dominant-negativer Caspase-9 infizierten Zellen führten wir, um die funktionelle Bedeutung einer Hemmung dieser Caspase zu zeigen, eine FACS-Analyse von mit Annexin V-PE und 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) gefärbten Zellen wie in 3.6 beschrieben durch.

Auch hier wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen pro Ansatz mit je zwei Ansätzen pro Zelllinie eingesetzt. Je einer der beiden Ansätze EGZ/EYZ, EGZ/Caspase9F, C/EBP $\beta$ /EYZ und C/EBP $\beta$ /Caspase9F wurde über 20 Stunden mit Tamoxifen (4-OH-Tm) stimuliert. Nach Färbung der Zellen mit Annexin V-PE und 7-AAD erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse mittels FACScan. Hier zeigte sich, ähnlich wie bei den die dominant-negative Form der Caspase-3 tragenden Zellen, dass auch eine Infektion mit einer dominant-negativen Caspase-9 die Zellen nicht vor der unter Aktivierung von C/EBP $\beta$  verstärkten Apoptose retten kann.

In den Kontrollen mit EGZ/EYZ und EGZ/Caspase9F fanden sich ähnliche Anteile Annexin V-PE- und 7-AAD-positiver Zellen. In den C/EBP $\beta$ /EYZ-Zellen zeigte sich der beschriebene Shift zu einem erhöhten Anteil Annexin V- und 7-AAD-positiver Zellen nach Behandlung mit 4-OH-Tm. Ohne Stimulation waren bei den C/EBP $\beta$ /EYZ-Zellen 4,15 % Annexin V-positiv Zellen. Unter 4-OH-Tm waren 15,95 % der beobachteten Zellen apoptotisch. Ein ähnlicher Befund ergab sich auch bei den zusätzlich Caspase-9F tragenden Zellen. Hier zeigte sich ein Anstieg der Annexin V-positiven Zellen von 3,74 % ohne Stimulation auf 12,34 % mit 4-OH-Tm. Auch die Expression der Caspase-9F und somit Inhibition der endogenen Caspase-9 konnte die Zellen nicht vor der durch Aktivierung von C/EBP $\beta$  verstärkten Apoptose schützen.



**Abbildung 3.25: Die durch Überexpression und Aktivierung von C/EBP $\beta$  verstärkte Apoptose kann durch Hemmung der Caspase-9 nicht verhindert werden.** Annexin V-PE- und 7-AAD-Färbung von EL-4 Zellen mit retroviraler Expression der Vektoren EGZ/EYZ, C/EBP $\beta$ /EYZ, EGZ/Caspase9F und C/EBP $\beta$ /Caspase9F, 5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Ansatz, unstimuliert und stimuliert mit 4-OH-Tm („Tm“) über 20 Stunden.

## 4 Diskussion

Der Transkriptionsfaktor C/EBP $\beta$  besitzt zahlreiche Funktionen bei Wachstums- und Differenzierungsvorgängen in verschiedenen Geweben. In murinen T-Lymphozyten transaktiviert er durch direkte Bindung an den *Il4*-Promotor das *Il4*-Gen und fördert so T<sub>H</sub>2-Immunantworten [Berberich-Siebelt et al. 2000]. Berberich-Siebelt et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass C/EBP $\beta$  proliferationshemmend wirkt. Über Bindung an den *Myc*-Promotor reprimiert es *Myc*, wodurch es zu einem Zellzyklusarrest in der G1 Phase des Zellzyklus kommt. [Berberich-Siebelt et al. 2006] Eine Zellzyklusanalyse mittels Propidiumjodidfärbung von mit C/EBP $\beta$ -ER<sup>TM</sup> transduzierten EL-4 T-Zellen zeigte bei den über drei Tage mit Tamoxifen (4-OH-Tm) behandelten Zellen doppelt so viele Zellen in der G1-Phase wie bei der unstimulierten Kontrolle. Auffallend war auch eine kleine Spitze unterhalb der G1-Phase, in der Sub-G1-Phase, ein Indiz für abgelaufene Apoptose, die sich ebenfalls nur bei den mit 4-OH-Tm stimulierten Zellen fand. [Berberich-Siebelt et al. 2006] 4-OH-Tm ermöglicht im Rahmen des ER<sup>TM</sup>-Konstruktes die induzierte nukleäre Translokation und damit spezifische Aktivierung von C/EBP $\beta$ . Aufgabe dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob C/EBP $\beta$  apoptosefördernd wirkt und welche Signalwege dabei beeinflusst werden. Mittels Hemmung ausgewählter Caspasen sollte versucht werden, die Apoptose zu hemmen. Gleichzeitig sollten die Auswirkungen einer solchen Inhibition auf das Verhalten der Zellen anhand von RNA-Expressionsanalysen der Interleukine und von für Proliferation, Differenzierung und Apoptose bedeutsamen Proteinen untersucht werden.

Mittels dreier Experimente fanden sich Hinweise darauf, dass C/EBP $\beta$  tatsächlich apoptosefördernd wirkt. So konnte durch Annexin-V- und 7-Amino-Actinomycin- (7-AAD) Färbung gezeigt werden, dass unter Überexpression und Aktivierung von C/EBP $\beta$  im Vergleich zu mit Kontrollvektor transduzierten oder nicht aktivierten EL-4 T-Zellen die Rate apoptotischer Zellen höher war. Durch Behandlung der EL-4 Zellen mit dem Pancaspaseinhibitor Z-VAD fmk ließ sich dieser Effekt reduzieren. Auch fand sich in den C/EBP $\beta$  überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Vektorkontrollen, den C/EBP $\beta$ LIP und C/EBP $\delta$  tragenden Zellen eine vermehrte Spaltung von PARP im Western Blot. Allerdings zeigten sich in den Färbeversuchen mit Annexin-V und 7-AAD unter zunehmender Stimulation mit Tamoxifen auch sehr viele doppelt-positive Zellen, sowohl in den Kontrollen als auch verstärkt in den C/EBP $\beta$  überexprimierenden Zellen. Dies ist ein Zeichen für spätapoptotische oder nekrotische Zellen. Da sich dies auch bei der Kontrolle in einer weiteren Färbung der doppeltransduzierten Zellen (Abb. 3.18) zeigte, wobei sich hier mehr apoptotische Zellen



fanden, ließ sich diese Rate spätapoptotischer Zellen am ehesten durch Bedingungen der Zellkultur unter Tamoxifenstimulation begründen. Methodisch könnte aufgrund der hohen Raten doppelt-positiver Zellen argumentiert werden, es handele sich um unspezifische Effekte oder Artefakte, da ein Fortschreiten *in vivo* wahrscheinlich dadurch verhindert wird, dass apoptotische Zellen beseitigt werden. Dennoch wurde deutlich, dass Vorhandensein und Aktivierung von C/EBP $\beta$  dazu führt, dass mehr Zellen (zunächst) apoptotisch werden und eine Beteiligung von Caspasen angenommen werden muss.

In einem weiteren Experiment wurden die mit C/EBP $\beta$  transduzierten EL-4 Zellen mit dem Pancaspaseinhibitor Z-VAD fmk behandelt. Da sich Z-VAD in einer Lösung in DMSO befand, wurden die Kontrollansätze mit DMSO alleine inkubiert. Bei diesen Ansätzen befanden sich die meisten Zellen durchflusszytometrisch im rechten oberen Quadranten, waren also Annexin-V- und 7-AAD-positiv. Die Ursache hierfür liegt am ehesten in den zytotoxischen Eigenschaften von DMSO begründet. Da aber die Behandlung mit Z-VAD fmk zu einer deutlichen Reduktion der absterbenden Zellen führte, konnte geschlossen werden, dass Caspasen im C/EBP $\beta$  vermittelten Zelltod beteiligt sind.

Weiterhin veranschaulichte der Nachweis der Spaltprodukte von PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) eine Aktivierung der Caspasekaskade. Das DNA-Reparaturenzym PARP stellt ein Substrat der Effektorcaspasen-3, -6 und -7 dar [Elmore 2007]. Typischerweise wird das 116 kD-Protein durch Caspase-3 in Fragmente von 89 kD und 24 kD gespalten [Chaitanya et al. 2010]. In Übereinstimmung mit der Positivkontrolle, einem Gesamtzellproteinextrakt einer apoptotischen Makrophagenlinie, zeigte sich das 89 kD – Spaltprodukt deutlich in den aktiviertes C/EBP $\beta$  tragenden EL-4 Zellen. Der Versuch einer Apoptoseinduktion mit Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) führte in allen Ansätzen zu einer stark verminderten Detektion sowohl der Fragmente als auch des vollständigen Proteins. Dies könnte ein Hinweis auf bereits erfolgte vollständige Degradation von PARP im Rahmen abgelaufener Apoptose oder Nekrose sein. Neben den 89 kD – Fragmenten fanden sich im C/EBP $\beta$ -Ansatz noch zahlreiche weitere Spaltprodukte verschiedener Größe. Übereinstimmend mit der Positivkontrolle zeigte sich ein ca. 55 kD großes Fragment, das aus einer Spaltung durch Cathepsine, die bei Nekrosevorgängen aktiv sind, resultieren könnte, oder durch eine Aktivität von Granzym A oder B [Chaitanya et al. 2010]. Die weiteren prominenten Fragmente ausschließlich im C/EBP $\beta$ -Ansatz von ca. 70 kD und 61 kD (schwächer ausgeprägt) könnten auch durch eine Spaltung im Rahmen von Nekrosevorgängen bewirkt sein [Chaitanya et al. 2010]. Anhand der nach C/EBP $\beta$  auftauchenden Bandenschar könnte es sich demnach um eine Mischform handeln, einerseits

Apoptose mit Aktivierung des Effektorcaspaseapparates, andererseits aber Nekrose mit Cathepsin-Spaltung. Zu einer näheren Spezifizierung wäre ein Nachweis der kleinen PARP-Spaltprodukte von 24 kD und 18,5 kD durch Caspase-3 bzw. Caspase-7-Aktivität hilfreich gewesen, die aber durch die Wahl der Gel-Prozentigkeit vernachlässigt wurde. So hätten nekrotische von spezifisch apoptotischen Spaltprodukten unterschieden werden und auch anteilmäßig bestimmt werden können. Nichtsdestotrotz fand sich zur Bestätigung Caspase-vermittelter Apoptosevorgängen in Anwesenheit von C/EBP $\beta$  auf RNA- und besonders auf Proteinebene eine Expressionssteigerung von Caspase-3.

Um die Signaltransduktionswege und die Rolle der Apoptose unter Aktivierung von C/EBP $\beta$  näher zu untersuchen, PARP insbesondere ein Substrat der Caspase-3 ist [Elmore 2007, Chaitanya et al. 2010] und Caspase-3 während der hier vorliegenden Untersuchungen als direktes oder indirektes Zielgen von C/EBP $\beta$  erkannt wurde, sollte Caspase-3 gehemmt werden. Dies geschah über Doppeltransduktion der EL-4 Zellen sowohl mit C/EBP $\beta$ -ER als auch einer dominant-negativen Form der Caspase-3. Hinsichtlich der Expression der Zytokine *Il4*, *Il2* und *Ifng* zeigten sich nur geringe Auswirkungen durch die Hemmung der Caspase-3. Die von Berberich-Siebelt et al. beschriebenen Effekte einer Expression und Aktivierung von C/EBP $\beta$ , d. h. eine Hochregulation von *Il4* und Suppression von *Il2* und *Ifng* [Berberich-Siebelt et al. 2000], waren - obwohl quantitativ - qualitativ nicht beeinflusst. Ein Augenmerk auf die Cytokinexpression ist deshalb wichtig, weil Caspasen neben der Vermittlung von Apoptose viele weitere zelluläre Vorgänge beeinflussen [Ranger et al. 2001, Garrido, Kroemer 2004]. So sind Aspekte von Proliferation und terminale Differenzierung der T-Zellen Caspase-8 reguliert [Garrido, Kroemer 2004]. Für B-Zellen ist beschrieben, dass Caspase-3 über sein Substrat p21 (kodiert von *Cdkn1a*) Proliferation hemmt [Woo et al. 2003]. Im Zusammenhang mit der analysierten Lymphokinexpression ist es erwähnenswert, dass auch ein Mitglied der Transkriptionsfaktorenfamilie „nuclear factor of activated T cells“ (NFAT) Ziel von Caspase-3 ist [Wu et al. 2006]. NFATc1 und NFATc2 werden in den T-Zellen nach Erkennung des Antigens, also durch den TCR, aktiviert und sind maßgeblich an der Expression von Interleukinen beteiligt. [Serfling et al. 2007, Müller, Rao 2010] Studien von NFAT-defizienten Mäusen legen nahe, dass das Caspase-3-Substrat NFATc2 eher Th1-Lymphokine transaktiviert. [Serfling et al. 2000, Müller, Rao 2010] Da C/EBP $\beta$  einen stark positiven Einfluss auf die IL-4 Expression hat und, wie in dieser Arbeit gezeigt, die Expression und v. a. die Aktivität von Caspase-3 steigert, könnte neben der direkten transkriptionellen Aktivierung auch eine Verschiebung des NFAT-Verhältnisses eine Rolle spielen. Die Überexpression der dominant-negativen Caspase-3 konnte dem aber nicht entscheidend entgegenwirken, so dass eine

NFATc2-Spaltung von eher untergeordneter Bedeutung zu sein scheint. Andererseits weisen EL-4 Zellen sowieso einen ungewöhnlich hohen Anteil an NFATc1 auf. Demnach mag dies ein möglicher Regulationsmechanismus in primären T-Zellen sein, wenn unter bestimmten Aktivitäts- und Differenzierungszuständen NFATc2 über NFATc1 dominiert. Tatsächlich belegen Experimente mit *Cebpb<sup>fl/fl</sup>* x *Cd4cre*-Mäusen eine wesentlich erhöhte NFATc2-Expression in T-Zellen [Berberich-Siebelt, persönliche Mitteilung].

*Nfatc2<sup>-/-</sup>* Mäuse produzieren hyperproliferative T- und B-Zellen, was dadurch erklärt wird, dass *Fasl* ein transaktiviertes und *Cdk4* ein transreprimiertes Zielgen ist [Hodge et al. 1996, Xanthoudakis et al. 1996]. Die Zellen können also nicht mehr über Fas:FasL getötet werden, verlieren aber auch intrinsisch einen Mitspieler der Zellzykluskontrolle, was in dieser Argumentationskette auch durch C/EBP $\beta$ -Expression wie z. B. in T<sub>H</sub>2-Zellen [Berberich-Siebelt et al. 2000] und sukzessive erhöhte Caspase-3-Aktivität (diese Arbeit) erreicht werden könnte.

Für Tumorzellen des Pankreas wurde publiziert, dass NFATc1 oder NFATc2 *Myc* transaktivieren [Singh et al. 2010]. In primären T-Zellen ist dies aber nicht zu beobachten [Berberich-Siebelt, persönliche Mitteilung]. Entsprechend zeigte sich in dieser Arbeit für die Familie der Myc/Mad/Max-Proteine der beschriebene repressive Effekt von C/EBP $\beta$  auf die RNA-Expression von *Myc*, der durch direkte Repression – des nicht sumoylierten – C/EBP $\beta$  am *Myc* Promotor verursacht ist [Berberich-Siebelt et al. 2006]. Eine Hemmung der Caspase-3 beeinflusste dies nicht. Interessanterweise fanden sich aber Hinweise auf eine vermehrte Hochregulation von *Mad4*, das durch c-Myc negativ reguliert ist [Kime, Wright 2003]. C-Myc bildet zusammen mit Miz-1 in undifferenzierten, proliferierenden Zellen einen Repressorkomplex in der Initiatorregion des *Mad4*-Promotors. In transienten Transfektionsstudien kann Miz-1 den Promotor alleine aktivieren. Man nimmt daher an, dass der *Mad4*-Anstieg im Verlauf der Zelldifferenzierung mitunter durch eine Abnahme von der durch c-Myc vermittelten Repression des *Mad4*-Promotors verursacht ist. [Kime, Wright 2003] Indem C/EBP $\beta$  am ehesten über Rekrutierung von Coaktivatoren/Corepressoren wie beispielsweise p300, CBP („CREB-binding protein“) oder Histondeacetylase 1 den *Myc*-Promotor hemmt [Berberich-Siebelt et al. 2006], kommt es zu einer Derepression von *Mad4*. Dies zeigt sich an der vermehrten *Mad4*-RNA unter Aktivierung von C/EBP $\beta$  [Berberich-Siebelt 2006]. Obgleich aber eine Hemmung der Caspase-3 die Inhibition von *Myc* durch C/EBP $\beta$  nicht weiter verstärkte, schien *Mad4* dennoch höher exprimiert als unter alleiniger Aktivierung von C/EBP $\beta$ . Schon bei ausschließlicher Hemmung der Caspase-3 fiel eine geringe

Induktion von *Mad4*-RNA auf. Hieraus ergibt sich die Frage, ob unter Hemmung von Caspase-3 vermehrt Wege der Zelldifferenzierung beschriftet werden bzw. Caspase-3 auch für manche Aspekte der Proliferation benötigt wird. Desweiteren bestärkt dies den Befund, dass die Menge an *Mad4* nicht ausschließlich über die An- und Abwesenheit von c-Myc bestimmt sein muss [Marcotte et al. 2005].

Woo et al. zeigten, dass Caspase-3 für Apoptosevorgänge eine essentielle Rolle besitzt, ihre Funktion jedoch stark gewebe- und zellabhängig ist [Woo et al. 1998]. Auch scheinen in bestimmten Situationen mehrere Caspasen zusammenzuarbeiten, sich in ihrer Funktion zu ergänzen und gegenseitig zu kompensieren. So konnte eine Aktivierung von Caspase-7 in Caspase-3-defizienten apoptotischen Zellen nachgewiesen werden. [Woo et al. 1998] In EL-4-Zellen mit dominant-negativer Caspase-3 hingegen wurde Effektorcaspase-7 in allen Zellen in konstanter Menge exprimiert. Allerdings fiel eine Steigerung der *Caspase11*-RNA in den C/EBP $\beta$  und dominant-negative Caspase-3 exprimierenden Zellen auf. Caspase-11 ist eine murine Caspase, die in gesunden Zellen nicht nachweisbar ist. Am ehesten entspricht sie der menschlichen Caspase-4, zu der sie zu 60% homolog ist. Sie gehört zu der Gruppe der inflammatorischen Caspasen. Durch LPS (Lipopolysaccharid) sowie zahlreiche apoptotische Stimuli, wozu auch schon Transfektion von Kulturzellen zählen kann, wird Caspase-11 hochreguliert. Sie besitzt eine essentielle Rolle als Mediator des septischen Schocks, indem sie für die Aktivierung von Caspase-1 („ICE“) und somit der IL-1 $\beta$ -Produktion sowie der Reifung anderer Zytokine durch ICE notwendig ist. [Wang et al. 1998, Kang et al. 2000] Kang et al. beschreiben darüber hinaus, dass Caspase-11 unter pathologischen Bedingungen im Mausmodell eines zerebralen Infarktgeschehens neben Caspase-1 auch Caspase-3 direkt aktivieren kann. So finden sich bei diesem Modell deutlich weniger apoptotische Zellen in den Caspase-11-*knockout*-Mäusen. [Kang et al. 2000] Des Weiteren steht Caspase-11 wie auch Caspase-1 im Zentrum der *Pyroptosis*, der Form eines proinflammatorischen Zelltodes im Rahmen der Immunabwehr [Casson, Shin 2013]. Während nun C/EBP $\beta$  alleine nicht zu mehr Caspase11 führte, schien C/EBP $\beta$  in Kombination mit Hemmung der Caspase-3 *Caspase11* zu induzieren. Denkbar ist, dass im Sinne einer kompensatorischen Reaktion Caspase-11, ebenfalls potentieller Aktivator von Caspase-3, hochreguliert wird, um dennoch einen Vollzug der Apoptose zu ermöglichen. Direkt transkriptionell reguliert durch C/EBP $\beta$  war nur Caspase-3, deren Hemmung durch Überexpression der dominant-negativen Form durch Steigerung der endogenen (RNA-) Menge kompensiert wurde.

Trotz der eindeutigen Verbindung zwischen C/EBP $\beta$  und Caspase-3 zeigte sich jedoch, dass eine funktionelle Hemmung der endogenen Caspase-3-Aktivierung allenfalls einen etwas verzögernden Einfluss auf die durch Aktivierung von C/EBP $\beta$  induzierte Apoptose besaß. Nur bei einem geringen Zellanteil war dies der Fall, so dass Caspase-3 zumindest nicht allein für die C/EBP $\beta$  vermittelte Apoptose verantwortlich gemacht werden kann. In der Western Blot Analyse (Abb. 3.5) fanden sich deutlich größere Mengen an Caspase-3-Mutante in unstimulierten Zellen, weshalb eine suffiziente Hemmung der Caspase-3-Aktivierung anzunehmen war. Doch konnte unter Stimulation eine vermehrte Expression endogener Caspase-3 in den C/EBP $\beta$ -Zellen beobachtet werden. So könnte die Hemmung der Caspase-3 doch nicht in ausreichendem Maße erfolgt sein, bleibt aber unwahrscheinlich. Gegen eine mögliche Aktivierung caspaseunabhängiger Apoptosewege unter Aktivierung von C/EBP $\beta$  sprach die Apoptosehemmung durch den Caspaseinhibitor Z-VAD fmk. So ist auch eine unter Hemmung von Caspase-3 mögliche kompensatorische Aktivierung alternativer Caspasen bzw. Apoptosewege wie beispielsweise von Caspase-7 oder des intrinsischen Apoptoseweges denkbar. Ein Aspekt, der während der Experimente völlig vernachlässigt wurde, ist die Kompartementalisierung von Caspasen. Besonders für Caspase-3 ist dies – wenn auch nicht für T-Zellen – beschrieben [Connolly et al. 2014], so dass die dominant-negative Caspase-3 möglicherweise anders lokalisiert war als die endogene Caspase-3 und deshalb nicht zur Hemmung der C/EBP $\beta$  vermittelten Apoptose führen konnte.

Um den Signalweg einer durch C/EBP $\beta$  medierten Apoptose näher zu spezifizieren, wurde Caspase-9, die als Initiatorcaspase im Zentrum des intrinsischen, mitochondrialen Weges steht, gehemmt. Dies geschah mittels Überexpression einer dominant-negativen Form, die ähnlich wie Caspase-3 nicht durch Spaltung aktiviert werden kann. Auch hierdurch konnte funktionell die durch Aktivierung von C/EBP $\beta$  ausgelöste Apoptose von EL-4 Zellen nicht verhindert werden, was in einer Annexin-V- und 7-AAD-Färbung durchflußzytometrisch gezeigt wurde. Dennoch interessierte hier auch ein möglicher Einfluss von C/EBP $\beta$  und einer Hemmung der Caspase-9 auf die Expression der Mitglieder der Bcl-2-Familie Unter C/EBP $\beta$  und besonders bei zusätzlicher Hemmung von Caspase-9 zeigten sich RNA-Expressionsanstiege sowohl der antiapoptotischen Proteine *A1* und *Bclx*, als auch der proapoptotischen *Bak*, *Bax* und *Bad*. Hier fanden sich insgesamt keine richtungsweisenden Effekte, die alleine die apoptosefördernde Wirkung von C/EBP $\beta$  erklären könnten. Allerdings ergaben - übereinstimmend mit den hier dargestellten Ergebnissen - Untersuchungen von Leberzellen von C/EBP $\beta$ -*Knockout*-Mäusen, dass diese für Fas-induzierte Apoptose viel unempfindlicher waren als solche von Wildtypmäusen und eine geringere Aktivierung von Caspase-3 aufwiesen [Mukherjee et al.

2001]. Als Erklärung hierfür zeigte sich in den *Knockout*-Tieren eine Erhöhung des antiapoptotischen Bcl-x<sub>L</sub>-Proteins bei jedoch unveränderter *Bclx<sub>L</sub>*-RNA. Dies weist auf eine Beteiligung von C/EBPβ an einer inhibierenden translationalen oder posttranslationalen Regulation von Bcl-x<sub>L</sub> hin [Mukherjee et al. 2001], die auch in T-Zellen zum Tragen kommen könnte und deren Apoptosevorgänge beeinflusst. Dass unterschiedliche Zellen allerdings sehr verschieden auf eine C/EBPβ-Expression reagieren, wird an Untersuchungen deutlich, bei denen C/EBPβ mit Inhibition rezeptorvermittelter Apoptose in Verbindung gebracht wird. So zeigten Buck et al. für hepatische Sternzellen, dass durch RSK (Ribosomale S6 Kinase) an Threonin<sup>217</sup> phosphoryliertes C/EBPβ eine funktionelle XEXD-Caspase-Substrat-Inhibitorbox bildet, durch die es mit Caspase-1 und Caspase-8 assoziiert und deren Aktivierung hemmt [Buck et al. 2001]. Auch scheint C/EBPβ mit dem Procaspase-8-Inhibitor FLIP<sub>L</sub> in hepatischen Sternzellen zu assoziieren und so über den MAPK-RSK-C/EBPβ-Signalweg an deren Apoptoseregulation beteiligt zu sein, wobei die genauen Mechanismen noch unklar sind [Buck, Chojkier 2007]. Eine Doppelinfektion mit dominant negativer Caspase-8 wurde versucht, führte aber – trotz wiederholter Anstrengungen – nicht zu einer stabilen Expression der Caspase-8-Mutante. Es ist denkbar, dass EL-4 Zellen die Hemmung der Caspase-8 nicht tolerieren. Eine lang bekannte, aber wenig verstandene Caspase ist Caspase-2 [Olsson et al. 2014]. Sie gehört zu den apikalen Mitgliedern, scheint aber nicht an den typischen Kaskaden teilzunehmen, obwohl sie zu mitochondrialer Cytochromfreisetzung und Apoptose führt. Sie ist an weiteren Stress induzierten Prozessen wie auch der Onkogen induzierten Seneszenz (OIS) beteiligt, denn solange Tumorsuppressoren wie p53 und/oder RB-Protein nicht inaktiviert wurden, sind Zellen mit entfesselten Onkogenen durch Apoptose oder OIS vor Entartung geschützt. OIS definiert dabei einen permanenten G1-Zellzyklusblock. Interessanterweise wurde C/EBPβ als wichtige Komponente in der Ras vermittelten OIS beschrieben, bei der es E2F-Zielgene inklusive Myc reprimiert. [Sebastian, Johnson 2006] Damit wäre Caspase-2 ein guter Kandidat für eine Umschaltung von OIS zu Apoptose, leider ein Aspekt, der zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung nicht offensichtlich war. Trotzdem verdeutlichen die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Einblicke in die proapoptotische Wirkung von C/EBPβ in murinen T-Zellen sowie die in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse, dass C/EBPβ neben vielen anderen wichtigen Zellfunktionen auch an Apoptosevorgängen in sehr vielgestaltiger und vielschichtiger Weise involviert ist. Eine Vertiefung dieser Thematik könnte dazu beitragen, die Rolle von C/EBPβ bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Tumoren, aber auch Erkrankungen des Immunsystems besser zu verstehen.

## 5 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor C/EBP $\beta$  gehört zu der Familie der C/EBP-Transkriptionsfaktoren, die in zahlreiche essentielle Organismusfunktionen involviert sind. Er selbst wird infolge translationaler Regulation in drei Isoformen, LAP\*, LAP und LIP exprimiert, wobei C/EBP $\beta$ LAP im Zentrum dieser Arbeit steht. C/EBP $\beta$  besitzt sehr vielgestaltige Funktionen und ist an Wachstums- und Differenzierungsvorgängen verschiedener Gewebe beteiligt. So fördert es in T-Lymphozyten über Transaktivierung des *Il4*-Promotors und Repression der T<sub>H</sub>1-Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  die Bildung eines T<sub>H</sub>2-Phänotyps [Berberich-Siebelt et al. 2000]. Durch Herabregulation von c-Myc bewirkt es einen Zellzyklusarrest in G1 und vermehrte Differenzierung der Zellen auch über eine reziproke Steigerung von Differenzierungsfaktoren wie Mad4 [Berberich-Siebelt et al. 2006]. In einer den G1-Arrest nachweisenden Zellzyklusanalyse von mit C/EBP $\beta$  transduzierten EL-4 Zellen zeigte sich daneben ein kleiner Sub-G1-Peak, der auf eine apoptotische Zellpopulation hinweist [Berberich-Siebelt et al. 2006]. Aufgabe dieser Arbeit war es, den möglichen Zusammenhang zwischen der Aktivierung von C/EBP $\beta$  und Auslösung von Apoptose in EL-4 Zellen hinsichtlich seiner Spezifität und dabei favorisierter Signalwege zu untersuchen.

Gegenstand der Untersuchungen waren mit dem C/EBP $\beta$ -ER<sup>TM</sup>-Konstrukt alleine und in Kombination mit dominant-negativen Mutanten der Caspase-3 und der Caspase-9 transduzierte EL-4 Kulturzellen. Durch Einbringen der Caspase-Mutanten sollte eine kompetitive Hemmung der entsprechenden endogenen Caspasen bewirkt werden. Methodisch erfolgten Apoptosenachweise mittels durchflusszytometrischer Analysen von mit Annexin V-PE und 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) gefärbten EL-4 Zellen sowie die Detektion von gespaltener PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase), einem Substrat der Caspase-3 im Western Blot. Des Weiteren erfolgten mittels Ribonuklease-Protektionsanalysen Untersuchungen der RNA-Expression von Zytokinen, Caspasen und von Mitgliedern der Myc- und der Bcl-2-Proteinfamilien, um das Verhalten der Zellen unter Hemmung von Apoptosewegen bzw. Caspasen bei Aktivierung von C/EBP $\beta$  näher betrachten zu können.

In Annexin V-PE- und 7-AAD-Färbungen sowie durch Nachweis der spezifischen Spaltung von PARP konnte gezeigt werden, dass C/EBP $\beta$  Zelluntergang und Apoptose fördert. Diese war durch den Pancaspaseinhibitor Z-VAD fmk hemmbar, was, wie auch die PARP-Spaltung, auf einen caspaseabhängigen Signalweg hinweist. Hemmung der Caspase-3 durch

Transduktion der Zellen mit einer Caspase-3-Mutante besaß kaum Einfluss auf die durch C/EBP $\beta$  veränderte Zytokinexpression und die Repression von c-Myc, doch erschien eine vermehrte Hochregulation des Differenzierungsfaktors *Mad4*, der endogenen *Caspase3*- und der *Caspase11*-RNA. Die Steigerung von Caspase-3 unter Aktivierung von C/EBP $\beta$  fand sich auch auf Proteinebene. Allerdings konnte eine Hemmung der Caspase-3 bei den untersuchten EL-4 Zellen die durch C/EBP $\beta$  vermittelte Apoptose nicht verhindern, was auf andere Apoptosewege oder kompensatorischer Effekte verwies. Durch Beeinflussung des intrinsischen Signalweges mit Hemmung der Caspase-9 zeigten sich ebenfalls kaum Auswirkungen auf die Zytokinexpression der untersuchten Zellen. Hier fanden sich Hochregulationen sowohl der pro- als auch antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie. Funktionell konnte auch eine Hemmung von Caspase-9 die Zellen nicht vor der Apoptose durch Aktivierung von C/EBP $\beta$  bewahren.

So konnte hier gezeigt werden, dass Aktivierung von C/EBP $\beta$  in den untersuchten EL-4 Zellen Apoptose fördern kann, dies über eine Aktivierung der Caspasekaskade zu geschehen scheint und mit einer Steigerung endogener Caspase-3-Expression einhergeht. Aus den Untersuchungen dieser Arbeit konnte eine Favorisierung eines bestimmten Apoptosesignalweges nicht abgeleitet werden, da eine Hemmung des intrinsischen Weges die Zellen nicht vor dem Zelltod schützen konnte. Zu ergänzen wäre eine Untersuchung des rezeptorvermittelten Signalweges durch Hemmung der Caspase-8, was im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

Insgesamt lässt sich aber, obwohl nicht alle Details geklärt werden konnten, festhalten, dass C/EBP $\beta$ LAP in T-Zellen neben Proliferationshemmung und Differenzierungsinduktion auch für Caspase vermittelten Zelltod verantwortlich ist.



## 6 Literaturverzeichnis

Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM (2002): T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol* 3, 549-557

Akira S, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T, Hirano T, Kishimoto T (1990): A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J* 9, 1897-1906

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996): Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171

Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, und Willems GM (1990): Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem* 265, 4923-4928

Ashkenazi A, Dixit VM (1998): Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308

Bedi R, Du J, Sharma AK, Gomes I, Ackerman SJ (2009): Human C/EBP-epsilon activator and repressor isoforms differentially reprogram myeloid lineage commitment and differentiation. *Blood* 113, 317-327

Berberich-Siebelt F, Berberich I, Andrulis M, Santner-Nanan B, Jha MK, Klein-Hessling S, Schimpl A, Serfling E (2006): SUMOylation interferes with CCAAT/enhancer-binding protein beta-mediated c-myc repression, but not IL-4 activation in T cells. *J Immunol* 176, 4843-4851

Berberich-Siebelt F, Klein-Hessling S, Hepping N, Santner-Nanan B, Lindemann D, Schimpl A, Berberich I, Serfling E (2000): C/EBPbeta enhances IL-4 but impairs IL-2 and IFN-gamma induction in T cells. *Eur J Immunol* 30, 2576-2585

Billin AN, Eilers AL, Queva C, Ayer DE (1999): Mlx, a novel Max-like BHLHZip protein that interacts with the Max network of transcription factors. *J Biol Chem* 274, 36344-36350

Black RA, Kronheim SR, Sleath PR (1989): Activation of interleukin-1 beta by a co-induced protease. *FEBS Lett* 247, 386-390

Buck M, Chojkier M (2007): C/EBPbeta associates with caspase 8 complex proteins and modulates apoptosis in hepatic stellate cells. *J Clin Gastroenterol* 41, 295-299

Buck M, Poli V, Hunter T, Chojkier M (2001): C/EBPbeta phosphorylation by RSK creates a functional XEXD caspase inhibitory box critical for cell survival. *Mol Cell* 8, 807-816

Calkhoven CF, Müller C, Leutz A (2000): Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression. *Genes Dev* 14, 1920-1932

Cao Z, Umek RM, McKnight SL (1991): Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 5, 1538-1552

Casson CN, Shin S (2013): Inflammasome-mediated cell death in response to bacterial pathogens that access the host cell cytosol: lessons from *Legionella pneumophila*. *Front Cell Infect Microbiol* 3, 111

Chaitanya GV, Steven AJ, Babu PP (2010): PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal* 8:31. doi: 10.1186/1478-811X-8-31.

Chang CJ, Chen TT, Lei HY, Chen DS, Lee SC (1990): Molecular cloning of a transcription factor, AGP/EBP, that belongs to members of the C/EBP family. *Mol Cell Biol* 10, 6642-6653

Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159

Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK (2008): Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 151, 10-27

Coffman RL, Carty J (1986): A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. *J Immunol* 136, 949-954

Cohen GM (1997): Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem J* 326, 1-16

Connolly PF, Jäger R, Fearnhead HO (2014): New roles for old enzymes: killer caspases as the engine of cell behavior changes. *Front Physiol* 149. doi: 10.3389/fphys.2014.00149. eCollection 2014.

Constance CM, Morgan JI 4th, Umek RM (1996): C/EBPalpha regulation of the growth-arrest-associated gene gadd45. *Mol Cell Biol* 16, 3878-3883

Cooper C, Henderson A, Artandi S, Avitahl N, Calame K (1995): Ig/EBP (C/EBP gamma) is a transdominant negative inhibitor of C/EBP family transcriptional activators. *Nucleic Acids Res* 23, 4371-4377

Cory S, Adams JM (2002): The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656

Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA (1998): The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 273, 30057-30060

Descombes P, Chojkier M, Lichtsteiner S, Falvey E, Schibler U (1990): LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. *Genes Dev* 4, 1541-1551

Descombes P, Schibler U (1991): A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* 67, 569-579

Diolaiti D, McFerrin L, Carroll PA, Eisenman RN (2014): Functional interactions among members of the MAX and MLX transcriptional network during oncogenesis. *Biochim Biophys Acta*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.05.016>

Djuretic IM, Levanon D, Negreanu V, Groner Y, Rao A, Ansel KM (2007): Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate *Ifng* and silence *Il4* in T helper type 1 cells. *Nat Immunol* 8, 145-153

Eberstadt M, Huang B, Chen Z, Meadows RP, Ng SC, Zheng L, Lenardo MJ, Fesik SW (1998): NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature* 392, 941-945

Eckart WU (1998): *Geschichte der Medizin*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 246

Eckhart L, Ballaun C, Uthman A, Kittel C, Stichenwirth M, Buchberger M, Fischer H, Sipos W, Tschachler E (2005): Identification and characterization of a novel mammalian caspase with proapoptotic activity. *J Biol Chem* 280, 35077-35080

Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR (1991): Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7, 663-698

Elmore S (2007): Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM (1992): Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148, 2207-2216

Flodby P, Barlow C, Kylefjord H, Ahrlund-Richter L, Xanthopoulos KG (1996): Increased hepatic cell proliferation and lung abnormalities in mice deficient in CCAAT/enhancer binding protein alpha. *J Biol Chem* 271, 24753-24760

Freytag SO, Geddes TJ (1992): Reciprocal regulation of adipogenesis by Myc and C/EBP alpha. *Science* 256, 379-382

Garrido C, Kroemer G (2004): Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Curr Opin Cell Biol* 16, 639-646

Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, Presky DH (1998): The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 495-521

Ghannam A, Fauquert JL, Thomas C, Kemper C, Drouet C (2014): Human complement C3 deficiency: Th1 induction requires T cell-derived complement C3a and CD46 activation. *Mol Immunol* 58, 98-107

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74

Grandori C, Cowley SM, James LP, Eisenman RN (2000): The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 653-699

Hamalainen-Laanaya HK, Kobie JJ, Chang C, Zeng W (2007): Temporal and spatial changes of histone 3 K4 dimethylation at the IFN- $\gamma$  gene during Th1 and Th2 cell differentiation. *J Immunol* 179, 6410-6415

Hodge MR, Ranger AM, Charles de la Brousse F, Hoey T, Grusby MJ, Glimcher LH (1996): Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* 4, 397-405

Hsu W, Kerppola TK, Chen PL, Curran T, Chen-Kiang S (1994): Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region. *Mol Cell Biol* 14, 268-276

- Hwang ES, Szabo SJ, Schwartzberg PL, Glimcher LH (2005): T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science* 307, 430-433
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2002): *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1-93 und 240-274
- Kaisho T, Tsutsui H, Tanaka T, Tsujimura T, Takeda K, Kawai T, Yoshida N, Nakanishi K, Akira S (1999): Impairment of natural killer cytotoxic activity and interferon gamma production in CCAAT/enhancer binding protein gamma-deficient mice. *J Exp Med* 190, 1573-1582
- Kallies A, Hawkins ED, Belz GT, Metcalf D, Hommel M, Corcoran LM, Hodgkin PD, Nutt SL (2006): Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance. *Nat Immunol* 7, 466-474
- Kang SJ, Wang S, Hara H, Peterson EP, Namura S, Amin-Hanjani S, Huang Z, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Thornberry NA, Moskowitz MA, Yuan J (2000): Dual role of caspase-11 in mediating activation of caspase-1 and caspase-3 under pathological conditions. *J Cell Biol* 149, 613-622
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972): Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257
- Khaled AR, Durum SK (2002): Lymphocide: Cytokines and the control of lymphoid homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2, 817-830
- Kiani A, Viola JP, Lichtman AH, Rao A (1997): Down-regulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving NFAT1. *Immunity* 7, 849-860
- Kime L, Wright SC (2003): Mad4 is regulated by a transcriptional repressor complex that contains Miz-1 and c-Myc. *Biochem J* 370, 291-298
- Kirchhoff S, Müller WW, Li-Weber M, Krammer PH (2000): Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells. *Eur J Immunol* 30, 2765-2774
- Knodel M, Kuss AW, Lindemann D, Berberich I, und Schimpl A (1999): Reversal of Blimp-1-mediated apoptosis by A1, a member of the Bcl-2 family. *Eur J Immunol* 29, 2988-2998

Koenen P, Heinzl S, Carrington EM, Hoppo L, Alexander WS, Zhang JG, Herold MJ, Scott CL, Lew AM, Strasser A, Hodgkin PD (2013): Mutually exclusive regulation of T cell survival by IL-7R and antigen receptor-induced signals. *Nat Commun* 4:1735. doi: 10.1038/ncomms2719

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH (1994): Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 1415-1420

Kostura MJ, Tocci MJ, Limjuco G, Chin J, Cameron P, Hillman AG, Chartrain NA, Schmidt JA (1989): Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5227-5231

Kumar S, Vaux DL (2002): A Cinderella caspase takes center stage. *Science* 297, 1290-1291

Kumar S (2009): Caspase 2 in apoptosis, the DNA damage response and tumour suppression: enigma no more? *Nat Rev Cancer* 9, 897-903

Kuss AW, Knodel M, Berberich-Siebelt F, Lindemann D, Schimpl A, und Berberich I (1999): A1 expression is stimulated by CD40 in B cells and rescues WEHI 231 cells from anti-IgM-induced cell death. *Eur J Immunol* 29, 3077-3088

Lamb J, Ramaswamy S, Ford HL, Contreras B, Martinez RV, Kittrell FS, Zahnow CA, Patterson N, Golub TR, Ewen ME (2003): A mechanism of cyclin D1 action encoded in the patterns of gene expression in human cancer. *Cell* 114, 323-334

Landschulz WH, Johnson PF, Adashi EY, Graves BJ, McKnight SL (1988): Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP. *Genes Dev* 2, 786-800

Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL (1989): The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. *Science* 243, 1681-1688

Lane DP (1992): Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16

Lane MD, Tang QQ, Jiang MS (1999): Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 266, 677-683

Lassus P, Opitz-Araya X, Lazebnik Y (2002): Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* 297, 1352-1354

Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. (1990): Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* 172, 921-929

LeClair KP, Blonar MA, Sharp PA (1992): The p50 subunit of NF-kappa B associates with the NF-IL6 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8145-8149

Lecoeur H, de Oliveira-Pinto LM, Gougeon ML (2002): Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay. *J Immunol Methods* 265, 81-96

Lekstrom-Himes J, Xanthopoulos KG (1998): Biological Role of the CCAAT/Enhancer-binding Protein Family of Transcription Factors. *J Biol Chem* 273, 28545-28548

Lekstrom-Himes J, Xanthopoulos KG (1999): CCAAT/enhancer binding protein epsilon is critical for effective neutrophil-mediated response to inflammatory challenge. *Blood* 93, 3096-3105

Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD, Nguyen BV, Gadina M, Sher A, Paul WE, O'Shea JJ (2001): T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15137-15142

Lin CY, Lovén J, Rahl PB, Paranal RM, Burge CB, Bradner JE, Lee TI, Young RA (2012): Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell* 151, 56-67

Lin FT, MacDougald OA, Diehl AM, Lane MD (1993): A 30-kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein alpha message: transcriptional activator lacking antimitotic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9606-9610

Lindemann D, Patriquin E, Feng S, und Mulligan RC (1997): Versatile retrovirus vector systems for regulated gene expression in vitro and in vivo. *Mol Med* 3, 466-476

Link JM, Hurlin PJ (2014): The activities of MYC, MNT and the MAX-interactome in lymphocyte proliferation and oncogenesis. *Biochim Biophys Acta*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.04.004>

Listman JA, Wara-aswapati N, Race JE, Blystone LW, Walker-Kopp N, Yang Z, Auron PE (2005): Conserved ETS domain arginines mediate DNA binding, nuclear localization, and a novel mode of bZIP interaction. *J Biol Chem* 280, 41421-41428

Liszewski MK, Kolev M, Le Friec G, Leung M, Bertram PG, Fara AF, Subias M, Pickering MC, Drouet C, Meri S, Arstila TP, Pekkarinen PT, Ma M, Cope A, Reinheckel T, Rodriguez de Cordoba S, Afzali B, Atkinson JP, Kemper C (2013): Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. *Immunity* 39, 1143-1157

Littlewood TD, Hancock DC, Danielian PS, Parker MG, und Evan GI (1995): A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res* 23, 1686-1690

Littlewood TD, Kreuzaler P, Evan GI (2012): All Things to All People. *Cell* 151, 11-13

Lohoff M, Mittrücker HW, Prechtel S, Bischof S, Sommer F, Kock S, Ferrick DA, Duncan GS, Gessner A, Mak TW (2002): Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11808-11812

Lu B, Yu H, Chow C, Li B, Zheng W, Davis RJ, Flavell RA (2001): GADD45gamma mediates the activation of the p38 and JNK MAP kinase pathways and cytokine production in effector TH1 cells. *Immunity* 14, 583-590

Macatonia SE, Hsieh CS, Murphy KM, O'Garra A (1993): Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4+ T cells from alpha beta TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN-gamma production is IFN-gamma-dependent. *Int Immunol* 5, 1119-1128

Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S (1993): Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med.* 177, 1199-1204

Marcotte R, Chen JM, Huard S, Wang E (2005): c-Myc creates an activation loop by transcriptionally repressing its own functional inhibitor, hMad4, in young fibroblasts, a loop lost in replicatively senescent fibroblasts. *J Cell Biochem* 96, 1071-1085

Marsden VS, O'Connor L, O'Reilly LA, Silke J, Metcalf D, Ekert PG, Huang DC, Cecconi F, Kuida K, Tomaselli KJ, Roy S, Nicholson DW, Vaux DL, Bouillet P, Adams JM, Strasser A (2002): Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* 419, 634-637



Martins GA, Cimmino L, Shapiro-Shelef M, Szabolcs M, Herron A, Magnusdottir E, Calame K (2006): Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function. *Nat Immunol* 7, 457-465

Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwig EA, Yuan J (1993): Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 75, 653-660

Morgan DO (1997): Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 261-291

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986): Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357

Mosmann TR, Coffman RL (1989): TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu rev immunol* 7, 145-173

Mukherjee D, Kaestner KH, Kovalovich KK, Greenbaum LE (2001): Fas-induced apoptosis in mouse hepatocytes is dependent on C/EBPbeta. *Hepatology* 2001, 1166-1172

Müller MR, Rao A (2010): NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol* 10, 645-656

Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, Kung AL, Cereb N, Yao TP, Yang SY, Reiner SL (2001): Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292, 1907-1910

Mullen AC, Hutchins AS, High FA, Lee HW, Sykes KJ, Chodosh LA, Reiner SL (2002): Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction. *Nat Immunol* 3, 652-658

Murphy KL, Reiner SL (2002): The lineage decisions of helper t cells. *Nat Rev Immunol* 2, 933-944

Neighbors M, Xu X, Barrat FJ, Ruuls SR, Churakova T, Debets R, Bazan JF, Kastelein RA, Abrams JS, O'Garra A (2001): A critical role for interleukin 18 in primary and memory effector responses to *Listeria monocytogenes* that extends beyond its effects on Interferon gamma production. *J Exp Med* 194, 343-354

Nie Z, Hu G, Wei G, Cui K, Yamane A, Resch W, Wang R, Green DR, Tessarollo L, Casellas R, Zhao K, Levens D (2012): c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell* 151, 68-79

Nuchprayoon I, Simkevich CP, Luo M, Friedman AD, Rosmarin AG (1997): GABP cooperates with c-Myb and C/EBP to activate the neutrophil elastase Promotor. *Blood* 89, 4546-4554

Olsson M, Forsberg J, Zhivotovsky B (2014): Caspase-2: the reinvented enzyme. *Oncogene* 2014 Jun 2. doi: 10.1038/onc.2014.139

Opferman JT, Korsmeyer SJ (2003): Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol* 4, 410-415

Osada S, Yamamoto H, Nishihara T, Imagawa M (1996): DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *J Biol Chem* 271, 3891-3896

Ouyang W, Löhning M, Gao Z, Assenmacher M, Ranganath S, Radbruch A, Murphy KM (2000): Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* 12, 27-37

Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Akira S, Araki E, Mori M (2002): Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest* 109, 525-532

Partanen JI, Nieminen A, Klefstrom J (2009): 3D view to tumor suppression: Lkb1, polarity and the arrest of oncogenic c-Myc. *Cell Cycle* 8, 716-724

Patra AK, Avots A, Zahedi RP, Schüler T, Sickmann A, Bommhardt U, Serfling E (2013): An alternative NFAT-activation pathway mediated by IL-7 is critical for early thymocyte development. *Nat Immunol* 14, 127-135

Pelengaris S, Khan M, Evan G (2002): c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* 2, 764-776

Petosa C, Morand P, Baudin F, Moulin M, Artero JB, Müller CW (2006): Structural basis of lytic cycle activation by the Epstein-Barr virus ZEBRA protein. *Mol Cell* 21, 565-572

Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, Phillips JH, McClanahan TK, de Waal Malefyt R, Kastelein RA (2004): WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* 172, 2225-2231

Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein WM, Mattson JD, Wagner JL, To W, Zurawski S, McClanahan TK, Gorman DM, Bazan JF, de Waal Malefyt R, Rennick D, Kastelein RA (2002): IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 16, 779-790

Qiao D, Im E, Qi W, Martinez JD (2002): Activator protein-1 and CCAAT/enhancer-binding protein mediated GADD153 expression is involved in deoxycholic acid-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1583, 108-116

Qin H, Srinivasula SM, Wu G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, Shi Y (1999): Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature* 399, 549-557

Ramji DP, Foka P (2002): CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 365, 561-575

Ranger AM, Hodge MR, Gravalles EM, Oukka M, Davidson L, Alt FW, de la Brousse FC, Hoey T, Grusby M, Glimcher LH (1998): Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc. *Immunity* 8, 125-134

Ranger AM, Malynn BA, Korsmeyer SJ (2001): Mouse models of cell death. *Nat Genet* 28, 113-118

Rengarajan J, Tang B, Glimcher LH (2002): NFATc2 and NFATc3 regulate T(H)2 differentiation and modulate TCR-responsiveness of naïve T(H) cells. *Nat Immunol* 3, 48-54

Robinson D, Shibuya K, Mui A, Zonin F, Murphy E, Sana T, Hartley SB, Menon S, Kastelein R, Bazan F, O'Garra A (1997): IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity* 7, 571-581

Ron D, Habener JF (1992): CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev* 6, 439-453

Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM (2000): Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14, 1293-1307

Schulz EG, Mariani L, Radbruch A, Höfer T (2009): Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12. *Immunity* 30, 673-683

Screpanti I, Romani L, Musiani P, Modesti A, Fattori E, Lazzaro D, Sellitto C, Scarpa S, Bellavia D, Lattanzio G, Bistoni F, Frati L, Cortese R, Gulino A, Ciliberto G, Constantini F, Poli V (1995): Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice. *EMBO J* 14, 1932-1941

Sebastian T, Johnson PF (2006): Stop and go: anti-proliferative and mitogenic functions of the transcription factor C/EBPbeta. *Cell Cycle* 5, 953-957

Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE (1993): Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10188-10192

Seoane J, Le HV, Massagué J (2002): Myc suppression of the *p21<sup>cip1</sup>* Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 419, 729-734

Serfling E, Berberich-Siebelt F, Avots A (2007): NFAT in lymphocytes: A factor for all events? *Sci STKE*. 2007(398):pe42.

Serfling E, Berberich-Siebelt F, Chuvpilo S, Jankevics E, Klein-Hessling S, Twardzik T, Avots A (2000): The role of NFAT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1498, 1-18

Singh G, Singh SK, König A, Reutlinger K, Nye MD, Adhikary T, Eilers M, Gress TM, Fernandez-Zapico ME, Ellenrieder V (2010): Sequential activation of NFAT and c-Myc transcription factors mediates the TGF-beta switch from a suppressor to a promoter of cancer cell proliferation. *J Biol Chem* 285, 27241-27250

Smith LT, Hohaus S, Gonzalez DA, Dziennis SE, Tenen DG (1996): PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor Promotor in myeloid cells. *Blood* 88, 1234-1247

Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE, Griffiths JC, Romano G, Kingsman SM, Kingsman AJ (1995): A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res* 23, 628-633

Stennicke HR, Salvesen GS (2000): Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta* 1477, 299-306

Sterneck E, Paylor R, Jackson-Lewis V, Libbey M, Przedborski S, Tessarollo L, Crawley JN, Johnson PF (1998): Selectively enhanced contextual fear conditioning in mice lacking the transcriptional regulator CCAAT/enhancer binding protein delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10908-10913

Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G (1990): IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 145, 3796-3806

Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Climcher LH (2000): A novel transcription factor, T-bet, directs T<sub>H</sub>1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669

Tahirov TH, Sato K, Ichikawa-Iwata E, Sasaki M, Inoue-Bungo T, Shiina M, Kimura K, Takata S, Fujikawa A, Morii H, Kumasaka T, Yamamoto M, Ishii S, Ogata K (2002): Mechanism of c-Myb-C/EBP beta cooperation from separated sites on a Promotor. *Cell* 108, 57-70

Takeda K, Tsutsui H, Yoshimoto T, Adachi O, Yoshida N, Kishimoto T, Okamura H, Nakanishi K, Akira S (1998): Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity* 8, 383-390

Takemoto N, Kamogawa Y, Jun Lee H, Kurata H, Arai KI, O'Garra A, Arai N, Miyatake S (2000): Cutting edge: chromatin remodeling at the IL-4/IL-13 intergenic regulatory region for Th2-specific cytokine gene cluster. *J Immunol* 165, 6687-6691

Tanaka T, Akira S, Yoshida K, Umemoto M, Yoneda Y, Shirafuji N, Fujiwara H, Suematsu S, Yoshida N, Kishimoto T (1995): Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell* 80, 353-361

Timchenko NA, Wilde M, Nakanishi M, Smith JR, Darlington GJ (1996): CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP alpha) inhibits cell proliferation through the p21 (WAF-1/CIP-1/SDI-1) protein. *Genes Dev* 10, 804-815

Tsukada J., Yoshida Y, Kominato Y, Auron PE (2011): The CAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine* 54, 6-19

Ubeda M, Wang XZ, Zinszner H, Wu I, Habener JF, Ron D (1996): Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. *Mol Cell Biol* 16, 1479-1489

Vallejo M, Ron D, Miller CP, Habener JF (1993): C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4679-4683

Vinson CR, Sigler PB, McKnight SL (1989): Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* 246, 911-916

Wagener C (1999): *Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumoren*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 115-157

Wan YY, Flavell RA (2009): How diverse – CD4 effector Tcells and their functions. *J Mol Cell Biol* 1, 20-36

Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, Taylor LR, Wilson DR, Darlington GJ (1995): Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 269, 1108-1112

Wang S, Miura M, Jung YK, Zhu H, Li E, Yuan J (1998): Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell* 92, 501-509

Weinberg RA (1995): The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330

Werner AB, de Vries E, Tait SW, Bontjer I, Borst J (2002): Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit its collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax. *J Biol Chem* 277, 22781-22788

Williams SC, Angerer ND, Johnson PF (1997): C/EBP proteins contain nuclear localization signals imbedded in their basic regions. *Gene Expr* 6, 371-385

Williams SC, Baer M, Dillner AJ, Johnson PF (1995): CRP2 (C/EBP beta) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *EMBO J* 14, 3170-3183

Williams SC, Cantwell CA, Johnson PF (1991): A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro. *Genes Dev* 5, 1553-1557

Woo M, Hakem R, Furlonger C, Hakem A, Duncan GS, Sasaki T, Bouchard D, Lu L, Wu GE, Paige CJ, Mak TW (2003): Caspase-3 regulates cell cycle in B cells: a consequence of substrate specificity. *Nat Immunol* 4, 1016-1022

Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kägi D, Hakem A, McCurrach M, Khoo W, Kaufman SA, Senaldi G, Howard T, Lowe SW, Mak TW (1998): Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev* 12, 806-819

Wu W, Misra RS, Russell JQ, Flavell RA, Rincón M, Budd RC (2006): Proteolytic regulation of nuclear factor of activated T (NFAT) c2 cells and NFAT activity by caspase-3. *J Biol Chem* 281, 10682-10690

Yamanaka R, Barlow C, Lekstrom-Himes J, Castilla LH, Liu PP, Eckhaus M, Decker T, Wynshaw-Boris A, Xanthopoulos KG (1997): Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/enhancer binding protein epsilon-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13187-13192

Xanthoudakis S, Viola JP, Shaw KT, Luo C, Wallace JD, Bozza PT, Luk DC, Curran T, Rao A (1996): An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* 10, 892-895

Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ (1995): Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80, 285-291

Yang J, Murphy TL, Ouyang W, Murphy KM (1999): Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4+ T cells: evidence for two distinct pathways for Promotor activation. *Eur J Immunol* 29, 548-555

Yang J, Zhu H, Murphy TL, Ouyang W, Murphy KM (2001): IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN-gamma production. *Nat Immunol* 2, 157-164

Yoshida H, Hamano S, Senaldi G, Covey T, Faggioni R, Mu S, Xia M, Wakeham AC, Nishina H, Potter J, Saris CJ, Mak TW (2001): WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to L. major infection. *Immunity* 15, 569-578

Yoshida H, Nakaya M, Miyazaki Y (2009): Interleukin 27: a double-edged sword for offense and defense. *J Leukoc Biol* 86, 1295-1303

Yoshida H, Nishina H, Takimoto H, Marengère LE, Wakeham AC, Bouchard D, Kong YY, Ohteki T, Shahinian A, Bachmann M, Ohashi PS, Penninger JM, Crabtree GR, Mak TW (1998): The transcription factor NFATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity* 8, 115-124

Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, Akira S, Nakanishi K (1998): IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* 161, 3400-3407

Zeiss CJ (2003): The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol* 40, 481-495

Zhang DE, Hetherington CJ, Meyers S, Rhoades KL, Larson CJ, Chen HM, Hiebert SW, Tenen DG (1996): CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF alpha2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor Promotor. *Mol Cell Biol* 16, 1231-1240

Zhang X, Brunner T, Carter L, Dutton RW, Rogers P, Bradley L, Sato T, Reed JC, Green D, Swain SL (1997): Unequal death in T helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis. *J Exp Med* 185, 1837-1849

Zheng W, Flavell RA (1997): The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587-596

Zheng W, Zhao Q, Zhao X, Li B, Hubank M, Schatz DG, Flavell RA (2004): Up-regulation of Hlx in immature Th cells induces IFN- $\gamma$  expression. *J Immunol* 172, 114-122

Zhu J, Guo L, Min B, Watson CJ, Hu-Li J, Young HA, Tschlis PN, Paul WE (2002): Growth factor independent-1 induced by IL-4 regulates Th2 cell proliferation. *Immunity* 16, 733-744

Zhu J, Min B, Hu-Li J, Watson CJ, Grinberg A, Wang Q, Killeen N, Urban JF Jr, Guo L, Paul WE (2004): Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat Immunol* 5, 1157-1165

Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D (1998): CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 12, 982-995



Zou H, Li Y, Liu X, Wang X (1999): An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. J Biol Chem 274, 11549-11556

## Abbildungsverzeichnis

1.1: Überblick über die für die Differenzierung der T-Helferzellen wichtigen Zytokine [aus Wan, Flavell 2009].	9
1.2: Schematische Darstellung des Aufbaus der C/EBPs [aus Ramji, Foka 2002].	12
1.3: Schema der Caspasekaskade [aus Chowdhury et al. 2008].	33
3.1: Überexpression und Aktivierung von C/EBP $\beta$ erhöht die Apoptoserate in EL-4 Zellen.	66
3.2: Der Caspaseinhibitor Z-VAD fmk verringert die Apoptoserate in C/EBP $\beta$ -überexprimierenden EL-4 T-Zellen.	68
3.3: Eine Überexpression und Aktivierung von C/EBP $\beta$ erhöht die Spaltproduktbildung aus PARP.	70
3.4: Nachweis der Expression von C/EBP $\beta$ -ER und Caspase-3F in zweifach infizierten EL-4 Zellen.	72
3.5: Die dominant-negative Caspase-3 wird in den untersuchten EL4 Zellen im Vergleich zu endogener Caspase-3 überexprimiert.	73
3.6: Dominant-negative Caspase-3 unterstützt Reduktion von <i>Il2</i> und <i>Ifng</i> , vermindert aber die <i>Il4</i> -Induktion durch C/EBP $\beta$ .	75
3.7: Dominant-negative Caspase-3 vermindert die <i>Il4</i> -Induktion durch C/EBP $\beta$ .	76
Abbildung 3.8: Dominant-negative Caspase-3 scheint die Unterdrückung von <i>Il2</i> und <i>Ifng</i> zu verstärken.	77
3.9: Dominant-negative Caspase-3 beeinflusst die Suppression von <i>Myc</i> durch C/EBP $\beta$ nicht, steigert jedoch die <i>Mad4</i> -Expression.	79
3.10: Dominant-negative Caspase-3 beeinflusst die Unterdrückung von <i>Myc</i> durch C/EBP $\beta$ nicht.	80
3.11: C/EBP $\beta$ und dominant-negative Caspase-3 beeinflussen die <i>Mad3</i> -Expression nicht.	81
3.12: Dominant-negative Caspase-3 verstärkt <i>Mad4</i> -Induktion durch C/EBP $\beta$ .	81
3.13: C/EBP $\beta$ verstärkt die <i>Caspase3</i> -Expression und bei Hemmung von Caspase-3 die Expression von <i>Caspase11</i> .	83
3.14: C/EBP $\beta$ steigert die Expression der endogenen <i>Caspase3</i> .	84
3.15: Mit dominant-negativer Caspase-3 steigert C/EBP $\beta$ die Expression der <i>Caspase11</i> .	85

3.16: Aktivierung von C/EBP $\beta$ und Expression von dominant-negativer Caspase-3 steigern die Proteinexpression von endogener Caspase-3. ....	87
3.17: Weder eine Aktivierung von C/EBP $\beta$ noch dominant-negative Caspase-3 beeinflussen die Expression der endogenen Caspase-7 in den untersuchten EL4 Zellen.....	87
3.18: Die durch Überexpression und Aktivierung von C/EBP $\beta$ verstärkte Apoptose kann durch Hemmung der Caspase-3 nicht vermindert werden. ....	89
3.19: Nachweis der Expression von C/EBP $\beta$ -ER und Caspase-9F in zweifach infizierten EL-4 Zellen. ....	91
3.20: Dominant-negative Caspase-9 beeinflusst die <i>Il4</i> -Induktion durch C/EBP $\beta$ nicht, scheint aber die Suppression von <i>Il2</i> und <i>Ifng</i> abzuschwächen. ....	92
3.21: Dominant-negative Caspase-9 beeinflusst die <i>Il4</i> -Induktion durch C/EBP $\beta$ nicht.....	93
3.22: Caspase-9F scheint die Reduktion von <i>Il2</i> durch C/EBP $\beta$ etwas abzuschwächen. ....	94
3.23: Caspase-9F scheint die Suppression von <i>Ifng</i> durch C/EBP $\beta$ leicht abzuschwächen. ....	95
3.24: Dominant-negative Caspase-9 steigert die Expression pro- und antiapoptotischer Bcl-2-Mitglieder. ....	96
3.25: Die durch Überexpression und Aktivierung von C/EBP $\beta$ verstärkte Apoptose kann durch Hemmung der Caspase-9 nicht verhindert werden. ....	98

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Dr. Edgar Serfling danke ich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, das gute Arbeitsklima und die Überlassung des Themas.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Friederike Berberich-Siebelt für die sehr gute Betreuung bedanken, für die hilfreiche Unterstützung, die guten Ideen und Anregungen, die stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowohl bei fachlich-theoretischen als auch praktischen Fragestellungen sowie besonders für die zahlreichen Ermutigungen und das sehr gute Arbeitsklima.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Mithilesh Jha, Herrn Dr. Jan Schulze-Lührmann, Herrn Dr. Stefan Klein-Hessling und Herrn Dr. Andris Avots sowie allen anderen damaligen Labormitgliedern für die technischen und fachlichen Hilfestellungen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Ursula Sauer für die hervorragende technische Assistenz und die große Hilfe und Unterstützung im Labor. Ebenso bedanke ich mich hierfür bei Frau Doris Michel und Frau Ilona Pietrowski.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Ingolf Berberich vom Institut für Virologie und Immunbiologie danke ich für die Überlassung der Genexpressionsvektoren der Caspasemutanten.

Herrn Christian Linden vom Institut für Virologie und Immunbiologie danke ich für die FACS-basierte Sortierung von Zellen.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern für die große Unterstützung und die Ermöglichung meines Studiums und dieser Arbeit.

Schließlich möchte ich mich bei meinem Mann Michael bedanken für seine große Geduld und Unterstützung während der Niederschrift dieser Arbeit.