

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. med. Hans Konrad Müller-Hermelink

**BINDUNGSVERHALTEN DER VERSCHIEDENEN NFAT-
TRANSKRIPTIONSFAKTOREN AN DEN *NUR77*-
PROMOTOR UND IHRE KOOPERATIONSFÄHIGKEIT
MIT MEF2D BEI DER AKTIVIERUNG DES *NUR77*-
PROMOTORS**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
medizinischen Fakultät
der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Tatjana Cordes, geb. Rittner,
aus Bonn-Duisdorf

Würzburg, August 2007

Referent: Prof. Dr. Dr. E. Serfling

Koreferent: Prof. Dr. C. Kneitz

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Januar 2008

Die Promovendin ist Ärztin.



Diese Arbeit wurde auf 100% chlorfrei
gebleichtes Papier aus FSC-zertifizierter
Waldwirtschaft gedruckt.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Aufgaben und Zellen des Immunsystems.....	1
1.1.2	T-Zell-Reifung, positive und negative Selektion	2
1.1.3	'Activation-Induced Cell Death' (AICD) und 'Activated T cell Autonomous Death' (ACAD) peripherer T-Zellen	3
1.2	Apoptose	3
1.2.1	Extrinsischer oder 'Todesrezeptor'-Signalweg	5
1.2.2	Intrinsischer oder mitochondrialer Signalweg.....	6
1.2.3	Endoplasmatischer Retikulum- oder Stress-induzierter Signalweg.....	6
1.2.4	Signalwege, über die Apoptose in T-Zellen vermittelt wird.....	7
1.3	Nur77.....	9
1.3.1	Die Nur77-Familie und ihre Struktur	10
1.3.2	Expression und Funktion von Nur77	10
1.3.3	Regulation der Aktivität von Nur77.....	12
1.4	NFATc-Transkriptionsfaktoren	14
1.4.1	NFATc-Familie und -Struktur	15
1.4.2	Expression und Funktion von NFATc-Faktoren.....	17
1.4.3	Regulation der Aktivität der NFATc-Faktoren.....	19
1.5	MEF2-Transkriptionsfaktoren	22
1.5.1	MEF2-Familie und Struktur.....	23
1.5.2	Expression und Funktionen von MEF2-Faktoren	24
1.5.3	Regulation der Aktivität von MEF2-Faktoren.....	25
1.6	Zielsetzung der Arbeit	28
2	MATERIAL UND METHODEN	30
2.1	Material.....	30
2.1.1	Chemikalien und Reaktionssysteme	30
2.1.2	Lösungen und Puffer	32
2.1.3	Enzyme	39
2.1.4	Antikörper.....	39

2.1.5	Oligonukleotide	40
2.1.6	Protein-Größenstandards	40
2.1.7	Verwendete Plasmide und Vektoren	41
2.1.8	Nährmedien.....	42
2.1.9	Antibiotika	44
2.1.10	Bakterien	44
2.1.11	Gewebekulturzellen	45
2.1.12	Verbrauchsmaterialien.....	45
2.1.13	Geräte	46
2.1.14	Angaben zu den Herstellern.....	47
2.2	Zellkultur und zellbiologische Methoden.....	49
2.2.1	Lagerung und Kultivierung verwendeter Zelllinien.....	49
2.2.2	Induktion der Zellen.....	50
2.2.3	Transiente Transfektionen	50
2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	51
2.3.1	Präparation von Kernprotein- und Zytoplasma-Extrakten eukaryontischer Zellen.....	51
2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Westernblot-Analyse	51
2.3.3	Luziferase-Reportergen-Assay	53
2.4	Molekularbiologische Methoden.....	54
2.4.1	Transformation kompetenter Bakterien	54
2.4.2	Bakterienkulturen	54
2.4.3	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> durch alkalische Lyse in präparativen Mengen (Maxi- Präparation).....	54
2.4.4	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	55
2.4.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	56
2.4.6	DNA-Protein-Bindungsstudien mittels EMSA.....	56
2.4.7	DNA-Protein-Bindungsstudien mittels Streptavidin-Biotin-Oligonukleotiden / ‘pull- down-Experimente’	59
3	ERGEBNISSE	61
3.1	Stimulation der Zellen mit TPA + Ionomycin führt zu einer verstärkten Bindung von NFATc1 und NFATc2 an den <i>nur77</i> -Promotor	61

3.1.1	Protein-DNA-Bindungsstudien zeigen eine verstärkte Bindung von NFAT-Faktoren an den Promotor des <i>nur77</i> -Gens nach Stimulation von T-Zellen	61
3.2	Endogenes NFATc1 und NFATc2 binden an den <i>nur77</i> -Promotor	64
3.2.1	Sowohl endogenes NFATc1 als auch endogenes NFATc2 binden an den <i>nur77</i> -Promotor in Protein-DNA-Bindungsstudien (EMSAs)	64
3.2.2	Bestätigung der Bindung von endogenem NFATc1 und NFATc2 an den <i>nur77</i> -Promotor durch Protein-DNA-Bindungsversuche ('pull-down-Experimente')	66
3.3	Mutation der NFAT-Bindungsstelle führt zu einer verminderten bzw. ausbleibenden DNA-Bindung von NFATc1 und NFATc2.....	67
3.3.1	Verminderte NFAT-Bindung von transfiziertem HA-NFATc1/ α A und HA-NFATc2 bei Mutation der NFAT-Bindungsstelle	67
3.3.2	Ausbleibende Bindung von endogenem NFATc1 oder NFATc2 an den <i>nur77</i> -Promotor bei Mutation der NFAT-Bindungsstelle, jedoch unveränderte NFAT-Bindung bei aufgehobener MEF2-Bindung	69
3.4	MEF2 unterstützt die Bindung von NFAT-Faktoren an den <i>nur77</i> -Promotor	71
3.4.1	Protein-DNA-Bindungsstudie mit Zellkernextrakten unstimulierter und stimulierter EL4-Zellen am <i>nur77</i> -Wildtyp- und MEF2-mutierten- <i>nur77</i> -Promotor	71
3.5	MEF2D und NFAT-Faktoren kooperieren hinsichtlich der Aktivierung von Promotoren verschiedener Zielgene	72
3.5.1	Kooperation von MEF2D und NFATc2 am <i>nur77</i> -Promotor	72
3.5.2	Kooperation verschiedener NFAT-Faktoren mit MEF2D am <i>hFasL</i> -Promotor.....	74
3.5.3	Kooperation verschiedener NFAT-Faktoren mit MEF2D am Promotor des <i>desmin</i> -Gens, einem Muskel-spezifischen Gen.....	75
4	DISKUSSION.....	77
4.1	Verschiedene NFAT-Proteine binden an den <i>nur77</i> -Promotor	77
4.2	NFAT-Faktoren binden, unterstützt durch gebundene MEF2-Faktoren, direkt an den Promotor des <i>nur77</i> -Gens	78
4.3	MEF2- und NFAT-Proteine kooperieren bei der Aktivierung gemeinsamer Zielgene	80
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	83
6	LITERATURVERZEICHNIS	85

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

1.1.1 Aufgaben und Zellen des Immunsystems

Das Immunsystem der Vertebraten ist ein komplexes System verschiedener Zellen und Makromoleküle, die den Organismus vor schädigenden Mikroorganismen schützen und veränderte körpereigene Zellen eliminieren sollen. Um diese Aufgaben zu erfüllen, besitzt das Immunsystem eine unspezifische, angeborene und eine spezifische, erworbene Immunabwehr, der jeweils zelluläre und humorale Anteile zur Verfügung stehen. Zur unspezifischen Abwehr gehören sowohl gelöste Abwehrstoffe, wie Lysozym und Komplementfaktoren, als auch Phagozyten, besonders Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Diese werden sofort nach Eindringen eines Erregers in den Organismus aktiv und versuchen, den Erreger zu eliminieren. Dagegen benötigt die spezifische Abwehr gewöhnlich einige Tage, bevor sie gegen einen speziellen Erreger vorgehen kann. Zur spezifischen Abwehr gehören ebenfalls gelöste Abwehrstoffe, die Antikörper, und verschiedene Typen der Lymphozyten: B-Lymphozyten, die sich zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen differenzieren können, und T-Lymphozyten, die entweder selbst zytotoxisch aktiv sein können zur Eliminierung veränderter körpereigener (Krebs-)Zellen (CD8-positive, zytotoxische T-Zellen, T-Killerzellen) oder aber CD4-positive T-Helferzellen, die die Immunantwort gegen körperfremde Antigene durch Produktion von Interleukinen unterstützen und gezielt die Differenzierung Antigen-spezifischer B-Zellen zu Plasmazellen induzieren. Als Antigen wird die kleinste Einheit bezeichnet, die eine immunologische Abwehrreaktion hervorrufen kann. Dabei hat das Immunsystem die Fähigkeit, körpereigene Strukturen ('Selbst') von körperfremden Strukturen ('Nicht-Selbst') zu unterscheiden und nur gegen letztere zu reagieren, was als Toleranz bezeichnet wird. Dieses Prinzip ist von entscheidender Bedeutung, denn reagiert das Immunsystem nicht gegen körperfremde Strukturen, wie eingedrungene Viren oder veränderte Körperzellen, kommt es zur Viruspersistenz bzw. Krebserkrankungen. Reagiert das Immunsystem dagegen auch gegen körpereigene Strukturen, entwickelt der Betroffene eine Autoimmunerkrankung.

1.1.2 T-Zell-Reifung, positive und negative Selektion

T-Vorläuferzellen werden aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark abgeleitet. Sie wandern schon als unreife Vorläuferzellen vom Knochenmark in die Rinde des Thymus (den Cortex), wo sie sich vermehren und differenzieren. Dabei durchlaufen sie verschiedene Stadien der Differenzierung, was sich in der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle zeigt. Dabei sind für T-Zellen besonders CD25 und CD44, der T-Zell-Rezeptor-Komplex, mit dem die T-Zelle ihr spezifisches Antigen erkennt, und seine Corezeptoren CD4 und CD8 von Bedeutung. Der T-Zell-Rezeptor (TCR) ist aus einer α - und einer β -Kette und den CD3-Ketten zusammengesetzt. Zuerst wird das Gen der β -Kette rekombiniert, was zur Expression eines prä-T-Zell-Rezeptors führt. Ist dieser funktionell, bekommt die Zelle das Signal, die Rekombination der β -Kette zu stoppen, sich zu vermehren und die Rekombination des Gens für die α -Kette zu beginnen. Die Rekombination der α -Kette wird so lange fortgesetzt, bis ein funktioneller TCR, der den MHC-Komplex einer Nachbarzelle erkennt, gebildet ist und die Zelle ein positives Selektionssignal erhält, das zur weiteren Reifung führt. Wird kein funktioneller TCR gebildet, erreicht die Zelle kein positives Signal und sie stirbt durch Vernachlässigung ('neglect'). Durch diesen Vorgang wird sicher gestellt, dass keine Zellen mit nicht-funktionellen TCR gebildet werden, was man als positive Selektion bezeichnet.

T-Zellen erkennen ihr spezifisches Antigen, wenn es in Form eines Peptids an den MHC-Komplex einer Antigen-präsentierenden Zelle gebunden ist. Bindet eine reifende T-Zelle mit hoher Affinität an ein im Thymus präsentiertes Antigen, erhält sie ebenfalls das Signal zur Apoptose, was man negative Selektion nennt. So wird sicher gestellt, dass Zellen gegen körpereigene Bausteine/Antigene eliminiert werden (Ausbildung der zentralen (Selbst-) Toleranz). Dieser Vorgang findet etwa zum Zeitpunkt der Geburt statt, wenn (hoffentlich) noch keine fremden Antigene in den Organismus eingedrungen sind, gegen die sich so eine Toleranz ausbilden würde.

Ein Großteil der kortikalen T-Zellen überlebt diese Selektionsvorgänge nicht. Nur etwa 2-3% der ursprünglich generierten Zellen reifen weiter und wandern ins Thymusmark (die Medulla), um sich dort zu CD4- oder CD8-einfach positiven T-Zellen weiter zu differenzieren. Reife naive T-Zellen wandern daraufhin in periphere lymphatische

Organe (Lymphknoten, Milz), wo es zum Kontakt mit einem für sie passenden Antigen kommen kann (Baumann et al 2002, Böcker et al 1997).

1.1.3 'Activation-Induced Cell Death' (AICD) und 'Activated T cell Autonomous Death' (ACAD) peripherer T-Zellen

Wird eine naive T-Zelle über ihren TCR durch Kontakt mit einem an einen MHC-Komplex-gebundenen Antigen aktiviert, kommt es zur klonalen Expansion und Immunantwort der Zelle. Nach abgeschlossener Immunantwort muss jedoch ein Großteil eines Zellklons wieder eliminiert werden, um eine für den Gesamtorganismus sinnvolle Anzahl Antigen-spezifischer T-Zellen (eines Klons) zu schaffen, was als periphere Deletion bezeichnet wird. Nur ein kleiner Teil eines Zellklons überlebt und bildet die Gedächtnis- (Memory-) T-Zellen. Diese Reduktion der T-Zellen wird durch den 'Activation-Induced Cell Death' (AICD) und 'Activated T Cell Autonomous Death' (ACAD) vermittelt. Beim AICD kommt es zur erneuten Stimulierung der T-Zelle über den TCR, was bei einer vorstimulierten T-Zelle zur Apoptose über den extrinsischen Signalweg (siehe Kapitel über Apoptose) führt. Dagegen kommt es beim ACAD zu keiner erneuten Stimulierung der T-Zellen, sondern in der Zelle kommt es autonom zur Aktivierung des intrinsischen Signalwegs, der die Apoptose der T-Zelle auslöst. Welche Faktoren dafür verantwortlich sind, dass einige Zellen diesem Prozess entgehen und stattdessen Gedächtnis-Zellen bilden, ist bisher nicht vollständig geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Vorhandensein von Adjuvantien wie IL-2 bei der TCR-Aktivierung zu höheren NF- κ B-Spiegeln in der Zelle führt, die eine anti-apoptotische Funktion ausüben (Baumann et al 2002, Hildeman et al 2002, Arnold et al 2006).

1.2 Apoptose

Als Apoptose wird der programmierte Zelltod bezeichnet, der ebenso wie die Zellteilung ein fein regulierter physiologischer Mechanismus ist. Sie dient der Anpassung des Gewebes an wechselnde Belastungen, der Eliminierung überflüssig gewordener Zellen bei der Embryonalentwicklung sowie der Entfernung schädlicher

Zellen, wie etwa Tumorzellen, Virus-befallener Zellen oder immunkompetenter Zellen, die sich gegen körpereigene Antigene richten.

Morphologisch geht die Apoptose mit einer DNA-Kondensation und -Fragmentierung, einer Zellschrumpfung und schließlich mit einem Zerfall der Zelle in kleine Partikel, die von umgebenden Makrophagen aufgenommen werden, einher. Es kommt dabei zu keiner Freisetzung von intrazellulären Molekülen und somit auch zu keinem entzündlichen oder immunologischen Prozess. Damit unterscheidet sich die Apoptose klar von der Zellnekrose, von der meist mehrere Zellen eines geschädigten Organs aufgrund von Substratmangel oder toxischen Substanzen betroffen sind. Zudem kommt es bei der Nekrose zur Zellschwellung und dem Verlust der Membranintegrität, was zum Austritt von intrazellulären Molekülen führt, die eine Entzündungsreaktion und Antikörperbildung hervorrufen.

Die Apoptose einer Zelle kann generell über drei verschiedene Wege induziert werden:

Erstens durch Aktivierung verschiedener Todesrezeptoren, wie z.B. über die Aktivierung des Fas-(CD95-)Rezeptors oder den Tumornekrosefaktor (TNF α)-Rezeptor. Diesen Signalweg bezeichnet man als extrinsischen Signalweg.

Zweitens über den intrinsischen oder auch mitochondrialen Signalweg, bei dem intrazelluläre Vorgänge die Apoptose der Zelle auslösen, wobei jedoch extrazelluläre Faktoren, wie Glucocorticoide, Chemokine, Zytokine oder Wachstumsfaktoren, diesen Weg beeinflussen. Dabei spielt das resultierende Verhältnis zwischen pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern an den Mitochondrien die entscheidende Rolle, ob es zur Apoptose der Zelle kommt oder die Zelle überlebt.

Als dritten, relativ neu beschriebenen Apoptoseweg kennt man den endoplasmatischen Retikulum- oder auch Stress-induzierten-Signalweg, bei dem Stress-bedingte Veränderungen der Calciumkonzentration im endoplasmatischen Retikulum Apoptose auslösen.

Die drei Signalwege agieren jedoch nicht isoliert, sondern beeinflussen sich gegenseitig und werden durch Einflüsse von außen und Faktoren innerhalb der Zelle modifiziert.

Beim Auslösen der Apoptose kommt es dabei in der Zelle immer zur Aktivierung von Initiator-Caspasen (die sich bei den verschiedenen Signalwegen unterscheiden).

Caspasen sind eine Familie von Cystein-Proteasen. Sie werden als Pro-Caspasen synthetisiert und liegen inaktiv in der Zelle vor. Initiator-Caspasen (die Caspasen 2, 8, 9

und 10) werden erst nach Dimerisierung - vermittelt durch verschiedene Adapterproteine - aktiv und können dann Effektor-Caspasen (die Caspasen 3, 6 und 7) spalten, was diese aktiviert. Effektor-Caspasen wiederum spalten verschiedene Schlüsselenzyme, wie z.B. Endonukleasen, die dadurch aktiviert werden und zum Phänotyp der apoptotischen Zelle führen (Böcker et al 1997, Silbernagl und Lang 1998, Pinkosky und Green 2005).

1.2.1 Extrinsischer oder 'Todesrezeptor'-Signalweg

Die Todesrezeptoren gehören zu der großen Familie der Tumornekrose-Faktor-Rezeptoren (TNFR) und Nervenwachstumsfaktor-Rezeptoren (NGFR). Sie stellen transmembranäre Rezeptoren dar, die nach Bindung ihrer jeweiligen Liganden mit Hilfe von Adapterproteinen die Caspasen-Kaskade im Zytosol der Zelle in Gang setzen. Zu ihnen gehören u. a. Fas/FasL (CD95/CD95L), TNFR/TNF- α , TRAIL- ('TNF-related apoptosis-inducing ligand', DR4) R1/TRAIL und DR3. Besonders intensiv untersucht wurde bisher der Fas/FasL-Signalweg, weswegen er exemplarisch dargestellt werden soll:

Fas ist ein Transmembran-Rezeptor, der auf vielen Zellen exprimiert wird. Der Fas Ligand (FasL) ist ebenfalls ein Transmembran-Protein, wird jedoch nur unter bestimmten Bedingungen (z.B. bei der T-Zell-Rezeptor-Aktivierung) exprimiert. FasL kann an der Zelloberfläche durch Metalloproteasen abgespalten werden, wodurch eine lösliche Form des FasL gebildet wird. So kann FasL sowohl Fas an der Zelloberfläche der FasL-exprimierenden Zelle (Suizid) als auch an benachbarten Zellen (Fraterizid) aktivieren. Durch Bindung von FasL an Fas, bildet Fas Trimere. Da die zytosolischen Domänen von Fas selbst keine enzymatische Aktivität besitzen, rekrutieren sie das Adapterprotein FADD (Fas-associated death domain), das mit der homologen Todesdomäne von Fas interagiert. FADD verfügt auch über eine 'Todeseffektordomäne' (DED), über die es Pro-Caspase 8 (FLICE) bindet und mit ihr den Tod-induzierenden Signal-Komplex bildet (DISC). Pro-Caspase 8 wird dabei dimerisiert und dadurch aktiviert zu aktiver Caspase 8. Caspase 8 spaltet daraufhin in so genannten Typ I-Zellen direkt verschiedene Effektor-Caspasen und aktiviert sie damit, ihre verschiedenen Substrate (Transkriptionsfaktoren, Enzyme, Strukturproteine) zu spalten, was zur morphologisch erkennbaren Apoptose der Zelle führt. In Typ II-Zellen

ist der Pro-Caspase 8-Spiegel sehr niedrig, so dass die Caspase-Kaskade durch den intrinsischen Signalweg verstärkt werden muss. Caspase 8 spaltet dabei Bid, ein pro-apoptotisches Bcl-2-Protein, in eine kürzere Form, wodurch es vom Zytosol zu den Mitochondrien translozieren kann, um dort seine pro-apoptotische Wirkung zu entfalten. Der Fas/FasL-Signalweg kann durch Interaktion mit FLIP (FLICE-inhibitory protein) gehemmt werden. Dabei bindet FLIP mit seiner homologen DED an den Fas/FADD-Komplex und verhindert so die Rekrutierung und Dimerisierung von Pro-Caspase 8 (Zhang et al 2004, Gupta 2005, Arnold et al 2006).

1.2.2 Intrinsischer oder mitochondrialer Signalweg

Der intrinsische Signalweg der Apoptose hängt entscheidend von der Permeabilität der äußeren Membran der Mitochondrien ab. Diese wird durch das Verhältnis von pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen gesteuert. Dabei wirken u. a. Bim, Bid, Bax und Bad pro-apoptotisch und Bcl-2, Mcl-1 und Bcl-xL anti-apoptotisch. Extrazelluläre Faktoren, wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine oder Glucocorticoide, können über verschiedene intrazelluläre Signalwege, wie PI3K/Akt-Kinasen, MAP-Kinasen, Glucocorticoid-Rezeptoren, NF- κ B oder STAT-Proteine, die Aktivität und Expression der Bcl-2-Proteine beeinflussen.

Eine Permeabilitätssteigerung der mitochondrialen Membran führt zur Freisetzung des mitochondrialen Inhalts, vor allem von Cytochrom c, ins Zytosol, wo es mit dem Apoptose-Proteasen aktivierenden Faktor 1 (Apaf-1) einen Komplex, das so genannte Apoptosom, bildet. Am Apoptosom wird die Initiator-Pro-Caspase 9 dimerisiert und aktiviert, die wiederum die Effektor-Caspasen 3 und 7 spaltet und damit den apoptotischen Tod der Zelle in Gang setzt (Ayala et al 2007, Gupta 2005, Arnold et al 2006).

1.2.3 Endoplasmatischer Retikulum- oder Stress-induzierter Signalweg

Durch oxidative Noxen, Überexpression von Proteinen oder veränderte Calciumspiegel der Zelle kann Stress am endoplasmatischen Retikulum (ER) ausgelöst werden. Hält dieser Stress längere Zeit an, führt er zu einer Funktionsstörung des ER, besonders zur

Störung der Calcium-Homöostase mit Verlust von Calcium aus dem ER. Diese kann entweder direkt die Pro-Caspase 12 in der Membran des ER aktivieren oder aber durch Translokation des Calciums in die Mitochondrien zur Aktivierung des intrinsischen Signalwegs führen (Gupta 2005).

1.2.4 Signalwege, über die Apoptose in T-Zellen vermittelt wird

In T-Zellen kann es in verschiedenen Entwicklungsstadien zur Induktion von Apoptose kommen. Im Thymus müssen $CD4^+CD8^+$ doppelt-positive (DP) Lymphozyten die positive und negative Selektion überleben, um sich weiter zu einfach-positiven ('single positive', SP) $CD4^+$ oder $CD8^+$ -T-Zellen zu differenzieren. Nach einer abgelaufenen Immunreaktion muss der entstandene T-Zell-Pool wieder auf eine für den Organismus angemessene Menge an T-Zellen reduziert werden.

Positive Selektion

Bei der positiven Selektion werden unreife T-Zellen auf ihre Funktionalität getestet. Bekommt eine Zelle kein Signal über ihren T-Zell-Rezeptor, da dieser MHC-Komplexe Antigen-präsentierender Zellen nicht erkennt, stirbt die Zelle einen Tod durch Vernachlässigung ('neglect'). Dieser wird wahrscheinlich über eine Kombination extrinsischer und intrinsischer Signalwege vermittelt. Sowohl für Bcl-2, Bcl-X_L als auch für Fas/FasL wurde eine Beteiligung an der positiven Selektion beschrieben (Baumann et al 2002).

Negative Selektion

Wenn unreife T-Zellen schon im Thymus mit hoher Affinität einen MHC-Komplex mit präsentiertem Antigen binden, bekommen sie, da sich ihre Spezifität mit hoher Wahrscheinlichkeit gegen körpereigene Antigene richtet (autoimmune Zellen), ein Signal zur Apoptose. Diese negative Selektion wird ebenfalls über extrinsische und intrinsische Signalwege vermittelt.

Es konnte bislang gezeigt werden, dass der Fas/FasL-Signalweg bei der negativen Selektion von geringer Bedeutung ist, da sowohl Fas- als auch FasL-defiziente Mäuse eine normale Apoptose unreifer Thymozyten zeigen. Dieser Signalweg könnte jedoch eine modulierende Funktion haben, da er in hohem Maße in diesen Zellen exprimiert wird.

Auch die Rolle des Todesrezeptors TRAIL wird kontrovers diskutiert. So ist zwar einerseits die negative Selektion in Thymozyten von TRAIL-defizienten Mäusen verringert, andererseits ist unklar, ob TRAIL in unreifen Thymozyten überhaupt exprimiert wird.

Das pro-apoptotische Bcl-2-Familienmitglied Bim ist einer der Faktoren des intrinsischen Signalwegs, der für die negative Selektion von Thymozyten wichtig ist. In DP Thymozyten wird *bim* nach Stimulation des TCR, vermittelt über Ca^{2+} und die Protein Kinase C (PKC), vermehrt transkribiert und löst damit Apoptose aus (Cante-Barret et al 2006). Bim-defiziente Thymozyten zeigen bei einer Stimulation des TCR eine verringerte Apoptose (Bouillet et al 2002).

Auch für Nur77 wurde gezeigt, dass es an der Regulation der negativen Selektion beteiligt ist: So führt eine Überexpression von Nur77 zur verstärkten Auslösung von Apoptose bzw. eine Überexpression einer dominant-negativen Form von Nur77 zur verminderten Apoptose in Thymozyten. Auch wird Nur77 in hohem Maße in Thymozyten exprimiert. Es ist bislang nicht schlüssig geklärt, wie Nur77 in einen Apoptose-Signalweg eingreift und seine Wirkung entfaltet. Möglicherweise wird die Expression von TRAIL und FasL durch Nur77 kontrolliert, da deren Promotoren von Nur77 aktiviert werden (Rajpal et al 2003).

Somit wäre eine Kooperation verschiedener Signalwege und Proteine bei der Vermittlung der negativen Selektion denkbar. Damit soll sicher gestellt werden, dass keine autoimmunen T-Zellen den Thymus verlassen (Baumann et al 2002, Green et al 2003).

AICD ('Activation Induced-Cell Death')

Kommt es nach einer Immunantwort einer T-Zelle zu einer erneuten Aktivierung ihres T-Zell-Rezeptors, kann in dieser Zelle die Auslösung der Apoptose induziert werden. Diese wird hauptsächlich über den extrinsischen Fas/FasL-Signalweg vermittelt, wobei jedoch auch andere Todesrezeptoren, wie TRAIL oder TNF-R, beteiligt sind.

Wie bereits beschrieben wird der Fas-Rezeptor auf vielen Zellen exprimiert, und nur die Bindung von FasL an den Rezeptor löst die Apoptose aus. Wird nun eine prä-aktivierte T-Zelle erneut über ihren T-Zell-Rezeptor stimuliert, kommt es zur verstärkten Expression von FasL, was zum Tod ihrer Fas-Rezeptor exprimierenden Nachbarzellen bzw. zum Suizid der Zelle führt.

Die transkriptionelle Regulation des *fasL*-Promotors war Schwerpunkt der experimentellen Arbeiten vieler Labore weltweit, was zu zahlreichen Veröffentlichungen geführt hat. Es ist bekannt, dass der *fasL*-Promotor durch verschiedene Transkriptionsfaktoren, u. a. von NFAT- ('Nukleärer Faktor Aktivierter T-Zellen'-) Faktoren, AP-1- ('Activator Protein-1'-) Faktoren, c-Myc, NF-κB ('Nukleärer Faktor kappa B'), Egr- ('Early Growth Response'-) Faktoren, SP-1 ('secretory protein-1') und IRF-1 ('Interferon regulierenden Faktor 1') reguliert wird. NFAT-Faktoren sind dabei die Schlüsselfaktoren bei der Aktivierung des *fasL*-Promotors. Das konnte mit verschiedenen NFAT-defizienten-Mäusen gezeigt werden. Dabei kooperieren die NFAT-Faktoren mit verschiedenen anderen Transkriptionsfaktoren (wie AP-1, SP-1 und Egr-Faktoren)(Baumann et al 2002, Zhang et al 2004, Serfling et al 2006b).

ACAD ('Activated T Cell Autonomous Death')

Kommt es nach beendeter Immunantwort zum Absinken der Interleukin-Spiegel, wird in einer Vielzahl von prä-aktivierten T-Zellen der intrinsische Apoptoseweg aktiviert. Dafür ist kein erneuter Kontakt mit anderen Zellen nötig, sondern die Zelle stirbt 'autonom'. Dieser Apoptoseweg kann erfolgreich durch hohe Interleukin-Spiegel (von IL-2, IL-4, IL-7 und IL-15) gehemmt werden. Man hat die Beobachtung gemacht, dass es nach der Aktivierung des TCR zu einem Absinken der Bcl-2-Konzentration in den T-Zellen kommt. Fällt nun nach der Immunantwort der Stimulus durch die Interleukine weg, überwiegen pro-apoptotische Faktoren, wie Bim, und lösen über den intrinsischen Signalweg die Apoptose aus (Hildeman et al 2002, Baumann et al 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit habe ich mich besonders mit der Regulation des bei der negativen Selektion aktiven *nur77*-Gens durch MEF2- und NFAT-Faktoren beschäftigt. Deshalb soll hier näher auf diese Faktoren eingegangen werden.

1.3 Nur77

Ursprünglich wurde *nur77* als ein Gen isoliert, das rasch auf die Stimulierung mit NGF (nerve growth factor) in PC12 Phäochromozytom-Zellen (Milbrandt 1988) bzw. nach Stimulierung mit Serum oder Wachstumsfaktoren in BALB/c 3T3-Fibroblasten-Zellen (Hazel et al 1988) induziert wird. Inzwischen weiß man, dass Nur77 in einer Vielzahl

von Geweben und Zellen aktiv ist und dabei so verschiedene Zellfunktionen wie Differenzierung, Proliferation und Zelltod durch Apoptose reguliert.

1.3.1 Die Nur77-Familie und ihre Struktur

Die Nur77 Familie (oder auch NR4A-Gruppe) besteht aus 3 Mitgliedern: Nur77 (auch als NGFI-B α , N10, NAK, TR3 oder NR4A1 bezeichnet), Nurr1 (auch NGFI-B β oder NR4A2 genannt) und Nor1 (auch NGFI-B γ oder NR4A3). Sie gehören zu den nukleären oder Steroid-Rezeptoren und werden, da bisher kein endogener Ligand für sie gefunden werden konnte, auch als nukleäre 'orphan' Rezeptoren bezeichnet. Es wird angenommen, dass Nur77 die Transkription seiner Zielgene unabhängig von einem gebundenen Liganden reguliert. Übereinstimmend damit konnte gezeigt werden, dass die Expression von Nur77 ausreicht, um ohne Stimulierung durch eine Ligand-Bindung die Transkription von Nur77-abhängigen Reporter-Genen zu aktivieren (Davis et al 1993, Paulsen et al 1995).

Nur77 ist ein Protein von 69 kDa, das aus 601 Aminosäuren besteht. Ein strukturelles Merkmal der Nur77-Familien-Mitglieder ist, dass sie neben einer zentral gelegenen DNA-bindenden Domäne (DBD) mit zwei darin enthaltenen Zink-Fingern und einer C-terminal gelegenen Ligand-bindenden Domäne (LBD) am N-Terminus eine Transaktivierende Domäne (TAD) besitzen (Davis et al 1993). Während sie in der DBD eine Homologie von über 90% aufweisen, zeigen sie in der LBD nur eine mäßige und in der TAD eine geringe (ca.25%) Sequenz-Übereinstimmung (Winoto 1997).

Die Faktoren der Nur77-Subfamilie können als Monomere, Homodimere oder als Heterodimere mit RXR (= 9-*cis*-retinoic acid receptor) an die DNA binden. Sie binden als Monomere an NBREs (NGF (nerve growth factor)-induced B factor 'response element'), die die Sequenz AAAGGTCA enthalten, und als Homodimere an NurREs (Nur 'response element') mit der Sequenz TGATATTTX6AAATGCCA (Philips et al 1997).

1.3.2 Expression und Funktion von Nur77

Nur77 wird in vielen Zellen des Körpers exprimiert und kann dabei verschiedene Signale übermitteln. So wird den Mitgliedern der Nur77-Subfamilie zugeschrieben, an der Regulation von Zellwachstum und Apoptose beteiligt zu sein. Für die beiden

Faktoren Nur77 und Nor1 konnte gezeigt werden, dass sie den Zelltod von Krebszellen und Makrophagen unterstützen (Ohkubo et al 2000, Kim et al 2003, Wu et al 2002). Im Gegensatz dazu kann Nur77 auch am Überleben und Wachstum von manchen Krebszelllinien beteiligt sein (Kolluri et al 2003, Suzuki et al 2003). Nur1 wird für die Differenzierung und das Überleben von dopaminergen Nervenzellen benötigt und wird mit der Parkinson-Krankheit in Verbindung gebracht (Zetterström et al 1997, Le et al 2003, Chu et al 2006).

Im Thymus werden besonders Nur77 und Nor1 exprimiert und spielen dort bei der negativen Selektion, und zwar bei der Auslösung von Apoptose über den T-Zell-Rezeptor (TCR), eine wichtige Rolle. So konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Nur77 zur verstärkten Apoptose in T-Zell-Hybridomen führt (Liu et al 1994, Woronitz et al 1994). Diese Beobachtung wurde durch Thymozyten von transgenen Mäusen, die eine konstitutiv aktive Form von Nur77 exprimieren und eine hohe Apoptoserate besitzen, bestätigt (Calnan et al 1995, Weih et al 1996). Stattdessen inhibiert die Expression einer dominant-negativen Form von Nur77, die alle Nur77-Subfamilienmitglieder blockiert, die TCR-übermittelte Apoptose in T-Zelllinien (Liu et al 1994, Woronitz et al 1994) und in transgenen Mäusen (Calnan et al 1995, Zhou et al 1996). Zum allgemeinen Erstaunen zeigen jedoch Nur77-defiziente Mäuse keinen messbaren Defekt in der TCR-übermittelten Apoptose in unreifen Thymus- oder peripheren reifen T-Zellen (Lee et al 1995). Diese Beobachtung legt nahe, dass die Funktion von Nur77 in T-Zellen von anderen Apoptose-fördernden Faktoren oder Verwandten aus der Nur77-Subfamilie übernommen werden kann. So konnte für Nor1 gezeigt werden, dass es in den gleichen Zellen wie Nur77 im Thymus exprimiert wird und dort ebenfalls Apoptose nach TCR-Stimulierung vermittelt (Cheng et al 1997).

Im Thymus wird Nur77 in $CD4^+CD8^+$ DP-Thymozyten und in $CD4^+CD8^-$ SP-T-Zellen exprimiert. Dabei ist zu bemerken, dass es sich um relativ "reife" Formen von Thymozyten handelt, die in einem hohem Maß CD69 und den TCR exprimieren (Cho et al 2003) und somit positiv selektiert wurden. Während jedoch unreife $CD4^+CD8^-$ Thymozyten durch eine Stimulierung des TCRs ein Signal zur Apoptose erhalten, wird in einfach positiven $CD4^+CD8^-$ T-Zellen durch eine Stimulierung des TCRs die Zellteilung aktiviert. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass dieser Unterschied der Reaktion auf den gleichen Stimulus auf einen verschiedenen Phosphorylierungsgrad

von Nur77 in DP-Thymozyten im Vergleich zu SP-Thymozyten zurückzuführen ist (Cunningham et al 2006).

1.3.3 Regulation der Aktivität von Nur77

Die Aktivität von Nur77 wird sowohl auf transkriptioneller Ebene als auch auf post-translationaler Ebene reguliert.

Transkriptionelle Regulation

Zahlreiche extrazelluläre Stimuli können in verschiedenen Zellen zur erhöhten Expression von Nur77 führen. Dies können je nach Zelltyp eine Stimulation mit TNF, Anisomycin, Wachstumsfaktoren im Serum oder PMA in Fibroblasten sein (Williams und Lau 1993). Desweiteren eine durch KCl ausgelöste Membrandepolarisierung oder Stimulierung mit NGF (nerve growth factor) in PC12-Zellen (Yoon und Lau 1993), oder in T-Zellen eine Stimulierung der Zellen über den T-Zell-Rezeptor (TCR), z.B. mit einem Antikörper gegen CD3. Bei diesen verschiedenen Stimuli wird das extrazelluläre Signal auf verschiedenen Signalwegen in den Zellen weitergegeben.

So wurde in Fibroblasten gezeigt, dass für die *nur77*-Expression zwei 'AP-1 (activator protein-1) like elements' in der Promotorregion von Nur77 benötigt werden, an die das 'cAMP-response element'-bindende Protein (CREB) und der aktivierende

Transkriptionsfaktor 1 (ATF1) nach deren Phosphorylierung durch die MSKs ('mitogen- and stress-activated protein kinase') 1 und 2 binden (Darragh et al 2005).

In PC12 Zellen ist für die Aktivierung der Transkription Nur77s die Bindung von JunD (jedoch nicht von CREB) an ebenfalls zwei 'AP-1-like elements' nötig, und die Expression von dominant-negativem JunD führt zu einer Blockade der Nur77-Transkription nach NGF-Zugabe oder Membrandepolarisation (Yoon und Lau 1993 und 1994).

Dagegen scheint in T-Zellen eine andere *nur77*-Promotorregion (die von Position –307bp bis –242bp reicht) wichtig zu sein, die über einen Ca^{2+} -abhängigen Signalweg aktiviert wird und durch Cyclosporin A gehemmt werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass zwei darin enthaltene MEF2-Bindungsstellen für die Promotoraktivierung verantwortlich sind. Allerdings bindet MEF2 konstitutiv an den Promotor (Woronitz et al 1995), der in seiner transaktivierenden Funktion in unstimulierten Zellen durch Co-Repressoren gehemmt wird und erst nach TCR-Stimulation in Kooperation mit anderen

Co-Aktivatoren die Expression von Nur77 aktivieren kann. Bisher konnten Cabin-1 und Histondeacetylasen (HDACs) der Klasse IIa (HDAC4, 5, 7 und 9) als Co-Repressoren von MEF2 identifiziert werden. Cabin-1 wiederum vermittelt über mSin3 die Rekrutierung von HDAC1 und HDAC2 und verhindert durch kompetitive Bindung die Rekrutierung der Co-Aktivatoren p300 und ERK5 (extracellular signal-regulated protein kinase 5) (Youn and Liu 2000). Interessanterweise zeigen jedoch Mäuse mit einer inaktiven Variante von Cabin-1, der die MEF2-bindende Domäne fehlt, keine Veränderung der Thymozyten-Reifung und -Apoptose (Esau et al 2001). Das weist darauf hin, dass andere Co-Repressoren entscheidend an der Inhibition der Promotoraktivität von *nur77* in T-Zellen beteiligt sein müssen. Ein weiterer speziell im Thymus aktiver Co-Repressor von MEF2-vermittelter Nur77 Aktivität stellt HDAC7 dar, während HDAC4 und 5 in Muskelzellen diese Funktion übernehmen (Dequiedt et al 2003, McKinsey et al 2001). Nach TCR-Aktivierung kommt es zur Dissoziation der Co-Repressoren von MEF2 durch Bindung von Ca^{2+} -aktiviertem Calmodulin an Cabin1 (Youn et al 1999) und zum Ca^{2+} -vermittelten Export von Klasse II HDAC-Enzymen aus dem Zellkern (McKinsey et al 2001). Ebenso kommt es zur Bindung von Calcineurin an NFAT-Faktoren, wodurch diese de-phosphoryliert und in den Zellkern transloziert werden. Dort aktivieren NFAT-Faktoren mit MEF2 und p300 als weitere Co-Aktivatoren (Blaeser et al 2000, Youn et al 2000) die Transkription von Nur77.

Posttranslationale Regulation

Posttranslational kann die Aktivität Nur77s durch verschiedene Mechanismen moduliert werden. In T-Zellen können die Protein-Kinasen Akt und MAPK ('mitogen-activated protein kinase') über die RSK ('ribosomal S6 Kinase') Nur77 in seiner DNA-Bindungsdomäne an Ser-354 phosphorylieren und so seine DNA-Bindungsfähigkeit und apoptotische Aktivität vermindern (Davis et al 1993, Pekarsky et al 2001, Masuyama et al 2001). Es konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung von Nur77 an Ser-354 durch RSK eine Assoziation von Nur77 mit 14-3-3-Proteinen *in vitro* unterstützt (Wingate et al 2006), was zu einem nukleären Export führen würde. Unterschiede in der Phosphorylierung scheinen auch entscheidend zu sein für das verschiedene Schicksal von DP-Thymozyten und SP-Thymozyten. So wurden diese Zellen von Cunningham und Kollegen (2006) auf ihren Phosphorylierungsgrad des Nur77-Proteins untersucht. Dabei zeigte sich, dass unreifere DP-Thymozyten sowohl

weniger aktives Akt als auch einen geringeren Phosphorylierungsgrad von Nur77 aufweisen, was in DP-Thymozyten zum Verbleib von Nur77 im Nukleus führt, während in SP-Thymozyten Nur77 ins Zytosol transloziert wird.

Jedoch führt die Phosphorylierung von Nur77 nicht immer zur Inaktivierung von Nur77. So wurde gezeigt, dass Nur77 in BGC-823 Zellen (einer Magen-Carcinom-Zelllinie) nach TPA-Stimulierung über den Proteinkinase C-Signalweg von Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) phosphoryliert wird, was zur Translokation von Nur77 vom Zellkern in die Mitochondrien führt, wo es zur Cytochrom c (Cyt c)-Ausschüttung kommt, die zur Apoptose führt (Wu et al 2002). Dabei scheint eine Heterodimerisierung von Nur77 mit RXR (retinoid X receptors) eine Rolle beim Export aus dem Zellkern und der Lokalisierung in Mitochondrien zu spielen (Cao et al 2004).

Allerdings konnte eine Translokation von Nur77 zu den Mitochondrien und eine nachfolgende Cyt-c-Ausschüttung in Thymozyten bei der Apoptoseinduktion nicht beobachtet werden. In T-Zell-Hybridomen befindet sich Nur77 meist im Zellkern lokalisiert, was auf einen anderen Apoptoseweg als den mitochondrialen über Cytochrom c hinweist. Rajpal et al zeigten 2003, dass nach Nur77-Expression FasL, TRAIL und zwei weitere neue Apoptose-Gene (die 'Nur77 dependent-genes' (NDG) 1 und 2) angeschaltet werden und ihre Transkriptionsprodukte über die Caspase 8 bzw. über die Caspasen 3 und 8 Apoptosesignale vermitteln.

1.4 NFATc-Transkriptionsfaktoren

NFATc-Faktoren sind entscheidende Transkriptionsfaktoren für die Aktivierung und Differenzierung von Lymphozyten und spielen eine zentrale Rolle bei der Induktion der Transkription wichtiger Gene bei der Immunantwort. Erstmals wurde NFAT (der 'Nuclear Factor of Activated T cells') 1988 als möglicher Transkriptionsfaktor in Kernproteinextrakten beschrieben, der an den humanen *il-2* Promotor bindet (Shaw et al 1988).

Kurz darauf wurde dieser Faktor als eines der Zielproteine der Immunsuppressiva Cyclosporin A (CsA) und FK 506 (Tacrolimus) identifiziert (Randak et al 1990, Flanagan et al 1991), die die T-Zell-Aktivierung inhibieren und eine effiziente Immunsuppression, wie z.B. nach Organtransplantationen, erst ermöglichen.

Jedoch ist die Funktion der NFATc-Faktoren nicht auf T-Zellen beschränkt. NFATc-Faktoren spielen auch eine entscheidende Rolle bei der embryonalen Herzentwicklung, der Muskel- und Fettzellendifferenzierung, der Knochenhomöostase, der perinatalen Lungenreife, der Neurogenese, der Angiogenese und einer Vielzahl anderer zellulärer Vorgänge.

1.4.1 NFATc-Familie und -Struktur

Heute kennt man vier NFATc-Familienmitglieder, die in zahlreichen Zellen exprimiert werden: NFATc1 (NFATc, NFAT2), NFATc2 (NFATp, NFAT1), NFATc3 (NFATx, NFAT4) und NFATc4 (NFAT3). NFATc1 bis NFATc4 werden durch einen Calcium-abhängigen Signalweg über Calcineurin aktiviert, während ein fünftes NFAT-Protein, NFAT5 (NFATz, tonic-responsive enhancer-binding protein = TonEBP), über Änderungen der osmotischen Spannung reguliert wird (Miyakawa et al 1999, Go et al 2004).

Die NFATc-Familienmitglieder (NFATc1-NFATc4) besitzen zwei zentrale, evolutionell konservierte Domänen: eine hochkonservierte Domäne von ca. 300 Aminosäuren, die für die DNA-Bindung verantwortlich ist und die wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit zur DNA-bindenden Domäne der Rel/NF- κ B-Transkriptionsfaktoren auch als Rel-ähnliche Domäne ('Rel similarity domain', RSD) bezeichnet wird (Serfling et al 2000), und eine N-terminal angeordnete, regulatorische Domäne, die auch NFAT-homologe Region (NHR) genannt wird.

Durch die hohe Sequenzhomologie der RSD von 70% zwischen den typischen NFATc-Mitgliedern zeigen diese NFAT-Faktoren sehr ähnliche DNA-Bindungseigenschaften. NFATc-Faktoren binden an das NFAT-'core'-Motiv 5'-GGAAA-3'. Sie können entweder als Monomere, als Homodimere oder als Heterodimere mit anderen Transkriptionsfaktoren (wie z.B. AP-1-Proteine, Egr oder GATA-Faktoren) an die DNA binden. Als kooperativer Komplex mit AP-1-Proteinen binden sie an eine zusammengesetzte Bindungsstelle mit der Sequenz 5'-GGAAAxxxxTGxTGA-3' (Serfling et al 2006b). Auch die Interaktion mit den AP-1 Proteinen Fos und Jun wird über die RSD vermittelt (siehe unten).

Die NHR enthält zahlreiche konservierte Sequenz-Motive, die für den zytoplasmatisch / nukleären Transfer und damit für die Regulation der Aktivität der NFATc-Faktoren

wichtig sind: Serin-reiche Regionen (SRR-1 und SRR-2), Serin-Prolin Motive (SP1-SP3), zwei Bindungsstellen für Calcineurin (die SPRIEIT- und LxVP-Motive), ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) und ein nukleäres Export-Signal (NES) (Hogan et al 2003).

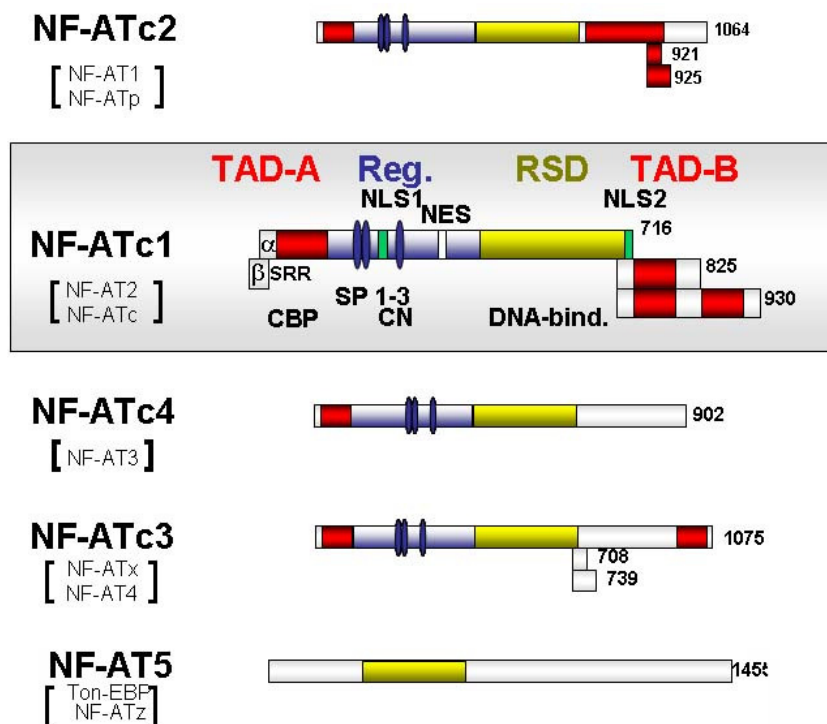


Abbildung 1: Schematische Darstellung der NFAT-Faktoren (aus Serfling et al 2006a)

TAD-A und TAD-B: transaktivierende Domänen

Reg.: regulatorische Domäne, auch NFAT-homologe Region (NHR) genannt

RSD: 'Rel similarity domain', DNA-bindende Domäne

SR 1-3: SP-Motiven 1 bis 3

NLS: nukleäres Lokalisationssignal

NES: nukleäres Exportsignal

CN: Bindungsstellen für Calcineurin

Die SRR- und SP-Motive enthalten zahlreiche Serine, die 'Target' für verschiedene Kinasen (CK1, GSK3, DYRK, JNK, p38, PKA) bzw. die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige

Ser/Thr-Phosphatase Calcineurin sind und in ruhenden Zellen in phosphorylierter Form vorliegen (siehe unter 1.4.3 Regulation der Aktivität der NFATc-Faktoren).

Die beiden Bindungsstellen für Calcineurin vermitteln die Interaktion mit Calcineurin, wobei die C-terminale Bindungsstelle (das LxVP-Motiv) von NFATc2 eine geringere Bindungsaffinität zu Calcineurin besitzt als die anderen NFATc-Mitglieder, was zu Isoform-spezifischen Unterschieden in der Aktivität der NFATc-Faktoren und deren subzellulären Lokalisation führen kann, wie sie z.B. bei der Muskeldifferenzierung oder in Endothelzellen beobachtet wird (Hogan et al 2003, Martínez-Martínez et al 2006).

Das NLS und das NES bestimmen die subzelluläre Lokalisation der NFATc-Faktoren. Je nach Phosphorylierungsgrad der SRR-1 liegen die NFATc-Faktoren in maskierter oder enthüllter Konformation vor, was zu einem entsprechenden Im- oder Export in den bzw. aus dem Zellkern führt (Beals et al 1997, Zhu et al 1998, Hogan et al 2003, Okamura et al 2004).

Am N-Terminus besitzen alle typischen NFATc-Faktoren eine transaktivierende Domäne (TAD-A). Eine transaktivierende Domäne am C-Terminus (TAD-B) ist dagegen nur in NFATc2, c3 und c4, und den langen Splicingformen von NFATc1 (NFATc1/ α C, NFATc1/ β C) enthalten (Imamura et al 1998, Chuvpilo et al 1999). Über TAD-A interagieren NFATc-Faktoren mit den transkriptionellen Co-Aktivatoren p300/CBP, was ihre transkriptionelle Aktivität erhöht (Avots et al 1999).

1.4.2 Expression und Funktion von NFATc-Faktoren

NFATc-Faktoren werden in einer Vielzahl von Zellen exprimiert und übernehmen dort verschiedene Aufgaben. Dabei überlappen die Expressionsmuster und Funktionen der verschiedenen NFATc-Faktoren. Jedoch erfüllen die NFATc-Faktoren auch spezifische Aufgaben. In den letzten Jahren sind immer mehr molekulare Mechanismen identifiziert worden, an denen NFAT-Faktoren beteiligt sind.

So spielen sie bei der Osteoklastendifferenzierung und damit der Knochenhomöostase eine entscheidende Rolle (Asagiri et al 2005, Crotti et al 2006), bei der Differenzierung von β -Zellen im Pankreas (Heit et al 2006) und bei der Regulation der Funktion von Fettzellen (Kim et al 2006). Für die perinatale Lungenreife und Lungenfunktion konnte gezeigt werden, dass durch NFATc3 entscheidende Gene kontrolliert und aktiviert

werden, die für eine normale Lungenstruktur und Surfactantbildung benötigt werden (Davé et al 2006).

Auch im Nervensystem scheinen sie entscheidende Regulatoren zu sein. So werden für das Überleben hohe Konzentrationen von NFATc4 im Zellkern der Nervenzellen benötigt und pro-apoptotische Signale, wie ein Absinken der extrazellulären Kaliumkonzentration oder ein Entzug von Serum-Wachstumsfaktoren, führen zum nukleären Export von NFATc4 und zur Apoptose der Nervenzellen (Benedito et al 2005). Auch als Ursache für das Down-Syndrom wird eine zu geringe NFAT-Aktivität im Zellkern angenommen, da das Down-Syndrom durch die Trisomie zur Überexpression von *DSCR1*, einem Inhibitor von Calcineurin, und *DYK1A*, einer NFAT-Kinase, führt. Das resultiert in der Phosphorylierung der NFAT-Faktoren und somit im nukleären Export von NFATc4. Auch eine Akkumulation von NFATc1, wie sie bei der Neurogenese beobachtet wird, wird durch diese Mechanismen verhindert (Arron et al 2006).

Des Weiteren sind NFAT-Faktoren in Muskelzellen aktiv und vermitteln dort u. a. die Differenzierung von langsamen und schnellen Muskelfasern (Chin et al 1998, Tothova et al 2006). Auch für die embryonale Herzentwicklung sind NFAT-Faktoren essentiell. So versterben NFATc1-defiziente Mäuse schon *in utero* durch Fehlbildungen der Herzklappen und -septen (de la Pompa et al 1998, Ranger et al 1998). Im erwachsenen Organismus werden NFAT-Faktoren mit Skelett- und Herzmuskelhypertrophie assoziiert (Crabtree und Olson 2002).

Das jedoch am besten studierte Zellsystem, in dem NFAT-Faktoren exprimiert werden, ist das Immunsystem. In ihm wurden die NFAT-Faktoren entdeckt, werden NFATc1, c2 und c3 exprimiert und übernehmen wichtige Aufgaben, wie Versuche mit verschiedenen Knock-Out-Mäusen zeigen (Serfling et al 2000, Hogan et al 2003). NFATc-Faktoren vermitteln die Aktivierung von T-Zellen über den TCR, steuern die Expression von verschiedenen Interleukinen (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5) und weiteren Cytokinen (TNF α , GM-CSF) (Serfling et al 2000) und damit die Differenzierung von naiven T-Helfer-Zellen (TH-Zellen) zu Effektor-T-Zellen. Außerdem kontrollieren sie die periphere T-Zell-Toleranz über die Induktion des AICD peripherer Lymphozyten über den FasL bzw. durch Unterdrückung einer Immunantwort durch CD4⁺CD25⁺-T-

regulatorische Zellen (Treg) in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren, besonders mit FoxP3 (Serfling et al 2006b).

1.4.3 Regulation der Aktivität der NFATc-Faktoren

Die NFATc-Faktoren NFATc1-c4 werden, wie bereits erwähnt, Calcium-abhängig aktiviert. Dabei müssen zur vollständigen Aktivierung der Transkription NFATc-abhängiger Zielgene immer zwei Signalwege in der Zelle aktiviert werden.

Durch ein extracelluläres Signal, z.B. durch die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors, kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die wiederum Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) hydrolysiert zu Phosphatidylinositoltriphosphat (IP₃). IP₃ bindet an IP₃-Rezeptoren (IP₃R) am endoplasmatischen Retikulum (ER), was zu einem raschen Ausstrom von Calcium-Ionen aus dem ER ins Zytosol und damit zur kurzfristigen Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt. Durch einen bislang unbekanntem Signalweg wird daraufhin die Öffnung von 'calcium-release-activated' Calcium-Kanälen (CRAC-Kanälen) vermittelt, so dass es zum Einstrom von extrazellulärem Calcium in die Zelle und damit zu einer starken, lang anhaltenden Calciumkonzentrationserhöhung kommt. Hierdurch kommt es zur Bindung von Calmodulin und Calcium an die Calcium-abhängige Phosphatase Calcineurin, die dadurch aktiviert wird. Calcineurin bindet nun, vermittelt durch die zwei Calcineurin-Bindungsstellen in der regulatorischen Domäne von NFATc-Faktoren, SPRIET- und LxVP-Motiv, an NFATc-Faktoren und dephosphoryliert 13 Phosphoserine in den SRR- und SP-Motiven im N-Terminus der NFATc-Proteine (Okamura et al 2000). Dieser Schritt ist für den zytoplasmatisch-nukleären Transport von NFATc-Faktoren von entscheidender Bedeutung, da es durch die Dephosphorylierung wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung der NFATc-Faktoren mit Exponierung des NLS kommt (Crabtree und Olson 2002). Erst jetzt kann NFATc im Komplex mit Calcineurin in den Zellkern importiert werden und dort seine Zielgene aktivieren. Zur Stabilisierung des NFATc-Calcineurin-Komplexes werden anhaltend hohe Calciumspiegel in der Zelle benötigt, da es sonst rasch zur Dissoziation von Calcineurin von NFATc und zur Re-Phosphorylierung der NFATc-Faktoren durch konstitutiv aktive Kinasen (s.unten) kommt. Das induziert den nukleären Export der NFATc-Proteine (Crabtree und Olson 2002, Hogan et al 2003). NFATc hat eine eher

schwache DNA-Bindungsfähigkeit, weshalb NFATc-Proteine oft an der DNA mit anderen Faktoren zur Bildung eines NFAT-Transkriptionskomplexes kooperieren (Hogan et al 2003). Besonders gut studierte Kooperationspartner stellen dabei die AP-1-Proteine Jun und Fos dar (Chen et al 1998), die über den zweiten Signalweg aktiviert werden: parallel zur Generierung von IP_3 kommt es bei Hydrolysierung von IP_2P durch die PLC zur Bildung von Diacylglycerolen (DAGs), die den Raf/Ras-Signalweg und Proteinkinase C (PKC) aktivieren. MAP Kinasen-Aktivierung führt zur Synthese und Aktivierung von Jun und Fos. Auch andere co-aktivierende Proteine werden durch MAP-Kinasen aktiviert, so werden z.B. MEF2-Faktoren durch p38-MAP-Kinase und ERK5 phosphoryliert (siehe Kapitel 1.5.3 über MEF2-Faktoren). Jedoch können NFAT-Faktoren auch mit anderen Faktoren interagieren und dadurch Gene inaktivieren. Ein interessantes Beispiel dafür stellt der FoxP3 dar, der besonders in T-regulatorischen Zellen (Treg) exprimiert wird und in Kooperation mit NFAT-Faktoren zahlreiche Promotoren von Lymphokinen inhibiert und damit ihre Bildung unterdrückt (Serfling et al 2006b).

Es gibt mindestens drei Mechanismen, durch die NFATc-Aktivität in der Zelle inhibiert wird (Graef et al 2001):

- Die Phosphatase Calcineurin wird durch endogene inhibitorische Proteine antagonisiert. Dies kann durch verschiedene Wirkmechanismen geschehen: DSCR1, DSCR1L1 und DSCR1L2 stellen kompetitive Hemmstoffe dar. Cabin1 ist ein nicht kompetitiver Hemmstoff. CHP-Proteine inhibieren die Calcium-abhängige katalytische Untereinheit von Calcineurin. Das Zellstrukturprotein AKAP bindet Calcineurin an bestimmte Stellen der Zelle. Calcineurin ist auch Angriffspunkt für die Immunsuppressiva CsA und FK506 (Lee und Park 2006).
- Eine Rephosphorylierung von NFATc-Faktoren durch verschiedene Kinasen führt zum raschen nukleären Export von NFAT-Faktoren aus dem Zellkern und verhindert so deren Akkumulation im Zellkern, die für das Überschreiten eines transkriptionellen Schwellenwerts nötig ist.

Dabei gibt es konstitutiv aktive Kinasen und induzierbare Kinasen. Die induzierbaren Kinasen p38-MAPK und die JNK (c-jun amino-terminalen Kinase) phosphorylieren die SP-Motive am Beginn der SRR-1 (Gómez del Arco et al 2000, Yang et al 2002; Chow et al 1997, Hogan et al 2003), die daraufhin

durch die CK1 (Casein Kinase 1) vollständig phosphoryliert werden kann. Durch den Phosphorylierungszustand der SRR-1 wird wiederum die Ver- bzw. Enthüllung des NLS und damit der nukleäre Export der NFAT-Faktoren kontrolliert (Zhu et al 1998, Okamura et al 2004).

Die GSK-3 (Glykogen-Synthase-Kinase 3) phosphoryliert dagegen die SP-Motive 2 und 3 nach einer Initialphosphorylierung durch andere Kinasen, wie die Protein Kinase A (PKA), die über den cAMP-PKA-Signalweg aktiviert wird (Beals et al 1997, Sheridan et al 2002).

Auch die Familie der DYR-Kinasen ('dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase') können als Initiatorinasen fungieren. So phosphorylieren DYRK1A, DYRK1B und DYRK2 das SP-3-Motiv, was eine weitere Phosphorylierung der SRR-1 durch die CK1 (Casein-Kinase 1) und des SP-2 durch die GSK-3 (Glykogen Synthase Kinase 3) in Gang setzt (Gwack et al 2006, Arron et al 2006).

- NFAT-Faktoren können einen negativen 'feedback'-Mechanismus aktivieren. So wird durch NFAT-Signale das *DSCR1*-Gen aktiviert und dadurch Calcineurin durch DSCR1-Protein inhibiert.

Es kann jedoch auch verstärkend zum positiven Feedback der NFAT-Signale kommen. So aktivieren NFAT-Faktoren das *IP3R*-Gen, was den Calcineurin/NFAT-Signalweg verstärkt und zu einem erhöhten Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum in die Zelle durch CRAC-Kanäle führt (Graef et al 2001).

Auch autoregulatorische Mechanismen wurden für NFATc1 (und NFATc4) beschrieben. So wird in peripheren T-Zellen nach der TCR-Aktivierung die kurze 'splice'-Form von NFATc1, NFATc1/ α A, in großen Mengen synthetisiert, was auf eine Aktivierung des induzierbaren P1 Promotors im *nfatc1*-Gen zurückzuführen ist, der durch zwei NFAT-Bindungsstellen autoregulatorisch kontrolliert wird (Serfling et al 2006a). Auch für die Osteoklasten-Differenzierung scheint besonders die autoregulatorische Synthese von NFATc1/ α A entscheidend zu sein (Asagiri et al 2005). Ein ähnlicher Mechanismus ist für NFATc4 denkbar, in dessen regulatorischen Region des *nfatc4*-Promotors ebenfalls NFAT-Bindungsstellen gefunden wurden, wodurch sich der starke Dosis-Effekt der NFAT-Inhibition bei der Trisomie 21 erklären lässt (Arron et al 2006).

Ein weiterer posttranslationaler Regulationsmechanismus, über den bisher nur weniger bekannt ist, stellt bei den NFATc-Faktoren die Sumoylierung dar. Dabei wird ein Polypeptid, das SUMO- ('Small Ubiquitin-like Modifier'-) Protein, kovalent an Lysinreste des Zielproteins gebunden, was zu einer Veränderung seiner subzellulären Lokalisation, seiner transkriptionellen Aktivität oder seiner subnukleären Zielrichtung führen kann. Bei den NFATc-Faktoren wurden bisher zwei Sumoylierungsstellen gefunden, die sich beide in der C-terminalen Region befinden. Eine dieser Sumoylierungsstellen (in NFATc2 das Lysin 684) befindet sich in direkter Nachbarschaft zur RSD, die die DNA-Bindung vermittelt, ist in allen NFATc-Proteinen konserviert und scheint die DNA-Bindungsaffinität der NFATc-Faktoren zu verstärken. Die zweite Sumoylierungsstelle in NFATc2, Lysin 897, inhibiert einen Export von NFATc2 aus dem Zellkern (Terui et al 2004).

Auch in den langen Isoformen von NFATc1 (NFATc1/ α C und / β C) sind zwei Sumoylierungsstellen im C-Terminus vorhanden (Lys701, Lys914), die in den kurzen Isoformen von NFATc1 (NFATc1/A) fehlen. Am Promotor des *il-2*-Gens konnte gezeigt werden, dass NFATc1/C an diesen Stellen *in vivo* sumoyliert wird. Damit kommt es zur Lokalisation von SUMO-NFATc1/C in 'Promyelocytic leucemia nuclear bodies' (PML-NBs) und zur Interaktion mit Histondeacetylasen (HDACs). Diese wiederum deacetylieren die Histone der DNA, was zur Inaktivierung des Promotors führt. Somit kann NFATc1/C im Gegensatz zu NFATc1/A eine Transkription des *il-2*-Gens unterdrücken, was auf einen neuen Regulationsmechanismus durch verschiedene Isoformen der NFATc1-Faktoren hinweist (Nayak A. und Berberich-Siebelt F, bisher unveröffentlichte Daten).

1.5 MEF2-Transkriptionsfaktoren

Die Familie der MEF2- (myocyte-specific enhancer-binding factor-2) Transkriptionsfaktoren wurde ursprünglich als eine Muskel-spezifische DNA-Bindungsaktivität beschrieben, die eine A/T reiche Region in Promotor- und Enhancer-Elementen verschiedener Muskel-spezifischer Gene erkennt (Gossett et al 1989). So konnte gezeigt werden, dass MEF2-Faktoren eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Muskelzellen spielen (McKinsey et al 2001). Neuere Studien zeigen auch ihre wichtige Rolle bei Herzmuskelwachstum und -entwicklung,

neuronaalem Überleben, der postsynaptischen Differenzierung von Nervenzellen, bei der Stressbewältigung und der Apoptose von T-Zellen.

1.5.1 MEF2-Familie und Struktur

Man kennt zur Zeit in Vertebraten vier *mef2* Gene (*mef2A-D*), welche vielfache Splicingformen - zumindest auf RNA-Ebene - exprimieren. Die MEF2-Faktoren gehören zur MADS-Box Familie (benannt nach den vier zuerst gefundenen Mitgliedern der Familie: MCM1, Agamous, Deficiens und 'SSerum-Response Factor') von Transkriptionsfaktoren. Die MADS-Box ist ein 57 Aminosäure messendes Motiv am extremen N-Terminus der MEF2-Faktoren, das als minimale DNA-Bindungsdomäne fungiert (Black und Olson 1998). Für eine erhöhte DNA-Bindungsaffinität und für die Bildung von Dimeren wird eine Erweiterung um weitere 29 Aminosäuren benötigt, welche als MEF2-Domäne bezeichnet wird (Molkentin et al 1996a). MEF2-Faktoren binden als Homo- oder Heterodimere an die Sequenz (C/T)TA(A/T)₄TA(A/G). Innerhalb der MADS-Box und MEF2-Domäne teilen die MEF2-Faktoren eine Homologie von ca. 95% der Aminosäuren, während sie sich in ihrer C-terminalen Region größtenteils unterscheiden (Black und Olsen 1998). Die MADS- und MEF2-Domänen interagieren auch mit weiteren Faktoren, wie den Co-Repressoren Cabin1 (Youn et al 1999) und Histon Deacetylasen (HDACs) der Klasse IIa (McKinsey et al 2001 und 2002) oder den Co-Aktivatoren p300/CBP (Sartorelli et al 1997), Mitgliedern der myogenen 'basis helix-loop-helix'-Familie, wie MyoD oder Myogenin (Kaushal et al 1994), und NFATc-Transkriptionsfaktoren. Während die MADS-Box- und MEF2-Domänen die Bindung an die DNA vermitteln, enthalten sie keine direkte transkriptionelle Aktivität.

Die C-terminalen Regionen der MEF2-Faktoren enthalten Transkriptions-aktivierende Domänen (TAD) (Molkentin et al 1996a, Yu et al 1996) und unterliegen einem komplexen Muster alternativem Splicings, wobei bestimmte Exons ubiquitär exprimiert werden und andere nur Muskel- oder Nerven-spezifisch präsent sind. Nur wenige Regionen des C-Terminus sind konserviert. Sie vermitteln u.a. die Translokalisierung in den Nukleus, enthalten verschiedene Phosphorylierungs- und Sumoylierungs-Orte und regulieren darüber die transkriptionelle Aktivität (siehe Kapitel 1.5.3 Regulation der Aktivität der MEF2-Faktoren).



Abbildung 2: Schematische Darstellung der MEF2-Faktoren am Beispiel von MEF2A

- ◆ p300-Acetylierungsstellen: Lysin 234, 239, 252 und 264
- BMK1-Phosphorylierungsstelle: Serin 387
- p38-Phosphorylierungsstellen: Threonin 312 und 319, Serin 453
- Cdk5-Phosphorylierungsstelle: Serin 408
- Sumoylierungsstelle: Lysin 403
- █ Caspase-Spaltstelle bei ca. Position 100

NLS: nukleäres Lokalisationssignal

MADS: MADS-Domäne

MEF2: MEF2-spezifische Domäne

1.5.2 Expression und Funktionen von MEF2-Faktoren

MEF2-Faktoren werden in besonders hohem Maß in Muskel- und Nervenzellen exprimiert, jedoch auch in einer Vielzahl anderer Zellen. Sie zeigen in diesen Organen überlappende Expressionsmuster, die bei der Embryogenese genau zeitlich abgestimmt sind (Black und Olson 1998). Während die Expression von MEF2C auf Skelettmuskel-, Nerven- und B-Zellen beschränkt ist, werden MEF2A, MEF2B und MEF2D in zahlreichen Zellen exprimiert. Im Immunsystem wird MEF2C nur in B-Zellen exprimiert, während MEF2D-Protein sowohl in B- als auch in T-Zellen nachweisbar ist (Swanson et al 1998).

Die Funktion und Expression von MEF2-Faktoren wurde besonders intensiv an Muskelzellen untersucht, wo sie eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung spielen (Black und Olson 1998, McKinsey et al 2002). Sie werden auch mit der Hypertrophie und Proliferation von Muskelzellen in Verbindung gebracht und sind mit der dilatativen Cardiomyopathie assoziiert (Han und Molkenin 2000, Czubryt und Olson 2004, Xu et al 2006). In post-mitotischen Nervenzellen des ZNS wurde gezeigt, dass MEF2-Aktivität zum neuronalen Überleben bei Depolarisation benötigt wird und die postsynaptische Differenzierung von Dendriten reguliert (Mao und Wiedmann 1999,

Linsemann et al 2003, Shalizi et al 2006). Bei der Induktion von Apoptose neuraler Zellen durch Absenkung der extracellulären Kaliumkonzentration oder Glutamat werden dagegen MEF2A und MEF2D degradiert und damit inaktiviert (Li et al 2001, Tang et al 2005). Ein Polymorphismus des *mef2A*-Gens scheint eine Disposition für die Entwicklung der Alzheimer-Krankheit zu sein (Gonzalez et al 2007).

Eine wichtige Rolle spielen MEF2-Faktoren auch im Immunsystem, wo sie über Nur77 bei der negativen Selektion von T-Zellen im Thymus die Apoptose autoreaktiver T-Zellen vermitteln (Woronitz et al 1995, Blaeser et al 2000, Youn et al 2000). Ebenso sind sie an der Calcium-abhängigen Transkription von Interleukinen in reifen T-Zellen beteiligt (Esau et al 2001, Pan et al 2004).

1.5.3 Regulation der Aktivität von MEF2-Faktoren

Die Regulation der MEF2-Proteinaktivität ist komplex. So werden die Expression und Aktivität von MEF2-Faktoren sowohl auf transkriptioneller, translationaler als auch auf posttranslationaler Ebene gesteuert und können sowohl eine DNA-repressive als auch eine DNA-aktivierende Rolle übernehmen.

Transkriptionelle Regulation

Die verschiedenen *mef2*-Gene sind zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung aktiv. Es zeigte sich, dass sie von mindestens einem Dutzend unabhängiger Enhancerelemente kontrolliert werden, die zellspezifisch aktiviert werden (Black und Olson 1998). In *Drosophila* konnten bislang zwei Faktoren identifiziert werden, die als Transkriptionsfaktoren an Enhancerelementen des *mef2*-Promotors aktiv sind: Twist, ein 'basic helix-loop-helix'-Faktor, der bei der Differenzierung des Mesoderms wichtig ist (Cripps et al 1998) und Tinman, der das *mef2*-Gen bei der Herzentwicklung aktiviert (Gajewski et al 1997).

Translationale Regulation

mef2-mRNA wird in verschiedenen Zellen unterschiedlich prozessiert. So konnte u.a. für eine evolutionell konservierte Sequenz in der 3'-untranslatierten Region von *mef2A*-mRNA gezeigt werden, dass sie eine Translation in Nicht-Muskelzellen inhibiert und erst bei der Muskeldifferenzierung dieser Effekt aufgehoben wird (Black et al 1997). Auch bei verschiedenen MEF2C-'Splice'-Isoformen zeigt sich durch einen zusätzlich enthaltenen, regulatorisch aktiven Phosphoserinrest (Zhu und Gulick 2004), über den

eine Sumoylierung von MEF2C vermittelt wird (Kang et al 2006), ein Unterschied in der Aktivität von MEF2C.

Posttranslationale Regulation

In Abwesenheit von transaktivierenden Stimuli unterdrücken MEF2-Faktoren die Transkription ihrer Zielgene durch Assoziation mit Co-Repressoren.

Histondeacetylasen (HDACs) der Klasse IIa (HDACs 4, 5, 7 und 9) können direkt an die MEF2-Domäne von MEF2-Faktoren binden, die N-terminalen Anteile der Histone deacetylieren und durch die daraus folgende Chromatinkondensation eine Transkription inhibieren. Erst nach Stimulierung der Zellen und Ca^{2+} -Einstrom kommt es zur Phosphorylierung der HDACs durch Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Kinasen (=CaMKs) (Linseman et al 2003) und durch die Protein-Kinase D (PKD). Dadurch werden die HDACs von MEF2 gelöst und binden an 14-3-3 Proteine (Wang et al 2000), was zum nukleären Export führt (McKinsey 2001 und 2002, Verdin et al 2003, Dequiedt et al 2003).

Desweiteren werden MEF2-Faktoren in Abwesenheit von Calcium durch Assoziation mit Cabin1 in ihrer transkriptionellen Aktivität gehemmt. Cabin1 bindet ebenfalls direkt an MEF2 und rekrutiert über mSin3 HDACs der Klasse I (HDACs 1 und 2) (Youn et al 1999, Youn et Liu 2000) und die Methyltransferase SUV39H1 (Jang et al 2007). Nach Ca^{2+} -Einstrom bindet aktiviertes Calmodulin an Cabin1 und führt so zur Dissoziation von MEF2. Die CaMKIV phosphoryliert Cabin1, was den nukleären Export von Cabin1 durch 14-3-3 Proteine unterstützt (Pan et al 2005).

Kürzlich konnte HDAC3 als ein weiterer Co-Repressor von MEF2-Faktoren identifiziert werden. Dabei deacetyliert der HDAC3-Komplex (HDAC3 mit SMRT und N-CoR) direkt MEF2, was zur Inhibition der MEF2-abhängigen Transkription und der Myogenese in Fibroblasten führt (Gregoire et al 2007). Welcher Mechanismus die HDAC3-Interaktion antagonisiert, konnte bisher nicht festgestellt werden.

Zur Erhöhung der transkriptionellen Aktivität nach Stimulierung der Zellen binden verschiedene Co-Aktivatoren an MEF2. Acetylasen, wie p300, können nach Dissoziation der Co-Repressoren an die MADS-Box der MEF2-Faktoren binden (Sartorelli et al 1997). Dort acetylieren sie spezifische Lysinreste von MEF2-Faktoren und verstärken so die transkriptionelle Aktivität (Ma et al 2005). Auch andere Transkriptionsfaktoren, wie MyoD (Kaushal et al 1994) oder NFATs (Blaeser et al

2000, Youn et al 2000), können direkt mit MEF2-Faktoren über die MADS/MEF2-Domäne interagieren und so ihre Zielgene synergistisch aktivieren.

Als weiterer Mechanismus zur Regulation der transkriptionellen Aktivität der MEF2-Faktoren ist die Phosphorylierung zu nennen. Durch die Mitogen-aktivierte Protein-Kinase p38 und die 'extracellular signal-regulated kinase 5' (ERK5, auch bekannt als 'big MAP kinase 1' (BMK1)) werden MEF2-Faktoren phosphoryliert, was zu einer Aktivierung der Transkription führt (Yang et al 1998, Zhao et al 1999, Han und Molckentin 2000). Auch die Phosphorylierung einer Phosphorylierungsstelle in der MADS-Box durch Casein Kinase II (CKII) erhöht die DNA-Bindungsaffinität und die transkriptionelle Aktivität von MEF (Molckentin et al 1996b).

Dagegen führt eine Phosphorylierung von MEF2A, MEF2C und MEF2D durch die 'cyclin-dependent kinase 5' (Cdk5) an Ser444 im C-Terminus von MEF2D (bzw. an homologen Positionen in MEF2A, Ser408, und MEF2C, Ser396,) zu einer Inhibition der Transkription MEF2-abhängiger Gene (Gong et al 2003). Dieser Effekt scheint durch verschiedene Signal-Wege vermittelt zu werden. Erstens zeigte sich in Muskelzellen, dass diese Phosphorylierung eine Sumoylierung an einem benachbarten konservierten Lysinrest (in MEF2D Lys439, in MEF2A Lys403) in der transaktivierenden Domäne von MEF2-Faktoren durch SUMO2 und SUMO3 fördert, was eine Transkription unterdrückt. Die Sumoylierung wird von Klasse IIa HDACs unterstützt und von der Protease SENP3 rückgängig gemacht (Grégoire et al 2005 und 2006). Von MEF2C konnte gezeigt werden, dass eine Sumoylierung des Lysin391 die transkriptionelle Aktivität hemmt und diese Sumoylierung ebenfalls durch eine Phosphorylierung des benachbarten Serin396 unterstützt wird (Kang et al 2006). Auch in sich entwickelnden Nervenzellen konnte eine Sumoylierung an MEF2A als regulatorisch entscheidender Vorgang nachgewiesen werden (Shalizi et al 2006). In Nervenzellen des Cerebellums zeigte sich zudem ein zweiter Mechanismus. Dort unterliegen am C-Terminus phosphorylierte MEF2A- und MEF2D-Faktoren einer Degradation durch Caspasen, die ein N-terminales DNA-bindendes Fragment vom transaktivierenden C-Terminus abspalten. Dieses N-terminale Fragment wirkt als dominant-negative Variante und inhibiert die MEF2-abhängige Transkription (Li et al 2001, Tang et al 2005). Die Phosphorylierung von Ser444 bei MEF2D (bzw. Ser408 bei MEF2A) durch die Cdk5 kann durch Calcineurin rückgängig gemacht werden, was zu einer Stabilisierung der

MEF2-Faktoren und einer Aktivierung der MEF2-abhängigen Transkription führt (Mao und Wiedmann 1999, Grégoire et al 2006).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Zum Zeitpunkt des Beginns meiner experimentellen Arbeiten war schon längere Zeit bekannt, dass Calcium-sensible Regionen des *nur77*-Promotors dessen Aktivität in Thymozyten entscheidend regulieren. Diese Promotoraktivität konnte durch Cyclosporin A gehemmt werden und wurde auf zwei Bindungsstellen zurückgeführt, die der Bindungsstelle für Serumwachstumsfaktoren ähneln (related to serum-response factor, RSRF) (Woronitz et al 1995). In weiteren Studien zeigte sich, dass an diese Bindungsstellen MEF2-Transkriptionsfaktoren banden. Im Vorfeld dieser Arbeit wurden zwei Artikel veröffentlicht, die sich mit der kooperativen Bindung von MEF2- und NFAT-Transkriptionsfaktoren an den *nur77*-Promotor befassten (Blaeser et al 2000, Youn et al 2000). Die Autoren postulierten, dass MEF2D mit NFATc2 (NFATp) durch Protein-Protein-Bindungen einen Komplex an der DNA bilde, während andere NFAT-Transkriptionsfaktoren dazu nicht in der Lage seien. Ebenso konnten die Autoren keine direkte Bindung von NFAT-Transkriptionsfaktoren an den *nur77*-Promotor nachweisen, was sie zu der Schlussfolgerung führte, NFATc2 würde nur über die durch MEF2-vermittelte Protein-Interaktion an die DNA binden (obwohl eine NFAT-Bindungsstelle in direkter Nachbarschaft zu der MEF2-Bindungsstelle vorliegt). Es stellte sich somit die Frage, wodurch sich die verschiedenen NFAT-Faktoren unterscheiden. So haben die NFAT-Faktoren verschiedene Expressionsmuster und verschiedene Promotoren, die in verschiedenen Zellen zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten aktiv sind, jedoch ist immer noch unklar, ob die verschiedenen NFAT-Faktoren aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede bestimmte Aufgaben ausschließlich übernehmen. Auch im Rahmen dieser Arbeit sollte dieser Frage nachgegangen werden. Da NFATc1/αA als kurze 'splice'-Form im Gegensatz zur langen 'splice'-Form NFATc1/αC und NFATc2 keine zweite Transaktivierende Domäne (TAD-B) am C-Terminus enthält (Chuvpilo et al 1999), wurde vermutet, dass sich die Kooperationsfähigkeit von NFATc1/αA mit MEF2D von der von NFATc2 bzw. NFATc1/αC unterscheiden könnte.

In dieser Arbeit sollte das Verhalten der verschiedenen NFAT-Transkriptionsfaktoren in ihrer Bindung an die DNA (den *nur77*-Promotor) und ihre Kooperationsfähigkeit mit MEF2D in der Aktivierung des *nur77*- und anderer Promotoren untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reaktionssysteme

- Acrylamidlösung	Carl Roth
- Acryl-Bisacrylamidlösung	Serva
- AEBSF (Pefabloc SC)	Roche
- Agar-Agar	Carl Roth
- Agarose	Sigma-Aldrich
- Aprotinin	Serva
- APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Merck Eurolab
- β -Mercaptoethanol	Carl Roth
- BioRad Protein Assay (5 x Bradford Reagenz)	BioRad
- Bromphenol Blau	Merck Eurolab
- Calciumchlorid (CaCl_2)	Carl Roth
- D-Luziferin	Serva
- D-MEM Fertigmedium (Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium)	Gibco BRL
- DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth
- DTT (1,4-Dithiothreitol)	Carl Roth
- EDTA ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth
- EGTA (Na_4EGTA)	Sigma-Aldrich
- Essigsäure ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)	Carl Roth
- Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma-Aldrich
- FCS (Fötale Kälberserum)	Gibco BRL
- Ficoll	Amersham Pharmacia
- Glyzerin (87%)	Carl Roth
- Glyzin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	Merck Eurolab
- HEPES; N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N'-(3-Propansulfonsäure)	Carl Roth, Gibco BRL

- Ionomycin	Sigma-Aldrich
- Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich
- Kaliumhydroxid (KOH)	Carl Roth
- L-Glutamin	Gibco BRL
- Leupeptin Hydrochlorid	Roche Applied Science
- Magermilchpulver	Saliter
- Magnesiumazetat (Mg(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ • 4H ₂ O)	Sigma-Aldrich
- Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth
- Magnesiumsulfat (MgSO ₄ • 7H ₂ O)	Carl Roth
- MES (2-N-Morpholinoethansulfonsäure, C ₆ H ₁₃ NO ₄ S)	Sigma-Aldrich
- Methanol (CH ₄ O)	Carl Roth
- Natriumazetat (CH ₃ COONa • 3H ₂ O)	Merck Eurolab
- Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
- Natriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O)	Merck Eurolab
- Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth
- Natrium-Pyruvat (C ₃ O ₃ H ₃ Na)	Gibco BRL (100 mM)
- poly dI/dC	Boehringer-Ingelheim
- PolyFect™	Quiagen
- Ponceau-Rot	Sigma-Aldrich
- radioaktive Nukleotide (γ ³² P-ATP)	Amersham Pharmacia
- RPMI 1640	Gibco BRL
- Salzsäure (HCl)	Merck Eurolab
- SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth
- Streptavidin-Agarose	Gibco BRL
- Sulfosalicylsäure (2-Hydroxy-5-sulfobenzoessäure)	Sigma-Aldrich
- SuperFect™	Quiagen
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth
- TPA (12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat)	Sigma-Aldrich
- Trichloressigsäure (C ₂ HCl ₃ O ₂)	Sigma-Aldrich
- Tris (2-Amino-2-(Hydroxylmethyl)-1,3 -Propandiol)	Carl Roth
- Triton X-100 (Alkylphenylpolyethylenglykol)	Sigma-Aldrich

- Trypsin-EDTA	Gibco BRL
- Tween 20	Carl Roth
- Xylencyanol FF	Serva

2.1.2 Lösungen und Puffer

Die verwendeten Chemikalien wurden in jeweils höchstmöglichem Reinheitsgrad von den angegebenen Herstellern bezogen. Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit doppelt destilliertem bzw. deionisiertem (Millipore-Filter) Wasser bereitet und anschließend entweder autoklaviert oder sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte in der Regel bei Raumtemperatur (RT).

APS-Stammlösung (10 %)

APS	10 g / 100 ml
-----	---------------

DTT-Stammlösung (1 M)

DTT	3,09 g / 20 ml
-----	----------------

in 10 mM Natriumazetat (pH 5,2) lösen und aliquotiert bei -20°C lagern

EDTA-Stammlösung (0.5 M)

Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O	186,1 g / l
---	-------------

pH-Wert mit 10 M NaOH (~ 50 ml) auf 8,0 einstellen;

EDTA löst sich erst bei korrektem pH-Wert

EGTA-Stammlösung (0.25 M)

EGTA	95 g / l
------	----------

pH-Wert mit KOH auf 8,0 einstellen; EGTA löst sich erst bei korrektem pH-Wert

Ethidiumbromid-Stammlösung (1 %)

EtBr	1 g / 100 ml
------	--------------

lichtgeschützt bei 4°C aufbewahren

Hepes/ KOH-Stammlösung (1 M)

Hepes	238,33 g / l
-------	--------------

pH-Wert mit KOH auf 7,2 / 7,4 / 7,9 einstellen

Kaliumchlorid-Stammlösung (1 M)

KCl	74,6 g / l
-----	------------

Natriumchlorid-Stammlösung (5 M)

NaCl 292,22 g / l

zum Lösen auf 60°C erwärmen

SDS-Stammlösung (10%)

SDS 100 g / l

auf 70°C erwärmen, pH-Wert mit 1 N HCl auf 7,2 einstellen

Tris / HCl-Stammlösung (1,5 M)

Tris 181,7g / l

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

PBS (10x)

NaCl 80 g / l

KCl 2 g / l

CaCl₂ 1 g / l

MgCl₂ 1 g / l

Na₂HPO₄ • 7 H₂O 26,8 g / l

KH₂PO₄ 2,4 g / l

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

PBS (1x)

PBS (10x) 100 ml / l

PBS-Ca²⁺ / -Mg²⁺ (10x)

NaCl 80 g / l

KCl 2 g / l

Na₂HPO₄ • 7 H₂O 26,8 g/l

KH₂PO₄ 2,4 g / l

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

PBS-Ca²⁺ / -Mg²⁺ (1x)

PBS-Ca²⁺ / -Mg²⁺ (10x) 100 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 ₂ EDTA • 2 H ₂ 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
0,7	7	800 - 12.000
1,0	10	500 - 10.000
1,2	12	400 - 7.000
1,4	14	200 - 4.000
2,0	20	50 - 2.000

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

Extraktions-Puffer A (Kernprotein- und Zytoplasmaextrakte, hypotonisch)

1 M Hepes/KOH (pH 7,9)	10 ml / l
1 M KCl	10 ml / l
0,5 M Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O (pH 8,0)	200 µl / l
0,25 M EGTA (pH 8,0)	400 µl / l

Lagerung bei 4°C, vor Verwendung Zugabe pro 10 ml Extraktions-Puffer A von:

10 µl DTT-Stammlösung (1 M)
50 µl AEBSF (0,2 M)

Extraktions-Puffer C (Kernprotein- und Zytoplasmaextrakte, Hochsalz-Extraktionspuffer)

1 M Hepes/KOH (pH 7,9)	20 ml / 1
1 M KCl	400 ml / 1
0,5 M Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O (pH 8,0)	2 ml / 1
0,25 M EGTA (pH 8,0)	4 ml / 1

Lagerung bei 4 °C, vor Verwendung Zugabe pro 10 ml Extraktions-Puffer C von:

10 µl DTT-Stammlösung (1 M) und 1 Tablette der „complete Mini“ (Protease Inhibitor) von Roche

oder 100 µl AEBSF (0,2 M), 10 µl Leupeptin (2 mM), 10 µl Aprotinin (0,3 M)

Sammelgel für SDS-Page (5 %ige Gellösung)

ddH ₂ O	34,75 ml
30 %ige Acryl-Bisacrylamidlösung	8,5 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	6,25 ml
10 % SDS	0,5 ml

zum Starten der Polymerisierung je 5 ml Gellösung Zugabe von:

10 % APS	60 µl
TEMED	10 µl

Trenngel für SDS-Page (8 %ige Gellösung)

ddH ₂ O	23,7 ml
30 %ige Acryl-Bisacrylamidlösung	13,3 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	12,5 ml
10 % SDS	0,5 ml

zum Starten der Polymerisierung je 10 ml Gellösung Zugabe von:

10 % APS	60 µl
TEMED	8 µl

Trenngel für SDS-Page (10 %ige Gellösung)

ddH ₂ O	20,3 ml
30 %ige Acryl-Bisacrylamidlösung	16,7 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	12,5 ml
10 % SDS	0,5 ml

zum Starten der Polymerisierung je 10 ml Gellösung Zugabe von:

10 % APS	60 µl
TEMED	10 µl

Trenngel für SDS-Page (12,5 %ige Gellösung)

ddH ₂ O	16,2 ml
30 %ige Acryl-Bisacrylamidlösung	20,8 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	12,5 ml
10 % SDS	0,5 ml

zum Starten der Polymerisierung je 10 ml Gellösung Zugabe von:

10 % APS	60 µl
TEMED	15 µl

4 x Lämmli-Puffer (SDS-PAGE Probenpuffer)

1,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	20 ml / 100 ml
SDS	2,4 g / 100 ml
Glycerin (87 %)	50 ml / 100 ml
β-Mercaptoethanol	25 ml / 100 ml
Bromphenol Blau	0,04 %

auf 70°C erwärmen, Stock bei -20°C lagern

Laufpuffer für SDS-PAGE (10x)

Tris	30,3 g / l
Glycin	144,1 g / l
10 % SDS	100 ml / l

pH-Wert mit 1 N HCl auf 8,5 einstellen

Laufpuffer für SDS-PAGE (1x)

Laufpuffer (10x)	100 ml / l
------------------	------------

Transferpuffer für Westernblot

Glycin	2,9 g / l
Tris	5,8 g / l
10 % SDS	3,7 ml / l
Methanol	200 ml / l

Ponceau-Färbelösung

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

TBS (20x)

Tris	121,0 g / l
NaCl	175,2 g / l
KCl	7,5 g / l

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

TBS/Tween (TBST)

TBS (20x)	50 ml / l
Tween 20	1 ml / l

"Blocking"-Puffer für Westernblot (MPT)

Milchpulver	5 g
-------------	-----

auf 100 ml mit TBS/Tween auffüllen

"Stripping"-Puffer

1,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	41,7 ml / l
10 % SDS	200 ml / l

vor jedem Gebrauch Zugabe von 700 µl β-Mercaptoethanol je 100 ml „Stripping“-Puffer

Bindungspuffer für EMSA (3x)

1 M Hepes/KOH (pH 7,9)	3 ml / 50 ml
1 M KCl	7,5 ml / 50 ml
0,5 M Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O (pH 8,0)	300 µl / 50 ml
1 M DTT	150 µl / 50 ml
Ficoll	6 g / 50 ml

Aliquote bei -20°C lagern, vor Verwendung auf Eis auftauen

TBE (1x, DNA-EMSA-Laufpuffer)

TBE (10x)	100 ml / l
-----------	------------

PAA-Gel für Aufreinigung radioaktiver DNA-Sonden (12 %ige Gellösung)

ddH ₂ O	30 ml
30 %ige Acryl-Bisacrylamidlösung	18 ml
10x TBE-Puffer	2 ml

zum Starten der Polymerisierung (Polymerisationszeit 1 h) Zugabe von:

10 % APS	300 µl
TEMED	60 µl

PAA-Gel für EMSA (6 %ige Gellösung)

ddH ₂ O	72 ml
30 %ige Acryl-Bisacrylamidlösung	20 ml
10x TBE-Puffer	8 ml

zum Starten der Polymerisierung (Polymerisationszeit 1-3 h) Zugabe von:

10 % APS	500 µl
TEMED	50 µl

Hochsalz-Elutionspuffer (PAA-Gel)

1,5 M Tris/HCl (pH 7,5)	6,7 ml / l
5 M NaCl	200 ml / l
0,5 M Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O (pH 8,0)	2 ml / l

Lagerung bei 4 °C

„Harvesting“-Puffer für Luziferase-Assay

1,5 M Tris/HCl (pH 7,8)	1,7 ml / 50 ml
1 M MES	2,5 ml / 50 ml
Triton X-100	50 µl / 50 ml

frisch herstellen und vor Verwendung Zugabe von 50 µl DTT-Stammlösung (1 M)

„Assay“-Puffer für Luziferase-Assay

1,5 M Tris/HCl (pH 7,8)	4,17 ml / 50 ml
1 M MES	6,25 ml / 50 ml
1 M Mg(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ • 4 H ₂ O	1,25 ml / 50 ml

frisch herstellen und vor Verwendung Zugabe von ATP (eine Spatelspitze)

Luziferin-Lösung für Luziferase-Assay

Luziferin	28 mg / 100 ml
1 M KHPO ₄ (pH 7,8)	0,5 ml / 100 ml

Aliquots bei -20 °C lagern

Einfriermedium

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

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

10 x Puffer für Restriktionsendonukleasen (MBI-Fermentas)

<u>Puffer</u>	<u>Zusammensetzung</u>
B ⁺	0,1 M Tris / HCl (pH 7,5); 0,1 M MgCl ₂ ; 1 mg / ml BSA
G ⁺	0,1 M Tris / HCl (pH 7,5); 0,1 M MgCl ₂ ; 0,5 M NaCl; 1 mg / ml BSA
O ⁺	0,5 M Tris / HCl (pH 7,5); 0,1 M MgCl ₂ ; 1 M NaCl; 1 mg / ml BSA
R ⁺	0,1 M Tris / HCl (pH 8,5); 0,1 M MgCl ₂ ; 1 M KCl; 1 mg / ml BSA
Y ⁺	0,33 M Tris / Azetat (pH 7,9); 0,1 M Mg-azetat; 0,66 M K-azetat; 1 mg / ml BSA

2.1.3 Enzyme

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

Restriktionsendonukleasen	MBI-Fermentas, NEB
T4 Polynukleotid-Kinase (PNK)	MBI-Fermentas

2.1.4 Antikörper

Es wurden primäre monoklonale Maus-Antikörper verwendet.

<u>Antigen</u>	<u>Hersteller</u>
NFATc1 (7A6)	Alexis Biochemicals
NFATc2 (4G6-G5)	Santa Cruz (sc-7296)
HA-Epitop (HA.11)	BAbCO
β-Aktin (AC-15)	Sigma-Aldrich

Als sekundärer Antikörper diente der an HRP-gekoppelte Anti-Maus-Antikörper der Firma Amersham Pharmacia der Spezies Schaf.

2.1.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech synthetisiert und lyophilisiert zugesandt. Die Aufnahme erfolgte in ddH₂O in einer Stockkonzentration von 100 pmol / µl.

Für Protein-DNA-Bindungsexperimente wurden folgende Oligonukleotide verwendet, wobei die upper-Oligos am 5'-Ende biotinyliert waren:

nur77 Wildtyp (umfasst die Basenpaare von -274 bis -247 bp des *nur77*-Promotors):

upper 5'-TCG A-CC CGA GAG GAA AAC TAT TTA TAG ATC AAA G-3'

lower 5'-TCG A-CT TTG ATC TAT AAA TAG TTT TCC TCT CGG G-3'

nur77-MEF2mut (die MEF2-Bindungsstelle ist mutiert):

upper 5'-TCG A-CC CGA GAG GAA AAC cAT TTA TcG ATC AAA G-3'

lower 5'-TCG A-CT TTG ATC gAT AAA TgG TTT TCC TCT CGG G-3'

nur77-NFATmut (die NFAT-Bindungsstelle ist mutiert):

upper 5'-TCG A-CC CGA GAc cAA AAC TAT TTA TAG ATC AAA G-3'

lower 5'-TCG A-CT TTG ATC TAT AAA TAG TTT Tgg TCT CGG G-3'

nur77-MEF2mutNFATmut (die Bindungsstellen für MEF2 und NFAT sind beide mutiert):

upper 5'-TCG A-CC CGA GAc cAA AAC cAT TTA TcG ATC AAA G-3'

lower 5'-TCG A-CT TTG ATC gAT AAA TgG TTT Tgg TCT CGG G-3'

2.1.6 Protein-Größenstandards

Es wurde der Protein-Größenmarker BenchMarkTM von Gibco BRL verwendet, dessen Fragmentgrößen zwischen den einzelnen Chargen leicht variierten (10 Banden zwischen 10-200 Kilodalton). Exemplarisch sind die Bandengrößen in Kilodalton (kDa) der Charge 1.068.669 angegeben: 173, 111, 80, 61*, 49, 36, 25, 19, 13 und 9. Die mit * markierte, pinkfarbene Bande dient dabei zur Orientierung auf dem SDS-PAA-Gel bzw. dem Immunoblot, da alle anderen Banden blau sind.

2.1.7 Verwendete Plasmide und Vektoren

Reporterplasmide für Luciferase-Assays:

***nur77*-Promotor gesteuertes Luciferase-Reporter-Gen:** *nur77*(-307 bis -242)-luc (wt), basierend auf dem pGL2-Plasmid, konstruiert und freundlicherweise bereitgestellt von Hong-Duk Youn (Youn et al 2000).

***hFasL*-Promotor gesteuertes Luciferase-Reporter-Gen:** aus dem Labor von Dr. Koretzky.

***3xdesmef*-Luciferase-Reporter:** basierend auf dem PGL3-TATA-Vektor, enthält 3 Kopien der Promotorsequenz des *desmin*-Gens mit Bindungsstellen für MEF2 und NFAT, konstruiert und freundlicherweise bereitgestellt von Hai Wu (Wu et al 2000).

Leervektoren zur Kontrolle:

Krspa: freundlicherweise bereitgestellt von Dr. J. Troppmair, MSZ, Uni Würzburg
cDNAamp: Invitrogen, Inc.

Expressionsvektoren:

c-myc-MEF2D-Fusionsprotein: basierend auf dem pSG5-Vektor (Stratagene), konstruiert und freundlicherweise bereitgestellt von Hong-Duk Youn (Youn et al 2000).

HA-NFATc1/ α A-Fusionsprotein: konstruiert und freundlicherweise bereitgestellt von S. Chuvpilo, Molekulare Pathologie, Würzburg.

HA-NFATc2-Fusionsprotein: konstruiert und freundlicherweise bereitgestellt von S. Chuvpilo, Molekulare Pathologie, Würzburg.

MEF2D-Expressionsvektor: basierend auf dem pcDNA1.1/amp-Vektor (Invitrogen), konstruiert und freundlicherweise bereitgestellt von Brain L.Black (Black et al 1995).

NFATc1/ α A-Expressionsvektor: basierend auf dem Krspa-Vektor, konstruiert und freundlicherweise bereitgestellt von S. Chuvpilo, Molekulare Pathologie, Würzburg.

NFATc1/ α C-Expressionsvektor: basierend auf dem Krspa-Vektor, konstruiert und freundlicherweise bereitgestellt von S. Chuvpilo, Molekulare Pathologie, Würzburg.

NFATc2-Expressionsvektor: basierend auf dem Krspa-Vektor, konstruiert und freundlicherweise bereitgestellt von S. Chuvpilo, Molekulare Pathologie, Würzburg.

2.1.8 Nährmedien

Flüssigmedien und Agarplatten für die Bakterienkultur

2xYT-Medium

2-YT Broth (GibcoBRL)	31 g
-----------------------	------

auf 1000 ml mit ddH₂O auffüllen, nach dem Autoklavieren sowie Abkühlen auf ca. 60°C, evtl. Zugabe von Antibiotika.

oder

2xYT-Medium

Bacto-Trypton	16 g
---------------	------

Hefe-Extrakt	10 g
--------------	------

NaCl	10 g
------	------

auf 1000 ml mit ddH₂O auffüllen, pH-Wert mit 10 M NaOH (ca. 200 µl) auf 7,0 einstellen, nach dem Autoklavieren sowie Abkühlen auf ca. 60°C evtl. Zugabe von Antibiotika.

2xYT-Agarplatten

2-YT Broth (GibcoBRL)	31 g
-----------------------	------

Agar-Agar	12 g
-----------	------

auf 1000 ml mit ddH₂O auffüllen, nach dem Autoklavieren sowie Abkühlen auf ca. 60°C evtl. Zugabe von Antibiotika.

oder

2xYT-Agarplatten

Bacto-Trypton	16 g
---------------	------

Hefe-Extrakt	10 g
--------------	------

NaCl	10 g
------	------

auf 1000 ml mit ddH₂O auffüllen, pH-Wert mit 10 M NaOH (ca. 200 µl) auf 7,0 einstellen, nach dem Autoklavieren sowie Abkühlen auf ca. 60°C evtl. Zugabe von Antibiotika.

LB-Medium

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

auf 1000 ml mit ddH₂O auffüllen, pH-Wert mit 10 M NaOH (ca. 200 µl) auf 7,0 einstellen, nach dem Autoklavieren sowie Abkühlen auf ca. 60°C evtl. Zugabe von Antibiotika.

LB-Agarplatten

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

auf 1000 ml mit ddH₂O auffüllen, pH-Wert mit 10 M NaOH (ca. 200 µl) auf 7,0 einstellen, nach dem Autoklavieren sowie Abkühlen auf ca. 60°C evtl. Zugabe von Antibiotika.

SOB-Medium

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

auf 1000 ml mit ddH₂O auffüllen, pH-Wert mit 10 M NaOH (ca. 200 µl) auf 7,0 einstellen, nach dem Autoklavieren und vor Verwendung Zugabe von:

MgCl ₂ (1 M)	10 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O (1 M)	10 ml

SOB-Agarplatten

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

auf 1000 ml mit ddH₂O auffüllen, pH-Wert mit 10 M NaOH (ca. 200 µl) auf 7,0 einstellen, nach dem Autoklavieren und vor Verwendung Zugabe von:

MgCl ₂ (1 M)	10 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O (1 M)	10 ml

Zellkultur-Medien**Suspensions-Zelllinien** (Jurkat T-Zellen, EL-4-T-Zellen)

RPMI 1640 Fertigmedium	1 l
FCS	5 %
L-Glutamin (200 mM)	5 ml
Penicillin (10.000 IU / ml), Streptomycinsulfat (10 mg / ml)	6 ml

bei EL-4-Zellen

β -Mercaptoethanol (50 mM)	1 ml
----------------------------------	------

adhärente Zelllinie (293 T-Zellen)

D-MEM Fertigmedium	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 μ l
Natrium-Pyruvat (100 mM)	5 ml
Hepes (1 M)	5 ml

2.1.9 Antibiotika

Ampicillin (Stock: 100 mg / ml), Endkonz. 100 μ g / ml	Hoechst
Stock: Penicillin (10.000 IU / ml) / Streptomycinsulfat (10 mg / ml)	Hoechst
Zeocin (Stock: 100 mg / ml), Endkonz. 200 μ g / ml bis 400 μ g / ml	InvitroGen

2.1.10 Bakterien

Die Bakterien wurden von Stratagene bezogen und wie unter 'Bakterienkulturen' beschrieben weiterbehandelt. In allen hier verwendeten Stämmen von Escherichia coli (E.coli) wird die genetische Rekombination aufgrund einer Mutation im recA-Gen unterdrückt.

Zur Vermehrung von Plasmiden mit einer Größe ab 9 Kilobasenpaare (kB) und größer wurde der hochkompetente Stamm XL10-GoldTM verwendet. In diesen Zellen wird eine höhere Ausbeute und Reinheit der Plasmid-DNA durch eine Deletion des EndA-Gens erreicht. Außerdem erlaubt die Deletion aller bekannten K 12-Restriktionssysteme

das Klonieren methylierter DNA. Zur Vermehrung von kleineren Plasmiden (3-9 kB) wurde der Stamm DH5 α mit den entsprechenden Vektoren transformiert.

2.1.11 Gewebekulturzellen

Alle Gewebekulturzellen wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) oder die „American Type Culture Collection“ (ATCC) bezogen.

Jurkat T-Zellen wurden von einem Patienten mit akuter T-Zell-Leukämie isoliert. Es ist eine pseudodiploide Zelllinie, die nach Stimulation mit Phorbol ester und anderen Lektinen (Adhäsionsmoleküle) oder monoklonalen Antikörpern gegen den T3-T-Zell-Rezeptor (TZR) große Mengen an Interleukin-2 (IL-2) synthetisiert (Weiss et al 1984). Die Produktion von humanem Interferon γ (IFN γ) kann ebenfalls induziert werden (DSMZ Nr. ACC 282).

293-Zellen wurden aus primären humanen embryonalen Nierenzellen nach einer Transformation durch einen Adenovirus des Types 5 (Ad 5) etabliert (Graham et al 1977). Diese Zelllinie, die sowohl adhärenz als auch in bewegten Suspensionskulturen wächst, ist auch unter den Bezeichnungen HEK 293 oder nach Einfügung des SV40-T-Antigens als 293 T bekannt (DSMZ Nr. ACC 305).

EL-4 T-Zellen wurden aus einem murinen, mittels 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracen induzierten T-Zell-Lymphom etabliert. Nach einer Phorbol ester-Stimulation sekretiert diese Zelllinie Zytokine wie IL-2, IL-3, IL-4 und IL-10 sowie den Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) (ATCC Nr. TIB-39).

2.1.12 Verbrauchsmaterialien

- 1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Eppendorf
- 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
- 6-well Gewebekulturplatten	Greiner bio-one
- 12-well Gewebekulturplatten	Greiner bio-one
- 24-well Gewebekulturplatten	Greiner bio-one, Falcon
- 15 ml/ 50 ml Polypropylenröhrchen	Greiner bio-one, Nunc
- 2 ml Kryotubes	Greiner bio-one
- Einmalkanülen (26 G 3/8; 0,45 x 10 mm)	Hartenstein

- Einmalküvetten	Hartenstein
- Einmalspritzen (1 ml, 10 ml, 20 ml)	Hartenstein
- Gewebekulturflaschen (50 ml, 250 ml, 500 ml))	Greiner bio-one
- Gewebekulturschalen (60 mm, 90 mm)	Falcon, Greiner bio-one
- Glaswaren	Schott
- Nitrozellulose Membran	Schleicher & Schuell
- Parafilm	Hartenstein
- Pipettenspitzen	Eppendorf
- Röntgenfilme (13 x 18 cm, BioMax)	Kodak
- Serologische Pipetten	Sarstedt
- Sterilfilter (0,2 µM/ 0,45 µM)	Schleicher & Schuell
- Whatman Papier	Hartenstein
- Zellsiebe (70 uM)	Falcon/ Laborbedarf Schubert

2.1.13 Geräte

- Autoklav	Stiefenhofer
- Brutschränke	Nunc, Heraeus
- Eismaschine	Genheimer
- Gefrierschränke (-20°C; -70°C)	Privileg, Bosch, Liebherr; Heraeus
- Geldokumentationssystem	Herolab
- Gelkammern	Stratagene, Hoefer
- Gelrockner	BioRad, Hartenstein
- Heizblöcke	Hartenstein
- Kühlzentrifugen	Heraeus
- Lichtmikroskope	Olympus, Leica
- Luminometer	Berthold
- Mikroliter Pipetten	Eppendorf, Brand
- Mikrozentrifugen	Eppendorf
- pH-Meter	Ingold, Hartenstein
- Quarzküvetten	Hellma
- Röntgen-Verstärkerfolie	DuPont
- Rotoren (JA-10, JA-14)	Beckman

- Schüttelinkubator	Hartenstein, New Brunswick
- Spannungsquelle	Amersham Pharmacia Biotech
- Spektralphotometer	Amersham Pharmacia Biotech
- Sterilbank	Heraeus, Gelaire
- Stickstoff-Tanks	tec-lab
- Szintillations-Messgerät	Canberra Packard
- Ultrazentrifuge	Beckman
- Vortexer	Hartenstein
- Waage Precisa 300 MC	Sartorius, Hartenstein
- Wasser-Entsalzungsanlage (MilliQ-Plus)	Millipore
- Westernblot-Apparatur	Hoefler
- Zählkammer (Neubauer improved)	Brand

2.1.14 Angaben zu den Herstellern

Alexis Biochemicals Deutschland GmbH, Grünberg, BRDeutschland

American Type Culture Collection (**ATCC**), Manassas, VA, USA

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRDeutschland

BAbCO (Berkeley Antibody Company), Richmond, CA, USA

Beckman, Palo Alto, CA, USA

Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim, BRDeutschland

BioRad Laboratories, München, BRDeutschland

Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, BRDeutschland

Bosch, Robert Bosch GmbH, Stuttgart, BRDeutschland

Brand GmbH + Co. KG, Wertheim a.M., BRDeutschland

Canberra Packard, Frankfurt a.M., BRDeutschland

Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe, BRDeutschland

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (**DSMZ**),

Braunschweig, BRDeutschland

DuPont Performance Coatings Herberts GmbH & Co. KG, Wuppertal, BRDeutschland

Eppendorf, Hamburg, BRDeutschland

FalconTM (BD Biosciences), Heidelberg, BRDeutschland; Boston, Massachusetts, USA

Gelaire Flow Laboratories, Opera, Italien

Genheimer GmbH, Hettstadt, BRDeutschland
GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe / Eggenstein, BRDeutschland
Greiner bio-one, Frickenhausen, BRDeutschland
Hartenstein, Würzburg, BRDeutschland
Hellma, Mühlheim/ Baden, BRDeutschland
Heraeus, Hanau, BRDeutschland
Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, BRDeutschland
Hoechst AG (Aventis), Frankfurt a.M., BRDeutschland
Hofer (Amersham Pharmacia Biotech), Freiburg, BRDeutschland
Ingold (Merck Eurolab), Darmstadt, BRDeutschland
Invitrogen, Groningen, Niederlande
Kodak, Stuttgart, BRDeutschland
Laborbedarf Schubert, Wackersdorf, BRDeutschland
Leica Microsystems AG, Wetzlar, BRDeutschland
Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, BRDeutschland
MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, BRDeutschland
Merck Eurolab (VWR International Inc.), Darmstadt, BRDeutschland
Millipore GmbH, Eschborn, BRDeutschland
MWG-Biotech, Ebersberg, BRDeutschland
NEB (New England Biolabs) GmbH, Frankfurt, BRDeutschland
New Brunswick Scientific, New Brunswick, NJ, USA
Nunc, Wiesbaden-Biebrich, BRDeutschland
Olympus Optical GmbH, Hamburg, BRDeutschland
Privileg, Quelle AG, Fürth, BRDeutschland
Quiagen GmbH, Hilden, BRDeutschland
Roche Applied Science, Mannheim, BRDeutschland
Saliter, J.M. Gabler Saliter GmbH & Co. KG - Milchwerk, Obergünzburg,
BRDeutschland
Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz CA, USA
Sarstedt, Nümbrecht, BRDeutschland
Sartorius, Göttingen, BRDeutschland
Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, BRDeutschland

Schott-Glas, Mainz, BRDeutschland

Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG, Heidelberg, BRDeutschland

Sigma Aldrich, Taufkirchen, BRDeutschland

Stiefenhofer C. GmbH, Peiting, BRDeutschland

Stratagene Europe, Amsterdam, Niederland

tec-lab, Königstein/ Ts., BRDeutschland

2.2 Zellkultur und zellbiologische Methoden

2.2.1 Lagerung und Kultivierung verwendeter Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten und Stimulationen wurden unter einer Sterilbank ausgeführt. Die in 2 ml - Kryotubes in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zellen ($6,0 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ Einfriermedium) wurden im 37°C warmen Wasser aufgetaut, und die Zellsuspension wurde in ein mit 10 ml Kompletmedium gefülltes 15 ml Polypropylenröhrchen pipettiert. Nach der Zentrifugation (200 g, 8 min, RT) wurden die Zellen in Kompletmedium resuspendiert, gezählt (Neubauer-Zählkammer, Trypanblau-Ausschlussmethode) und in Gewebekulturgefäße überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank. Das komplette Zellkulturmedium wurde wachstumsabhängig alle 2 bis 4 Tage erneuert. Die adhären 293 T-Zellen wurden nach Waschen mit PBS durch Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA pro 90 mm Gewebekulturschale und 3-minütigem Einwirken von den Kulturgefäßen gelöst und nach einmaligem Waschen mit Kompletmedium (200 g, 8 min, 10°C) in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 neu ausgesät.

2.2.2 Induktion der Zellen

Im folgenden Abschnitt werden die Konzentrationen für die optimale Stimulation bzw. Suppression von Gewebekulturzellen und primären Zellen mit unterschiedlichen Stimuli angegeben:

TPA: 20 ng / ml zur Stimulation von Zellen der Zelllinien EL-4 und 293T, 10 ng / ml für Zellen der Zelllinie Jurkat

Ionomycin: 1 μ M / ml zur Stimulation von Zellen der Zelllinien EL-4 und 293T, 0,5 μ M / ml für Zellen der Zelllinie Jurkat

Die Zellen wurden 4 - 20 h mit den angegebenen Induktoren inkubiert.

2.2.3 Transiente Transfektionen

Zur transienten Transfektion eukaryontischer Zellen wurden die Transfektionsreagenzien SuperFect™ bei Suspensionszellen (Jurkat, EL-4) und PolyFect™ bei adhärenen Zellen (293T) der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet. Zwei Stunden vor der Transfektion wurden in eine 6-well Gewebekulturplatte pro Kavität 2,5 ml in Suspension wachsende Zellen ($5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$) pipettiert. Die 293T-Zellen wurden einen Tag zuvor gesplittet, wobei pro Kavität einer 6-well Gewebekulturplatte $7,5 \times 10^3$ Zellen eingesetzt wurden. Der Transfektionsansatz setzte sich aus bis zu 4 μ g Plasmid-DNA in 75 μ l FKS-freiem Zellkulturmedium und 6 μ l Transfektionsreagenz zusammen. Nach kurzem Vortexen des Ansatzes und 5-10 min Inkubation bei RT wurde der Ansatz entweder direkt zu den Zellen (Suspensionskultur) gegeben, oder das Medium wurde vor Zugabe des Transfektionsansatzes verworfen und der Ansatz vorsichtig in 2,5 ml neuem Medium den Zellen zugegeben (adhärente Zellen). Nach 24-48 h Inkubation im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit) konnten die Zellen nach Bedarf stimuliert werden.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Präparation von Kernprotein- und Zytoplasma-Extrakten eukaryontischer Zellen

Nach der Zellernte (Zentrifugation bei 250 g, für 5 min, bei 4°C) wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem PBS-Ca²⁺/-Mg²⁺ in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis im Kühlraum. Die verwendeten Materialien wurden auf 4°C vorgekühlt. Die Zellen wurden sedimentiert (5.200 g, 1 min), das Pellet in Puffer A resuspendiert (100 µl pro 1 x 10⁷ Zellen) und 20 min inkubiert. In dieser Zeit schollen die Zellen im hypotonischen Puffer. Zur Zelllyse wurde die Suspension 8-10 mal mit Hilfe einer 1 ml Einmalspritze durch eine feine Kanüle (26G 3/8; 0,45 x 10 mm) gezogen. Die Abtrennung des Zytoplasmas erfolgte durch anschließende Zentrifugation (5.200 g, 2 min). Der Überstand (Zytoplasma) wurde in ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, das Sediment zweimal vorsichtig (nicht resuspendieren) mit 800 µl Puffer A gewaschen (12.000 g, 30 s) und das Pellet anschließend im einfachen Volumen des Puffers C gelöst. Zur Extraktion der Kernproteine wurden die Reaktionsgefäße 45-60 min auf einem Schüttler (2.000 U / min) inkubiert. Die Kernproteine sowie der ungereinigte Zytoplasmaextrakt wurden durch Zentrifugation (16.000 g, 30 min) geklärt und die jeweiligen Überstände in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Proteinkonzentrationen des Kernprotein- bzw. Zytoplasmaextraktes wurden mittels Bradford-Reagenz photometrisch bestimmt. Zur Langzeitlagerung wurden die Extrakte nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff (N₂) bei -70 °C aufbewahrt.

2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Westernblot-Analyse

SDS-PAGE

Denaturierende Polyacrylamidgele erlauben die Auftrennung von Proteinen oder Polypeptiden entsprechend ihrem Molekulargewicht. Sie bestehen aus einem Trenngel, das nach dem Gießen mit wassergesättigtem Iso-Butanol überschichtet wurde, um eine homogene Polymerisation sowie eine gerade Trennfläche zu erreichen. Nach

vollständiger Polymerisierung wurde das Butanol verworfen und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet, in das sofort ein für die zu ladenden Proben geeigneter Kamm eingeführt wurde. 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 ca. 2-4 h.

Transfer auf eine Nitrozellulose- (NC-) Membran (Westernblot)

Nach Beendigung des Gellaufs wurde das separierte Trenngel vorsichtig mit Transferpuffer gewaschen. Für den elektrophoretischen Transfer der Proteine auf eine NC-Membran wurden in einer Transferkassette von Kathode 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 16 stündige Transfer erfolgte bei 400 mA und 4°C in einer Transferkammer. Durch eine Inkubation der Membran in Ponceaurot-Lösung (5 min) und teilweiser Entfärbung mit ddH₂O kann der Transfer und die gleichmäßige Beladung des SDS-PAA-Gels überprüft werden, bevor die Membran mit TBS/Tween vollständig entfärbt wird.

Immundetektion

Nach dem Transferieren der Proteine auf die Membran wurde diese mit 5 % Milchpulver (MPT) oder im Fall der phospho-spezifischen Ak (p-Ak) mit 5 % BSA in TBS/Tween geblockt (1 h, RT, leicht schüttelnd). Die Membran wurde anschließend mit dem ersten (primären), im jeweiligen Blocking-Puffer verdünnten Ak inkubiert (1 h bei RT bzw. 16 h bei 4°C, leicht schüttelnd). Nach dem Waschen mit TBS/Tween (2 x 5 min und 3 x 10 min) wurde die Membran mit dem zweiten Ak (sekundärer Ak), der an HRP-gekoppelt und in MPT verdünnt war, inkubiert (1 h, RT, leicht schüttelnd). Anschließend wurde die Membran wie zuvor beschrieben mit TBS/Tween gewaschen. Die Detektion des HRP-gekoppelten Ak erfolgte mit dem ECL-System nach Angaben des Herstellers, wobei die Antikörperbindung mittels Chemoluminiszenz auf einem Röntgenfilm abgebildet wurde.

Entfernung gebundener Ak von NC-Membranen (Strippen)

Um eine bereits mit einem Ak bedeckte Membran mit einem anderen Ak zu markieren, der ein Protein mit ähnlichem Molekulargewicht erkennt wie der erste, wurde der erste Ak durch „Strippen“ der Membran entfernt. Dazu wurde die Membran mit „Stripping“-Puffer im Schüttel-Wasserbad (30 min, 60°C) inkubiert. Anschließend wurde die Membran einmal mit ddH₂O und dreimal mit TBS/Tween für je 5 min gewaschen und danach wie beschrieben mit einem neuen Ak inkubiert.

2.3.3 Luziferase-Reportergen-Assay

Das Luziferase-Gen des Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) dient häufig zur Quantifizierung der transkriptionellen Aktivität von Transkriptionsfaktoren. Typischerweise wird eine zu untersuchende „Promotorsequenz“ vor das Luziferase-Gen in ein Plasmid konstruiert. Nach der transienten Kotransfektion von Zellen mit diesem Luziferase-Plasmid und Plasmiden, die für zu untersuchende Faktoren kodieren, kann durch den Luziferase-Reportergen-Assay der transkriptionelle Einfluss dieser Faktoren auf die Promotor-Sequenz quantitativ bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen 48-72 h nach der Transfektion geerntet, in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zentrifugation (5.200 g, 1 min, RT) wurden die Zellen durch kurzes Vortexen in 100 µl „Harvesting“-Puffer lysiert und anschließend die Zellfragmente sedimentiert (12.000 g, 4 min, RT). In einer Mikrotiterplatte wurden pro Kavität zu 50 µl „Assay“-Puffer jeweils 50 µl der geklärten Zelllysate pipettiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit den beiden Puffern ohne Zelllysate. Die Messung der Luziferase-Werte erfolgte in einem Luminometer, wobei die Ansätze jeweils mit 100 µl 5 mM Luziferin, dem spezifischen Substrat der Luziferase, versetzt wurden. Die gemessenen Werte wurden mit den Proteinkonzentrationen abgeglichen.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Transformation kompetenter Bakterien

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurden kompetente Bakterien mit Vektoren transformiert. Dazu wurden 100 µl kompetente Bakterien in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis mit der einzubringenden DNA 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. Es folgte entweder ein Ausplattieren dieser Bakterienkultur auf Agarplatten oder das Animpfen einer weiteren Flüssigkultur. In beiden Fällen wurde ein geeignetes Antibiotikum (z.B. Ampicillin) zur Selektion der mit dem Plasmid transformierten Bakterien verwendet.

2.4.2 Bakterienkulturen

Bei den Übernachtskulturen wurden Bakterien in Flüssigkulturen vermehrt, die als Vorkultur zur Plasmid-Maxipräparation genutzt wurden. Hierzu wurden 3 ml Flüssigmedium (LB, 2xYT oder SOB) mit einem geeigneten Antibiotikum (Selektion transformierter Klone) in einem Reagenzglas mit einer Einzelkolonie angeimpft. Danach wurde die Kultur 8-16 h bei 37°C und 220 U / min in einem Schüttler inkubiert.

2.4.3 Plasmidisolierung aus *E.coli* durch alkalische Lyse in präparativen Mengen (Maxi-Präparation)

Bei der Maxipräparation von Plasmid-DNA (100 µg bis 1 mg) wurde die Methode der alkalischen Lyse angewandt. Dazu wurden 500 µl Übernachtskultur in 100-500 ml Antibiotika-haltigem Medium (LB oder 2YT) 12-16 h bei 37°C und 220 U/ min in einem Schüttler inkubiert. Zur Isolation der Plasmid-DNA wurden Protokolle und Reaktionssysteme der Firmen Quiagen und Macharey-Nagel verwendet. Die Bakterien wurden sedimentiert (250 g, 10 min, 4°C) und in 11 ml einer RNase-enthaltenden Lösung (S1) resuspendiert. Die Lyse der Bakterien (Denaturierung der DNA-Moleküle)

erfolgte durch Zugabe von 11 ml einer stark alkalischen Lösung (S2), vorsichtigem Mischen und 5-minütiger Inkubation bei RT. Anschließend erfolgte die Neutralisation (Renaturierung der DNA) durch Zugabe von 11 ml saurer Lösung (S3). Die bakterielle DNA fiel dabei aus und wurde von der in Lösung befindlichen Plasmid-DNA durch Zentrifugation (1200 g, 45 min, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine äquilibrierte Säule gegeben (DEAE-Kügelchen), an die die Plasmid-DNA unter Hochsalz-Bedingungen bindet. Verunreinigungen wurden mit 2 x 16ml Waschpuffer entfernt und die DNA unter Niedrigsalz-Bedingungen (16 ml M2) aus der Säule eluiert. Durch Zugabe von 11 ml Isopropanol wurde die Plasmid-DNA gefällt (1200 g, 45 min, 18°C), das Pellet mit 20 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen (1200 g, 20 min, 18°C) und anschließend 10 min bei 37°C getrocknet. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde in 200 µl bis 1 ml sterilem ddH₂O gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

2.4.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA durch sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen wurde bei der Charakterisierung von Plasmid-DNA angewandt.

Die Reaktionsbedingungen, wie Temperatur und Art des Restriktionspuffers (Salzkonzentration) sowie Zeitdauer der Reaktion, variieren dabei für das jeweilige Restriktionsenzym und bezüglich dessen, ob das Plasmid teilweise oder vollständig mit diesem Enzym geschnitten werden soll. 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 ddH₂O auf 15 µl auffüllen.

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

2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können je nach ihrer Größe optimal in 0,7 - 2,5 %-igen Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt werden. So ist es u.a. möglich, amplifizierte Plasmid-DNA nach der Spaltung mit spezifischen Restriktionsendonukleasen 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 der Polymerisation 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.

2.4.6 DNA-Protein-Bindungsstudien mittels EMSA

DNA/Protein-Bindungsstudien dienen u.a. zur Analyse von Transkriptionsfaktoren. Hierbei wird nicht nur die Konzentration der Transkriptionsfaktoren im Zellkern (Nukleus) untersucht, sondern auch deren Fähigkeit, spezifisch an DNA zu binden und die Transkription zu beeinflussen. Das Prinzip dieser *in vitro* Analyse ist die Inkubation von radioaktiv markierten DNA-Sonden (Proben) mit daran bindenden Kernproteinen, die dann auf einem nativen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt werden (EMSA = „electrophoretic-mobility-shift-assay“). In der autoradiografischen Auswertung ist es im Vergleich mit Kompetitoren (unmarkierten Sonden) und mit Supershift-Assays mit spezifischen Antikörpern möglich, spezifische Komplexe zu identifizieren.

Hybridisierung einzelsträngiger Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden einzelsträngig synthetisiert, so dass Sinn- und Gegensinn-Strang vor der radioaktiven Markierung hybridisiert werden mussten. Im Hybridisierungsansatz wurden dazu im 1,5 ml Reaktionsgefäß jeweils 80 µl der DNA-Oligonukleotide (100 pmol/ µl) mit 20 µl ddH₂O und 20 µl 10 x O⁺-Puffer 5 min auf

95°C erhitzt und danach langsam wieder auf RT abgekühlt ($\leq 1^\circ\text{C}$ pro Minute). Die so entstandenen doppelsträngigen DNA-Sonden konnten anschließend radioaktiv markiert werden.

Radioaktive Markierung der DNA-Sonde mit ^{32}P - γATP

Zur Markierung der doppelsträngigen DNA-Sonden wurde die Polynukleotidkinase (PNK) des Bakteriophagen T4 verwendet. Dieses Enzym markiert Einzel- oder Doppelstrang-DNA an endständigen 5'-Hydroxy-Gruppen, wobei überhängende 5'-Enden leichter phosphoryliert werden als zurückgesetzte oder glatte Enden. Zur radioaktiven Markierung wurde ^{32}P - γATP verwendet, so dass am Ende eine an beiden Enden markierte, doppelsträngige DNA-Sonde vorlag. Für die Kinase-Reaktion (30-60 min, 37°C) wurde folgendes Reaktionsgemisch in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt:

1 μl	doppelsträngige DNA-Sonde (100 ng/ μl)
5 μl	10 x PNK-Puffer
8 μl	^{32}P - γATP (10 μCi / μl)
34 μl	ddH ₂ O
2 μl	T4-PNK(10 U / μl)

Der Ansatz wurde nach der Reaktion wie unten beschrieben aufgereinigt.

Aufreinigung von ^{32}P -markierten DNA-Sonden

Zur Abtrennung der freien Radionukleotide und der markierten Einzelstränge wurden die PNK-Ansätze nach der Markierung mit 6 x „Gel loading“-Probenpuffer versetzt und auf ein 12%-iges natives PAA-Gel geladen, welches mit 0,4 x TBE-Puffer eine Stunde bei 220V vorgelaufen war. Die Auftrennung erfolgte elektrophoretisch (3h bei 220V), wobei die Bromphenolblau-Bande nicht über das erste Drittel der Gellänge hinaus laufen sollte.

Anschließend wurde die obere Glasplatte vom Gel entfernt und dieses - mit einer Lage Haushaltsfolie bedeckt - auf einem Röntgenfilm exponiert. So konnte die identifizierte Bande mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel isoliert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Zur Elution der markierten, doppelsträngigen DNA-Sonde wurden die Gelstücke mit 200 μl Hochsals-Elutionspuffer über Nacht (12-16 h) auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der markierten Probe im

Szintillationszähler gemessen. Die radioaktive Sonde wurde in einem Bleigefäß bei -20°C aufbewahrt und ca. 3-4 Wochen im EMSA verwendet.

Der Gelshift-Assay (EMSA)

Für EMSA („electrophoretic-mobility-shift-assay“)-Studien werden üblicherweise Kernproteine aus unterschiedlich behandelten Zellen verwendet. Dazu wurden auf Eis folgende Komponenten gemischt und 15-30 min inkubiert:

2-5 µg	Kernprotein in Puffer C
4 µl	3 x Bindungspuffer
1 µl	poly dI/dC (1 µg/ µl)
ca. 5.000 cpm	radioaktiv markierte DNA-Sonde
mit ddH ₂ O auf 12 µl auffüllen.	

Dabei kann die Menge des verwendeten unspezifischen Kompetitors (poly dI/dC) variieren.

Bei sehr unterschiedlichen Proteinkonzentrationen ist außerdem darauf zu achten, dass die verwendeten Volumina mit entsprechenden Mengen Puffer C ausgeglichen werden, um identische Ionenkonzentrationen in den einzelnen Ansätzen zu erreichen.

Im Falle der spezifischen Kompetition wurde ein 10-100-facher molarer Überschuss an unmarkierter DNA-Sonde im Reaktionsansatz hergestellt. Für „Supershift-Assays“ wurde 1 µl gegen den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor gerichtete Antikörperlösung (1 µg/ µl) zugegeben.

Zur Auftrennung wurde ein 6 %-iges natives PAA-Gel verwendet. Die benutzte Stromstärke sollte bei bzw. unter 11 mA am Gel liegen. Deshalb lief das Gel in 0,4 x TBE-Laufpuffer ca. 2,5 h bei 200 V vor. Danach wurden die Geltaschen erneut gespült und 6-10 µl der vorinkubierten Ansätze sowie - zur Kontrolle der Laufstrecke - auf einer separaten Spur 8 µl 6 x „Gel loading“-Probenpuffer auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V über ca. 3 h.

Anschließend wurde das Gel auf Whatman-Papier gebracht und mit Haushaltsfolie überzogen unter Vakuum getrocknet. Es folgte die Exponierung auf einem Röntgenfilm (1-14 d, -70 °C).

2.4.7 DNA-Protein-Bindungsstudien mittels Streptavidin-Biotin-Oligonukleotiden / ‘pull-down-Experimente’

Wie auch beim Gelshift-Assay (s.o.) kann man mit dieser Methode die Bindung von Proteinen (Transkriptionsfaktoren) an DNA-Fragmente (Oligonukleotide) und indirekt die Bindung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren aneinander (Komplexbildung) untersuchen.

Alle Arbeitsschritte wurden im Kühlraum vorgenommen.

Hierzu werden biotinylierte Oligonukleotide in einer Konzentration von 100 pmol / μ l gelöst und wie oben beschrieben hybridisiert.

Vorbereiten der Streptavidin Agarose

Vor Gebrauch die Flasche mit der Agarose-Suspension gut mischen, beim Arbeiten mit Agarose-Kügelchen immer das vordere Ende der Pipettenspitzen mit einem sauberen Rasiermesser abschneiden. Vor Gebrauch wird die Streptavidin-Agarose (500 μ l) 3 mal mit 1 ml PBS gewaschen (5 sec zentrifugieren, danach absaugen des Überstandes bis auf ca. 30 μ l), auffüllen auf das ursprüngliche Volumen von 500 μ l mit PBS. Blocken der unspezifischen Bindungen von je 50 μ l Agarose-Suspension pro Ansatz mit 1 ml PBS / 0,1 % BSA für 2 h mit Rotation bei 4°C. Zentrifugieren (5 sec, 4°C, 10.000 g), absaugen des Überstandes.

Binden der biotinylierten Oligonukleotide an Streptavidin-Agarose

Zugabe von 100 μ l hybridisierter, biotinylierter Oligonukleotide pro Ansatz Agarose-Suspension, Inkubation für mindestens 2 h bei 4°C. Zentrifugieren (5 sec, 4°C, 10.000 g), aufnehmen des Überstandes und verwahren der darin enthaltenen nicht gebundenen Oligonukleotide. Waschen der Agarose-Oligonukleotide mit je 1 ml kaltem PBS, zentrifugieren (5 sec, 4°C, 10000g), verwerfen des Überstandes, 4 mal wiederholen. Danach blocken mit je 1 ml kaltem 1x'1' / 50 mM NaCl / 0,1 % BSA für 1-2 h bei 4°C. Mischen mit je 1ml 1x'1' / 50 mM NaCl / 0,1 % BSA, zentrifugieren, verwerfen des Überstandes, wiederholen des Waschvorgangs 2 mal. Auf Eis stellen.

Verdünnung und Vorbereitung der Zellkernextrakte

Man bereite die Zellkernextraktlösung als „Master-Mix“ vor, hierzu nehme man pro Ansatz

100 µl	Zellkernextrakt
400 µl	1 x 'A' (+ AEBSF 1 µg / ml)
10 µl	poly dI/dC, 1 µg / µl

Inkubation für 10 min auf Eis, danach zentrifugieren (5 min, 10.000 g, 4°C). Übertragen in ein frisches Röhrchen.

Bindung der Zellkernproteine an die Oligonukleotide

Man gebe je 500 µl der vorbereiteten Zellkernextraktlösung zu der vorbereiteten Oligonukleotid-Agarose, Inkubation 1 h bei 4°C und Rotation. Abzentrifugieren (5 Min, 10.000g, 4°C), Überführen des Überstands in frische Röhrchen.

Waschen der Protein-Oligonukleotid-Agarose mit 1 ml kalter 1 x '1' / 50 mM NaCl / 0,1 % BSA-Lösung zum Entfernen von nicht gebundenen Proteinen und Nukleotiden, 9 mal wiederholen. Dabei ist darauf zu achten, die Proben immer auf Eis zu halten und die Waschvorgänge zügig durchzuführen. Am Ende komplette Entnahme des Überstands mit einer feinen Nadel.

Der Nachweis der gebundenen Proteine erfolgt nach Eluierung der Proteine von den Oligonukleotiden durch Zugabe von 40 µl 1,5 x Laemmli-Puffer und Denaturierung der Proteine für 3 min bei 100°C. Danach wurde ein Westernblot durchgeführt. Dabei wurden jeweils Kontrollen für die eingesetzte Proteinmenge (1% und 5%-Kontrolle entsprechend 5 µl bzw. 25 µl des Master-Mixes) und ein Agarose-Proteinmix ohne Oligonukleotide verwendet, um unspezifische Bindungen der Proteine an die Agarose auszuschließen.

3 Ergebnisse

3.1 Stimulation der Zellen mit TPA + Ionomycin führt zu einer verstärkten Bindung von NFATc1 und NFATc2 an den *nur77*-Promotor

In Transfektionsversuchen wurde gezeigt, dass zur vollständigen Aktivierung des *nur77*-Promotors eine Stimulierung der Zellen mit PMA (TPA) + Ionomycin nötig ist (Youn et al 2000, Blaeser et al 2000). Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob und wenn welche Transkriptionsfaktoren durch Stimulation der Zellen an den Promotor binden. Da für MEF2-Faktoren beschrieben ist, dass sie sich immer im Zellkern befinden und dort dauerhaft an die Promotoren ihrer Zielgene gebunden vorliegen (wenn auch in ihrer Funktion inhibiert durch verschiedene endogene Inhibitoren und in inaktiver Form (McKinsey et al 2002)), interessierte uns besonders das Verhalten der NFAT-Faktoren. NFAT-Faktoren liegen in nicht stimulierten Zellen in phosphorylierter und inaktiver Form im Zytosol vor und werden erst nach Stimulierung der Zelle Calcium-abhängig durch die Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert und in den Zellkern importiert, um dort dann an die Promotorregion vieler Zielgene zu binden und ihre Transkription zu aktivieren.

Ob es auch bei dem Promotor des *nur77*-Gens nach Stimulation der Zellen zu einer verstärkten NFAT-Bindung kommt, wurde in einer Reihe unterschiedlicher Versuchsansätze untersucht.

3.1.1 Protein-DNA-Bindungsstudien zeigen eine verstärkte Bindung von NFAT-Faktoren an den Promotor des *nur77*-Gens nach Stimulation von T-Zellen

Es wurden Zellkernextrakte von ruhenden und von mit TPA und Ionomycin für 4 h stimulierten EL4-T-Zellen hergestellt. Diese wurden mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden inkubiert, die einem Abschnitt der Promotorregion des *nur77*-Promotors, nämlich der Region von Position -274 bp bis -247 bp, entsprechen. Die sich

bildenden Protein-Oligonukleotid-Komplexe wurden daraufhin in einem nicht-denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt und anschließend autoradiografisch dargestellt. Dabei zeigte sich, dass sich die langsam wandernden Protein-DNA-Komplexe nach Stimulation unverändert darstellen (**Abb. 3**, obere Banden), während die schneller wandernden Protein-DNA-Komplexe (**Abb. 3**, untere Banden) nach Stimulation stark induziert sind. Es handelt sich bei den oberen Banden um MEF2-Dimere und bei den unteren Banden um verschiedene Iso- und Splicingformen der NFAT-Faktoren (siehe unten).

EMSA mit *nur77*-wt-Probe

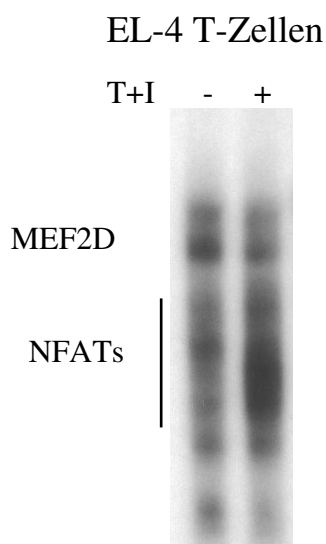


Abbildung 3:

Stimulation von EL-4 T-Zellen führt zu einer verstärkten DNA-Bindung von NFAT-Faktoren an den *nur77*-Promotor.

EL-4 T-Zellen wurden 4 h mit TPA + Ionomycin (T+I) stimuliert und anschließend Zellkernproteinextrakte von unbehandelt belassenen (-) und stimulierten Zellen (+) isoliert. Je ca. 10 µg Proteinextrakt wurde mit radioaktiv-markierten Oligonukleotiden des *nur77*-Promotors 10 min auf Eis inkubiert und auf einem nicht-denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt. Autoradiographische Darstellung.

Dieses Ergebnis bestätigte sich in Protein-DNA-Bindungsversuchen mit Streptavidin-Biotin-Oligonukleotiden. Hierfür wurden 293 T-Zellen mit Expressionsvektoren für c-myc-MEF2D und für verschiedene HA-NFAT-Faktoren (HA-NFATc1/ α A und HA-NFATc2) kotransfiziert. Danach wurden sowohl aus unstimuliert belassenen als auch aus mit TPA und Ionomycin für 4 h stimulierten Zellen Proteinextrakte aus Zellkernen gewonnen. Je 20 µg dieser Proteinextrakte wurden mit einem Streptavidin-Biotin-Oligonukleotid inkubiert, das der Promotorregion des *nur77*-Gens von -274 bp bis -247 bp entsprach. Nach mehrfachem Waschen wurden die gebundenen Proteine von dem

Oligonukleotid gelöst, denaturiert und in einem Westernblot mit einem Antikörper gegen das 'HA-Tag', das die chimären NFAT-Faktoren besitzen, nachgewiesen. Dabei zeigte sich bei den Zellextrakten der mit c-myc-MEF2D und HA-NFATc2 transfizierten Zellen eine deutliche Zunahme des an das Oligonukleotid bindenden NFATc2 nach Stimulation der Zellen (**Abb. 4, B**).

Ein ähnliches Bild ergab sich beim Nachweis von NFATc1/ α A (**Abb. 4, A**), wobei hier der Unterschied nur scheinbar deutlicher erscheint, da bei der Probe der stimulierten Zellen etwas mehr Protein eingesetzt wurde (man beachte die etwas höhere β -Actin-Vergleichsmenge).

DNA/Protein-Bindung an den *nur77*-wt-Promotor

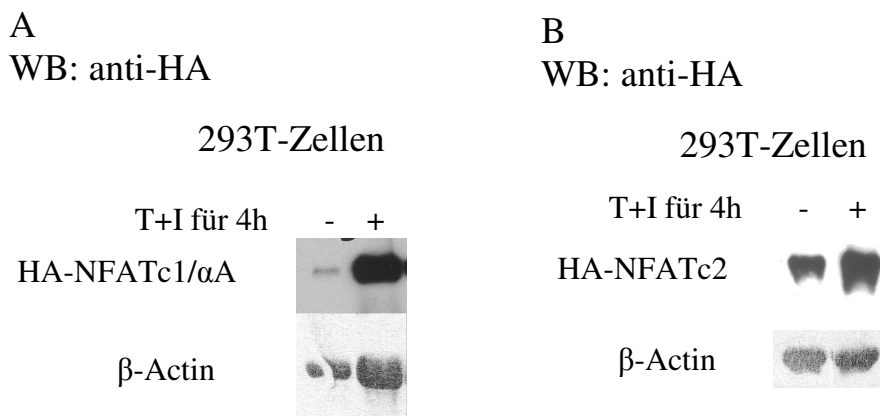


Abbildung 4:

Stimulation von 293 T-Zellen führt zu einer verstärkten DNA-Bindung von NFATc1/ α A und NFATc2 an den *nur77*-Promotor.

293 T-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für HA-NFAT-Fusionsproteine und einem Expressionsvektor für ein c-myc-MEF2D-Fusionsprotein transient kotransfiziert. Ein Teil der Zellen wurde 4 h mit TPA und Ionomycin (T+I) stimuliert, und anschließend wurden Zellkernproteinextrakte von unstimulierten (-) und stimulierten Zellen (+) isoliert. Je 20 μ g dieser Proteinextrakte wurden mit einem Streptavidin-Biotin-Oligonukleotid inkubiert, das die Promotorregion des *nur77*-Gens von -274bp bis -247 bp enthielt. Nach mehrfachem Waschen wurden die gebundenen Proteine von dem Oligo gelöst, denaturiert und in einem Immunoblot mit einem Antikörper gegen das 'HA-Tag' nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente β -Actin. **A:** Zellen transfiziert mit HA-markiertem NFATc1/ α A, **B:** Zellen transfiziert mit HA-NFATc2.

3.2 Endogenes NFATc1 und NFATc2 binden an den *nur77*-Promotor

Um zu prüfen, ob verschiedene NFAT-Isoformen an den *nur77*-Promotor binden können, wurden verschiedene Protein-DNA-Bindungsstudien (EMSAs und DNA-Präzipitationen mit Streptavidin-Biotin-Oligonukleotiden) mit dem *nur77*-Promotor und Kernproteinen aus EL-4-Zellen durchgeführt.

3.2.1 Sowohl endogenes NFATc1 als auch endogenes NFATc2 binden an den *nur77*-Promotor in Protein-DNA-Bindungsstudien (EMSAs)

Es wurden Zellkernproteinextrakte von EL4 T-Zellen hergestellt, die vorher mit TPA und Ionomycin 4 h stimuliert worden waren. Diese wurden mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden inkubiert, die der Promotorregion des *nur77*-Promotors, von Position -274 bis -247 bp reichend, entsprachen. Die sich bildenden Protein-Oligonukleotid-Komplexe wurden daraufhin in einem nicht-denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt und anschließend autoradiografisch dargestellt. Zur Verifizierung der verschiedenen Banden wurden verschiedene Kompetitionen und Antikörper-Supershift-Assays durchgeführt. Es stellten sich zwei obere Banden, die MEF2 entsprechen, sowie verschiedene NFAT-Isoformen dar (**Abb. 5**).

Dabei zeigte sich, dass bei Kompetition mit 50 ng eines nicht-radioaktiv-markierten Oligonukleotids des *IL-2*-Promotors (Pu-b_{distal}), an das NFAT-Faktoren stark binden, die NFAT-Banden vollständig verschwanden, während die obere Bande (MEF2) erhalten blieb (Spur 2).

Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich bei Kompetition mit 50 ng eines Oligonukleotids des *nur77*-Promotors, bei dem die MEF2-Bindungsstelle mutiert (Spur 4) war, d.h. nur die NFAT-Bindungsstelle erhalten war und NFAT an das unmarkierte Oligonukleotid binden konnte.

Bei Kompetition mit 50 ng eines Oligonukleotids des *nur77*-Promotors, bei dem die NFAT-Bindungsstelle mutiert war, die MEF2-Bindungsstelle jedoch erhalten war (Spur

3), verblassten die MEF2-Bande, jedoch nicht die NFAT-Banden, was für eine unabhängige Bindung von NFAT an die DNA spricht.

EMSA mit *nur77*-wt-Probe

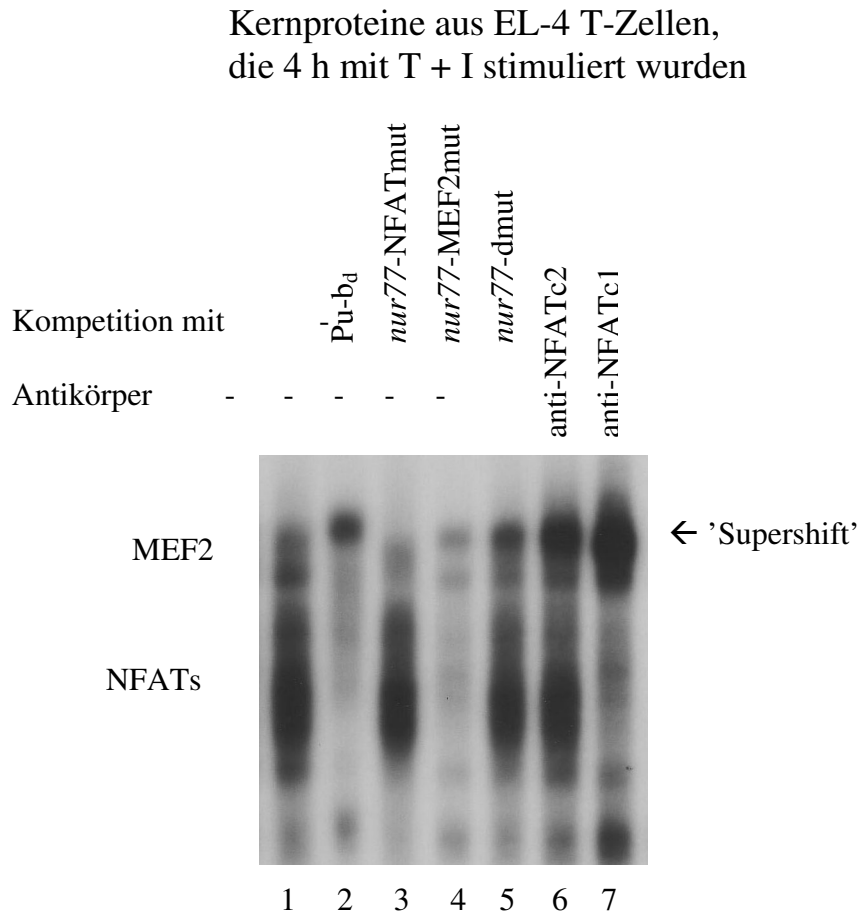


Abbildung 5:

Endogenes NFATc1 und NFATc2 binden an den *nur77*-Promotor.

Zellkernproteinextrakte aus EL-4 T-Zellen, die 4 h mit TPA und Ionomycin stimulierten worden waren, wurden mit einem radioaktiv-markierten Oligonukleotid des Wildtyp-*nur77*-Promotors und verschiedenen anderen Oligonukleotiden zur Kompetition bzw. mit spezifischen Antikörpern gegen NFAT-Proteine inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung an einem PAA-Gel und der autoradiographische Nachweis.

1.Spur: *nur77*-wt-Probe ohne Kompetitoren und Antikörper; 2.Spur: Kompetition der NFAT-Banden durch ein Pu-b_d-Oligonukleotid aus dem IL-2-Promotor; 3.Spur: Kompetition der MEF2-Faktoren durch Zugabe eines in der NFAT-Bindungsstelle mutierten, nicht-radioaktiv-markierten *nur77*-Promotor-Oligonukleotids; 4.Spur: Kompetition der NFAT-Faktoren durch Zugabe eines in der MEF2-Bindungssequenz mutierten, nicht-radioaktiv-markierten *nur77*-Promotor-Oligonukleotids; 5.Spur: Kompetition mit einem in der NFAT-Bindungssequenz und der MEF2-Bindungssequenz mutierten *nur77*-Promotor-Oligonukleotids; 6.Spur: Antikörper gegen NFATc2; 7.Spur: Antikörper gegen NFATc1.

Zur Kontrolle, ob es sich bei den Banden auch um unspezifische Bindungen anderer Proteine handeln könnte, die nicht an die NFAT- oder MEF2-Bindungsstelle binden, wurde auch eine Kompetition mit 50 ng eines Oligonukleotids des *nur77*-Promotors durchgeführt, bei dem beide Bindungsstellen (NFAT- und MEF2-Bindungsstelle) mutiert waren (Spur 5). Hierbei zeigte sich kein Verblässen oder Verschwinden der NFAT- und MEF2-Banden. Für die Antikörper-’Supershifts’ wurden die Proben vor dem Laden auf das Gel mit je 1,5 µl des entsprechenden Antikörpers inkubiert. Dabei zeigte sich bei Zugabe eines NFATc2-spezifischen Antikörpers ein Verschieben (’Supershift’) der oberen NFAT-Banden-Anteile und eine entsprechende Verstärkung der oberen Bande auf Höhe der MEF2-Bande (Spur 6). Bei Zugabe des NFATc1-spezifischen Antikörpers zeigte sich das Verblässen der NFAT-Banden deutlicher sowie eine Verstärkung der oberen Bande (Spur 7).

Hieraus zeigt sich, dass sowohl MEF2 als auch NFATc1 und NFATc2 direkt an den Promotor des *nur77*-Gens binden können.

3.2.2 Bestätigung der Bindung von endogenem NFATc1 und NFATc2 an den *nur77*-Promotor durch Protein-DNA-Bindungsversuche (’pull-down-Experimente’)

Für die ’pull-down-Experimente’ (DNA-Präzipitationen) wurden Zellkernproteinextrakte von Jurkat T-Zellen hergestellt, die vorher 4 h mit TPA und Ionomycin induziert worden waren. Die Extrakte wurden mit Sepharose-Biotin-Oligonukleotiden inkubiert, um Protein-DNA-Bindungen zu erreichen. Als Oligonukleotid wurde wieder die Promotorregion des *nur77*-Gens (von -274 bp bis -247 bp reichend) verwendet. Nach mehreren Waschkücheln zur Reinigung der Komplexe wurden diese eluiert und anschließend auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Danach wurden die verschiedenen NFAT-Isoformen mit spezifischen Antikörpern gegen entweder NFATc1 oder NFATc2 in einem Westernblot nachgewiesen.

Dabei zeigte sich beim Immunoblot gegen NFATc2 (**Abb. 7, B**, Spur 1) eine kräftige Bande entsprechend NFATc2 und mehrere Banden geringeren Mol.-Gewichts, die wahrscheinlich Abbauprodukten entsprechen (nicht abgebildet). Beim Immunoblot gegen NFATc1 ergab sich ein Muster von 5 Banden (**Abb. 7 A**, Spur 1), die aller

Wahrscheinlichkeit nach den verschiedenen Splicing-Formen von NFATc1 entsprechen: NFATc1/ α A, NFATc1/ α B, NFATc1/ β B, NFATc1/ α C und NFATc1/ β C.

3.3 Mutation der NFAT-Bindungsstelle führt zu einer verminderten bzw. ausbleibenden DNA-Bindung von NFATc1 und NFATc2

Um zu bewerten, ob eine über MEF2D-vermittelte DNA-Bindung von NFAT-Proteinen auch bei mutierter NFAT-Bindungsstelle möglich ist beziehungsweise ob eine fehlende MEF2D-Bindung an die DNA zu einer verringerten NFAT-Bindung an die DNA führt, wurden ‘pull-down-Experimente’ mit mutierten Streptavidin-Biotin-Oligonukleotiden durchgeführt.

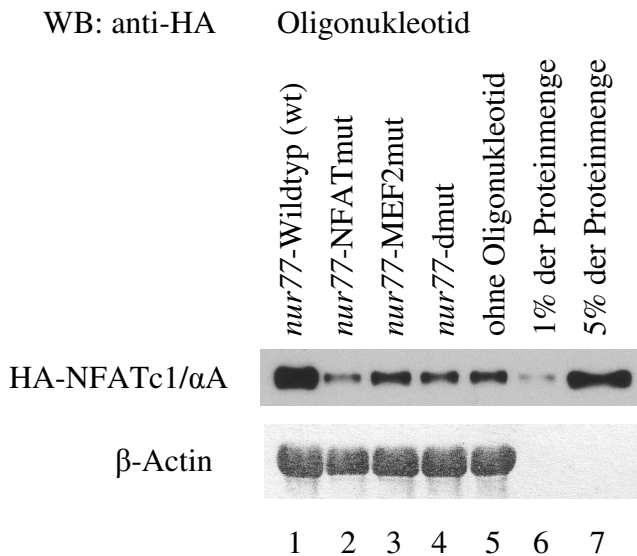
3.3.1 Verminderte NFAT-Bindung von transfiziertem HA-NFATc1/ α A und HA-NFATc2 bei Mutation der NFAT-Bindungsstelle

Für diesen Versuch wurden Zellkernextrakte von 293 T-Zellen verwendet, die vorher mit Expressionsvektoren für ein c-myc-MEF2D-Fusionsprotein sowie für HA-NFATc1/ α A- bzw. HA-NFATc2-Fusionsproteine kotransfiziert und 4 Stunden mit TPA und Ionomycin induziert worden waren. Als Oligonukleotide wurde die *nur77*-Promotorregion (von -274 bp bis -247 bp) eingesetzt (**Abb. 6 C**): entweder entsprechend der natürlich vorkommenden Form (wt), mit einer Mutation der NFAT-Bindungsstelle (NFAT-mut), einer Mutation der MEF2-Bindungsstelle (MEF2-mut) oder mit Mutationen beider Bindungsstellen (dmut).

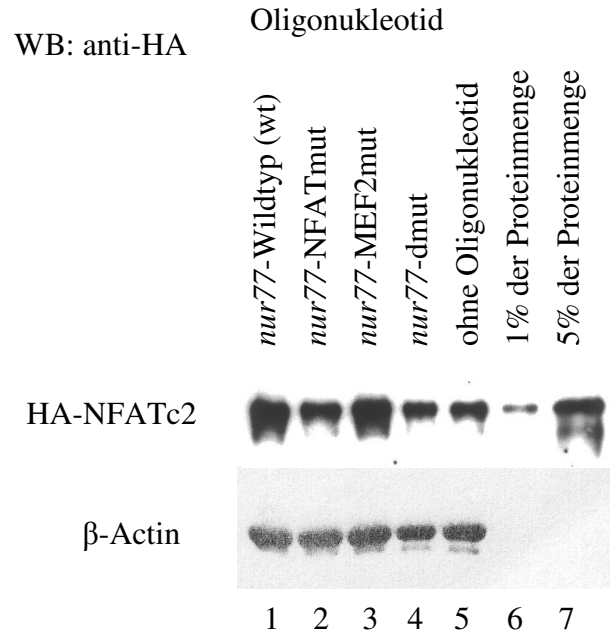
Die Zellkernextrakte wurden eine Stunde mit den Streptavidin-Biotin-Oligonukleotid-Kügelchen inkubiert, mehrfach gewaschen und anschließend eluiert. Nachgewiesen wurden die NFAT-Proteine mit einem Antikörper gegen das ‘HA-Tag’. Als Kontrollen wurden Streptavidin-Kügelchen ohne Oligonukleotid als Negativkontrolle und 1% bzw. 5% der eingesetzten Zellkernextrakte als Positivkontrolle auf das Gel mit aufgetragen.

Protein-Bindung an den *nur77*-Promotor

A transfizierte 293 T-Zellen



B transfizierte 293 T-Zellen

C *nur77*-Promotor-Sequenz von -274 bp bis -247 bp

Wildtyp: 5'-CCGAGAGGAAAACTATTTATAGATCAAAG-3'
 NFAT MEF2

NFATmut: 5'-CCGAGAccAAAACTATTTATAGATCAAAG-3'

MEF2mut: 5'-CCGAGAGGAAAACCcATTTATcGATCAAAG-3'

dmut: 5'-CCGAGAccAAAACCcATTTATcGATCAAAG-3'

Abbildung 6:**Abnahme der DNA-Bindung von NFAT-Faktoren an den *nur77*-Promotor bei Mutation der NFAT-Bindungsstelle, jedoch nicht bei Mutation der MEF2-Bindungsstelle.**

293 T-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für c-myc-MEF2D und entweder für HA-NFATc1/αA (A) oder HA-NFATc2 (B) transient kotransfiziert und anschließend 4 h mit TPA und Ionomycin stimuliert. Zellkernproteinextrakte wurden mit verschiedenen Streptavidin-Biotin-Oligonukleotiden inkubiert, und danach wurde die DNA-Bindung der NFAT-Faktoren in einem Westernblot mit einem HA-Antikörper gegen gebundene NFATs nachgewiesen. 1.Spur: Oligonukleotid der *nur77*-Wildtyp-Promotor-Sequenz von -274bp bis -247bp; 2.Spur: Oligonukleotid des *nur77*-Promotors mit mutierter NFAT-Bindungssequenz; 3.Spur: Oligonukleotid des *nur77*-Promotors mit mutierter MEF2D-Bindungssequenz; 4.Spur: Oligonukleotid des *nur77*-Promotors mit mutierten NFAT- und mutierten MEF2D-Bindungssequenzen; 5. Spur: Negativkontrolle ohne eingesetztes Oligonukleotid; 6. und 7.Spur: Positivkontrolle mit 1% bzw. 5% der eingesetzten Proteinmenge des Zellkernproteinextrakts. C: Oligonukleotidsequenzen des *nur77*-Promotors (von -274 bp bis -247 bp) mit den NFAT- und MEF2-Bindungsstellen und den verwendeten Mutanten. Das 5'-Ende war jeweils biotinyliert und wurde deshalb an die Streptavidin-Agarose gebunden.

Es zeigte sich, dass HA-NFATc1/ α A an den Wildtyp des *nur77*-Promotors bindet (**Abb. 6, A, Spur 1**). Diese Bindung ist aufgehoben bei Mutation der NFAT-Bindungsstelle (Spur 2). Auch bei Mutation der MEF2-Bindungsstelle (Spur 3) scheint in diesem Versuch die NFAT-Bindung beeinträchtigt zu sein, da sich eine deutlich schwächere Bande als beim Wildtyp-Promotor zeigt. Es kommt bei den transfizierten HA-markierten NFAT-Isoformen jedoch auch zu einer unspezifischen Bindung der HA-NFATs an die Streptavidin-Agarose (Spur 5), ohne dass ein Oligonukleotid vorhanden wäre (Negativkontrolle).

Auch HA-NFATc2 bindet an den *nur77*-Wildtyp-Promotor (**Abb. 6 B, Spur 1**). Während die NFATc2-Bindung an den Promotor bei Mutation der NFAT-Bindungsstelle (Spur 2) stark vermindert oder sogar aufgehoben ist (die verbleibende Bande ist nicht stärker als die Bande bei der Negativkontrolle (Spur 5)), beeinflusst eine Mutation der MEF2-Bindungsstelle (Spur 3) die NFATc2-Bindung nicht.

3.3.2 Ausbleibende Bindung von endogenem NFATc1 oder NFATc2 an den *nur77*-Promotor bei Mutation der NFAT-Bindungsstelle, jedoch unveränderte NFAT-Bindung bei aufgehobener MEF2-Bindung

Ähnliche Ergebnisse wie bei transfizierten 293T-Zellen wurden mit Zellkernextrakten von untransfizierten Jurkat-Zellen erzielt. Die Zellen wurden mit TPA und Ionomycin 4 Stunden stimuliert und danach Zellkernextrakte präpariert. Diese wurden - wie beim oben genannten Versuch - mit Streptavidin-Biotin-Oligonukleotiden der verschiedenen Formen des *nur77*-Promotors (**6 C**) inkubiert, und die NFAT-Bindung endogener NFAT-Faktoren an den *nur77*-Promotor wurde im Westernblot nachgewiesen. Wieder diente als Negativkontrolle eine Inkubation aus Zellkernextrakt und Streptavidin-Kügelchen ohne Oligonukleotid, und als Input-Kontrolle wurden 1%, 5% bzw. 35% der eingesetzten Proteinmenge des Zellkernextrakts eingesetzt.

Bei Färbung der Membran mit einem NFATc1-spezifischen Antikörper (**Abb. 7, A**) konnten verschiedene NFATc1-Isoformen nachgewiesen werden, die an den *nur77*-Promotor binden (Spur 1, Erläuterung s.o.). Bei Mutation der NFAT-Bindungsstelle (Spur 2) ist kein NFATc1 nachweisbar, was eine allein über Protein-

Protein-Interaktionen mit MEF2 vermittelte DNA-Bindung von NFATc1 ausschließt. Die NFATc1-Bindung ist dagegen bei Mutation der MEF2-Bindungsstelle nicht wesentlich beeinträchtigt, d.h. wenn kein MEF2 mehr an den Promotor binden kann (Spur 3). Es können offenbar weiterhin alle NFATc1-Isoformen an den *nur77*-Promotor binden, unabhängig von MEF2. Bei dem Versuch mit endogenen NFAT-Proteinen zeigt sich keine unspezifische Bindung von NFAT-Faktoren an den *nur77*-Promotor mit mutierten Bindungsstellen (Spur 4) oder an die Streptavidin-Agarose direkt (Spur 5).

Jurkat-T-Zellen

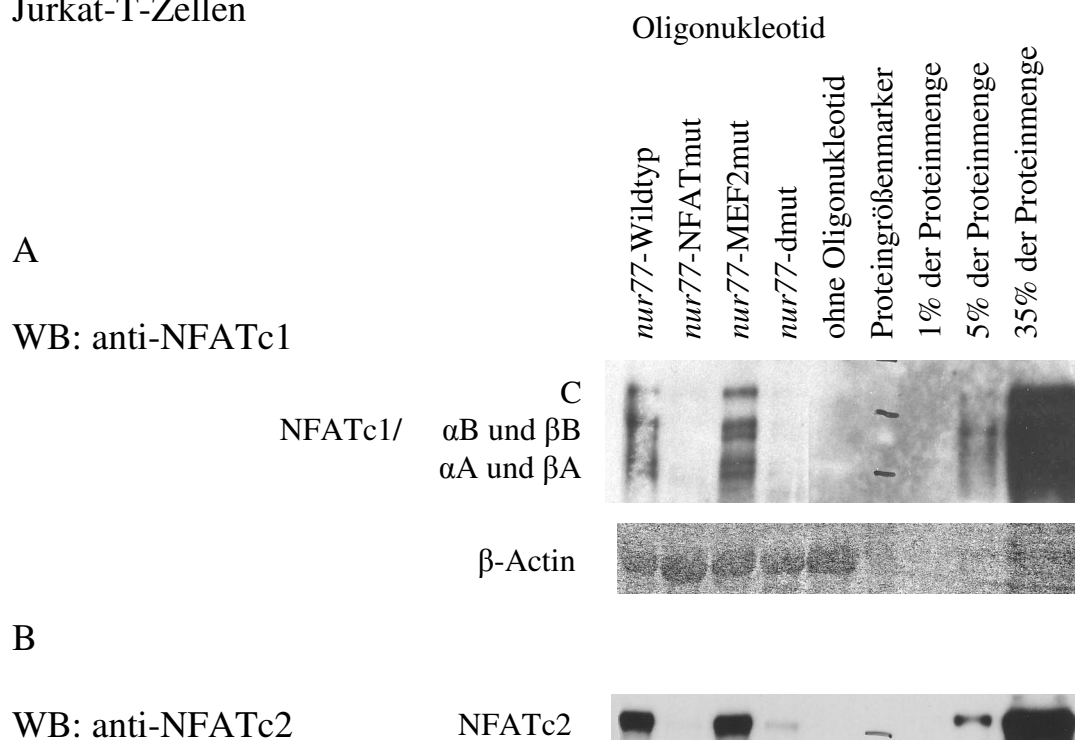


Abbildung 7:
Fehlende DNA-Bindung von endogenem NFATc1 und NFATc2 an den *nur77*-Promotor bei Mutation der NFAT-Bindungsstelle, jedoch nicht bei Mutation der MEF2-Bindungsstelle.

Jurkat T-Zellen wurden 4 h mit TPA und Ionomycin stimuliert und anschließend wurden Zellkernproteinextrakte isoliert. Die DNA-Bindung von NFAT-Faktoren wurde an verschiedenen biotinylierten Oligonukleotiden studiert (siehe Abbildung 4 C), es wurden wieder Positiv- (1%, 5%, 35% der eingesetzten Proteinmenge des Zellkernproteinextraktes) und Negativ-Kontrollen (ohne Oligonukleotid) mit einbezogen. Nachweis der verschiedenen NFAT-Faktoren im Westernblot mit spezifischen Antikörpern gegen NFATc1 (A) und NFATc2 (B). Als Ladekontrolle diente β-Actin.

Bei Färbung mit einem NFATc2-spezifischen Antikörper zeigte sich, dass endogenes NFATc2 an den *nur77*- Wildtyp-Promotor bindet (**Abb. 7 B**). Diese Bindung scheint unbeeinflusst durch die Bindung von MEF2, da sich die NFAT-Bande bei Mutation der MEF2-Bindungsstelle vergleichbar stark darstellt (Spur 3). Bei Mutation der NFAT-Bindungsstelle (Spur 2), die die Bindung von NFATs verhindert, ist kein NFATc2 mehr nachweisbar.

Unter diesen Bedingungen binden somit die NFAT-Proteine NFATc1 und NFATc2 unabhängig von MEF2 direkt an die Promotorregion von *nur77*.

3.4 MEF2 unterstützt die Bindung von NFAT-Faktoren an den *nur77*-Promotor

3.4.1 Protein-DNA-Bindungsstudie mit Zellkernextrakten unstimulierter und stimulierter EL4-Zellen am *nur77*-Wildtyp- und MEF2-mutierten- *nur77*-Promotor

Um zu überprüfen, ob die Bindung von MEF2 an den *nur77*-Promotor eine Rolle für die Bindung von NFAT-Faktoren an den Promotor spielt, wurden Protein-DNA-Bindungsstudien (EMSA) mit zwei radioaktiv markierten Proben durchgeführt. Bei einer Probe lag die *nur77*-Promotorregion im Wildtyp vor, bei der zweiten Probe war die MEF2-Bindungsstelle mutiert. Beide Proben wurden 10 min mit Zellkernextrakten von uninduziert belassenen bzw. von 4 Stunden induzierten EL4-T-Zellen inkubiert und danach auf einem nicht-denaturierenden SDS-PAA-Gel aufgetrennt.

Es zeigte sich (**Abb. 8**), dass die Bindung von MEF2 an den mutierten *nur77*-Promotor aufgehoben ist (die Banden der langsam wandernden Protein-DNA-Komplexe, die durch die MEF2-Bindung entstehen, sind deutlich abgeschwächt). Bei mutierter MEF2-Bindungsstelle und damit aufgehobener MEF2-Bindung an die DNA kommt es unter diesen Versuchsbedingungen auch zu einer Beeinträchtigung der NFAT-Bindung an den *nur77*-Promotor. Das ist an der deutlichen Abschwächung der NFAT-Banden bei dem mutierten Promotor im Vergleich zum Wildtyp-Promotor erkennbar.

EMSA mit zwei *nur77*-Proben

EL-4 T-Zellen

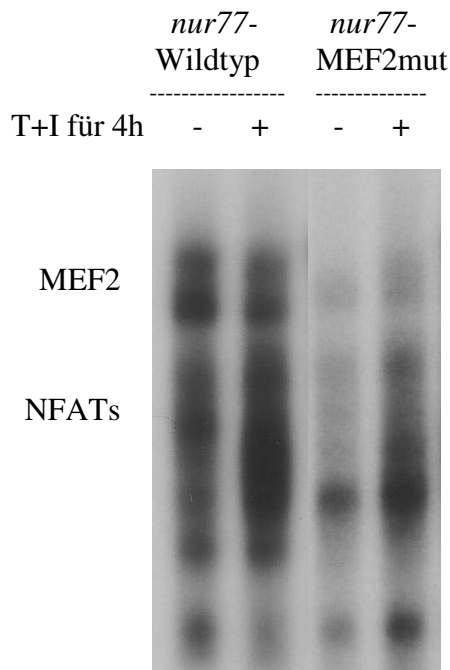


Abbildung 8:

Die Bindung von MEF2D unterstützt die Bindung von NFAT-Faktoren an den *nur77*-Promotor

Zellkernproteinextrakte von unstimulierten (-) und 4 h mit TPA und Ionomycin stimulierten (+) EL-4 T-Zellen wurden isoliert und mit verschiedenen radioaktiv markierten Proben des *nur77*-Promotors (von -274 bp bis -247 bp) inkubiert. Danach wurden die Proben auf einem nicht-denaturierenden 6%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Die *nur77*-MEF2mut-Probe enthält eine mutierte MEF2-Bindungsstelle, während die NFAT-Bindungsstelle intakt ist.

3.5 MEF2D und NFAT-Faktoren kooperieren hinsichtlich der Aktivierung von Promotoren verschiedener Zielgene

Sowohl NFAT- als auch MEF2-Faktoren werden nach Stimulation der Zelle mit Aktivierung Calcium-abhängiger Signalwege aktiviert. Um zu prüfen, ob sie nach ihrer Aktivierung in ihrer Funktion kooperieren, wurden Transfektionen in T-Zell-Linien mit verschiedenen Reporter-Genen durchgeführt.

3.5.1 Kooperation von MEF2D und NFATc2 am *nur77*-Promotor

Bei diesem Versuch wurden Jurkat T-Zellen mit einem *nur77*-Promotor gesteuerten-Luciferase-Reporter-Gen und Expressionsvektoren für NFATc2 und MEF2D bzw. ihren Leervektoren transient kotransfiziert. Die Hälfte der Zellen wurde nach 5 h mit TPA

und Ionomycin induziert, die andere Hälfte uninduziert belassen, und alle Zellen wurden nach weiteren 20 h für Luciferase-Assays geerntet.

Transfektion von Jurkat T-Zellen mit einem *nur77*-Promotor gesteuerten-Luciferase-Reporter-Gen

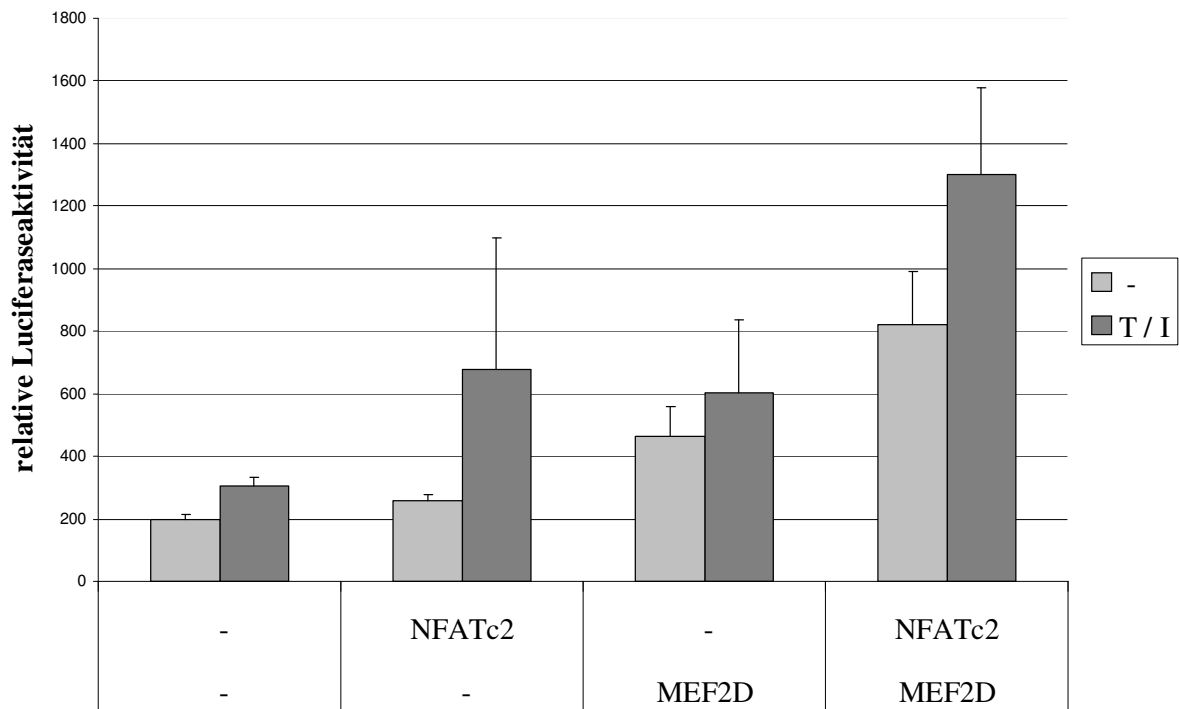


Abbildung 9:
MEF2D und NFATc2 aktivieren ein *nur77*-gesteuertes-Reporter-Gen in additiver Weise

Jurkat T-Zellen wurden mit 1,5 µg *nur77*-Reporter-DNA und je 1,25 µg DNA der Expressionsvektoren für NFATc2 und MEF2D bzw. deren Leervektoren kotransfiziert. Die transfizierten Zellen wurden entweder unstimuliert belassen (-) oder nach 5 h mit TPA und Ionomycin 20 h stimuliert. Anschließend wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt.

Es zeigte sich, dass sowohl NFATc2 als auch MEF2D in der Lage sind, den *nur77*-Luciferase-Reporter zu aktivieren (**Abb. 9**). Dabei entspricht die Aktivität bei NFATc2-Transfektion etwa der bei MEF2D-Transfektion (innerhalb verschiedener Versuche konnte die Aktivität etwas variieren, entsprach jedoch im Grunde den oben gezeigten Verhältnissen). Eine Kotransfektion mit Expressionsvektoren beider Transkriptionsfaktoren führte zu einer Addition der beiden Einzelaktivitäten.

3.5.2 Kooperation verschiedener NFAT-Faktoren mit MEF2D am *hFasL*-Promotor

293T-Zellen wurden mit einem *hFasL*-Promotor gesteuerten Luciferase-Reporter-Gen und Expressionsvektoren für verschiedene NFAT-Proteine (NFATc1/ α A, NFATc1/ α C, NFATc2) und MEF2D transient kotransfiziert. Als Kontrolle wurden die jeweiligen Leervektoren eingesetzt. Die Hälfte der Zellen wurde nach ca. 5 h mit TPA und Ionomycin induziert, die andere Hälfte uninduziert belassen, und alle Zellen wurden nach weiteren 20 h Inkubation für den Luciferase-Assay geerntet.

Transfektion von 293 T-Zellen mit einem *hFasL*-Promotor-gesteuerten Luciferase-Reporter-Gen

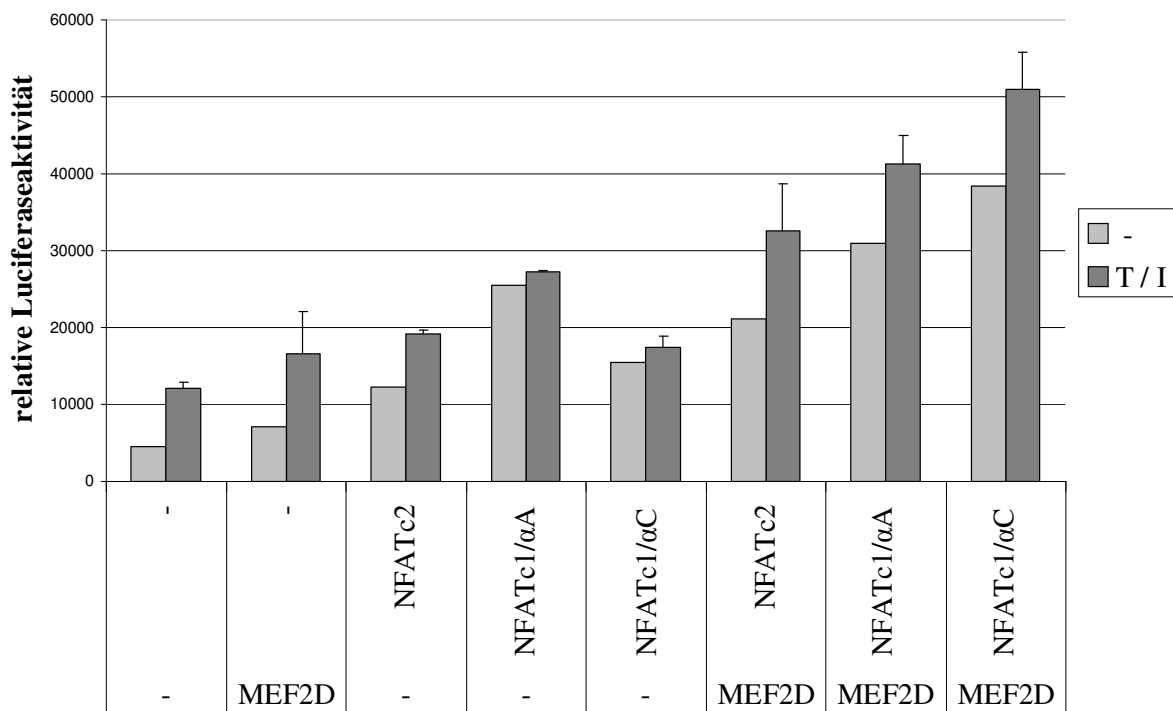


Abbildung 10:

MEF2D und NFAT-Faktoren aktivieren gemeinsam den *hFasL*-Reporter.

293 T-Zellen wurden mit 0,25 μ g eines *hFasL*-Luciferase-Reporter-Gen und je 0,45 μ g Expressionsvektoren, die für verschiedene NFAT-Faktoren (NFATc2, NFATc1/ α A, NFATc1/ α C) und MEF2D kodieren bzw. deren Leervektoren, kotransfiziert. Die transfizierten Zellen wurden entweder unstimuliert belassen (-) oder nach einem Tag mit TPA und Ionomycin 20 h stimuliert. Anschließend wurde der Luciferase-Assay durchgeführt. Der Versuch umfasste zwei Parallelen, und die Werte wurden gegen die enthaltene Proteinmenge abgeglichen.

In **Abb. 10** ist das Ergebnis der Transfektion graphisch dargestellt. Alle im Versuch einbezogenen NFAT-Formen (NFATc1/ α A, NFATc1/ α C und NFATc2) aktivierten den *hFasL*-Promotor, ebenso MEF2D. Wieder zeigte sich bei Kotransfektion der Expressionsvektoren für MEF2D und NFAT-Isoformen eine Addition der Reporter-Aktivität.

3.5.3 Kooperation verschiedener NFAT-Faktoren mit MEF2D am Promotor des *desmin*-Gens, einem Muskel-spezifischen Gen

Für diesen Versuch wurde ein Luciferase-Reporter-Gen eingesetzt, dessen Aktivität durch den Promotor eines Muskel-spezifischen Gens, des *desmin*-Gens, kontrolliert wurde. Dieser Promotor enthält sowohl eine NFAT- als auch eine MEF2-Bindungsstelle.

Jurkat T-Zellen wurden mit einem Luciferase-Reporter-Konstrukt transfiziert, das die Promotorsequenz des *desmin*-Gens dreimal enthält (*3xdesmef*-Luc-Reporter), und die Auswirkung einer Kotransfektion von Expressionsvektoren für NFAT-Isoformen und MEF2D wurde untersucht. Eine Hälfte der Zellen wurde wieder TPA und Ionomycin stimuliert, die andere Hälfte unstimuliert belassen (s.o.).

Es zeigte sich (**Abb. 11**), dass MEF2D und verschiedene NFAT-Proteine den Reporter aktivierten. Dabei weisen die verschiedenen NFAT-Isoformen keinen wesentlichen Unterschied in ihrer Fähigkeit auf, den Reporter zu aktivieren. Wieder führte eine Kotransfektion zu etwa einer Addition der Luciferase-Aktivität im Vergleich zu einer Transfektion mit nur einem Expressionsvektor.

Transfektion von Jurkat T-Zellen mit einem *3xdesmef*-Promotor gesteuerten Luciferase-Reporter-Gen

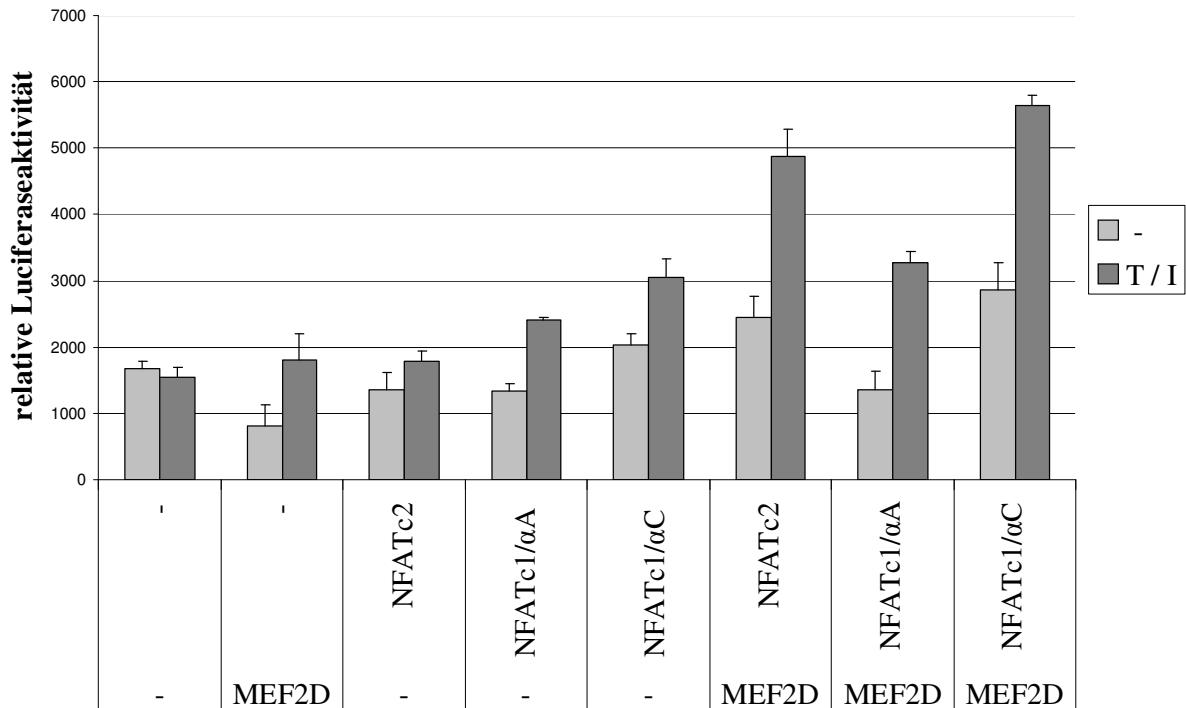


Abbildung 11:

MEF2D und NFAT-Faktoren kooperieren bei der Aktivierung des *3xdesmef*-Promotors.

Jurkat T-Zellen wurden mit 0,8 µg DNA eines *3xdesmef*-Luciferase-Reporter-Gens und je 1,4 µg DNA von Expressionsvektoren, die für verschiedene NFAT-Faktoren (NFATc2, NFATc1/αA, NFATc1/αC) und MEF2D kodieren bzw. deren Leervektoren, kotransfiziert.

Das *3xdesmef*-Luc-Reporter-Gen-Konstrukt umfasst drei Kopien der Promotorsequenz des *desmin*-Gens mit Bindungsstellen für NFAT- und MEF2-Faktoren. Eine Hälfte der transfizierten Zellen wurde nach 5 h mit TPA und Ionomycin 20 h stimuliert, die andere Hälfte unstimuliert belassen, und anschließend wurden Luciferase-Assays durchgeführt. Der Versuch umfasste zwei Parallelen, und die Werte wurden gegen die enthaltene Proteinmenge abgeglichen.

4 Diskussion

Eukaryotische Zellen werden durch verschiedenste Mechanismen genau kontrolliert, um einen funktionierenden Gesamtorganismus zu bilden. So lässt es sich auch erklären, dass die Regulation zellulärer Differenzierung und Funktion nicht nur von einem einzigen Mechanismus kontrolliert wird, sondern verschiedene Faktoren sinnvoll zusammenwirken und nur in ihrer Gesamtheit eine bestimmte Aufgabe erfüllen.

Sowohl für die Familie der MEF2- als auch für die der NFAT-Faktoren ist bekannt, dass sie mit anderen Transkriptionsfaktoren kooperieren und so zusätzliche

Kontrollmechanismen bestehen, da mehrere Faktoren aktiv sein müssen, bevor so wichtige Vorgänge wie Zelldifferenzierung, Proliferation oder Apoptose ausgelöst werden.

Kurz vor Beginn der experimentellen Arbeiten zu dieser Dissertation erschienen zwei Arbeiten, die eine Kooperation von MEF2- und NFAT-Faktoren bei der Aktivierung des *nur77*-Promotors beschrieben (Blaeser et al 2000, Youn et al 2000). Die Autoren beobachteten in Transfektionsversuchen besonders eine Kooperation von MEF2D und NFATc2 und sahen in Protein-Protein-Bindungsstudien mit zellulären Proteinextrakten aus unstimuliert belassenen DO11.10-Zellen eine direkte Bindung von NFATc2 an MEF2D, jedoch nicht an die DNA.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun das Bindungsverhalten verschiedener NFAT-Faktoren an den *nur77*-Promotor bzw. an die MEF2-Faktoren untersucht werden.

4.1 Verschiedene NFAT-Proteine binden an den *nur77*-Promotor

Um zu prüfen, ob individuelle NFAT-Proteine unterschiedlich an den *nur77*-Promotor binden können, wurden verschiedene Protein-DNA-Bindungsexperimente durchgeführt. Es wurden hierfür verschiedene Zellkernextrakte verwendet und die Bindung von NFATc1 und NFATc2 an den *nur77*-Promotor nachgewiesen. So zeigte sich in 'EMSA's mit Zellkernextrakten aus EL-4-Zellen eine Bindung von endogenem NFATc1 und NFATc2 an eine radioaktive Probe, die der Promotorsequenz des *nur77*-Promotors entsprach. Diese Bindung war nach vorheriger Stimulation der Zellen mit

TPA und Ionomycin, die zu einer Translokation der NFAT-Faktoren in den Zellkern führt, verstärkt (**Abb. 3**) und konnte in 'Supershift-Assays' mit spezifischen Antikörpern gegen NFATc1 bzw. NFATc2 nachgewiesen werden (**Abb. 5**). Auch in 'pull-down-Experimenten' mit Streptavidin-Biotin-Oligonukleotiden konnte eine Bindung von verschiedenen NFAT-Faktoren an eine DNA-Sequenz, die der Promotorregion des *nur77*-Promotors entsprach, nachgewiesen werden. Die hierfür verwendeten Zellkernextrakte wurden aus 293 T-Zellen gewonnen, die zuvor mit verschiedenen HA-NFAT-Fusionsproteinen transfiziert worden waren. Auch hier zeigte sich eine nach Stimulierung mit TPA und Ionomycin verstärkte Bindung von NFATc1/ α A und NFATc2 an die Oligonukleotide (**Abb. 4**).

Um zu überprüfen, ob auch unter physiologischen NFAT-Konzentrationen eine Bindung von verschiedenen NFAT-Faktoren nachweisbar ist, wurden Zellkernextrakte aus Jurkat T-Zellen gewonnen, die zuvor 4 Stunden mit TPA und Ionomycin induziert worden waren. In 'pull-down-Experimenten' bestätigte sich hier eine Bindung von verschiedenen NFAT-Isoformen an die DNA, dabei konnten sogar verschiedene gebundene Isoformen für NFATc1 nachgewiesen werden (**Abb. 7**, Spur 1). Es bindet also nicht nur NFATc2 in Nachbarschaft von MEF2-Faktoren an den *nur77*-Promotor, sondern auch die Mehrzahl der NFATc1-Isoformen.

4.2 NFAT-Faktoren binden, unterstützt durch gebundene MEF2-Faktoren, direkt an den Promotor des *nur77*-Gens

Es stellte sich nun die Frage, ob die Bindung von NFAT-Faktoren an den *nur77*-Promotor allein durch eine Bindung von NFAT an MEF2, das an die DNA konstitutiv gebunden vorliegt, vermittelt wird oder ob NFAT-Faktoren direkt an die im Promotor des *nur77*-Gens enthaltene NFAT-Bindungsstelle binden können.

Hierfür wurden Protein/DNA-Bindungsstudien ('pull-down-Experimente') mit verschiedenen Oligonukleotiden durchgeführt. 293 T-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für ein c-myc-MEF2D-Fusionsprotein sowie für HA-NFATc1/ α A- bzw. HA-NFATc2-Fusionsproteine kotransfiziert und anschließend 4 Stunden mit TPA und Ionomycin induziert. Die daraus gewonnenen Zellkernextrakte wurden mit verschiedenen mutierten Streptavidin-Biotin-Oligonukleotiden inkubiert, und

anschließend wurde eine Bindung der NFAT-Faktoren mit einem Antikörper gegen das 'HA-Tag' im Westernblot nachgewiesen. Es wurden Oligonukleotide verwendet, die der Promotorregion des *nur77*-Promotors, von -274 bp bis -247 bp reichend, im Wildtyp entsprachen bzw. bei denen die Bindungsstellen für MEF2D-, NFAT-Faktoren oder für beide Faktoren mutiert waren (**Abb. 6, C**).

Dabei zeigte sich, dass die Bindung von transfiziertem HA-NFATc1 und HA-NFATc2 bei mutierter NFAT-Bindungsstelle, jedoch nicht bei mutierter MEF2-Bindungsstelle, beeinträchtigt ist (**Abb. 6, A und B**). Diese Beobachtung spricht für eine direkte Bindung von NFAT-Faktoren an den *nur77*-Promotor, die nicht über MEF2-Faktoren vermittelt wird wie ehemals von Youn und Kollegen postuliert wurde (Youn et al 2000). Es konnte auch keine Komplexbildung zwischen MEF2- und NFAT-Faktoren beobachtet werden, da diese auch bei Mutation der NFAT-Bindungsstelle mit einer gleich bleibenden Bindung von NFAT-Faktoren an die DNA einher gehen müsste. Dieses Ergebnis bestätigte sich in 'pull-down-Experimenten' mit Zellkernextrakten von Jurkat-T-Zellen, die 4 Stunden mit TPA und Ionomycin induziert worden waren. Wie bereits beschrieben, wurde eine Bindung von endogenem NFATc1 und NFATc2 an den Promotor des *nur77*-Gens nachgewiesen (s.o.). Diese Bindung war jedoch gänzlich aufgehoben bei Mutation der NFAT-Bindungsstelle. Eine Mutation der MEF2-Bindungsstelle führte dagegen zu keiner Verminderung der NFAT-Bindung an die DNA (**Abb. 7**).

Auch in EMSAs wurde der Einfluss der MEF2-Bindung auf die Bindung der NFAT-Faktoren an den *nur77*-Promotor untersucht. Dafür wurden Zellkernextrakte aus EL-4-Zellen, die 4 Stunden mit TPA und Ionomycin stimuliert worden waren, mit zwei verschiedenen radioaktiven Proben inkubiert und anschließend in einem PAA-Gel aufgetrennt. Während eine Probe der Promotorsequenz des *nur77*-Gens im Wildtyp entsprach, war bei der anderen Probe die MEF2-Bindungsstelle mutiert, um eine MEF2-Bindung zu verhindern. Es zeigte sich wie erwartet eine aufgehobene MEF2-Bindung. Auch die Bindung der NFAT-Faktoren an die DNA war unter diesen Versuchsbedingungen vermindert, wenn auch nicht aufgehoben (**Abb. 8**), was für einen unterstützenden Effekt einer MEF2-Bindung für die NFAT-Bindung spricht. Für diesen Unterschied zwischen den 'pull-down-Experimenten' und den EMSAs könnte die kürzere Inkubationszeit bei den EMSAs (nur 15 Minuten Inkubationszeit im Vergleich

zu einer Stunde bei den ‘pull-down-Experimenten) verantwortlich sein, was für einen stabilisierenden oder vermittelnden Effekt der MEF2-Faktoren bei der NFAT-Bindung an die DNA sprechen würde. Jedoch könnten auch weitere Faktoren die NFAT-Bindung an den *nur77*-Promotor beeinflussen, die in den verschiedenen Zelllinien in verschiedenem Maß aktiv sein können. So ist bekannt, dass MEF2-Faktoren in ruhenden Zellen durch verschiedene Faktoren in ihrer Funktion inhibiert werden (Cabin1, HDACs) und erst nach einem starken Calcium-Signal für eine Interaktion mit trans-aktivierenden Proteinen bzw. Kooperationspartnern wie p300 oder MyoD bereitstehen. Auch die gesamte NFAT-Konzentration in den verschiedenen Zellkernextrakten könnte bei den Jurkat- und transfizierten 293 T-Zellen größer gewesen sein als in den EL4-Zellen, so dass eine Bindung an die DNA eher stattfinden konnte.

4.3 MEF2- und NFAT-Proteine kooperieren bei der Aktivierung gemeinsamer Zielgene

Eine Kooperation von MEF2D und NFATc2 bei der Aktivierung des *nur77*-Promotors war schon von Youn und seinen Kollegen 2000 beschrieben worden (Youn et al 2000). Nachdem sich in den Versuchen unserer Arbeit zeigte, dass verschiedene NFAT-Faktoren an den *nur77*-Promotor binden können, stellte sich die Frage, ob diese auch in ähnlichem Maß mit MEF2D bei der Aktivierung von Reporter-Gen-Konstrukten kooperieren können.

Dafür wurden verschiedene Zelllinien mit Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukten transfiziert und der Effekt einer Kotransfektion mit Expressionsvektoren für MEF2D und verschiedener NFAT-Faktoren untersucht. Zuerst wurde der beobachtete kooperative Effekt einer Kotransfektion von NFATc2 und MEF2D an einem *nur77*-Promotor gesteuerten Luciferase-Reporter-Gen nachvollzogen. Es zeigte sich in Jurkat T-Zellen ein additiver Effekt bei der Aktivierung des Reporter-Gens bei Kotransfektion von MEF2D und NFATc2 (**Abb. 9**). Ähnliche Effekte zeigten sich auch bei der Kotransfektion von MEF2D mit anderen NFAT-Isoformen (hier nicht dargestellt). Da auch in Promotorregionen anderer NFAT- bzw. MEF2-Zielgene Bindungsstellen für beide Transkriptionsfaktoren vorhanden sind, stellte sich die Frage, ob NFAT- und

MEF2-Faktoren auch bei der Aktivierung dieser Zielgene miteinander kooperieren können. NFAT-Faktoren spielen u.a. eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung von Apoptose in T-Zellen (Serfling et al 2006b). Dieser Effekt kann auf die Induktion verschiedener Zielgene zurückgeführt werden. Während die Induktion des *nur77*-Gens besonders bei der negativen Selektion unreifer T-Zellen im Thymus (Thymozyten) beobachtet wird (Cho et al 2003), wird in reifen T-Zellen die T-Zell-Rezeptor vermittelte Apoptose vor allem über den extrinsischen Apoptoseweg vermittelt. Dabei ist wahrscheinlich der Promotor des *FasL* das wichtigste Zielgen für die NFAT-Faktoren. Der FasL löst bei Bindung an den Fas-Rezeptor die Apoptose von T-Zellen aus, was u. a. beim AICD peripherer T-Zellen beobachtet wird (Green et al 2003, Zhang et al 2004). Da der Promotor des *FasL*-Gens zusätzlich zur NFAT-Bindungsstelle eine Bindungsstelle für MEF2-Faktoren enthält, wurde untersucht, ob auch an diesem eine Kooperation von MEF2D und NFAT-Faktoren beobachtet werden kann. Es zeigte sich in Transfektionsversuchen mit 293 T-Zellen eine additive Aktivierung des durch den *FasL*-Promotor gesteuerten Reporter-Gens mittels MEF2D und NFATc2 sowie NFATc1/αA und NFATc1/αC (**Abb. 10**). Es ist somit zu vermuten, dass somit MEF2D auch bei der Aktivierung des *FasL*-Gens eine Rolle spielt und dabei mit verschiedenen NFAT-Isoformen kooperieren kann.

NFAT- und MEF2-Faktoren sind jedoch nicht nur in T-Zellen aktiv, sondern regulieren wichtige Prozesse in einer ganzen Reihe von Zellen. MEF2-Faktoren wurden erstmals in Muskelzellen beschrieben (Gossett et al 1989), wo sie essentiell für deren Differenzierung sind (McKinsey et al 2001). Ein wichtiges Gen, das bei der Differenzierung von Fibroblasten zu Muskelzellen aktiv ist, ist das *desmin*-Gen. Da dieses ein wichtiges MEF2-Zielgen darstellt, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob auch hier eine Kooperation von MEF2- und NFAT-Faktoren stattfindet. Es zeigte sich, dass auch im Promotor des *desmin*-Gens eine NFAT-Bindungsstelle in direkter Nachbarschaft zur MEF2-Bindungsstelle vorhanden ist. In Transfektionsversuchen mit einem *desmin*-gesteuerten Luciferase-Reporter-Gen in Jurkat T-Zellen konnte gezeigt werden, dass auch dieser Promotor durch verschiedene NFAT-Isoformen (NFATc1/αA, NFATc1/αC und NFATc2) und MEF2D in additiver Weise aktiviert wird (**Abb. 11**).

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass MEF2D und verschiedene NFAT-Isoformen kooperieren können bei der Aktivierung ihrer Zielgene und sich ihre Wirkung dabei addiert. Dieser Effekt scheint nicht auf T-Zellen beschränkt zu sein, sondern findet wahrscheinlich in verschiedenen Zellsystemen statt, da auch nicht T-Zell-spezifische Zielgene gemeinsam aktiviert werden können. Es konnte kein Unterschied zwischen verschiedenen NFAT-Isoformen bei der Aktivierung der Promotoren festgestellt werden, so dass zu vermuten ist, dass verschiedene NFAT-Isoformen die gleiche Aufgabe an diesen Genen übernehmen können.

Im Laufe der letzten Jahre sind verschiedene Veröffentlichungen erschienen, die mit meinen Beobachtungen übereinstimmen. So konnten u. a. neue physiologische Aufgaben für NFAT-Faktoren gefunden werden, die mit länger bekannten MEF2-Funktionen übereinstimmen z.B. bei der Vermittlung von neuronalem Überleben nach Wachstumsfaktorentzug (Benedito et al 2005, Belfield et al 2006) oder bei der Herzmuskelzell- und Skelettmuskelzellendifferenzierung (Crabtree und Olson 2002). Dabei spielen oft andere NFAT-Proteine als NFATc2 (in Nervenzellen eher NFATc4, in Skelettmuskelzellen NFATc1 und NFATc3 (Olson und Williams 2000)) eine besondere Rolle, so dass auch hier andere NFAT-Faktoren als NFATc2 mit MEF2-Faktoren in ihrer Funktion kooperieren.

Auch für MEF2-Faktoren wurden neue Zielgene identifiziert, die mit klassischen NFAT-Zielgenen übereinstimmen. So fand sich im Promotor des *il-2*-Gens eine MEF2-Bindungsstelle in direkter Nachbarschaft zu einer der NFAT-Bindungsstellen, über den MEF2-Faktoren ebenfalls das *il-2*-Gen in Kooperation mit NFAT-Faktoren aktivieren können (Pan et al 2005).

5 Zusammenfassung

Sowohl NFAT- (Nukleäre Faktoren aktivierter T-Zellen) als auch MEF2- ('myosin-enhancer factor 2') Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung, Proliferation oder Apoptose vieler eukaryotischer Zellen (Serfling et al 2000, Hogan et al 2003, Serfling et al 2006a; Black und Olson 1998, McKinsey et al 2002). Sie sind in einer Vielzahl von Zellen aktiv und können dort die Transkription ihrer Zielgene nach Stimulation der Zellen mit anschließendem Calcium-Einstrom aktivieren. Dabei kooperieren sie oft mit anderen Transkriptionsfaktoren: MEF2-Faktoren z.B. mit MyoD (Kaushal et al 1994) oder GATA-Faktoren (McKinsey et al 2002), NFAT-Faktoren z.B. mit den AP-1-Proteinen Jun und Fos (Chen et al 1998) oder Egr- ('early growth response protein'-) Faktoren (Hogan et al 2003).

Kurz vor Beginn dieser Arbeit erschienen zwei Veröffentlichungen, die eine Kooperation von MEF2D mit NFATc2 bei der Aktivierung des *nur77*-Promotors, der bei der negativen Selektion von T-Zellen aktiv ist, beschrieben (Blaeser et al 2000, Youn et al 2000). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun das Bindungsverhalten verschiedener NFAT-Proteine an den *nur77*-Promotor und ihre Kooperationsfähigkeit mit MEF2D bei der Aktivierung des *nur77*- und anderer Promotoren untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene NFAT-Faktoren direkt an ein Oligonukleotid des *nur77*-Promotors (von Position -274 bis -247 bp reichend) binden. Diese Bindung wird zwar durch eine Bindung von MEF2-Faktoren an den Promotor unterstützt, ist jedoch nicht wesentlich beeinträchtigt, wenn MEF2-Faktoren aufgrund von einer Mutation in ihrer Bindungssequenz nicht binden können. Dagegen führt eine Mutation der NFAT-Bindungsstelle zu einer aufgehobenen Bindung von NFAT-Faktoren an den Promotor. Desweiteren zeigte sich, dass nicht nur endogenes NFATc2 sondern auch verschiedene NFATc1-Isoformen an den Promotor binden können. In ihrer Fähigkeit mit MEF2D zu kooperieren, zeigte sich kein Unterschied zwischen den getesteten NFAT-Isoformen NFATc1/ α A, NFATc1/ α C oder NFATc2. So aktivierten in Transfektionsversuchen in Jurkat T-Zellen und 293 T-Zellen alle NFAT-Proteine die Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukte gemeinsam mit MEF2D in etwa additiver Weise. Dies konnte an verschiedenen Luciferase-Reporter-Genen (*nur77*-gesteuert, *hFasL*-gesteuert und *desmin*-gesteuert) nachgewiesen werden, was auf eine

mögliche Kooperation der verschiedenen NFAT-Faktoren mit MEF2D (und evtl. auch anderen MEF2-Faktoren) nicht nur bei der Apoptose von T-Zellen sondern auch in anderen Zellen hinweist.

6 Literaturverzeichnis

- Arnold R, Brenner D, Becker M, Frey CR, Krammer PH. 2006. How T lymphocytes switch between life and death. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1654-1658
- Arron JR, Winslow MM, Polleri A, Chang CP, Wu H, Gao X, Neilson JR, Chen L, Heit JJ, Kim SK, Yamasaki N, Miyakawa T, Francke U, Graef IA, Crabtree GR. 2006. NFAT dysregulation by increases dosage of *DSCR1* and *CYRDIA* on chromosome 21. *Nature* **441**, 595-600
- Asagiri M, Sato K, Usami T, Ochi S, Nishina H, Yoshida H, Morita I, Wagner EF, Mak TW, Serfling E, Takayanagi H. 2005. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J. Exp. Med.* **202**, 1261-1269
- Avots A, Buttmann M, Chuvpilo S, Escher C, Smola U, Bannister AJ, Rapp UR, Kouzarides T, Serfling E. 1999. CBP/p300 integrates Raf/Rac-signalling pathways in the transcriptional induction of NF-ATc during T cell activation. *Immunity*, **10**, 515-524
- Ayala A, Wesche-Soldato DE, Perl M, Lomas-Neira JL, Swan R, Chung CS. 2007. Blockade of apoptosis as a rational therapeutic strategy for the treatment of sepsis. *Novartis Found Symp.* **280**, 37-164
- Baumann S, Krueger A, Kirchhoff S, Krammer PH. 2002. Regulation of T cell apoptosis during the immune response. *Curr. Mol. Med.* **2**, 257-272
- Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR. 1997. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* **275**, 1930-1933
- Belfield J, Whittaker C, Cader MZ, Chawla S. 2006. Differential effects of Ca²⁺ and cAMP on transcription mediated by MEF2D and cAMP-response element-binding protein (CREB) in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* **38**, 27724-27732

- Benedito AB, Lehtinen M, Massol R, Lopes UG, Kirchhausen T, Rao A, Bonni A. 2005. The transcription factor NFAT3 mediates neuronal survival. *J. Biol. Chem.* **280**, 2818-2825
- Black BL, Lu J, Olson EN. 1997. The MEF2A 3'untranslated region functions as a *cis*-acting translational repressor. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2756-2763
- Black BL, Martin JF, Olson EN. 1995. The mouse *mrf4* promotor is *trans*-activated directly and indirectly by muscle-specific transcription factors. *J. Biol. Chem.* **270**, 2889-2892
- Black BL, Olson EN. 1998. Transcriptional Control of Muscle Development by Myocyte Enhancer Factor-2 (MEF2) Proteins. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **14**, 167-196
- Blaeser F, Ho N, Prywes R, Chatila TA. 2000. Ca²⁺-dependent gene expression mediated by MEF2 transkription factors. *J. Biol. Chem.* **275**, 197-209
- Böcker W, Denk H, Heitz PU. 1997. Pathologie. Lehrbuch. *Urban und Schwarzenberg*
- Bouillet P, Purton JF, Godfrey DI, Zhang LC, Coultas L, Puthalakath H, Pellegrini M, Cory S, Adams JM, Strasser A. 2002. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* **415**, 922-926
- Calnan BJ, Szychowski S, Chan FK, Cado D, Winoto A. 1995. A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity* **3**, 273-282
- Canté-Barrett K, Gallo EM, Winslow MM, Crabtree GR. 2006. Thymocyte negative selection is mediated by protein kinase C- and Ca²⁺-dependent transcriptional induction of Bim. *J Immunol.* **176**, 2299-2306

Cao X, Liu W, Lin F, Li H, Kolluri SK, Lin B, Han YH, Dawson MI, Zhang XK. 2004. Retinoid X receptor regulates Nur77/TR3-dependent apoptosis by modulating its nuclear export and mitochondrial targeting. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 9705-9725.

Chen L, Glover JNM, Hogan PG, Rao A, Harrison SC. 1998. Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature* **392**, 42-48

Cheng LE, Chan FK, Cado D, Winoto A. 1997. Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J.* **16**, 1865-1875.

Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R, Williams RS. 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* **12**, 2499-2509

Cho HJ, Edmondson SG, Miller AD, Sellars MC, Alexander ST, Somersan S, Punt JA. 2003. Cutting edge: identification of the targets of clonal deletion in an unmanipulated thymus. *J. Immunol.* **170**, 10-13.

Chow CW, Rincón M, Cavanagh J, Dickens M, Davis RJ. 1997. Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* **278**, 1638-1641

Chuvpilo S, Avots A, Berberich-Siebelt F, Glöckner J, Fischer C, Kerstan A, Escher C, Inashkina I, Hlubek F, Jankevics E, Brabletz T, Serfling E. 1999. Multiple NFATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *J. Immunol.* **162**, 7294-7301

Chu Y, Le W, Kompolti K, Jankovic J, Mufson EJ, Kordower JH. 2006. Nurr 1 in Parkinson's disease and related disorders. *J. Comp. Neuro.* **494**, 495-514

Crabtree GR, Olson EN. 2002. NFAT Signalling: Choreographing the social lives of cells. *Cell* **109**, S67-S79

- Cribbs RM, Black BL, Zhao B, Lien CL, Schulz RA, Olson EN. 1998. The myogenic regulatory gene *mef2* is a direct target for transcriptional activation by Twist during *Drosophila* myogenesis. *Genes Dev.* **12**, 422-434
- Crotti TN, Flannery M, Walsh NC, Fleming JD, Goldring SR, McHugh KP. 2006. NFATc1 regulation of the human β_3 integrin promoter in osteoclast differentiation. *Gene* **372C**, 92-102
- Cunningham NR, Artim SC, Fornadel CM, Sellars MC, Edmonson SG, Scott G, Albino F, Mathur A und Punt JA. 2006. Immature CD4⁺CD8⁺ Thymocytes and Mature T Cells Regulate Nur77 Distinctly in Response to TCR Stimulation. *J.Immunol.* **177**, 6660-6666
- Czubryt MP, Olson EN. 2004. Balancing contractility and energy production: the role of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) in cardiac hypertrophy. *Recent Prog Horm Res.* **59**, 105-124.
- Darragh J, Soloaga A, Beardmore VA, Wingate AD, Wiggin GR, Peggie M, Arthur JSC. 2005. MSKs are required for the transcription of the nuclear orphan receptors *Nur77*, *Nurr1* and *Nor1* downstream of MAPK signalling. *Biochem. J.* **390**, 749-759
- Davé V, Childs T, Xu Y, Ikegami M, Besnard V, Maeda Y, Wert SE, Neilson JR, Crabtree GR, Whitsett JA. 2006. Calcineurin/NFAT signalling is required for perinatal lung maturation and function. *J. Clin. Invest.* **116**, 2597-2609
- Davis IJ, Hazel TG, Chen R, Blenis J, Lau LF. 1993. Functional Domains and Phosphorylation of the Orphan Receptor Nur77. *Mol. Endo.* **7**, 953-964
- de la Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, Yoshida H, Elia AJ, Samper E, Potter J, Wakeham A, Marengere L, Langille BI, Crabtree GR, Mak TW. 1998. Role of NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* **392**, 182-186

Dequiedt F, Kasler H, Fischle W, Kiermer V, Weinstein M, Herndier BG, Verdin E. 2003. HDAC7, a Thymus-Specific Class II Histone Deacetylase, Regulates Nur77 Transkription and TCR-Mediated Apoptosis. *Immunity*. **18**, 687-698.

Esau C, Boes M, Youn HD, Tatterson L, Liu J, Chen J. 2001. Deletion of Calcineurin and Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2) Binding Domain of Cabin1 Results in Enhanced Cytokine Gene Expression in T Cells. *J. Exp. Med.* **194**, 1449-1459

Flanagan WM, Corthésy B, Bram RJ, Crabtree GR. 1991. Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* **352**, 803-807

Gajewski K, Kim Y, Lee YM, Olson EN, Schulz RA. 1997. *D-mef2* is a target for Tinman activation during Drosophila heart development. *EMBO* **16**, 515-522

Go WY, Liu XL, Roti MA, Liu F, Ho SN. 2004. NFAT5/TonEBP mutant mice define osmotic stress as a critical feature of the lymphoid microenvironment. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **101**, 10673-10678

Gómez del Arco P, Martínez-Martínez S, Maldonado JL, Ortega-Pérez I, Redondo JM. 2000. A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp. *J. Biol. Chem.* **275**, 13872-13878

Gong X, Tang X, Wiedmann M, Wang X, Peng J, Zheng D, Blair LAC, Marshall J, Mao Z. 2003. Cdk5-mediated inhibition of the protective effects of transcription factor MEF2 in neurotoxicity-induced apoptosis. *Neuron* **38**, 33-46

González P, Álvarez V, Menéndez M, Lahoz CH, Martínez C, Corao AI, Calatayud MT, Peña J, García-Castro M, Coto E. 2007. Myocyte enhancing factor-2A in Alzheimer's disease: Genetic analysis and association with MEF2A-polymorphisms. *Neuroscience Letters* **411**, 47-51

- Gossett LA, Kelvin DJ, Sternberg EA, Olsen EN. 1989. A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5022-5033
- Graef IA, Chen F, Crabtree GR. 2001. NFAT signalling in vertebrate development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 505-512
- Graham TW, 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
- Green DG, Droin N, Pinkosky M. 2003. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* **193**, 70-81
- Grégoire S, Yang X. 2005. Association with class IIa histone deacetylases upregulates the sumoylation of MEF2 transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 2273-2287
- Grégoire S, Tremblay AM, Xiao L, Yang Q, Ma K, Nie J, Mao Z, Wu Z, Giguère V, Yang XJ. 2006. Control of MEF2 transcriptional activity by coordinated phosphorylation and sumoylation. *J. Biol. Chem.* **281**, 4423-4433
- Grégoire S, Xiao L, Nie J, Zhang X, Xu M, Li J, Wong J, Seto E, Yang X-J. 2007. Histone deacetylase 3 interacts with and deacetylates myocyte enhancer factor 2. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 1280-1295
- Gupta S. 2005. Molecular mechanisms of apoptosis in the cells of the immune system in human aging. *Immunol. Rev.* **205**, 114-129
- Gwack Y, Sharma S, Nardone J, Tanasa B, Iuga A, Srikanth S, Okamura H, Bolton D, Feske S, Hogan PG, Rao A. 2006. A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* **411**, 646-650

Han J, Molkentin JD. 2000. Regulation of MEF2 by p38 MAPK and its implication in cardiomyocyte biology. *Trends Cardiovasc. Med.* **10**, 19-22

Hazel TG, Nathans D, Lau LF. 1988. A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 8444-8448

Heit JJ, Apelqvist AA, Gu X, Winslow MM, Neilson JR, Crabtree GR, Kim SK. 2006. Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta-cell growth and function. *Nature* **443**, 345-349

Hildeman DA, Yanan Z, Mitchell TC, Kappler J, Marrack P. 2002. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 354-349

Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. 2003. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* **17**, 2205-2232

Imamura R, Masuda ES, Naito Y, Imai SI, Tadahiro F, Takano T, Arai KI, Arai N. 1998. Carboxyl-terminal 15-amino acid sequence of NFATx1 is possibly created by tissue-specific splicing and is essential for transactivation activity in T cells. *J. Immunol.* **161**, 3455-3463

Jang H, Choi DE, Kim H, Cho EJ, Youn HD. 2007. Cabin1 represses MEF2 transcriptional activity by association with a methyltransferase, SUV39H1. *J. Biol. Chem.* **282**, 11172-11179

Kang J, Gocke C, Yu H. 2006. Phosphorylation-facilitated sumoylation of MEF2C negatively regulates its transcriptional activity. *BMC Biochem* **7**, 5

Kaushal S, Schneider JW, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. 1994. Activation of the Myogenic Lineage by MEF2A, a Factor That Induces and Cooperates with MyoD. *Science* **266**, 1236-1240

- Kim HB, Kong M, Kim TM, Suh YH, Kim WH, Lim JH, Song JH, Jung MH. 2006. NFATc4 and ATF3 negatively regulate adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* **55**, 1342-1352
- Kim SO, Ono K, Tobias PS, Han J. 2003. Orphan nuclear receptor Nur77 is involved in caspase-independent macrophage cell death. *J. Exp. Med.* **197**, 1441-1452
- Kolluri SK, Bruey-Sedano N, Cao X, Lin B, Lin F, Han YH, Dawson MI, Zhang XK. 2003. Mitogenic effect of orphan receptor TR3 and its regulation by MEKK1 in lung cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 8651-8667
- Le WD, Xu P, Jankovic J, Jiang H, Appel SH, Smith RG, Vassilatis DK. 2003. Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat. Genet.* **33**, 85-89
- Lee M, Park J. 2006. Regulation of NFAT activation: a potential therapeutic target for immunosuppression. *Mol. Cells* **22**, 1-7
- Lee SL, Wesselschmidt RL, Linette GP, Kanagawa O, Russell JH, Milbrandt J. 1995. Unimpaired Thymic and Peripheral T Cell Death in Mice Lacking the Nuclear Receptor NGFI-B (Nur77). *Science* **269**, 532-535.
- Li M, Linseman DA, Allen MP, Meintzer MK, Wang X, Laessig T, Wierman ME, Heidenreich KA. 2001. Myocyte enhancer factor 2A and 2D undergo phosphorylation and caspase-mediated degradation during apoptosis of rat cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* **21**, 6544-6552
- Linseman DA, Bartley CM, Le SS, Laessig TA, Bouchard RJ, Meintzer MK, Li M, Heidenreich KA. 2003. Inactivation of the myocyte enhancer factor-2 repressor histone deacetylase-5 by endogenous Ca²⁺/Calmodulin-dependent kinase II promotes depolarization-mediated cerebellar granule neuron survival. *J. Biol. Chem.* **278**, 41472-41481

- Liu ZG, Smith SW, McLaughlin KA, Schwartz LM, Osborne BA. 1994. Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene *nur77*. *Nature* **367**, 281-284.
- Ma K, Chan JKL, Zhu G, Wu Z. 2005. Myocyte enhancer factor 2 acetylation by p300 enhances its DNA binding activity, transcriptional activity, and myogenic differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 3575-3582
- Mao Z und Wiedmann M. 1999. Calcineurin Enhances MEF2 DNA Binding Activity in Calcium-dependent Survival of Cerebellar Granule Neurons. *J. Biol. Chem.* **274**, 31102-31107
- Martínez-Martínez S, Rodríguez A, López-Maderuelo MD, Ortega-Pérez I, Vázquez J, Redondo JM. 2006. Blockade of NFAT activation by the second calcineurin binding site. *J. Biol. Chem.* **281**, 6277-6235
- Masuyama N, Oishi K, Mori Y, Ueno T, Takahama Y, Gotoh Y. 2001. Akt inhibits the orphan nuclear receptor Nur77 and T-cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 32799-32805.
- McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. 2001. Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 497-504
- McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. 2002. MEF2 : a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 40-47
- Milbrandt J.1988. Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* **1**, 183-188
- Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. 1999. Tonicity-responsive enhancer binding protein, a Rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2538-2542

Molkentin JD, Black BL, Martin JF, Olson EN. 1996a. Mutational analysis of the DNA binding, dimerization, and transcriptional activation domains of MEF2C. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2627-2636

Molkentin JD, Li L, Olson EN. 1996b. Phosphorylation of the MADS-box transcription factor MEF2C enhances its DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 17199-17204

Ohkubo T, Ohkura N, Maruyama K, Sasaki K, Nagasaki K, Hanzawa H, Tsukada T, Yamaguchi K. 2000. Early induction of the orphan nuclear receptor NOR-1 during cell death of the human breast cancer cell line MCF-7. *Mol. Cell. Endocrinol.* **162**, 151-156

Okamura H, Aramburu J, García-Rodríguez C, Viola JP, Raghavan A, Tahiliani M, Zhang X, Qin J, Hogan PG, Rao A. 2000. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol. Cell* **6**, 539-550

Okamura H, García-Rodríguez C, Martinson H, Qin J, Virshup DM, Rao A. 2004. A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4184-4195

Olson EN, Williams RS. 2000. Remodeling muscles with calcineurin. *BioEssays* **22**, 510-519

Pan F, Ye Z, Cheng L, Liu JO. 2004. Myocyte enhancer factor 2 mediates calcium-dependent transcription of the interleukin-2 gene in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **279**, 14477-14480

Pan F, Means AR, Liu JO. 2005. Calmodulin-dependent protein kinase IV regulates nuclear export of Cabin1 during T-cell activation. *EMBO* **24**, 2104-2113

- Paulsen RF, Granas K, Johnsen H, Rolseth V, Sterri S. 1995. Three related brain nuclear receptors, NGFI-B, Nurr1, and NOR-1, as transcriptional activators. *J Mol Neurosci* **6**, 249-255
- Pekarsky Y, Hallas C, Palamarchuk A, Koval A, Bullrich F, Hirata Y, Bichi R, Letofsky J, Croce CM. 2001. Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nur77. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3690-3694.
- Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira MH, Gauthier Y, Hugo P, Drouin J. 1997. Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5946-5951
- Pinkoski MJ, Green DR. 2005. Apoptosis in the regulation of immune responses. *J. Rheumatol.* **32 Suppl 74**, 19-25
- Rajpal A, Cho YA, Yelent B, Koza-Taylor PH, Li D, Chen E, Whang M, Kang C, Turi TG, Winoto A. 2003. Transcriptional activation of known and novel apoptotic pathways by Nur77 orphan steroid receptor. *EMBO* **22**, 6526-6536.
- Randak C, Brabletz T, Hergenröther M, Sobotta I, Serfling E. 1990. Cyclosporin A suppresses the expression of the interleukin 2 gene by inhibiting the binding of lymphocyte-specific factors to the IL-2 enhancer. *EMBO J.* **9**, 2529-2536
- Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, Gravallesse EM, de la Brousse FC, Hoey T, Mickanin C, Baldwin HS, Glimcher LH. 1998. The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* **392**, 186-190
- Sartorelli V, Huang J, Hamamori Y, Kedes L. 1997. Molecular mechanisms of myogenic coactivation by p300: Direct interaction with the activation domain of MyoD and with the MADS Box of MEF2C. *Mol. Cell. Biol.* **17**, Seite 1010-1026

- 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
- Serfling E, Chuvpilo S, Liu J, Höfer T, Palmetshofer A. 2006a. NFATc1 autoregulation: a crucial step for cell-fate determination. *Trends Immunol.* **27**, 461-469
- Serfling E, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Bopp T, Stassen M, Schmidt E. 2006b. NFAT transcription factors in control of peripheral T cell tolerance. *Eur. J. Immunol.* **36**, 2837-2843
- Shalizi A, Gaudillière B, Yuan Z, Stegmüller J, Shirogane T, Ge Q, Tan Y, Schulman B, Harper JW, Bonni A. 2006. A calcium-regulated MEF2 sumoylation switch controls postsynaptic differentiation. *Science* **311**, 1012-1017
- Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR. 1988. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* **241**, 202-205
- Sheridan CM, Heist EK, Beals CR, Crabtree GR, Gardner P. 2002. Protein kinase A negatively modulates the nuclear accumulation of NFATc1 by priming for subsequent phosphorylation by glycogen synthase kinase-3. *J. Biol. Chem.* **277**, 48664-48676
- Silbernagl S, Lang F. 1998. Taschenatlas der Pathophysiologie. *Georg Thieme Verlag*
- Suzuki S, Suzuki N, Mirtsos C, Horacek T, Lye E, Noh SK, Ho A, Bouchard D, Mak TW, Yeh WC. 2003. Nur77 as a survival factor in tumor necrosis factor signalling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8276-8280
- Swanson BJ, Jäck H-M, Lyons GE. 1998. Characterization of myocyte enhancer factor-2 (MEF2) expression in B and T cells: MEF2C is a B cell-restricted transcription factor in lymphocytes. *Mol. Immunol.* **35**, 445-458

- Tang X, Wang X, Gong X, Tong M, Park D, Xia Z, Mao Z. 2005. Cyclin-dependent kinase 5 mediates neurotoxin-induced degradation of the transcription factor myocyte enhancer factor 2. *J. Neurosci.* **25**, 4823-4834
- Terui Y, Saad N, Jia S, McKeon F, Yuan J. 2004. Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1. *J. Biol. Chem* **279**, 28257-28265
- Tothova J, Blaauw B, Pallafacchina G, Rudolf R, Argentini C, Reggiani, Schiaffino S. 2006. NFATc1 nucleocytoplasmic shuttling is controlled by nerve activity in skeletal muscle. *J. Cell Sci* **119**, 1604-1611
- Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG. 2003. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet.* **19**, 286-293
- Wang AH, Kruhlak MJ, Wu J, Bertos NR, Vezmar M, Posner BI, Bazett-Jones DP, Yang XJ. 2000. Regulation of histone deacetylase 4 by binding of 14-3-3 proteins. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6904-6912
- Weih F, Ryseck R-P, Chen L, Bravo R. 1996. Apoptosis of *nur77/N10*-transgenic thymocytes involves the Fas/Fas ligand pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 5533-5538.
- Weiss A, Imboden J, Shoback D, Stobo J. 1984. Role of T3 surface molecules in human T-cell activation: T3-dependent activation results in an increase in cytoplasmic free calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4169-4173
- Williams GT and Lau LF. 1993. Activation of the inducible orphan receptor gene *nur77* by serum growth factors: Dissociation of immediate-early and delayed-early responses. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 6124-6136

- Wingate AD, Campbell DG, Peggie M, Arthur JS. 2006. Nur77 is phosphorylated in cells by RSK in response to mitogenic stimulation. *Biochem. J.* **393**, 715-724.
- Winoto A. 1997. Genes involved in T-cell receptor-mediated apoptosis of thymocytes and T-cell hybridomas. *Semin. Immunol.* **9**, 51-58
- Woronicz JD, Calnan B, Ngo V, Winoto A. 1994. Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature* **367**, 277-281.
- Woronicz JD, Lina A, Calnan BJ, Szychowski S, Cheng L, Winoto A. 1995. Regulation of the Nur77 orphan steroid receptor in activation-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6364-6376.
- Wu H, Naya FJ, McKinsey TA, Mercer B, Shelton JM, Chin ER, Simard AR, Michel RN, Bassel-Duby R, Olson EN, Williams RS. 2000. MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. *EMBO* **19**, 1963-1973
- Wu Q, Liu S, Ye XF, Huang ZW, Su WJ. 2002. Dual roles of Nur77 in selective regulation of apoptosis and cell cycle by TPA and ATRA in gastric cancer cells. *Carcinogenesis* **23**, 1583-1592
- Xu J, Gong NL, Bodi I, Aronow BJ, Backx PH, Molkenin JD. 2006. Myocyte enhancer factors 2A and 2C induce cardiomyopathy in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **281**, 9152-9162
- Yang CC, Ornatsky OI, McDermott JC, Cruz TF, Prody CA. 1998. Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1. *Nucleic Acids Res.* **26**, 4771-4777.
- Yang TTC, Xiong Q, Enslin H, Davis RJ, Chow CW. 2002. Phosphorylation of NFATc4 by p38 Mitogen-Activated Protein Kinases. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3892-3904

Yoon JK, Lau LF. 1993. Transcriptional activation of the inducible nuclear receptor gene *nur77* by nerve growth factor and membrane depolarization in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 9148-9155

Yoon JK, Lau LF. 1994. Involvement of JunD in transcriptional activation of the orphan receptor gene *nur77* by nerve growth factor and membrane depolarization in PC12 cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7731-7743

Youn HD, Sun L, Prywes R and Liu JO. 1999. Apoptosis of T Cells Mediated by Ca²⁺-Induced Release of the Transcription Factor MEF2. *Science* **86**, 790-793

Youn HD, Chatila TA, Liu JO. 2000. Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis. *EMBO* **19**, 4323-4331

Youn HD und Liu JO. 2000. Cabin1 represses MEF2-dependent Nur77 Expression and T cell apoptosis by controlling association of histone deacetylases and acetylases with MEF2. *Immunity* **13**, 85-94

Yu YT. 1996. Distinct domains of myocyte enhancer binding factor-2A determining nuclear localization and cell type-specific transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 24675-24683

Zetterström RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T. 1997. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* **276**, 248-250

Zhang J, Xu X, Liu Y. 2004. Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity. *Cell. Mol. Immunol.* **1**, 186-192

Zhao M, New L, Kravchenko VV, Kato Y, Gram H, Padova F, Olson EN, Ulevitch RJ, Han J. 1999. Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 21-30

Zhou T, Cheng J, Yang P, Wang Z, Liu C, Su X, Bluethmann H, Mountz JD. 1996. Inhibition of Nur77/Nurr1 Leads to Inefficient Clonal Deletion of Self-Reactive T Cells. *J. Exp. Med.* **183**, 1879-1892

Zhu B, Gulick T. 2004. Phosphorylation and alternative pre-mRNA splicing converge to regulate myocyte enhancer factor 2C activity. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 8264-8275

Zhu J, Shibasaki F, Price R, Guillemot JC, Yano T, Dotsch V, Wagner G, Pascual F, McKeon F. 1998. Intramolucular masking of nuclear import signal of NFAT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell* **93**, 851-861

Danksagung

Zuerst möchte ich Dr. Andris Avots danken, meinem Betreuer bei dieser Dissertation. Er hat mich mit seinem umfangreichen Wissen in die Molekularbiologie mit ihren verschiedenen Methoden eingeführt, dieses Projekt mit mir geplant und die experimentellen Arbeiten betreut. Außerdem stand er immer zur Bewertung der Ergebnisse und für kritische Diskussionen zur Verfügung.

Besonders danke ich auch Prof. Dr. Edgar Serfling für die Idee und die Unterstützung meines Projekts, seine vielfältigen Ideen und sein anhaltendes Interesse am Fortgang der Arbeit. Es hielt auch noch so viele Jahre nach meinen experimentellen Arbeiten beim Schreiben meiner Dissertation an, womit er die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichte.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Christian Kneitz möchte ich für seine Bereitschaft danken, diese Arbeit zu begutachten.

Während meiner Zeit im Labor hat mir das Laborteam der molekularen Pathologie immer hilfreich zur Seite gestanden, auch dafür vielen Dank! Besonders zu erwähnen ist hierbei Jan Schulze-Lührmann, der mir bei den vielen kleineren und größeren Problemchen im Labor weitergeholfen hat und der mich bei missglückten Versuchen moralisch unterstützte.

Für Hilfe bei der Vorbereitung und Durchführung der Transfektionsversuche in der Virologie möchte ich den technischen Assistentinnen, Doris Michel und Ilona Pietrowski, danken.

Außerdem danke ich meinen Eltern, Gabriele und Christian Rittner, für ihre Beharrlichkeit, an das Gelingen dieser Arbeit zu glauben, für Diskussionen über die Molekularbiologie im Allgemeinen und meine Arbeit im Speziellen und schließlich das Korrekturlesen der Gesamtarbeit.

Außerdem haben sie vor Milijans Geburt durch Betreuung der beiden "Großen" die Fertigstellung der Erstversion der Arbeit ermöglicht.

In meiner familiären Situation mit inzwischen drei Kindern wäre das Fertigstellen dieser Arbeit nicht ohne Hilfe aus der Familie möglich gewesen!

So danke ich auch besonders meiner Schwiegermutter, Barbara Cordes, die geholfen hat, wo sie konnte, und mir mehrfach während der Ausarbeitung der Dissertation bei der Betreuung der Kinder unter die Arme gegriffen hat.

Meinem Ehemann, Jochen Cordes, gilt ganz besonderer Dank! Er hat mich immerwährend unterstützt, mich ermutigt, diese Arbeit fertig zu stellen, mir bei zahllosen Monologen zugehört, die geholfen haben, meine Gedanken zu sortieren (auch wenn er leider fachlich von Biologie und Medizin keine Ahnung hat), und dennoch hat er nie die Geduld verloren, auch wenn die Arbeit mal nicht so gut vorwärts ging. Außerdem war er ein wahrer Fachmann in der Anwendung von Word und somit von unschätzbarem Wert beim Schreiben der Arbeit. Ohne ihn gäbe es diese Arbeit wohl nicht – danke!

Lebenslauf

Tatjana Cordes geb. Rittner
Ernst-Reuter-Str. 11
97080 Würzburg
Tel.: 0931-2878983
email: Tatjana.Cordes@gmx.de



Persönliche Daten

Geboren am 11. Oktober 1977 in Bonn-Duisdorf

Zweites von drei Kindern von em. Prof. Dr. med. Christian Rittner, Institut für Rechtsmedizin, Mainz und Frau Dr. rer. nat. Gabriele Rittner, Humangenetikerin und Vaterschaftsgutachterin

Familienstand: Verheiratet, 3 Kinder (3 und 5 Jahre alt, 2 Monate)

Konfession: evangelisch

Schulbildung

1984 - 1985	Besuch der Grundschule Gielsdorf
1985 - 1989	Besuch der Grundschule Nieder-Olm
1989 - 1997	Besuch des Nieder-Olmer Gymnasiums
September - Dezember 1994	Besuch des Clifton College Bristol, Great Britain zur Verbesserung der Englischkenntnisse
1997	Abitur

Studium

1997 – 1999	Studium an der Universität Regensburg
September 1999	Ärztliche Vorprüfung
1999 - 2006	Studium an der bayr. Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Sommer 2000	1. Staatsexamen
ab September 2000	experimentelle Doktorarbeit bei Prof. Dr. E. Serfling, Pathologisches Institut, Abteilung für molekulare Pathologie, Universität Würzburg
März 2003	2. Staatsexamen
Mai 2006	3. Staatsexamen, Erlangung der Approbation als Ärztin

Praktisches Jahr

April 2003 bis Dez. 2003	Innere Medizin an der Med. Universitätsklinik Würzburg (halbtags)
Dez. 2003 bis März 2004	Chirurgie an der chirurgischen Universitätsklinik Würzburg
April 2005 bis Nov. 2005	Gynäkologie an der Universitätsfrauenklinik Würzburg (halbtags)