

**Die Rolle des Stress-Sensors  
Gadd45 $\beta$  in Autophagie, Apoptose  
und  
T-Zellentwicklung**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Eric Keil

aus Bendorf

Oktober, 2008

Aus dem Institut für Molekulare Medizin  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD. Dr. Ingo Schmitz  
Institut für Molekulare Medizin  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Koreferent: Prof. Dr. William Martin  
Institut für Ökologische Pflanzenphysiologie  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2008

## **Der Panther**

Sein Blick ist vom Vorübergehn der Stäbe  
so müd geworden, dass er nichts mehr hält.  
Ihm ist, als ob es tausend Stäbe gäbe  
und hinter tausend Stäben keine Welt.

Der weiche Gang geschmeidig starker Schritte,  
der sich im allerkleinsten Kreise dreht,  
ist wie ein Tanz von Kraft um eine Mitte,  
in der betäubt ein großer Wille steht.

Nur manchmal schiebt der Vorhang der Pupille  
sich lautlos auf -. Dann geht ein Bild hinein,  
geht durch der Glieder angespannte Stille -  
und hört im Herzen auf zu sein.

Rainer Maria Rilke

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>I.</b>  | <b>EINLEITUNG</b>  | <b>8</b>  |
| <b>1</b>   | <b>APOPTOSE</b>  | <b>9</b>  |
| 1.1        | <i>Morphologie und Rolle der Apoptose</i>  | 9         |
| 1.2        | <i>Caspasen</i>  | 10        |
| 1.3        | <i>Apoptotische Signalwege</i>   | 12        |
| <b>2</b>   | <b>AUTOPHAGIE</b>  | <b>15</b> |
| 2.1        | <i>Definition der Autophagie</i>   | 15        |
| 2.2        | <i>Formen und Rolle der Autophagie</i>   | 16        |
| 2.3        | <i>Die Regulation der Autophagie</i>   | 17        |
| <b>3</b>   | <b>IMMUNSYSTEM</b>   | <b>20</b> |
| 3.1        | <i>Immunologische Toleranz</i>   | 20        |
| 3.2        | <i>Der Thymus als Ort der T-Zellreifung</i>  | 22        |
| 3.3        | <i>Stadien der T-Zelldifferenzierung im Thymus</i>                                 | 23        |
| 3.4        | <i>Negative und positive Selektion im Thymus</i>                                   | 24        |
| <b>4</b>   | <b>GADD45<math>\beta</math></b>  | <b>27</b> |
| 4.1        | <i>Die Gadd45-Proteinfamilie</i>   | 27        |
| 4.2        | <i>Interaktionspartner von Gadd45<math>\beta</math>, die Zellzyklusregulatoren</i> | 27        |
| 4.3        | <i>Interaktionspartner von Gadd45<math>\beta</math>, die MAP-Kinasen</i>           | 28        |
| 4.4        | <i>Die Rolle von Gadd45<math>\beta</math> während der Apoptose</i>                 | 30        |
| <b>5</b>   | <b>ZIELSETZUNG</b>   | <b>33</b> |
| <b>II.</b> | <b>MATERIAL UND METHODEN</b>   | <b>34</b> |
| <b>1</b>   | <b>MATERIAL</b>  | <b>34</b> |
| 1.1        | <i>Chemikalien</i>   | 34        |
| 1.2        | <i>Eukaryotische Zellen</i>  | 34        |
| 1.3        | <i>Bakterienstämme</i>   | 35        |
| 1.4        | <i>Mäusestämme</i>   | 35        |
| 1.5        | <i>Nährmedien</i>  | 35        |
| 1.5.1      | <i>Nährmedien für die Zellkultur</i>   | 35        |
| 1.5.2      | <i>Nährmedien für Bakterien</i>  | 35        |
| 1.6        | <i>Vektoren</i>  | 36        |
| 1.7        | <i>Enzyme</i>  | 37        |
| 1.8        | <i>Größenstandards</i>   | 37        |
| 1.9        | <i>Oligonukleotide</i>   | 37        |
| 1.10       | <i>Antikörper</i>  | 39        |
| 1.10.1     | <i>Primäre Antikörper</i>  | 39        |
| 1.10.2     | <i>Primäre Antikörper (Fluoreszenz-markiert)</i>                                   | 40        |
| 1.10.3     | <i>Sekundäre Antikörper (Meerrettich-Peroxidase-konjugiert)</i>                    | 40        |
| 1.10.4     | <i>Sekundäre Antikörper (Fluoreszenz-markiert)</i>                                 | 40        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>2. METHODEN</b>   | <b>41</b> |
| 2.1 <i>Molekularbiologische Methoden</i>                                 | 41        |
| 2.1.1 <i>Analytische Plasmidpräparation</i>                              | 41        |
| 2.1.2 <i>Präparative Plasmidisolierung</i>                               | 41        |
| 2.1.3 <i>Restriktionsanalyse</i>   | 42        |
| 2.1.4 <i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>                              | 42        |
| 2.1.5 <i>Quantitative PCR (realtime PCR)</i>                             | 43        |
| 2.1.6 <i>Aufreinigung von PCR-Produkten</i>                              | 45        |
| 2.1.7 <i>Ligation</i>  | 45        |
| 2.1.8 <i>Isolation von mRNA aus eukaryotischen Zellen</i>                | 45        |
| 2.1.9 <i>Reverse Transkription (RT-PCR)</i>                              | 45        |
| 2.1.10 <i>Analytische Agarosegele</i>                                    | 46        |
| 2.1.11 <i>Präparative Agarosegele und Gelextraktionen</i>                | 46        |
| 2.1.12 <i>Transformation chemokompetenter Bakterien</i>                  | 46        |
| 2.1.13 <i>Transformation elektrokompeter Bakterien</i>                   | 47        |
| 2.1.14 <i>Kryokonservierung von Bakterien</i>                            | 47        |
| 2.2 <i>Zellbiologische Methoden</i>                                      | 47        |
| 2.2.1 <i>Kultivierung eukaryontischer Zellen</i>                         | 47        |
| 2.2.2 <i>Kryokonservierung eukaryontischer Zellen</i>                    | 48        |
| 2.2.3 <i>Herstellung und Lagerung von Zellpellets</i>                    | 48        |
| 2.2.4 <i>Transfektion</i>  | 49        |
| 2.2.5 <i>Thymuspräparation</i>   | 49        |
| 2.2.6 <i>Fötale Thymusorgankultur (FTOC)</i>                             | 50        |
| 2.2.7 <i>Herstellung von Retro- und Lentiviren</i>                       | 50        |
| 2.2.8 <i>Transduktion von Zielzellen mit Viruspartikeln</i>              | 51        |
| 2.2.9 <i>Immunofluoreszenzmikroskopie von adhärenen Zellen</i>           | 51        |
| 2.3 <i>Durchflusszytometrie (FACS)</i>                                   | 52        |
| 2.3.1 <i>Nachweis von Apoptose nach Nicoletti</i>                        | 52        |
| 2.3.2 <i>Cytometric Bead Array (CBA)</i>                                 | 53        |
| 2.3.3 <i>Acridine-Orange-Färbung</i>                                     | 53        |
| 2.4 <i>Proteinbiochemische Methoden</i>                                  | 54        |
| 2.4.1 <i>Konzentrationsbestimmungen von Proteinen nach Bradford</i>      | 54        |
| 2.4.2 <i>Konzentrationsbestimmungen von Proteinen über BCA</i>           | 54        |
| 2.4.3 <i>Herstellung zytoplasmatischer Zell-Lysate</i>                   | 55        |
| 2.4.4 <i>Herstellung von Gesamtzellextrakten</i>                         | 55        |
| 2.4.5 <i>Fraktionierte Zellyse</i>                                       | 56        |
| 2.4.6 <i>Koimmunpräzipitation von Proteinen über Protein G-Sepharose</i> | 57        |
| 2.4.7 <i>Pull-down-Analysen</i>  | 57        |
| 2.4.8 <i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>              | 57        |
| 2.4.9 <i>Western Blot</i>  | 58        |
| 2.4.10 <i>Coomassie-Blau-Färbung</i>                                     | 59        |

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| 2.4.11      | <i>Kinase-Test</i>   | 59        |
| 2.5         | <i>Herstellung und Aufreinigung rekombinanter Proteine</i>   | 60        |
| 2.5.1       | <i>Expressionsstudien rekombinanter Proteine</i>   | 60        |
| 2.5.2       | <i>Expression rekombinanter Proteine</i>   | 61        |
| 2.5.3       | <i>Dialyse</i>   | 61        |
| 2.5.4       | <i>Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels GSH-Affinitätschromatographie</i>   | 62        |
| 2.5.5       | <i>Aufreinigung 6xHis-markierter Proteine mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie</i>   | 62        |
| 2.5.6       | <i>Renaturierung von rekombinanten Fusionsproteinen</i>  | 63        |
| 2.6.        | <i>Produktion polyklonaler Antikörper im Huhn</i>  | 64        |
| 2.6.1       | <i>Immunisierung</i>   | 64        |
| 2.6.2       | <i>Isolierung von polyklonalen Hühner-Antikörpern</i>  | 64        |
| 2.7.        | <i>Histochemische Untersuchungen</i>   | 65        |
| 2.7.1       | <i>Herstellung von Paraffinschnitten</i>   | 65        |
| 2.7.2       | <i>In situ Hybridisierung</i>  | 65        |
| 2.7.3       | <i>Cortexfärbung im Thymus</i>   | 65        |
| <b>III.</b> | <b>ERGEBNISSE</b>  | <b>67</b> |
| <b>1</b>    | <b>DER GADD45<math>\beta</math>/MEKK4-SIGNALWEG IN DER AUTOPHAGIE</b>  | <b>67</b> |
| 1.1         | <i>Spezifische Interaktion von Gadd45<math>\beta</math> und MEKK4</i>  | 67        |
| 1.2         | <i>Spezifische Aktivierung von p38 durch Gadd45<math>\beta</math> und MEKK4</i>  | 68        |
| 1.3         | <i>Subzelluläre Lokalisation von Gadd45<math>\beta</math> und MEKK4</i>  | 69        |
| 1.4         | <i>Die Aktivierung von p38 durch Gadd45<math>\beta</math>/MEKK4 führt zu einer zytosolischen Lokalisation von aktivierter p38</i>                          | 70        |
| 1.5         | <i>Aktivierung von p38 durch Gadd45<math>\beta</math>/MEKK4 führt zu einer Kolokalisation von p38 mit dem Autophagiemarker LC3-II</i>                      | 74        |
| 1.6         | <i>Die Lokalisation von p38 in punktförmigen Strukturen ist spezifisch für die Aktivierung von p38 durch Gadd45<math>\beta</math> und MEKK4</i>            | 75        |
| 1.7         | <i>Die Aktivierung von p38 durch Gadd45<math>\beta</math> und MEKK4 führt zu einer Inhibition der Autophagie</i>   | 77        |
| 1.8         | <i>Identifizierung von ATG5 als Substrat von p38</i>   | 79        |
| 1.9         | <i>Threonin 75 der murinen Aminosäuresequenz von ATG5 wird von p38 phosphoryliert</i>  | 82        |
| 1.10        | <i>Phosphorylierung von ATG5 an Threonin 75 inhibiert den Prozess der Autophagie</i>   | 83        |
| <b>2</b>    | <b>DER GADD45<math>\beta</math>/MEKK4-SIGNALWEG WÄHREND DER NEGATIVEN SELEKTION</b>  | <b>87</b> |
| 2.1         | <i>Spezifische Hochregulation von Gadd45<math>\beta</math> während der negativen Selektion</i>   | 87        |
| 2.2         | <i>Gadd45<math>\beta</math> ist in der Medulla des Thymus lokalisiert</i>  | 92        |
| 2.3         | <i>Die Koexpression von endogene Gadd45<math>\beta</math> und MEKK4 während der negativen Selektion führt zu einer Aktivierung von p38</i>                 | 93        |
| 2.4         | <i>Die Koexpression von Gadd45<math>\beta</math> und MEKK4 in CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen führt zu einer verlängerten Aktivierung von p38</i> | 97        |

|              |   |            |
|--------------|---|------------|
| 2.5          | <i>Die Aktivierung von p38 durch den Gadd45<math>\beta</math>/MEKK4-Signalweg nach TCR-Stimulation führt in CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zum Zelltod</i>      | 100        |
| 2.6          | <i>Gadd45<math>\beta</math>-defiziente Thymozyten zeigen ein verändertes CD4/CD8 Differenzierungsmuster und geringere Sensitivität gegenüber TCR-induzierter Apoptose</i> | 102        |
| <b>IV.</b>   | <b>DISKUSSION</b>   | <b>105</b> |
| 1            | <i>Gadd45<math>\beta</math> und MEKK4 als Regulatoren von MAP-Kinasen</i>   | 105        |
| 2            | <i>Rolle von Gadd45<math>\beta</math> und MEKK4 in der Autophagie</i>   | 108        |
| 3            | <i>Rolle von Gadd45<math>\beta</math> während der Apoptose</i>  | 110        |
| 4            | <i>Rolle von Gadd45<math>\beta</math> und MEKK4 im Thymus während der negativen Selektion</i>   | 111        |
| <b>IV.</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b>  | <b>117</b> |
| <b>V.</b>    | <b>SUMMARY</b>  | <b>118</b> |
| <b>VI.</b>   | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b>   | <b>119</b> |
| <b>VII.</b>  | <b>ABKÜRZUNGEN</b>  | <b>132</b> |
| <b>VIII.</b> | <b>ANHANG</b>   | <b>135</b> |

## **I. Einleitung**

Multizelluläre Organismen verfügen über streng regulierte Mechanismen zur schnellen und selektiven Entfernung beschädigter, überflüssiger, fehlentwickelter oder potentiell schädigender Zellen. Apoptose stellt neben der Nekrose und dem autophagischen Zelltod eine Form des regulierten Zelltods dar. Anfänglich wurde der durch ein definiertes molekulares Programm regulierte Prozess der Apoptose dem passiven Prozess der Nekrose gegenübergestellt. Es zeigte sich aber, dass beide Prozesse nur die zwei Enden eines Spektrums darstellen, welches auch Mischformen beinhaltet. Nekrose tritt bei mechanischen und chemischen Verletzungen von Zellen und Geweben auf. Die Zellen weisen ein starkes Anschwellen des Zellkörpers auf (Onkose) und sind durch beschädigte oder zerstörte Organellen gekennzeichnet (Wyllie, 1997). Im Gegensatz zur Apoptose, bei der die Integrität der Zellmembran bis zur Phagozytose gewahrt bleibt, resultiert nekrotischer Zelltod in einem Zerfall der Zelle, einhergehend mit der Entleerung des Zellinhalts (Degterev et al., 2008). Infolgedessen kommt es hier zu Entzündungsreaktionen im umliegenden Gewebe. Autophagie beschreibt den partiellen Selbstverdau der Zelle, der ein Überlebensmechanismus bei kurzzeitiger Limitation an Nährstoffen oder Wachstumsfaktoren darstellen kann, oder beim vollständigen Ablauf zum Zelltod führt (Levine und Yuan, 2005). Apoptose und Autophagie sind im Gegensatz zur Nekrose genetisch regulierte, evolutionär hochkonservierte Prozesse, die wichtig für die Zellentwicklung, Zelldifferenzierung und die Homöostase sind. Deshalb spielen Störungen in der Regulation von Autophagie bzw. Apoptose eine zentrale Rolle bei vielen Krankheiten, wie z.B. Krebs und Immunerkrankungen (Mizushima et al., 2008; Rieux-Laucat et al., 2003). Der funktionelle Zusammenhang zwischen Apoptose und Autophagie ist sehr komplex, weil Autophagie ein Überlebensmechanismus ist, der nicht mehr benötigte Proteine oder auch überzählige Organellen, wie z.B. Mitochondrien, durch saure Degradation zersetzt und dabei Apoptose unterdrückt. Allerdings kann anhaltender Zellstress auch dazu führen, dass Autophagie den Zelltod induziert, den sogenannten autophagische Zelltod. Der autophagische Zelltod kann sowohl Caspase-abhängig, also durch Induktion von Apoptose, als auch Caspase-unabhängig ablaufen. Dies kann zur parallelen Ausführung und beiderseitigen Beeinflussung von Autophagie und Apoptose führen. Auf molekularer Ebene sind beide Mechanismen eng miteinander verknüpft. Dies führt dazu, dass Teile der Regulationsmechanismen identisch sind und es einige Mediatoren gibt, die je nach physiologischem Kontext den einen oder anderen Prozess regulieren (Maiuri et al., 2007).

# 1 Apoptose

## 1.1 Morphologie und Rolle der Apoptose

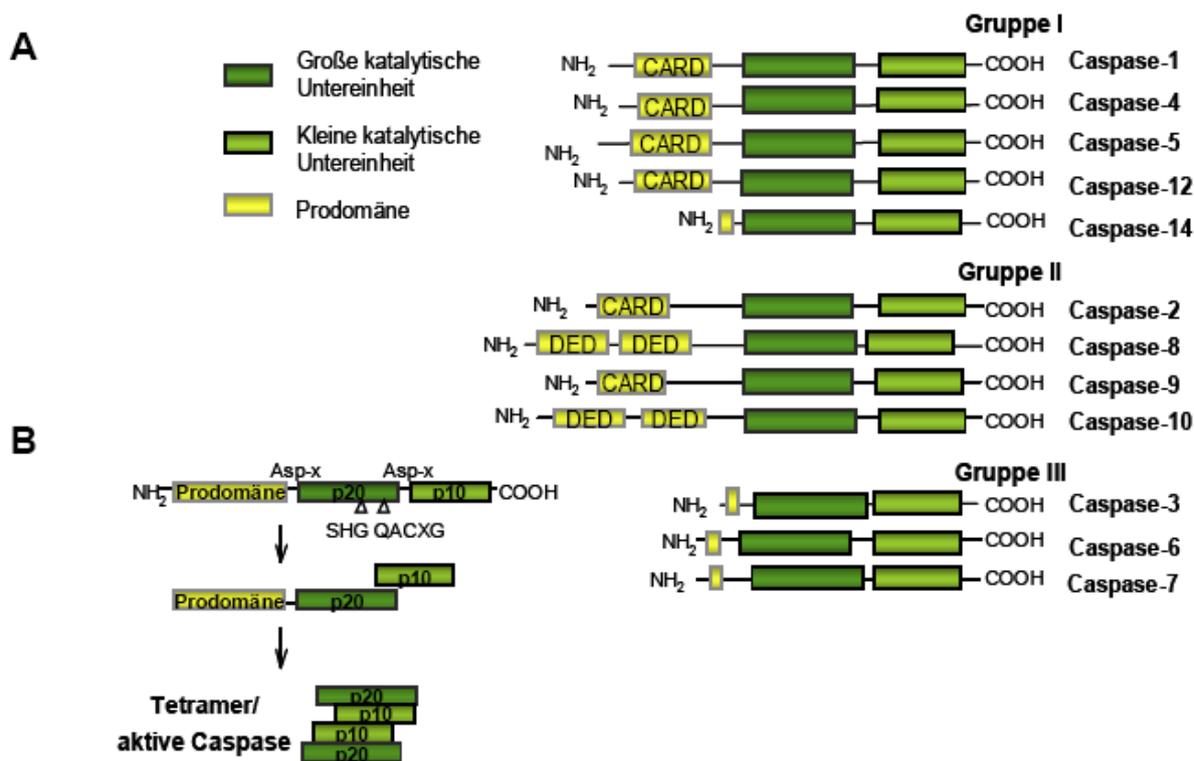
Der Begriff „Apoptose“ wurde durch Kerr, Wyllie and Currie geprägt, die damit eine Reihe morphologischer Veränderungen in Lebergeweben nach Entzug lebensnotwendiger Wachstumsfaktoren definierten (Kerr et al., 1972). Erste Studien von Wyllie zeigten, dass diese physiologische Form des Zelltods während der Embryonalentwicklung und Gewebereorganisation, aber auch bei der Regulation der Immunantwort und der Tumorregression eine bedeutende Rolle spielt (Wyllie et al., 1973). Die Apoptose kann durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli induziert werden, so z.B. durch UV- oder  $\gamma$ -Bestrahlung, Entzug von Wachstumsfaktoren, Chemotherapeutika sowie durch Stimulation sogenannter Todesrezeptoren. Die Apoptose läuft in einer geordneten Reihenfolge morphologisch unterscheidbarer Phasen ab. Apoptotische Zellen sind durch charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen gekennzeichnet und lassen sich makroskopisch durch die Blasenbildung der Plasmamembran (*membrane blebbing*) und den Zerfall der Zellen in kleine membranumhüllte Vesikel, die apoptotischen Körperchen, erkennen. Zudem separieren sich diese Zellen zunächst von ihren benachbarten Zellen und zeigen charakteristische Strangbrüche des Chromatins (DNA-Fragmentierung). Die DNA wird in oligonukleosomale Fragmente von 180 bp und Vielfachen davon gespalten (Wyllie et al., 1980; Wyllie et al., 1984). Apoptose wird von Membraninversion, Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche, Schrumpfen der Zellen und Abschnürungen der Plasmamembran (Zeiöse) sowie Bildung von apoptotischen Körperchen, welche kondensierte Organellen und Chromatinfragmente enthalten, begleitet.

Phosphatidylserinreste, die ausschließlich an der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert sind, invertieren nach Apoptoseinduktion auf die Außenseite der Zelle und dienen dabei als sogenannte „eat me“-Signale für phagozytierende Zellen, so dass die apoptotischen Körperchen anschließend von Makrophagen und anderen phagozytierenden Körperzellen aufgenommen werden (Lauber et al., 2004). Somit wird der Inhalt der Zellen nicht in die Umgebung entlassen, wodurch es folglich auch zu keiner Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe kommt.

Apoptose ist zur Aufrechterhaltung der Homöostase von Geweben notwendig. Sie spielt eine maßgebliche Rolle bei der embryonalen Morphogenese, der zellulären Homöostase, der Zellatrophie und der Beseitigung potentiell schädigender Zellen wie beispielsweise Tumorzellen oder autoreaktiver Thymozyten (Danial und Korsmeyer, 2004). Wie essentiell die Funktion der Apoptose ist, zeigt sich daran, dass die Blockierung apoptotischer Signalwege zu Krebs und Autoimmunität (z.B. Diabetes mellitus Typ I, Multiple Sklerose) führen kann. Eine Verstärkung der Apoptose kann der Grund für eine Vielzahl akuter und chronisch-degenerativer Erkrankungen (z.B. Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson), Immundefizienz und Infertilität sein (Danial und Korsmeyer, 2004).

## 1.2 Caspasen

Caspasen sind eine Familie von Aspartat-spezifischen Cystein-Proteasen, die für die Ausführung der Apoptose essentiell sind (Alnemri et al., 1996; Nicholson, 1999) und von denen in Säugetieren 12 verschiedene Mitglieder beschrieben sind (Launay et al., 2005). Die Unterteilung der Caspasen kann nach ihrer Strukturähnlichkeit oder ihrer phylogenetischen Verwandtschaft getroffen werden. Am geläufigsten ist aber eine Gruppierung in inflammatorische Caspasen, Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen (Abbildung 1). Die Caspasen-1, -4, -5, -11, -12, und -14 zählen zu der ersten Gruppe und sind hauptsächlich an der proteolytischen Prozessierung von Zytokinen wie IL-1 $\beta$  und IL-18 bei Entzündungsreaktionen beteiligt (Denault und Salvesen, 2002; Earnshaw et al., 1999). Für Caspase-4 und -12 ist aber z.B. auch eine Beteiligung am ER-Stress-induzierten Zelltod beschrieben. Die Caspasen-2, -3, -6, -7, -8, -9 und -10 sind hauptsächlich für die Regulation der Apoptose zuständig. Caspasen werden konstitutiv und in Form von katalytisch inaktiven Proenzymen (Zymogene) synthetisiert und durch proteolytische Spaltung aktiviert. Das Proenzym besteht aus einer N-terminalen Prodomäne sowie der Caspasen-Domäne. Analysen der Kristallstruktur von Caspase-1, Caspase-3 und Caspase-8 ergaben, dass das aktive Enzym aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten in Form eines  $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramers aufgebaut ist (Fesik, 2000). Die Aktivierung von Caspasen wurde für eine Reihe von apoptotischen Stimuli gezeigt, einschließlich der Signaltransduktion durch Todesrezeptoren (Schmitz et al., 2000). Zusammen mit den Initiatorcaspasen zeichnen sich die inflammatorischen Caspasen durch den Besitz von großen Prodomänen aus, welche typische Protein-Protein-Interaktionsdomänen enthalten. Die Aktivierung erfolgt über die Dimerisierung in Multiproteinkomplexen über die *Death Effector Domain* (DED; Caspase 8 und 10) oder die *Caspase Activating Recruitment Domain* (CARD; Caspase 1, 2, 4, 5, 9, 12).



**Abbildung 1: Unterteilung, Domänenstruktur und Aktivierung der humanen Caspasen.** (A) Unterteilung der Familie der humanen Caspasen in drei Hauptgruppen. Caspasen, die vorwiegend an Entzündungsprozessen beteiligt sind (Gruppe I), apoptotische Initiatorcaspasen (Gruppe II) und apoptotische Effektorcaspasen (Gruppe III). Das ursprünglich als Caspase-13 bezeichnete Protein stellte sich als bovines Homolog der Caspase-4 heraus. Caspase-11 stellt wahrscheinlich ein murines Homolog der humanen Caspase-4 und -5 dar. (B) Aktivierung von Procaspasen mittels Proteolyse an spezifischen Asp-Resten. Der erste Prozessierungsschritt trennt die große und kleine Untereinheit, die kleine Untereinheit bleibt an der großen Untereinheit gebunden. Der zweite Prozessierungsschritt führt zur Abtrennung der Prodomäne und Bildung des aktiven Tetramers. Die Motive QACXG und SHG bilden das katalytische Zentrum. Modifiziert nach Lavrik (Lavrik et al., 2005).

Die Effektorcaspasen (3, 6, 7) liegen dagegen bereits in der inaktiven Form als Dimere im Zytoplasma vor. Die Spaltung dieser Dimere durch die Initiatorcaspasen führt dazu, dass das aktive Zentrum zugänglich wird, und damit letztlich deren zelluläre Proteinsubstrate (Todessubstrate) gespalten werden können (Salvesen und Abrams, 2004).

Die Todessubstrate lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen. Gruppe I umfasst Proteine für DNA-Reparatur und Spleißen von mRNA, die durch die Spaltung inaktiviert werden. Die apoptotische Zelle kann damit energieverbrauchende und unwichtig gewordene Prozesse abschalten. Auch Signalmoleküle (Gruppe II) werden gespalten und dadurch aktiviert, aber auch inaktiviert, wenn sie antiapoptotisch wirken. Eine weitere Gruppe (III) stellen Strukturproteine der Zelle dar. Deren Spaltung könnte für die Veränderungen der Membranintegrität und die Bildung apoptotischer Körperchen verantwortlich sein. Darüber hinaus gibt es eine

Vielzahl von Todessubstraten, deren Funktion bei der Apoptose noch unklar ist (Fischer et al., 2003).

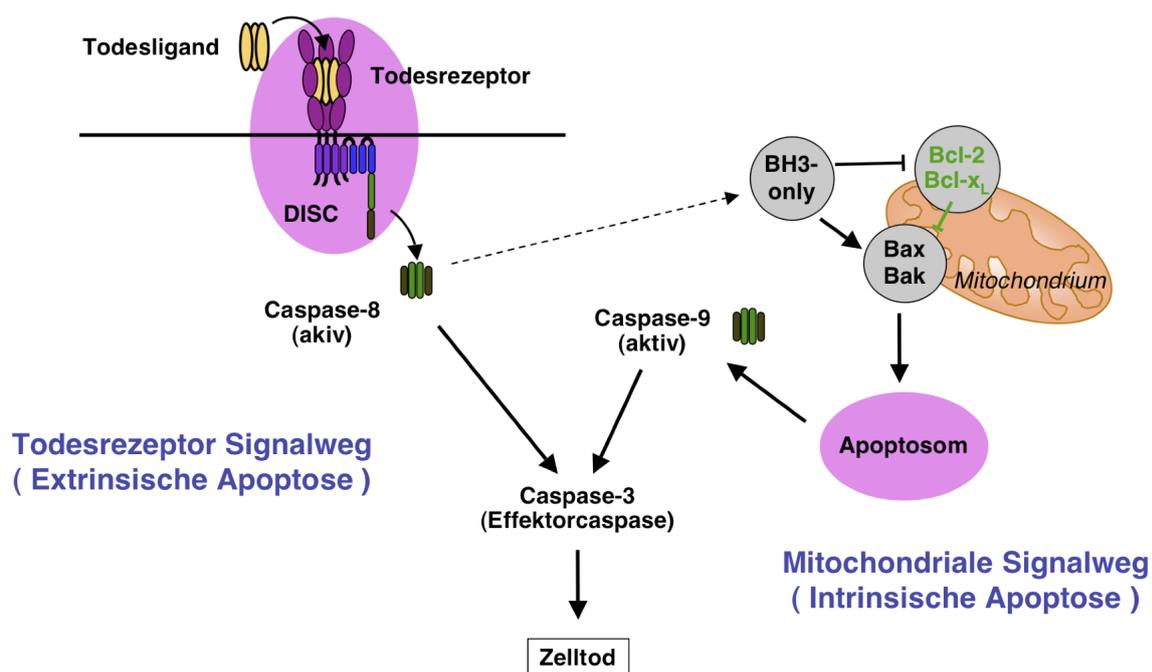
### 1.3 Apoptotische Signalwege

Momentan werden zwei apoptotische Signalwege unterschieden, die aber miteinander in Verbindung stehen. Der intrinsische oder mitochondriale Signalweg wird durch Signale innerhalb der Zelle aktiviert, so z.B. durch oxidativen Stress, schwere DNA Schäden (z.B. durch Bestrahlung oder zytotoxischen Verbindungen), Zytokinentzug oder Verlust der Zelladhäsion (Anoikis) (Bouchier-Hayes et al., 2005). Der extrinsische oder Rezeptorvermittelte Signalweg wird durch Signale außerhalb der Zelle initiiert, z.B. wenn transformierte oder Virus-infizierte Zellen von Effektorzellen des Immunsystems erkannt werden (Fas et al., 2006; Green, 2005; Grossmann, 2002; Kaufmann und Earnshaw, 2000)

Eine wichtige Proteinfamilie von Regulatoren der intrinsischen Apoptose bilden die sogenannten Bcl-2-Proteine. Sie wurde nach dem Onkogen Bcl-2 benannt, welches als Folge einer chromosomalen Translokation in B-Zell-Lymphomen überexprimiert wird (Tsujimoto et al., 1985). Die Unterteilung der Mitglieder der Bcl-2-Familie erfolgt in drei Untergruppen und ist abhängig von ihrer Homologie zu vier konservierten Regionen. Sie werden Bcl-2-Homologiedomäne (BH) 1-4 genannt und bestimmen durch ihre  $\alpha$ -helikale Struktur die Funktion der Proteine. Zu der Gruppe der antiapoptotisch wirkenden Bcl-2-Proteine, welche drei bis vier BH-Domänen besitzen, gehören: Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1, A1, Bcl-W. Sie sind an der zytosolischen Seite von intrazellulären Membranen lokalisiert. Des weiteren gibt es die proapoptotisch wirkenden Bcl-2-Proteine, die sich in zwei Gruppen aufspalten. Einmal in die Multidomänengruppe (*multidomain group*) mit drei BH-Domänen, welche strukturell der antiapoptotischen Gruppe ähnlich sind. Hierzu gehören nur die beiden Proteine Bax (*Bcl-2 associated protein X*) und Bak (*Bcl-2 antagonist killer*). Dann in die *BH3-only*-Gruppe mit den Mitgliedern Bad, Bid, Bim, Noxa, Puma, welche nur eine BH3-Domäne besitzt (Danial und Korsmeyer, 2004; Marsden und Strasser, 2003). Strukturelle Analysen der BH3-Domäne ergaben, dass diese in eine hydrophobe Tasche inserieren kann, die durch die BH1-, BH2- und BH3-Domäne der antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder gebildet wird (Liu et al., 2003; Petros et al., 2000). Hierdurch kann deren antiapoptotisches Potential reprimiert werden, da eine Interaktion mit den beiden proapoptotischen Bax und Bak verhindert wird. Durch anschließende Konformationsänderungen von Bax und Bak sind diese nun in der Lage, Homooligomere zu bilden und Poren in der äußeren Mitochondrienmembran zu formen. Die

Permeabilisation der mitochondrialen Membran führt schließlich zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus dem Intermembranraum, wodurch letztendlich eine Aktivierung des apoptotischen Programms initiiert wird (Chen et al., 2005).

Das zentrale Ereignis im mitochondrialen Apoptoseweg ist die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP, *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation*), die zur Freisetzung proapoptotischer Proteine, wie z.B. Cytochrom c, aus dem mitochondrialen Intermembranraum führt (Liu et al., 1996). Nach Freisetzung aus den Mitochondrien induziert Cytochrom c, welches unter physiologischen Bedingungen eine Komponente der mitochondrialen Elektronentransportkette ist, die Bildung des Apoptosoms. Das Apoptosom ist ein großer Proteinkomplex und besteht im wesentlichen aus Caspase-9, Apaf 1 (*Apoptotic protease activating factor-1*) und Cytochrom c. Das freigesetzte Cytochrom c bindet an Apaf-1, ein zytosolisches Protein, das ein CARD-Motiv und eine Nukleotid-Bindungsstelle aufweist (Zou et al., 1997). Die Bindung von Nukleotiden an den Apaf-1/Cytochrom c-



**Abbildung 2: Der extrinsische und intrinsische Signalweg der Apoptose.** Nach der Induktion des extrinsischen Apoptosesignalweges durch einen Todesrezeptorliganden kommt es zur DISC-Bildung, d.h. zur Rezeptor-Trimerisierung und anschließender Rekrutierung des Adaptermoleküls FADD und der Procaspase-8. Die hierdurch prozessierte Caspase-8 aktiviert dann die Effektorcaspase-3, wodurch Apoptose ausgelöst wird. Alternativ kann der intrinsische Todesweg entweder durch Weiterleitung des Rezeptorsignals über ein *BH3-only*-Protein oder durch mitochondrialen Stress ausgelöst werden. In diesem Fall wird die Oligomerisierung der proapoptotischen Proteine Bax und Bak ausgelöst, die wiederum Poren in der äußeren Mitochondrienmembran induzieren, so dass Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt wird. Durch Komplexbildung von Apaf-1, Cytochrom c und Procaspase 9 entsteht ein heptamerer Proteinkomplex, das Apoptosom, welches zur autokatalytischen Aktivierung dieser Initiatorcaspase führt und über die anschließende Prozessierung von Caspase-3 Apoptose induziert.

Komplex fördert seine Oligomerisierung, wodurch die CARD-Domänen von Apaf-1 zugänglich gemacht wird. An diese CARD-Domänen kommt es zur homotypische Bindung von Procaspase-9, so dass mehrere Procaspase-9-Moleküle zum Komplex rekrutiert werden. Hierdurch wird die Autoaktivierung von Caspase-9 erleichtert (Li *et al.*, 1997). Nur die an das Apoptosom gebundene und somit aktive Caspase-9 ist in der Lage, Effektorcaspasen, wie Caspase-3, effizient durch Spaltung zu aktivieren und damit den nachfolgenden Prozess, der zum Zelltod führt, zu induzieren.

Die Rezeptor-vermittelte Apoptose wird durch Bindung eines Todesliganden (*Death Ligand*) an seinem entsprechenden Todesrezeptor (*Death Receptor*) ausgelöst. Am besten charakterisiert sind CD95/Fas und die TRAIL Rezeptoren 1 und 2. Nach Bindung des spezifischen Liganden erfolgt eine Trimerisierung des Rezeptors, was die Interaktion mit dem zytoplasmatischen Adapterprotein FADD (*Fas-Associated Death Domain*) an der konservierten homologen Todesdomäne (*Death Domain*, DD) begünstigt und die Oligomerisierung von FADD induziert. FADD besitzt eine zweite konservierte Domäne, die Todeseffektordomäne (*Death Effector Domain*, DED), über welche die Initiatorcaspasen-8 und/oder -10 in den Rezeptorkomplex, dem sogenannten Tod-induzierenden Signalkomplex (*Death-Inducing Signaling Complex*, DISC), rekrutiert werden (Peter and Kramer, 2003). Die Bildung des DISC ermöglicht die Aktivierung der Initiatorcaspasen. Der genaue Mechanismus ist noch nicht aufgeklärt. Das *proximity-induced dimerisation* Modell geht davon aus, dass der DISC eine Plattform bietet, welche die Dimerisierung und die räumliche Anordnung für die darauf folgende autokatalytische Prozessierung der Procaspasen ermöglicht (Shi, 2004a; Shi, 2004b). Grundsätzlich sind zwei Prozessierungsschritte für die Aktivierung notwendig. Die stabile Oligomerisierung im DISC ermöglicht zunächst die Prozessierung zwischen der großen und der kleinen Untereinheit und anschließend die autokatalytische Prozessierung zur aktiven Caspase durch Abspaltung der Prodomäne. Caspase-8 ist essentiell für Todesrezeptor-vermittelte Apoptose, was sich u.a. darin zeigt, dass eine Caspase-8-Deletion in Mäusen embryonal letal ist (Varfolomeev *et al.*, 1998).

Eine Verbindung zwischen extrinsischen und intrinsischen Signalweg besteht über das Bcl-2 Protein Bid, das ein Caspase-8 Substrat ist (Li *et al.*, 1998). Bereits geringe Mengen des durch Caspase-8 prozessierten Bid induzieren die Translokation von Bax in die äußere mitochondriale Membran und damit dessen Oligomerisierung, welche zur Aktivierung des mitochondrialen Signalweges und damit zur Amplifikation des Rezeptor-vermittelten

apoptotischen Signals führt. Bezüglich der Bedeutung des mitochondrialen Signalwegs für das Rezeptor-vermittelte apoptotische Signal unterscheidet man sogenannte Typ I und Typ II Zellen. In Typ I Zellen aktiviert das Ligand-Rezeptor-System über den DISC genügend Initiatorcaspasen, um Caspase-3 vollständig zu aktivieren und Zelltod auszulösen. In Typ II Zellen ist die DISC Bildung und dementsprechend die Caspase-8 Aktivierung dafür nicht ausreichend. Zur Weiterleitung und Amplifikation des apoptotischen Signals bedarf es daher der Aktivierung des mitochondrialen Signalweges (Samraj et al., 2006; Scaffidi et al., 1998).

## **2 Autophagie**

### **2.1 Definition der Autophagie**

Das Wort „Autophagie/Autophagozytose“ entstammt dem griechischen und setzt sich aus den Worten „selbst“ („auto“) und „essen“ („phagy“) zusammen. Das Phänomen der „Selbstverdauung“ zytoplasmatischer Anteile zur physiologischen Neuorientierung wurde von Ashford und Porter entdeckt (Ashford und Porter, 1962). Autophagie ist die generelle Bezeichnung für intrazelluläre Prozesse, bei denen zytosolische Komponenten innerhalb der Lysosomen mit Hilfe lysosomaler Enzyme degradiert werden. Das Ergebnis ist immer ein kompletter und irreversibler Abbau des Substrats zu seinen essentiellen Bestandteilen (Proteine zu Aminosäuren, Nukleinsäuren zu Nukleotiden, Lipide zu freie Fettsäuren). Autophagie ist ein evolutionär hochkonservierter Prozess, der in Eukaryoten wie Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*), Schleimpilzen (*Dictyostelium discoideum*), Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*), Nematoden (*Caenorhabditis elegans*), Fliegen (*Drosophila melanogaster*) und Säugern (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Homo sapiens*) erhalten ist (Klionsky, 2007; Levine und Klionsky, 2004; Levine und Kroemer, 2008; Mizushima, 2007). Die Erforschung der molekularen Mechanismen der Autophagie anhand der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus wurde 1992 durch die Forschergruppe um Ohsumi initiiert (Tsukada und Ohsumi, 1993; Wada et al., 1992). Die Entdeckung einer Genfamilie, die von Hefen bis Säugern konserviert ist, zeigt die Bedeutung der Autophagie in Physiologie und Pathophysiologie. Autophagie kann bei Krankheiten sowohl eine schützende als auch eine schädigende Rolle übernehmen. Einerseits wird durch den Abbau intrazellulärer Makromoleküle Energie bereitgestellt, die für die Minimalfunktionen bei Adaptation und Überleben unter extremen Bedingungen benötigt werden. Zusätzlich werden Toxine, Krankheitserreger, reaktive Sauerstoffspezies, veränderte zytosolische Komponenten wie

Proteinaggregate, beschädigte und ungebrauchte Organellen und Proteine abgebaut (Levine und Deretic, 2007; Levine und Kroemer, 2008; Mizushima, 2007). Andererseits kann Autophagie den programmierten Zelltod Typ II induzieren. Eine Dysregulation der Autophagie wird mit der Pathogenese vieler Krankheiten in Zusammenhang gebracht. Meist sind nichtproliferierende Zellen wie Muskelzellen oder Neuronen betroffen, bei denen die Akkumulation beschädigten Materials belastend ist (Maiuri et al., 2007; Mizushima et al., 2008; Thorburn, 2008).

## **2.2 Formen und Rolle der Autophagie**

Generell gibt es zwei Abbausysteme für Proteine in der Zelle: Durch den Ubiquitin Proteasom-Weg werden kurzlebige Proteine selektiv degradiert (Edinger und Thompson, 2003; Kim et al., 2000; Mizushima, 2007), während langlebige Proteine durch die Degradation in den Lysosomen abgebaut werden. Lysosomen sind saure Vesikel, die sich vom Golgi-Apparat abschnüren und mit hydrolysierenden Enzymen angefüllt sind. Der Abbau in den Lysosomen erfolgt über die saure Hydrolyse, weshalb der pH-Wert im Inneren bei einem pH von ca. 5 liegt. Mehr als 90 % der Proteine in der Zelle haben eine lange Halbwertszeit und eine Änderung der Abbaurate dieser langlebigen Proteine kann die Proteinmasse und Proliferationsfähigkeit einer Zelle drastisch verändern. Für langlebige Proteine und Organellen gibt es drei Wege vom Zytoplasma zu den Lysosomen: Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie, wobei der Makroautophagie (auch kurz als Autophagie bezeichnet, siehe Kapitel 2.3) der Großteil der intrazellulären Degradation zukommt (Levine und Klionsky, 2004; Mizushima, 2007).

Bei der Mikroautophagie wird zytoplasmatisches Material (Zytosol, Peroxisomen und sogar Teile des Nukleus) direkt an der Lysosomenoberfläche durch Invagination, Protrusion und/oder Septation aufgenommen. Diese schlauchartigen Einstülpungen schnüren sich ab und setzen intralysosomale Vesikel (autophagische Körper) frei. Lysosomale Hydrolasen degradieren die Vesikel und stellen die Abbauprodukte zur Wiederverwertung zur Verfügung. Die Chaperon-vermittelte Autophagie ist ein direktes und selektives Degradationssystem, bei dem zytoplasmatische Proteinsubstrate aufgrund eines spezifischen Pentapeptid-Signals (KFERQ Sequenzmotiv) von zytoplasmatischen und lysosomalen Co-Chaperonen der Hsc70-Familie erkannt werden. Der Proteinkomplex bindet an einen lysosomalen Rezeptor (Lamp2a, *Lysosomal associated membrane protein 2a*). Das Substrat wird entfaltet, in das

Lysosomenlumen transportiert und mit Hilfe lysosomaler Proteasen abgebaut (Levine und Klionsky, 2004; Mizushima, 2007; Mizushima et al., 2008).

Die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase zählt zur Hauptaufgabe der Autophagie und läuft daher konstitutiv auf basalem Niveau in allen Zelltypen ab. Durch Autophagie werden vor allem beschädigte oder überflüssige Produkte entfernt, wovon sowohl lösliche zytosolische Proteine als auch Organellen, wie Mitochondrien, Peroxisomen, Ribosomen, das endoplasmatische Retikulum oder Bereiche des Zellkerns, betroffen sind. Unter anderem werden hierdurch auch die Zusammensetzung des Zytoplasmas und Größe des endoplasmatischen Retikulums reguliert (Hoyer-Hansen und Jaattela, 2007).

Eine bedeutende Rolle spielt die Autophagie bei der Kontrolle und der Regulation der folgenden Prozesse: (Embryonal)-Entwicklung, Wachstumskontrolle (Proliferation, Änderung des Zellvolumens), Immunabwehr (Antigenpräsentation, Entfernung intrazellulärer Krankheitserreger und toxischer Metabolite), Anpassung an schlechte Umweltbedingungen (Nährstoff-, Sauerstoff- oder Energiemangel, Temperatur, Zelldichte), Alterung und Zelltod (Cuervo et al., 2005; Levine, 2007; Levine und Deretic, 2007; Maiuri et al., 2007; Mizushima et al., 2008; Thorburn, 2008). Folglich kann die Fehlregulation der Autophagie zu schweren Krankheiten wie verschiedenen Arten von Tumoren, neurodegenerativen Krankheiten, Kardiomyopathien und muskulären Atrophien führen (Levine und Kroemer, 2008; Mizushima et al., 2008).

### **2.3 Die Regulation der Autophagie**

Die Entdeckung der sogenannten Autophagie-bezogenen Gene (ATG-Gene; *autophagy related-genes*) (Tsukada und Ohsumi, 1993) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* trug wesentlich zum Verständnis der molekularen Kontrolle der Autophagie bei. Die Phasen Initiation, Elongation (Bildung des Autophagosoms) und Maturation (Abbau des autophagischen Körpers) kennzeichnen den Ablauf der Autophagie (Abbildung 3). Die Initiation wird sowohl über den Entwicklungsstatus der Zelle als auch über das Nährstoffangebot reguliert. mTor (*mammalian target of rapamycin*) ist eine Serin/Threonin-Kinase, die eine zentrale Rolle bei der Regulation der Autophagie spielt, weil sie als der Hauptsensor des Nährstoffangebotes in der Zelle gilt. Sie wurde zuerst als molekulares Angriffsziel des Antibiotikums Rapamycin identifiziert. mTor inhibiert im aktiven Zustand die Induktion von Autophagie (Fingar und Blenis, 2004). Unter physiologischen Bedingungen

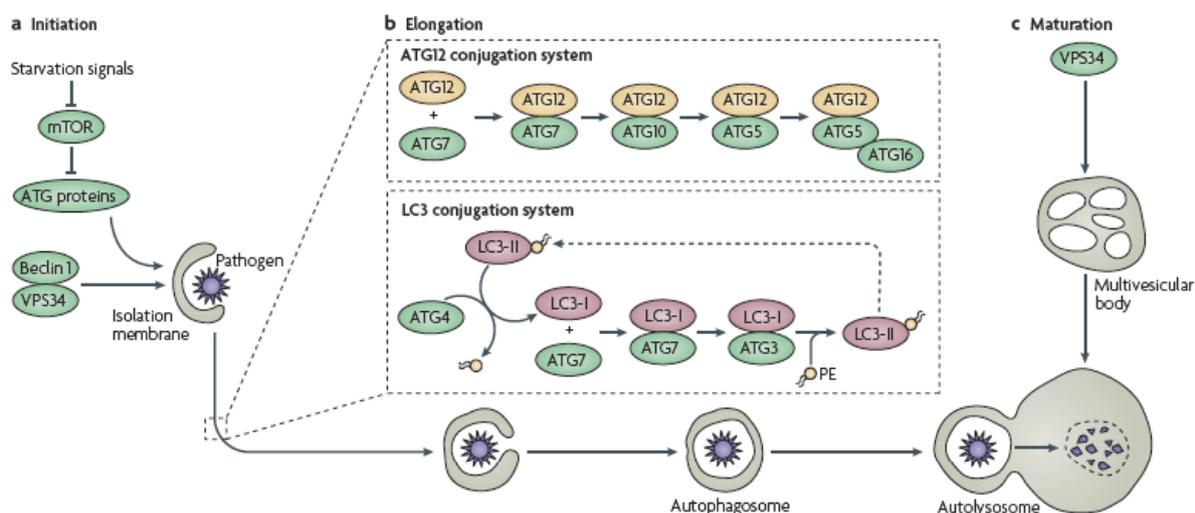
führt z.B. Nährstoffmangel oder osmotischer Stress zur natürlichen Inhibition des mTor-Signalweges und zur Induktion von Autophagie. Dies führt zu einer Aktivierung von ATG1 oder zur Bildung eines Komplexes aus Beclin1/ATG6 und VPS34 (einer Phosphoinositol-3-Kinase), welcher dann nachgelagerte ATG-Proteine aktivieren kann. Die Bildung des frühen Autophagosoms beginnt mit einer als Isolationsmembran bezeichneten Doppelmembran, welche auch *phagophore assembly site* (PAS) genannt wird, die durch die Elongation einen Teil des zytoplasmatischen Materials einschließt. Die Expansion dieser pre-autophagosomalen Membran wird von Signalmolekülen wie GTPasen ( $Ga_{13p}$ , Ypt7p), PI3-Kinasen (TORp, ATG1) und Phosphatasen (PP2Ap) und über die Aktivität autophagischer Gene kontrolliert (Dunn, 1990a; Fengsrud et al., 1995; Petiot et al., 2002).

Für die Elongation und Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom werden einige Komponenten des sekretorischen und endozytotischen Transportsystems benötigt. Dies sind unter anderem die Rab-Proteine und SNAREs. Durch die anschließende vakuoläre Ansäuerung mittels Protonen-ATPase wird das frühe Autophagosom zu einem späten Autophagosom transformiert. Die Fusion mit bereits existierenden Lysosomen oder späten Endosomen stellt die lysosomalen Hydrolasen zum Abbau des Vakuoleninhalts bereit. In diesem finalen Stadium wird der Vesikel Autophagolysosom oder Autolysosom genannt (Dunn, 1990b; Mizushima, 2007; Petiot et al., 2000). Nach der Fusion mit dem Lysosom wird die äußere Membran des Autophagosoms in die Lysosomenmembran inkorporiert. Die nunmehr einfache innere Membran, der sog. autophagosomale Körper, wird in das Lysosomenlumen freigesetzt und mit Hilfe von Proteinase A (Pep4p) und B (Prb1p), ATG22 und den Lipasen Cvt17p und ATG15 abgebaut (Levine und Klionsky, 2004; Luzio et al., 2007; Mizushima, 2007).

Zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme sind an der Elongation beteiligt. Im ersten Konjugationssystem (ATG12-ATG5-System) wird ATG12 mit ATG5 konjugiert: Der C-terminale Glycinrest von ATG12 wird durch das E1-Ubiquitin-Aktivierungsenzym ATG7 mittels ATP-Hydrolyse durch Adenylierung aktiviert. ATG12 geht über eine Thioesterbrücke eine Verbindung mit ATG7 ein und wird dann auf das E2-Ubiquitin-Konjugationssystem ATG10 transferiert, die Verbindung wird ebenfalls durch eine Thioesterbrücke hergestellt. Durch die Entstehung dieses Intermediats wird erst die Konjugation von ATG12 an einen Lysinrest von ATG5 mittels einer Isopeptidbrücke ermöglicht. Das ATG12-ATG5-Konjugat

formt einen nicht-kovalenten Proteinkomplex mit ATG16 an der Außenseite des entstehenden Autophagosoms. Es bilden sich meist ATG12-ATG5-ATG16-Komplexe von hetero-oktamerer Struktur. Die Bildung des ATG12-ATG5-Konjugats ist für die Elongation der Isolationsmembran zuständig und führt zur C-terminalen Proteinacylierung von LC3/ATG8 zum LC3-PE, das im folgendem näher erläutert wird (Codogno und Meijer, 2006; Levine und Deretic, 2007; Maiuri et al., 2007; Matsushita et al., 2007; Mizushima, 2007).

Im zweiten Konjugationssystem (LC3-System) wird LC3 mit dem Phospholipid Phosphatidylethanolamin (PE) konjugiert. Erst wird der C-Terminus von LC3 durch die Cystein-Protease ATG4 abgespalten, um einen Glycinrest zu exponieren. Dieses G116 wird durch das E1-Ubiquitin-Aktivierungsenzym ATG7 mittels ATP-Hydrolyse durch Adenylierung aktiviert, anschließend wird LC3 über eine Thioesterbrücke mit ATG7 konjugiert. LC3 wird dann auf das E2-Ubiquitin-Konjugationssystem ATG3 transferiert, wobei die Verbindung ebenfalls durch eine Thioesterbrücke hergestellt wird. Schließlich wird LC3 über eine Amidbrücke an die Aminogruppe von Phosphatidylethanolamin (PE) gebunden. Dieser LC3-PE Komplex lokalisiert über den Lipidteil an der



**Abbildung 3: Molekularer Ablauf der Autophagie (nach Levine und Deretic, 2007).** (A) Die Initiation der Autophagie wird z.B. durch Nährstoffmangel induziert. Dies führt zur Inhibition von mTOR und zur Aktivierung verschiedener ATG-Gene, die die Entstehung des Autophagosoms an der Isolationsmembran herbeiführen. (B) Die Elongationsphase ist gekennzeichnet durch die Aktivität der beiden Konjugationssysteme LC3 und ATG5-ATG12. Durch die kovalente Bindung von ATG5 an ATG12 und die anschließende Oligomerisierung durch ATG16 entsteht ein hochmolekularer Komplex, der für die Proteinacylierung von LC3 zu LC3-II-PE verantwortlich ist. LC3-II-PE bindet nun an der Isolationsmembran und ist essentiell für den Aufbau des Autophagosoms. (C) In der finalen Phase, der Maturation, kommt es zur Fusion des Autophagosoms mit einem Lysosom zum Autolysosom. Der Inhalt des Autolysosoms wird durch die lysosomalen Hydrolasen degradiert.

Autophagosomenmembran und vermittelt die Membranelongation. Später wird LC3 durch ATG4 von dem Phospholipidanker dekonjugiert. Der Zyklus von Konjugation und Dekonjugation ist für die normale Progression der Autophagie wichtig. Sowohl das LC3-System als auch der ATG12-ATG5-Komplex sind essentiell für die Autophagie. Da LC3 mit Mikrotubuli interagiert, wird vermutet, dass das LC3-PE-Konjugat beim Transport des Autophagosoms zum Lysosom über das Zusammenspiel mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett mitwirkt (Mizushima, 2007; Nakatogawa et al., 2007).

### **3     Immunsystem**

Das Immunsystem ist für den Organismus von zentraler Bedeutung, da es die Aufgabe hat, ihn vor pathogenen Mikroorganismen zu schützen. Neben der Abwehr exogener Krankheitserreger ist die Erkennung und Zerstörung entarteter körpereigener Zellen die zweite Hauptaufgabe des Immunsystems (Chen et al., 1993). Dabei besteht seine essentielle Leistung in der Unterscheidung zwischen körpereigenen Strukturen, die toleriert werden, und körperfremden Strukturen, die als gefährlich erkannt werden und eine Immunantwort einleiten. Die Grundlagen dafür, dass z.B. die T-Zellen nicht eigene Körperzellen angreifen, werden bei der negativen Selektion im Thymus gelegt. Hierbei spielt die Apoptose und deren Regulation bei der Eliminierung dieser potentiellen autoreaktiven und auch nutzlosen Immunzellen die Hauptrolle.

#### **3.1    Immunologische Toleranz**

Die Antigenrezeptoren der T-Zellen können eine große Diversität an Antigenen spezifisch erkennen. Ein Individuum kann schätzungsweise zwischen  $10^7$  und  $10^9$  unterschiedliche antigene Determinanten ausbilden. Dies wird durch die kombinatorische Vielfalt der Gensegmente, welche für die Antigenrezeptoren kodieren, sowie durch das zufällige Einfügen von Nukleotiden an den Verbindungen der einzelnen Segmente erreicht (Davis und Bjorkman, 1988). Das dadurch theoretisch mögliche Repertoire umfasst für T-Zellen etwa  $10^{15}$  mögliche spezifische Rezeptoren. Dieses Rezeptor-Repertoire kann jedoch nicht nur pathogene, sondern auch körpereigene Antigene erkennen. Daher ist es für das Immunsystem essentiell, dass der T-Zellrezeptor auf seine Fähigkeit zur Interaktion mit MHC-Molekülen (positive Selektion) und auf die Erkennung von Autoantigenen (negative Selektion) überprüft wird (Starr et al., 2003). So kann Toleranz gegen körpereigene Antigene sichergestellt werden. Der Erwerb der Toleranz im Thymus wird auch als zentrale Toleranz bezeichnet und

wird vor allem durch die klonale Deletion der autoreaktiver T-Zellen erreicht (Starr et al., 2003). Hierbei werden diese Zellen mittels Apoptose während der negativen Selektion eliminiert (siehe Kapitel 3.4).

Obwohl nur etwa 2% der ursprünglich vorhandenen T-Zellen den Thymus als reife T-Zellen verlassen, enthält diese T-Zellpopulation noch Zellen, die eine Affinität für Autoantigene besitzen und damit potentiell autoreaktiv sind (Bouneaud et al. 2000). Um eine Aktivierung dieser Zellen in der Peripherie zu verhindern, existieren mehrere Mechanismen, T-Zellen auch nach dem Verlassen des Thymus zu inaktivieren oder zu eliminieren. Diese werden unter dem Begriff der peripheren Toleranz zusammengefasst. Einer dieser Mechanismen ist die Anergie. Hierbei erkennen einige T-Zellen ihr Antigen auf der Oberfläche körpereigener Zellen ohne Kostimulation. Ein Signal über den T-Zellrezeptor ohne Kostimulation führt in diesem Fall zu einer Inaktivierung (Greenwald et al., 2005; Macian et al., 2004). Dieser Mechanismus betrifft sowohl CD4 als auch CD8 T-Zellen. Zusätzlich werden autoreaktive Klone durch klonale Deletion in der Peripherie durch den aktivierungs-induzierten Zelltod (*activation-induced cell death*, AICD) eliminiert. Speziell CD4-T-Zellen sind für den AICD über die Ligation des Fas-Rezeptors empfänglich (Krammer et al., 2007).

Ein weiterer Mechanismus hält die Toleranz gegenüber intrazellulären Antigenen aufrecht. Jeden Tag sterben im Zuge der Gewebekomöostase körpereigene Zellen und werden von umliegenden Zellen und professionellen Phagozyten aufgenommen, ohne diese zu aktivieren. Huang et al. (2000) konnten zeigen, dass diese Zellen zum Lymphknoten wandern und dort zirkulierenden T-Zellen Selbstantigene aus den apoptotischen Zellen präsentieren (Huang et al., 2000). T-Zellen, die ihr spezifisches Antigen in diesem Kontext binden, verlieren ihre Effektorfunktion durch Inaktivierung. Von diesem Mechanismus der Toleranzinduktion sind in erster Instanz CD4 T-Zellen betroffen, die ihr Antigen über MHC-II der dendritischen Zelle erkennen. Über Kreuz-Präsentation können Peptide jedoch an MHC-I Moleküle gelangen und auf diesem Weg auch bei CD8 T-Zellen Toleranz erzeugen. Ob Toleranz ausgelöst wird, hängt vom Aktivierungszustand der dendritischen Zelle ab. Denn nur die T-Zellen die ihr Antigen auf ruhenden dendritischen Zellen erkennen werden ausgeschaltet (Albert et al., 2001; Kurts et al., 1997; Lutz und Schuler, 2002).

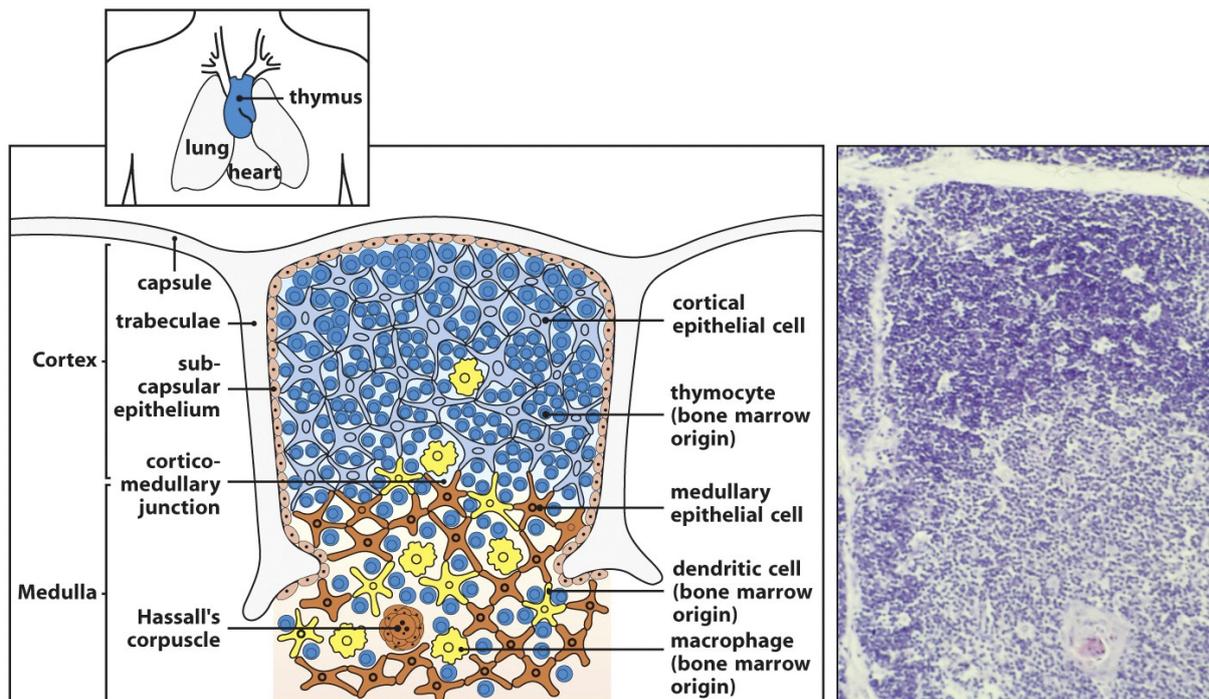
Neben den Mechanismen der peripheren Toleranz, die darauf abzielen, autoreaktive T-Zellen bereits vor ihrer Aktivierung unschädlich zu machen, besteht die Möglichkeit, autoreaktiven

T-Zellen auch nach ihrer Aktivierung abzuschalten und einen Angriff auf eigenes Gewebe zu verhindern. Dies ist die Aufgabe der Suppressor-T-Zellen oder regulatorischen T-Zellen (Liston und Rudensky, 2007).

### 3.2 Der Thymus als Ort der T-Zellreifung

T-Zellen leiten sich von den hämatopoetischen Stammzellen (HSC) aus dem Knochenmark ab. Aus den HSC entstehen die beiden liniendeterminierten oligopotenten Vorläuferzellen der lymphatischen (CLP, engl. „*common lymphoid progenitor*“) und der myeloiden Reihe (CMP, engl. „*common myeloid progenitor*“) (Akashi et al., 2000; Kondo et al., 1997). Die myeloide Vorläuferzelle ist die Vorstufe der Granulozyten, Makrophagen, Megakaryozyten und der Erythrozyten. Die Population der CLP ist ausschließlich befähigt Pro-T, Pro-B und NK-Zellen auszubilden. Die Vorläuferzellen der T-Zellen verlassen das Knochenmark und wandern zur Reifung in den Thymus, weshalb die sich aus diesen Zellen entwickelnden Lymphozyten als thymusabhängige T-Zellen oder Thymozyten bezeichnet werden. Die frühen T-Vorläuferzellen unterziehen sich einer Vielzahl geordneter Proliferations- und Differenzierungsschritte innerhalb des Thymus. Die reifen T-Zellen verlassen den Thymus um in die peripheren lymphatischen Organe einzutreten und dort Effektorfunktionen auszuführen.

Der Thymus liegt im oberen Brustbereich direkt über dem Herzen und ist bereits vor der Geburt voll entwickelt. Er besteht aus Lappen (Lobuli), die in zwei Kompartimente gegliedert sind; nämlich in eine helle Region, das Thymusmark (Medulla), und die die Medulla umgebende kerndichte, kortikale Region, den sog. Thymuskortex. Sich entwickelnde unreife T-Vorläuferzellen sind in ein epitheliales Netzwerk eingebettet, dem Thymusstroma. Dieser Zellkontakt zwischen sich differenzierenden, unreifen Thymozyten und den kortikalen, epithelialen Stroma- sowie den dendritischen Zellen des Thymus am Kortex-Medulla-Übergang ist von entscheidender Bedeutung für den Reifungsprozess der T-Zellen (Shores et al., 1991; van Ewijk, 1991). Hingegen findet man die reifen Thymozyten angehäuft mit weiteren dendritischen Zellen und Makrophagen in der Medulla. Welche funktionelle Bedeutung dieser gegliederte Aufbau des Thymus für die Immunität hat, konnte sowohl durch Patienten mit dem DiGeorge-Syndrom als auch durch Experimente am Mausmodell gezeigt werden (Blackburn et al., 1996; Di George et al., 1967; Pantelouris, 1971). In beiden Fällen sind die betroffenen Individuen aufgrund des Fehlens eines funktionellen Thymusepithels

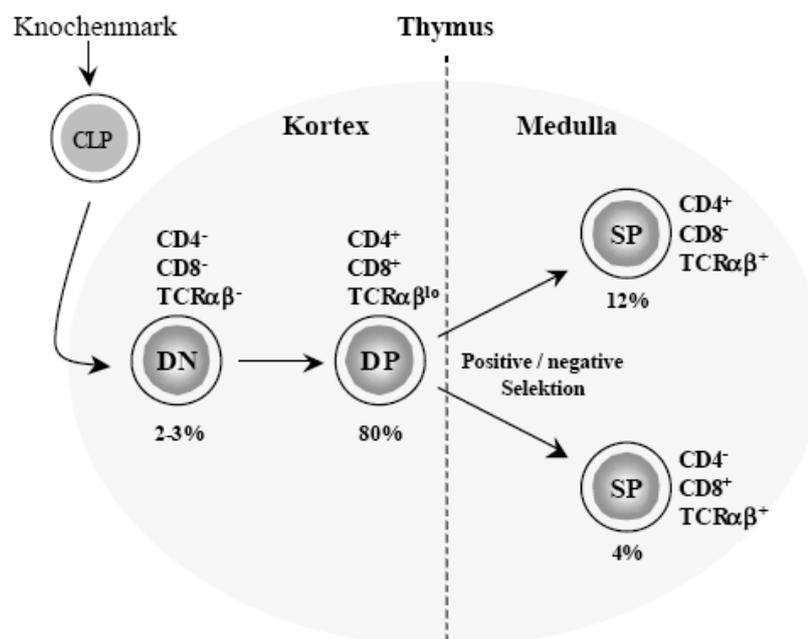


**Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Thymus (aus Janeway, Immunobiology, 7. Edition 2008).** Weitere Erläuterungen siehe Text.

nicht fähig, T-Zellen zu produzieren.

### 3.3 Stadien der T-Zelldifferenzierung im Thymus

Im Verlauf der Thymozyten-Entwicklung ist es möglich, die verschiedenen Differenzierungsstadien anhand der charakteristischen Expression von Oberflächenmolekülen zu definieren. Dabei spiegelt z.B. das Auftreten des pre-TCR, des TCR, der Korezeptoren CD4 und CD8 und des CD3-Komplexes sowie anderer Zelloberflächenmoleküle diskrete Phasen der funktionellen T-Zellreifung wider (Fehling und von Boehmer, 1997). Die Hauptklassifizierung der unreifen und reifen Thymozyten wird aufgrund der Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD8 vorgenommen. Diese Moleküle sind Korezeptoren des TCR und hilfreich bei der Unterscheidung der reifen T-Zellen in  $CD4^+$ -T-Helferzellen bzw.  $CD8^+$ -zytotoxische T-Zellen (Fehling und von Boehmer, 1997; Kisielow und von Boehmer, 1995). Thymozyten sind bezüglich CD4 und CD8 entweder doppeltnegativ (DN,  $CD4^-CD8^-$ ), doppeltpositiv (DP,  $CD4^+CD8^+$ ) oder einzelpositiv (SP,  $CD4^+$  oder  $CD8^+$ ) (Sebzda et al., 1999). Somit ergibt sich eine grobe Einteilung der Thymozyten in vier Populationen, die in Abbildung 5 schematisch zusammengefasst ist.



**Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung der Thymozyten-Populationen im Thymus.** T-Zellen leiten sich von dem gemeinsamen lymphatischen Vorläufer CLP aus dem Knochenmark ab. Die CD4- und CD8-Oberflächenmoleküle werden gemeinhin als Marker verwendet, um die Hauptklassen von Thymozyten einzuteilen, und um den Ablauf der Thymozyten-Reifung zu bestimmen („+“ bedeutet Expression, „-“ fehlende Expression und „lo“ niedrige Expression) (modifiziert nach Abbas et al., 1996).

### 3.4 Negative und positive Selektion im Thymus

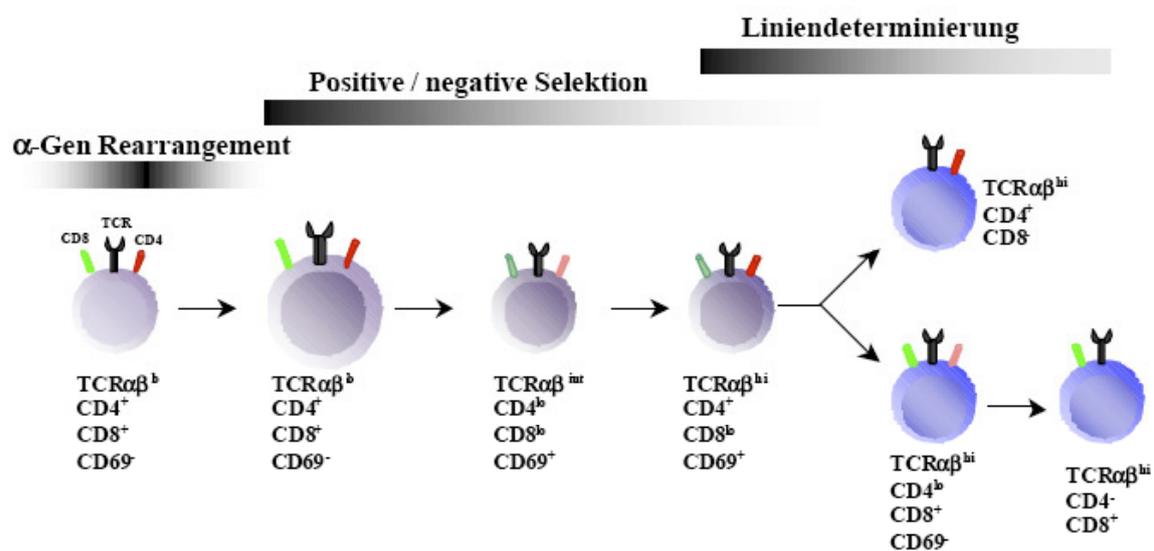
Wie weiter oben schon erwähnt, durchlaufen T-Zellen verschiedene Stadien, die durch die Expression bestimmter Oberflächenantigene gekennzeichnet sind. Im Thymuskortex beginnen die eingewanderten Zellen mit der Rekombination der TCR $\beta$ -Kette. Die Zellen, die gerade die  $\beta$ -Kette rekombinieren, werden Pro-T-Zellen genannt und befinden sich im doppel negativem (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) Stadium (DN) (Palmer, 2003). Die erfolgreich rekombinierte  $\beta$ -Kette wird zusammen mit einer Surrogat pre-T $\alpha$ -Kette im Komplex mit CD3 und der  $\zeta$ -Kette an der Zelloberfläche exprimiert. Die Expression dieses pre-T $\alpha$ -TCR $\beta$ -Komplexes führt zur Inhibition einer weiteren Rekombination des TCR $\beta$ -Lokus auf beiden Chromosomen, dieser Vorgang wird allele Exklusion genannt (Starr et al., 2003). Daraufhin proliferieren die Thymozyten und exprimieren CD4 und CD8. Die Zellen werden dann doppel positive Thymozyten (DP) genannt. In den DP-Zellen startet die Rekombination der TCR $\alpha$ -Kette und erfolgreich rekombinierte TCR $\alpha$ -Ketten werden zusammen mit der TCR $\beta$ -Kette auf der Zelloberfläche exprimiert. Da es für die  $\alpha$ -Kette jedoch keine allele Exklusion gibt, gibt es weitere Rekombinationen, bis die Zelle positiv selektioniert ist. Dies führt dazu, dass ca. 30%

der peripheren T-Zellen zwei unterschiedliche TCR $\alpha$ -Ketten exprimieren (Padovan et al., 1993). DP Zellen, die sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -TCR-Kette exprimieren, unterliegen den Prozessen der positiven und negativen Selektion. Nur etwa 3% der generierten DP-Zellen überleben diese beiden Prozesse (Werlen et al., 2003).

Nach erfolgreicher Rekombination und Expression der  $\alpha$ - als auch der  $\beta$ -TCR-Kette werden zwei Dinge überprüft: Erstens, alle DP-Zellen, die keine eigenen MHC-Peptid-Komplexe erkennen, werden nicht gerettet und sterben durch Apoptose (*Death by neglect*). Zweitens darf die Affinität zum eigenen MHC nicht zu hoch sein, damit die periphere T-Zelle nicht durch eigenes MHC alleine oder durch eigene Peptid-gebundene MHCs aktiviert und so zur autoreaktiven T-Zelle wird (Kappler et al., 1987). Diese potentiell autoreaktiven T-Zellen werden durch klonale Deletion eliminiert. Dieser Prozess wird negative Selektion genannt.

Die den Prozess der negativen Selektion überlebenden naiven T-Zellen unterliegen nun der positiven Selektion, um die Funktionsfähigkeit der reifen T-Zelle sicherzustellen. Der TCR der reifen T-Zelle muss einerseits eines oder mehrere der eigenen MHC-Moleküle erkennen können, um positiv selektioniert werden zu können. Dies ist notwendig, damit später fremde Peptide im Komplex mit eigenem MHC erkannt werden können (*MHC-Restriktion*) (Zinkernagel und Doherty, 1974). Im Zuge der positiven Selektion wird einer der Corezeptoren, CD8 oder CD4, herunterreguliert, so dass reife T-Zellen entweder nur CD4 oder nur CD8 exprimieren (Liniendeterminierung). Thymozyten, die Peptide im Kontext mit MHC I erkennen, behalten CD8; Thymozyten, die Peptid-MHC II Komplexe erkennen, exprimieren CD4. Somit verlassen vorwiegend reife CD8<sup>+</sup>- bzw. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit einer Spezifität für antigene Peptide fremden Ursprungs den Thymus. Die Gesamtzahl der Spezifitäten des T-Zellrepertoires innerhalb eines Individuums wird hierbei auf ca.  $10^{15}$  geschätzt (Casrouge et al., 2000; Davis und Bjorkman, 1988).

Die Mechanismen der Apoptose bei der negativen Selektion sind nur unzureichend aufgeklärt (Sohn et al., 2007). So wird die Rolle von Bcl-2 und CD95 (Fas/Apo1) kontrovers diskutiert (Chao und Korsmeyer, 1998; Mouliau und Berrih-Aknin, 1998). Ebenso gibt es widersprüchliche Berichte über die Rolle von Apaf-1 bei der negativen Selektion (Hara et al., 2002; Matsuki et al., 2002). Dagegen konnte eindeutig gezeigt werden, dass der Steroidrezeptor Nur77 (Calnan et al., 1995b; Zhou et al., 1996), das proapoptotische Bcl-2-Familienmitglied Bim (Bouillet et al., 2002), der NF- $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ BNS (Fiorini et al., 2002), die Kinase MINK (McCarty et al., 2005) und Caspasen (Alam et al., 1997; Clayton et al., 1997; Izquierdo et al., 1999) wesentlich zur negativen Selektion beitragen. DNA-Chip-Analysen zeigten, dass neben diesen genannten Genen noch Hunderte anderer Gene differentiell exprimiert werden, wenn negative Selektion in TCR-transgenen Mäusen ausgelöst wird (Baldwin und Hogquist, 2007; DeRyckere et al., 2003; Kasler und Verdin, 2007; Schmitz et al., 2003). Dies deutet darauf hin, dass noch weitere Gene essentiell für den komplexen Prozess der negativen Selektion sind. Eine funktionelle Charakterisierung dieser Gene in Thymozyten steht aber noch aus.



**Abbildung 6: Entwicklungsprozesse während den DP- und SP-Stadien.** Die jeweiligen Thymozyten-Populationen werden eingeteilt nach graduellen Unterschieden in der Expression der Oberflächenmarker TCR $\alpha\beta$ , CD4, CD8 und CD69. Durch die dargestellten Balken werden die Populationen den bestimmten Entwicklungsprozessen zugeordnet (Abbildung modifiziert nach (Moroy und Karsunky, 2000).

## 4 Gadd45 $\beta$

### 4.1 Die Gadd45-Proteinfamilie

Gadd45 $\beta$  (*growth arrest and DNA-damage inducible gene*) gehört zu einer Familie von drei Genen: Gadd45 $\alpha$ /Gadd45, Gadd45 $\beta$ /Myd118 und Gadd45 $\gamma$ /CR6 (Takekawa und Saito, 1998; Zhan et al., 1999; Zhan et al., 1994). Die Gene dieser Familie kodieren kleine (18 kDa) und saure Proteine (pI 4,0-4,2), die sowohl im Zellkern als auch im Zytosol lokalisiert sind. Sie sind evolutionär stark konservierte Proteine und weisen große Sequenzhomologie innerhalb der Familiemitglieder auf (55% bis 57% identisch) (Hoffman und Liebermann, 2007; Liebermann und Hoffman, 2007; Zhan et al., 1994). Die Gadd45-Proteine fungieren als Stresssensoren in den unterschiedlichsten physiologischen Zusammenhängen. Sie werden von genotoxischen Reagenzien, Zytokinen und DNA-schädigenden Einwirkungen, wie z.B. UV-Bestrahlung, induziert. Wichtig sind sie für die Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und angeborener Immunität (Hoffman und Liebermann, 2007; Liebermann und Hoffman, 2007). Hierbei spielen diese Proteine ähnliche, aber nicht identische Rollen. Z.B. wird Gadd45 $\beta$ , aber nicht Gadd45 $\alpha$  während der TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) vermittelten Apoptose induziert (Selvakumaran et al., 1994; Ungefroren et al., 2005; Yoo et al., 2003). Andererseits wurde Gadd45 $\alpha$ , nicht aber Gadd45 $\beta$  oder Gadd45 $\gamma$  als Zielgen von p53 identifiziert (Jackson und Pereira-Smith, 2006; Liebermann und Hoffman, 2007; Schneider-Stock et al., 2005). Des Weiteren werden alle drei Gene während der terminalen hämatopoetischen Differenzierung induziert (Liebermann und Hoffman, 2007; Takekawa und Saito, 1998; Zhang et al., 2001). Doch wie die individuelle Funktionsweise dieser Proteine sich zueinander oder andere Proteine beeinflussen, ist noch unklar und muss in Zukunft untersucht werden.

### 4.2 Interaktionspartner von Gadd45 $\beta$ , die Zellzyklusregulatoren

Gadd45 $\beta$  spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellteilungszyklus (Vairapandi et al., 2002). In diesem Zusammenhang konnte die Interaktion von Gadd45 $\beta$  mit cdc2/cdk1 (Cyclin-abhängige Kinase) gezeigt werden. Der cdc2/CyclinB1-Komplex ist als ein Schlüsselregulator für den Übergang von der G2- in die M-Phase bekannt (Elledge, 1996). Die Bindung von Gadd45 $\beta$  an cdc2 inhibiert dessen Kinaseaktivität, was eine Zellteilungsarretierung in der G2/M-Phase zur Folge hat (Jin et al., 2000; Yang et al., 2000; Zhan et al., 1999).

Alle drei Proteine der Gadd45-Familie interagieren mit p21, einem universellen Cdk-Inhibitor und ein Zielgen von p53 (Harper et al., 1993; Jackson und Pereira-Smith, 2006; Xiong et al., 1993; Zhang et al., 1993). In einer Studie (Dong et al., 2005) konnte ein neuer Caspasen-unabhängiger Signalweg der Apoptose gezeigt werden, der offensichtlich über eine Interaktion von Gadd45 $\alpha$  mit p21 vermittelt wird. Weiterhin ist eine Interaktion mit dem Kernprotein PCNA bekannt, welches ein zentraler Regulator der DNA-Reparatur und -Replikation ist (Vairapandi et al., 2000). Die physiologische Bedeutung dieser Interaktionen konnte noch nicht gezeigt werden, aber zumindest für Gadd45 $\alpha$  deutet sich auch hier eine Einflussnahme in den Zellzyklus und in den Ablauf der Apoptose an. Denn es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Gadd45 $\alpha$  und PCNA eine Rolle bei der *nucleotide excision repair* von DNA spielt (Azam et al., 2001; Liebermann und Hoffman, 2007; Maga und Hubscher, 2003; Smith et al., 2000; Vairapandi et al., 2000).

### 4.3 Interaktionspartner von Gadd45 $\beta$ , die MAP-Kinasen

Neben den Zellzyklusregulatoren wurde Gadd45 $\beta$  auch als ein Interaktionspartner von MEKK4 (Takekawa und Saito, 1998), MKK4 (Gupta et al., 2006a) und MKK7 (De Smaele et al., 2001) gefunden. Diese Proteine gehören zu den Mitogen-aktivierenden Proteinkinasen (MAP-Kinase, *mitogen-activated protein kinase*). Sie sind Komponenten des sogenannten MAP-Kinase-Signalwegs einer Signalkaskade, die in ihrer Struktur und Organisation evolutionär hoch konserviert ist (Hagemann und Blank, 2001). Das besondere dieser Kaskade ist, dass sie mindestens aus drei hintereinander geschalteten MAP-Kinasen besteht: Die *mitogen-activated protein kinase kinase kinase* (MAPKKK/MAP-3K), die *mitogen-activated protein kinase kinase* (MAPKK/MAP-2K) und die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Die MAPKKK ist eine Serin-Threonin-Kinase, welche von einem membrangängigen Rezeptor ein Signal erhält und durch Phosphorylierung ihr Substrat, die MAPKK, aktiviert. Die MAPKK ist eine Kinase mit zweifacher Spezifität, die ihr MAPK-Substrat durch Phosphorylierung an Tyrosin und Threonin aktiviert. MAPKs sind eine Familie von Serin-Threonin-spezifischen Kinasen, welche einerseits zytoplasmatische Proteine über Phosphorylierung aktivieren und andererseits in den Zellkern translozieren können. Im Zellkern kann die MAPK unter anderem die Kontrolle über die Genexpression durch die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren übernehmen (Hagemann und Blank, 2001).

Zwei wichtige Vertreter der MAPKs sind p38 und JNK, die vielfältige Prozesse in der Zelle beeinflussen. Zum Beispiel führt zellulärer Stress (z.B. UV-Bestrahlung, Hyperosmolarität, oxidativer Stress) oder Signaltransduktion durch Zytokine (z.B. IL-1, TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) zur Aktivierung von p38 oder JNK, was Apoptose zur Folge haben kann (Chang und Karin, 2001; Chen et al., 2001; Johnson und Lapadat, 2002). Die direkten Aktivatoren von p38 sind die MAP-2Ks MKK3 bzw. MKK6, während JNK entweder über die MAP-2Ks MKK4 oder die MKK7 phosphoryliert wird. Im Gegensatz dazu können p38 und JNK durch dieselben MAP-3Ks induziert werden, weil die MAP-3Ks in der Lage sind, sowohl die Aktivatoren von JNK als auch die von p38 zu aktivieren (Chang und Karin, 2001). Man geht aber davon aus, dass die verschiedenen MAP-3Ks individuell durch unterschiedliche Stimuli induziert werden. Hierbei kommt es zu einer gezielten und gerichteten Aktivierung von bestimmten MAP-2Ks, die im Kontext des jeweiligen Stimulus steht (Chang und Karin, 2001; Dhanasekaran et al., 2007; Hagemann und Blank, 2001). Hierbei spielen die sogenannten Gerüstproteine (*scaffold proteins*) eine entscheidende Rolle. Die Gerüstproteine verknüpfen die MAP-3K, MAP-2K und die MAPK zu einem Multienzymkomplex und bringen so spezifisch die Komponenten der Signalkaskade in räumliche Nähe, so dass es nur zur Aktivierung der sich in dem Komplex befindlichen MAP-Ks kommt (Dhanasekaran et al., 2007). Eine weitere Variante der spezifischen Aktivierung von bestimmten MAP-Ks über die MAP-3Ks konnte durch die Bestimmung einer speziellen Bindungsdomäne der MAP-2Ks gezeigt werden. Diese Bindungsstellen werden DVD (*domain for versatile docking*) genannt und bestehen aus einem Sequenzabschnitt von ca. 20 Aminosäuren, welches die spezifische Bindung der MAP-2Ks an die MAPK-3K induziert. Hierbei determiniert die DVD Bindungsdomäne die Bindung an nur eine bestimmte MAP-3K (Bardwell, 2006; Takekawa et al., 2005).

Eine JNK- und p38-aktivierende MAP-3K ist MEKK4, die über MKK6/MKK3/MKK4 p38 und JNK aktivieren kann (Gerwins et al., 1997; Hagemann und Blank, 2001; Takekawa et al., 1997). MEKK4 wurde als Interaktionspartner von Gadd45 $\beta$  durch einen *Yeast-Two-Hybrid screen* identifiziert (Takekawa und Saito, 1998). Gadd45 $\beta$  fungiert als ein spezifischer Aktivator von MEKK4, indem es MEKK4 durch die Interaktion in seine aktive Form überführt (Mita et al., 2002; Miyake et al., 2007). MEKK4 besitzt eine C-terminale Kinasedomäne, über die die Bindung an seine Substrate MKK3/MKK6 erfolgt. Die Bindung von MEKK4 an MKK 3/6 wird über die DVD von MKK3/6 spezifisch vermittelt (Takekawa et al., 2005). In seiner inaktiven Form verhindert eine N-terminale autoinhibitorische Domäne von MEKK4 die Bindung und Aktivierung seiner Substrate. Allerdings wird durch die

Bindung von Gadd45 $\beta$  an die autoinhibitorische Domäne eine Konformationsänderung von MEKK4 induziert wird, was zur Dimerisierung, Autophosphorylierung und Aktivierung von MEKK4 führt (Mita et al., 2002; Miyake et al., 2007). Damit dient Gadd45 $\beta$  als Aktivator von MEKK4 und löst gleichzeitig eine MAP-Kinase-Kaskade aus, die letztlich zur Induktion von Apoptose führt (Mita et al., 2002; Yoo et al., 2003). Neben MEKK4 ist ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*), eine weitere MAP-3-Kinase, als Interaktionspartner von Gadd45 $\beta$  bekannt, die JNK und p38 aktivieren kann (Nagai et al., 2007; Papa et al., 2004a). Allerdings gibt es bislang keine Daten, die eine physiologische Relevanz dieser Interaktion zeigen.

Weiterhin wurde die Interaktion von Gadd45 $\beta$  mit der MAP-Kinase-Kinase MKK4 und MKK7 gezeigt. Hier allerdings wirkt Gadd45 $\beta$  nicht als ein Aktivator, sondern als Inhibitor von MKK4 bzw. MKK7. Denn es verhindert durch seine Bindung an die beiden MAP-Kinasen die Aktivierung ihres Substrates die MAPK JNK (De Smaele et al., 2001; Gupta et al., 2006a; Papa et al., 2004a).

#### **4.4 Die Rolle von Gadd45 $\beta$ während der Apoptose**

Es wurden verschiedene Signaltransduktionswege beschrieben, die zum programmierten Zelltod führen können und bei denen Gadd45 $\beta$  möglicherweise eine entscheidende Rolle spielt. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass hämatopoetische Zellen von Gadd45 $\beta$  *knock-out* Mäusen eine erhöhte Apoptose-Sensitivität gegenüber genotoxischem Stress, wie UV-Bestrahlung oder Behandlung mit den Chemotherapeutika VP-16 und Daunorubicin, aufweisen (Gupta et al., 2006a; Gupta, 2003; Gupta et al., 2006b). Diese Sensitivierung geht mit der Aktivierung von p38 und der Inhibition von JNK einher.

Des Weiteren wurde eine antiapoptotische Wirkung von Gadd45 $\beta$  im Bezug auf die TNFR1-vermittelte Signaltransduktion beschrieben (De Smaele et al., 2001; Papa et al., 2004a). Im besonderen spielt Gadd45 $\beta$  eine entscheidende Rolle bei der Leberregeneration nach Verletzungen (Papa et al., 2008). Kein anderes Organ in Säugetieren besitzt eine solche Regenerationsfähigkeit wie die Leber. Diese Fähigkeit beruht darauf, dass Leberzellen in der G<sub>0</sub>-Phase nach Stimulation wieder in die S-Phase eintreten und solange proliferieren, bis die Leber wiederhergestellt ist. Dieser Vorgang unterliegt einer strengen Regulation, welche die proliferierenden Zellen unter die Kontrolle der Mitogene HGF (*hepatocyte growth factor*), TGF- $\alpha$  und TNF $\alpha$  stellt (Papa et al., 2008). Die Bindung von TNF $\alpha$  an TNFR1 führt zur

Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Nukleärer Faktor  $\kappa$ B), welcher die Transkription von des Gadd45 $\beta$ -Gens induziert (De Smaele et al., 2001). Das Gadd45 $\beta$ -Protein kann an MKK7 binden und dessen Kinaseaktivität inhibieren (De Smaele et al., 2001; Papa et al., 2004a). Damit stellt das TNF $\alpha$ /NF- $\kappa$ B-Zielgen Gadd45 $\beta$  einen negativen Rückkopplungsmechanismus für die TNF $\alpha$ -vermittelte JNK-Aktivierung dar. Durch die verminderte JNK-Aktivität kommt es zu einer verminderten Generierung von jBid, das für mitochondrielle Veränderungen während der TNF $\alpha$ -induzierten Apoptose wesentlich ist (Deng et al., 2003; Papa et al., 2004b). Allerdings fehlt bis heute der direkte Nachweis, das jBid überhaupt existiert. Deshalb ist diese Hypothese sehr umstritten und der genaue Mechanismus, über den JNK Apoptose nach TNF $\alpha$ -Stimulation reguliert, ist weiter unklar.

Eine pro-apoptotische Funktion von Gadd45 $\beta$  wurde in Zusammenhang mit der TGF- $\beta$ -induzierten Apoptose gefunden. TGF- $\beta$  ist ein multifunktionelles Protein mit einem breitem Spektrum von biologischen Aktivitäten. Im Wesentlichen wird mit Hilfe von TGF- $\beta$  das Zellwachstum und die Apoptose reguliert (Haufel et al., 1999; Hsing et al., 1996). Die TGF- $\beta$ -abhängige Apoptose ist wichtig für die Eliminierung von beschädigten und abnormalen Zellen in Geweben. So wurde gezeigt, dass TGF- $\beta$  die Lebergröße beeinflusst, und intravenös appliziertes TGF- $\beta$  Atrophie und Apoptose in normalem Lebergewebe verursacht (Oberhammer et al., 1992; Sanderson et al., 1995). TGF- $\beta$  bindet an einen heteromeren Rezeptorkomplex an der Zellmembran, welcher Typ I- und Typ II-Transmembranrezeptorkinasen beinhaltet. Nachdem TGF- $\beta$  an die Typ II-Transmembranrezeptorkinase gebunden hat, aktiviert diese die Typ I-Transmembranrezeptorkinase, die wiederum die zytoplasmatischen Signalproteine Smad2 und Smad3 durch Phosphorylierung aktiviert. Die so aktivierten Signalproteine durchlaufen dabei eine Konformationsänderung, so dass sie einen heteromeren Komplex mit Smad4 eingehen (Lagna et al., 1996; Macias-Silva et al., 1996; Nakao et al., 1997; Zhang et al., 1996). Dieser Komplex transloziert in den Zellkern und interagiert hier mit anderen Transkriptionsfaktoren und fungiert entweder als ein Coaktivator oder Corepressor (Attisano und Wrana, 2000; Massague und Wotton, 2000; ten Dijke et al., 2000; Zhang und Derynck, 1999). Der genaue Mechanismus der durch TGF- $\beta$  induzierten Apoptose wird allerdings noch ungenügend verstanden.

Untersuchungen haben gezeigt, dass während der TGF- $\beta$ -induzierten Apoptose, die Expression von Gadd45 $\beta$ -mRNA in Abhängigkeit von Smad stark induziert wird (Takekawa

et al., 2002). Die ektopische Expression von Gadd45 $\beta$  aktiviert p38 und führt zur Apoptose durch die Induktion der Expression von Biglycan, wohingegen die Inhibition der Gadd45 $\beta$ -Expression mittels *antisense*-mRNA die TGF- $\beta$ -vermittelte Apoptose und die damit verbundene Aktivierung von p38 blockiert (Takekawa et al., 2002; Ungefroren et al., 2005). Außerdem konnte die Aktivierung von p38 in TGF- $\beta$ -stimulierten Hepatozyten aus Wildtypmäusen gezeigt werden, während die Aktivierung von p38 in Hepatozyten aus Gadd45 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Mäusen durch TGF- $\beta$ -Stimulation unterblieb (Yoo et al., 2003). Es wird vermutet, dass diese Aktivierung von p38 durch die Interaktion von Gadd45 $\beta$  und MEKK4 induziert wird. Aufgrund dessen agiert Gadd45 $\beta$  als ein proapoptotischer Faktor.

Die vorgestellten Mechanismen sind Gegenstand einer kontroversen Diskussion über die Rolle von Gadd45 $\beta$  während der Apoptose (Amanullah et al., 2003; Liebermann und Hoffman, 2007; Nakano, 2004; Papa et al., 2004b). Es kann nach dem heutigen Wissensstand keine eindeutige Aussage über die Rolle von Gadd45 $\beta$  während der Apoptose gemacht werden. Möglicherweise haben diese Mechanismen einen zelltypspezifischen Kontext (Liebermann und Hoffman, 2007; Papa et al., 2004b).

## **5 Zielsetzung**

Ausgehend von publizierten Befunden, dass in humanen Zellen Gadd45 $\beta$  zusammen mit MEKK4 die Stresskinasen JNK und p38 aktivieren kann, sollte im Rahmen dieser Dissertation zunächst überprüft werden, ob dies auch für die homologen Proteine der Maus zutrifft. Über die physiologische Rolle dieser Interaktion war zum Beginn der Dissertation nichts bekannt. Deshalb sollte untersucht werden, in welchem physiologischen Kontext der Gadd45 $\beta$ /MEKK4-Signalweg seine Funktion ausübt. Dabei sollten vor allem Substrate für die von Gadd45 $\beta$  aktivierten Kinasen identifiziert werden. Da Gadd45-Proteine Funktionen in Zellzyklusarrest und Apoptose ausführen, sollte näher analysiert werden, über welche Signalwege Gadd45 $\beta$  die Apoptose beeinflusst. Apoptose spielt eine bedeutende Rolle bei der Ontogenese und Homöostase von mehrzelligen Organismen. Die Rolle von Gadd45 $\beta$ , während dieser Prozesse, ist noch weitgehend ungeklärt. DNA-Chip-Analysen von Schmitz et al. (2003) haben gezeigt, dass Gadd45 $\beta$  während der negativen Selektion von T-Zellen sehr stark hochreguliert wird. Ausgehend von diesem Befund, sollte die genaue Funktion und Wirkweise von Gadd45 $\beta$  während der negativen Selektion im Thymus aufgeklärt werden.

## II. Material und Methoden

### 1 Material

#### 1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma (München), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Die Peptide zur Stimulation der Mäuse wurden im BMFZ der Universität Düsseldorf hergestellt. Verwendet wurden: PCC (*pigeon cytochrome c*; aa 88-104; KAERADLIAYLKQATAK), VSV8 (*vesicular stomatitis virus nucleoprotein*; aa 52–59; RGYVYQGL), I4 (RGYIYQGL), L4 (RGYLYQGL) und NUBO (*NADH ubiquinone oxidoreductase*; aa 68-75; VNVDYSKL).

#### 1.2 Eukaryotische Zellen

| Zelllinie            | Herkunft                                   | Medium/Supplemente   |
|----------------------|--|--|
| FTOC                 | Fötale Maus-Embryonen                      | AIM-V, $\beta$ -Mercaptoethanol  |
| HEK 293T             | Humane, embryonale Nieren-Zelllinie        | RPMI, 10% FCS, je 50 $\mu$ g/ml Penicillin/Streptomycin                                      |
| HeLa                 | humane Cervixkarzinom-Zelllinie            | RPMI, 10 % FCS, je 50 $\mu$ g/ml Penicillin/Streptomycin                                     |
| MEF                  | murine embryonale Fibroblasten             | DMEM high glucose, 10% FCS, je 50 $\mu$ g/ml Penicillin/Streptomycin                         |
| NIH/3T3              | murine embryonale Fibroblasten             | DMEM high glucose, 10% FCS, je 50 $\mu$ g/ml Penicillin/Streptomycin                         |
| Primäre Thymuszellen | Maus                                       | IMDM, 20 % FCS, Glutamin, $\beta$ -Mercaptoethanol, je 50 $\mu$ g/ml Penicillin/Streptomycin |
| Thy278               | murine T-Lymphozyten-Zelllinie (CD4+/CD8+) | RPMI, 10 % FCS, Glutamin, $\beta$ -Mercaptoethanol, je 50 $\mu$ g/ml Penicillin/Streptomycin |

### 1.3 Bakterienstämme

| <i>E.coli</i> Stamm | Genotyp  | Verwendung                      | Referenz/<br>Bezugsquelle |
|---------------------|--|---------------------------------|---------------------------|
| DH5 $\alpha$        | F- $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1 endA1</i><br><i>hsdR17</i> ( $r_k^-$ , $m_k^-$ ) <i>phoA supE44</i><br><i>thi-1 gyrA96 relA1 <math>\lambda^-</math></i> | Amplifikation von Plasmid-DNA   | Invitrogen (Karlsruhe)    |
| BL21 (DE3) gold     | <i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> ( $r_B^-$ $m_B^-$ )<br><i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal<math>\lambda</math></i> (DE3) <i>endA Hte</i>                                      | Expression von Fusionsproteinen | Stratagene (Heidelberg)   |

### 1.4 Mäusestämme

Für die Experimente wurden Mäuse des Wildtyp Stammes C57BL/6 und die transgenen Mäuse vom Stamm N15 TCR Transgen *rag2*<sup>-/-</sup> (Gendler *et al.*, 1998), 5CC7 TCR Transgen *rag2*<sup>-/-</sup> (Seder *et al.*, 1992) und *Gadd45* $\beta$ <sup>-/-</sup> (Gupta *et al.*, 2005b) verwendet. Alle Mäuse wurden unter SPF-Bedingungen (*specific pathogen free*) gehalten.

### 1.5 Nährmedien

#### 1.5.1 Nährmedien für die Zellkultur

Zellkulturmedien RPMI 1640, DMEM, AIM-V und IMDM wurden von den Firmen Gibco bezogen und mit den entsprechenden Supplementen vervollständigt.

|               |                          |         |
|---------------|--------------------------|---------|
| 10 % (v/v)    | FCS                      | Biowest |
| 50 $\mu$ g/ml | Penicillin/Streptomycin  | Gibco   |
| 0,05 %        | $\beta$ -Mercaptoethanol | Gibco   |
| 200 mM        | Glutamin                 | Gibco   |

#### 1.5.2 Nährmedien für Bakterien

LB-Medium:            10 g/l Trypton/Pepton  
                               5 g/l Hefeextrakt  
                               10 g/l NaCl  
                               pH 7,2 mit NaOH eingestellt

Für die Herstellung von Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar hinzugefügt. Für die Herstellung von Selektionsmedien wurde Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) zugegeben.

## 1.6 Vektoren

| Name             | Verwendungszweck   | Referenz/Bezugsquelle                       |
|------------------|--|---|
| LZRSpBMN         | Vektor für die Produktion von Retroviren (Zielgenvektor)   | Ada Kruisbeek (Amsterdam/Niederlande)       |
| pcDNA3.1(+)      | Eu- und prokaryotischer Expressionsvektor  | Invitrogen (Karlsruhe)                      |
| pCMV5            | Eukaryotischer Expressionsvektor mit HA-Tag  | Pär Gerwins, USA                            |
| pCMV-dR8.2       | Vektor für die Produktion von Lentiviren (Strukturproteine und reverse Transkriptase)                  | Addgene, Inc. (Cambridge/USA)               |
| pCR-BluntII-TOPO | Prokaryotischer Expressionsvektor – Matrize zur Amplifikation von verschiedenen Zielgenen              | Invitrogen (Karlsruhe)                      |
| pEF/myc/cyto     | Eukaryotischer Expressionsvektor mit N-terminaler Myc-Markierung                                       | Invitrogen (Karlsruhe)                      |
| pEF6/V5-His-TOPO | Eu- und prokaryotischer Expressionsvektor mit N-terminaler V5-Epitop-Markierung sowie 6xHis-Markierung | Invitrogen (Karlsruhe)                      |
| pEF-FLAG         | Eukaryotischer Expressionsvektor mit N-terminalen FLAG-Epitop-Markierung                               | David Huang, Melbourne/Australien           |
| pEGFP-C1         | Eu- und prokaryotischer Expressionsvektor mit C-terminalem GFP zur Erzeugung eines GFP-Fusionsproteins | Clontech Laboratories (Mountain View, USA)  |
| pEGZ/MCS HA      | Vektor für die Produktion von Retroviren (Zielgenvektor)   | D. Lindemann, Würzburg, Deutschland         |
| pET-15b          | Prokaryotischer Expressionsvektor mit N-terminaler 6xHis-Markierung                                    | EMD Biosciences, Inc. Novagen (Madison/USA) |
| pET-28a(+)       | Prokaryotischer Expressionsvektor mit N-terminaler 6xHis-Markierung                                    | EMD Biosciences, Inc. Novagen (Madison/USA) |
| pGAG-Pol         | Vektor für die Produktion von Retroviren (Strukturproteine und reverse Transkriptase)                  | Markowitz et al., 1988                      |
| pGEX 4T-1        | Prokaryotischer GST-Fusionsprotein-Expressionsvektor   | Amersham Biosciences (Freiburg)             |
| pLKO.1           | Vektor zur Produktion von shRNA in Lentiviren (Zielgenvektor)  | Addgene Inc. (Cambridge/USA)                |

| Name              | Verwendungszweck   | Referenz/Bezugsquelle |
|-------------------|--|-----------------------|
| pME18S-VSV-G (NJ) | Vektor für die Produktion von Retroviren ( <i>Envelope</i> ) | Takebe et al., 1988   |

## 1.7 Enzyme

| Enzyme                                | Bezugsquelle/Referenz                   |
|---------------------------------------|---|
| RNase (DNase frei)                    | Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) |
| Proteinase K                          | Roche (Penzberg)                        |
| <i>Pfx</i> DNA Polymerase             | Invitrogen                              |
| <i>Taq</i> DNA Polymerase             | Qiagen (Hilden)                         |
| T4 DNA Ligase                         | MBI Fermentas (St Leon-Rot)             |
| QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit      | Qiagen (Hilden)                         |
| Zero Blunt Topo PCR Cloning Kit       | Invitrogen                              |
| pEF6/V5-His TOPO TA Expressionskit    | Invitrogen                              |
| Superscript III Reverse Transkriptase | Invitrogen                              |
| Lysozym                               | Sigma-Aldrich (München)                 |

Alle verwendeten Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von New England Biolabs (NEB, Beverly/USA) und MBI Fermentas bezogen.

## 1.8 Größenstandards

| Bezeichnung                                 | Verwendungszweck                      | Bezugsquelle/Referenz |
|---|---------------------------------------|-----------------------|
| O'Gene Ruler™<br>1kb DNA Ladder             | DNA Größenstandard (250 – 10.000 bp)  | Promega (Mannheim)    |
| Page Ruler™<br>prestained Protein<br>Ladder | Protein-Größenstandard (10 – 200 kDa) | MBI Fermentas         |

## 1.9 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Operon (Köln) synthetisiert, gereinigt und lyophilisiert. Ausnahme sind die Oligonukleotide für die *Realtime*-PCR von Gadd45 $\beta$ , die bei der Firma Qiagen bestellt wurden (Cat.Nr.: QT00099575).

| Bezeichnung  | Verwendung      | Sequenz 5' → 3'                                      |
|--------------|-----------------|--|
| ATG T75E     | Mutagenese      | GGTTTGAATATGAAGGC <b>GAA</b> CCACTGAAATGGC           |
| ATG5 PCR fw  | Klonierung      | ATGACAGATGACAAAGATGTG                                |
| ATG5 PCR rev | Klonierung      | ATCTCGTTGGGTGTGGGATG                                 |
| ATG5 T249A   | Mutagenese      | GGAAGCCAATGTTGGAA <b>GCA</b> CCTCTGCAGTGGC<br>TGAGTG |
| ATG5 T75E    | Mutagenese      | GGTTTGAATATGAAGGC <b>GCA</b> CCACTGAAATGGC           |
| Gadd45β fw   | RT-PCR          | CAC CCT GAT CCA GTC GTT CT                           |
| Gadd45β rev  | RT-PCR          | TTG CCT CTG CTC TCT TCA CA                           |
| GAPDH fw     | <i>Realtime</i> | TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG ATC                      |
| GAPDH rev    | <i>Realtime</i> | GGC AGA GAT GAT GAC CCT TTT GGC                      |
| MEKK4 fw     | RT-PCR          | GAG AGT GAC GAG GAG CCA AC                           |
| MEKK4 rev    | RT-PCR          | TGC TCT GAG GAA GGA GGT GT                           |
| MEKK4-DC fw  | Klonierung      | GGGGTACCATGAGAGACGCCATCGCC                           |
| MEKK4-DC rev | Klonierung      | GCTCTAGACTCCACTGGACGGTCGTCC                          |
| Nur77 fw     | RT-PCR          | TTC ATC CTC CGC CTG GCA TAC C                        |
| Nur77 rev    | RT-PCR          | GTC CGA AGC TCA GGC AGT TTG C                        |
| β-Aktin fw   | RT-PCR          | TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA                           |
| β-Aktin rev  | RT-PCR          | TCT CAG CTG TGG TGG TGA AG                           |

## 1.10 Antikörper

### 1.10.1 Primäre Antikörper

| Antigen             | Reaktivität            | Spezies   | Klon      | Verwendung      | Bezugsquelle/<br>Referenz          |
|---------------------|------------------------|-----------|-----------|-----------------|------------------------------------|
| β-Aktin             | Mensch,<br>Maus        | Maus      | AC-74     | WB              | Sigma-Aldrich                      |
| ATG5                | Maus, Ratte,<br>Mensch | Kaninchen |           | WB              | Cell Signaling                     |
| Bim                 | Mensch,<br>Maus        | Kaninchen |           | WB              | Stressgen                          |
| Caspase-3           | Maus                   | Maus      | 46        | WB              | BD Biosciences                     |
| Caspase-8           | Maus                   | Ratte     | 1G12      | WB              | Alexis<br>(Grünberg)               |
| CD3ε                | Maus                   | Maus      | 145-2C11  | für Stimulation | eigene Herstellung                 |
| c-MYC               | Maus, Ratte,<br>Mensch | Maus      | 9E10      | WB              | Santa Cruz                         |
| FLAG                |                        | Maus      | M2        | WB, IP, IF      | Sigma-Aldrich                      |
| Gadd45β             | Maus                   | Huhn      |           | WB              | Eigene Herstellung                 |
| GST                 |                        | Ziege     |           | WB              | Amersham-Biosciences<br>(Freiburg) |
| HA                  |                        | Maus      | 12CA5     | WB, IP, IF      | Roche                              |
| LC3                 | Maus, Ratte,<br>Mensch | Maus      | 2G5       | WB              | NanoTools                          |
| MEKK4               | Maus, Ratte,<br>Mensch | Maus      | 338       | WB              | Sigma-Aldrich                      |
| Nur77               | Maus, Ratte,<br>Mensch | Maus      | 12.14     | WB              | BD Biosciences                     |
| p38                 | Maus, Ratte,<br>Mensch | Kaninchen |           | WB              | Cell Signaling                     |
| p38 (P)             | Maus, Ratte,<br>Mensch | Kaninchen |           | WB,IP           | Cell Signaling                     |
| p38 (P)             | Maus, Ratte,<br>Mensch | Kaninchen |           | IF, IP          | Cell Signaling                     |
| Pan-<br>Zytokeratin | Mensch,<br>Maus        | Maus      | C10       | ICH             | Sigma-Aldrich                      |
| Tubulin             | Mensch,<br>Maus        | Maus      | 236-10501 | WB              | Molecular Probes<br>(Göttingen)    |
| V5                  |                        | Maus      | R960      | WB, IP, IF      | Invitrogen                         |

IF: Immunfluoreszenz, WB: Western Blot, IP: Immunpräzipitation, ICH: Immunhistochemie

### 1.10.2 Primäre Antikörper (Fluoreszenz-markiert)

| Antigen     | Reaktivität | Spezies | Klon   | Konjugat | Verwendung | Bezugsquelle/Referenz |
|-------------|-------------|---------|--------|----------|------------|-----------------------|
| CD4 (L3T4)  | Maus        | Ratte   | RM4-5  | R-PE     | FACS       | BD Biosciences        |
| CD8a (Ly-2) | Maus        | Ratte   | 53-6.7 | APC      | FACS       | BD Biosciences        |
| CD24        | Mensch      | Maus    | M1/69  | FITC     | FACS       | BD Biosciences        |

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorter, APC: Allophycocyanin, FITC: Fluorescein-Isothiocyanat, R-PE: R-Phycoerythrin

### 1.10.3 Sekundäre Antikörper (Meerrettich-Peroxidase-konjugiert)

| Antigen | Reaktivität | Spezies | Verwendung | Bezugsquelle/Referenz  |
|---------|-------------|---------|------------|------------------------|
| IgG     | Kaninchen   | Ziege   | WB         | Santa Cruz             |
| IgG     | Ratte       | Ziege   | WB         | Southern Biotechnology |
| IgG     | Ziege       | Esel    | WB         | Southern Biotechnology |
| IgG     | Maus        | Ziege   | WB         | Santa Cruz             |
| IgG 1   | Maus        | Ziege   | WB         | Southern Biotechnology |
| IgG 2a  | Maus        | Ziege   | WB         | Southern Biotechnology |
| IgG 2b  | Maus        | Ziege   | WB         | Southern Biotechnology |
| IgY     | Huhn        | Ziege   | WB         | Southern Biotechnology |

WB: Western Blot

### 1.10.4 Sekundäre Antikörper (Fluoreszenz-markiert)

| Antigen | Reaktivität | Spezies | Farbstoff                | Verwendung | Bezugsquelle/Referenz |
|---------|-------------|---------|--------------------------|------------|-----------------------|
| IgG 1   | Maus        | Ziege   | AlexaFluor 405, 488, 594 | IF         | Molecular Probes      |
| IgG     | Kaninchen   | Ziege   | AlexaFluor 405, 488, 594 | IF         | Molecular Probes      |
| IgG 2a  | Maus        | Ziege   | AlexaFluor 488, 594      | IF         | Molecular Probes      |
| IgG 2b  | Maus        | Ziege   | AlexaFluor 488, 594      | IF         | Molecular Probes      |

IF: Immunfluoreszenz

## **2. Methoden**

### **2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.1.1 Analytische Plasmidpräparation**

Zur analytischen Plasmidpräparation wurde eine *E.coli*-Einzelkolonie in 2 ml Antibiotika-haltigem LB-Medium (1% NaCl; 1% Bacto Trypton/Pepton; 0,5% Hefeextrakt, pH 7,0; 50 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) inokuliert und über Nacht bei 37°C und 220 rpm (Certomat Bs-1 / B.Braun Biotech International, Melsungen) inkubiert. Die Bakterienkultur wurde in der exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet (6000 rpm, 2 min, 20°C; 5417R / Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet in 100 µl P1-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Die Bakterienzell-Lyse erfolgte durch Zugabe von 200 µl P2-Puffer (200 mM NaOH; 1% SDS) bei RT. Die Lysate wurden über einen sauren Bindungspuffer, 150 µl P3-Puffer (3 M Kaliumacetat, pH 5,5), neutralisiert. Debris wurde über Zentrifugation (13000 rpm, 5 min, 20°C) pelletiert und der Überstand mit der darin enthaltenen Plasmid-DNA abgenommen. Die Plasmid-DNA wurde mit 400 µl Isopropanol und anschließende Zentrifugation (13000 rpm, 10 min, 4°C) gefällt und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Danach wurde die DNA getrocknet und in 20 µl sterilem Wasser gelöst. Positive Klone mit der gewünschten Plasmid-DNA wurden über Restriktionsanalyse und Auftrennung der Restriktionsfragmente auf einem analytischen Agarosegel identifiziert.

#### **2.1.2 Präparative Plasmidisolierung**

200-400 µl Bakteriensuspension aus der analytischen Plasmidpräparation oder 100 µl einer Glycerin-Stammkultur wurden in 200-400 ml Antibiotika-haltigem LB-Medium inokuliert und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Die Plasmidpräparation erfolgte gemäß Herstellerangaben (Qiagen Maxi Kit Protokoll / Qiagen, Hilden). Die DNA-Konzentration wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm (Biophotometer / Eppendorf) ermittelt. Die Reinheit der DNA-Lösung wurde über den Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt und die gewünschte Plasmid-DNA über Restriktionsanalyse verifiziert.

### 2.1.3 Restriktionsanalyse

Alle durchgeführten restriktionsenzymatischen Spaltungen wurden nach folgendem Schema angesetzt:

|             |                     |
|-------------|---------------------|
| DNA         | 1 $\mu\text{g}$     |
| 10 x Puffer | 2-4 $\mu\text{l}$   |
| Enzym       | 1 $\mu\text{l}$     |
| Wasser      | ad 20 $\mu\text{l}$ |

Die Restriktionsansätze wurden 1-1,5 h bei 37°C inkubiert und mittels Gelelektrophorese analysiert.

### 2.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaktion/PCR*) wurde zur selektiven Vervielfältigung definierter Nukleinsäureabschnitte eingesetzt. Bei der PCR können mit Hilfe spezifischer Oligonukleotidprimer und einer thermostabilen DNA-Polymerase wenige Kopien einer Ausgangs-DNA (*template*) schnell und effizient amplifiziert werden. Die Grundlage hierbei stellen zyklische Temperaturveränderungen dar. Nach Hitze-bedingter DNA-Denaturierung können sequenzspezifische Oligonukleotidprimer mit der einzelsträngigen DNA hybridisieren. An diese anknüpfend kann dann über eine DNA-Polymerase ein DNA-Doppelstrang aus der einzelsträngigen Vorlage synthetisiert werden. Da eine Zweitstrang-Synthese an beiden Einzelsträngen der Ausgangs-DNA erfolgt, wird somit in jedem Zyklus die Anzahl der Vorlagen verdoppelt.

Für analytische PCRs wurde in der Regel die klassische *Taq*-Polymerase (Eppendorf) aus dem thermostabilen Bakterium *Thermus aquaticus* eingesetzt. Diese zeichnet sich durch eine hohe Syntheserate aus, weist jedoch auf Grund der fehlenden 3'-5'-Exonukleaseaktivität auch eine relativ hohe Fehlerhäufigkeit mit etwa  $10^{-5}$  je eingebauter Base auf.

Für präparative PCR-Ansätze wurde daher die *Pfx*-Polymerase (Invitrogen) aus *Thermococcus kodakaraensis* (KOD1) gewählt. Zwar besitzt diese eine wesentlich geringere Syntheserate, dafür liegt jedoch auch die Fehlerrate mit etwa  $10^{-6}$  je eingebauter Base auf Grund ihrer Korrekturaktivität deutlich geringer.

Alle Polymerasekettenreaktionen wurden nach folgendem Schema angesetzt:

|                              |               |
|------------------------------|---------------|
| DNA-Matrize                  | 50-100 ng     |
| 10 x PCR-Puffer              | 5 $\mu$ l     |
| dNTPs (10mM)                 | 1 $\mu$ l     |
| 5'-Oligonukleotid (100 pmol) | 1 $\mu$ l     |
| 3'-Oligonukleotid (100 pmol) | 1 $\mu$ l     |
| DNA-Polymerase               | 1 $\mu$ l     |
| Wasser                       | ad 50 $\mu$ l |

Alle Polymerasekettenreaktionen wurden in einem Thermocycler (Eppendorf) durchgeführt. Reaktionen, bei denen die *Taq*-Polymerase eingesetzt wurde, wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

| Zeit              | Temperatur     | Anmerkung            |
|-------------------|----------------|----------------------|
| 5 min             | 94°C           | Start                |
| 30 sec            | 94°C           | DNA-Denaturierung    |
| 30 sec            | 60°C (-/+ x°C) | Hybridisierung       |
| 1 min (-/+ x min) | 72°C           | Elongation           |
| 10 min            | 72°C           | Terminale Elongation |

Es wurden 25 bis 30 Zyklen gefahren. Auf Grund der unterschiedlichen Temperaturoptima der DNA-Polymerasen wurden bei Polymerasekettenreaktionen mit der *Pfx*-Polymerase die Elongationstemperatur auf 68°C gesenkt.

### 2.1.5 Quantitative PCR (*realtime PCR*)

Die quantitative Echtzeit PCR (*realtime PCR*) wurde zur Quantifizierung von Nukleinsäuren eingesetzt. Über den Einsatz eines in die doppelsträngige DNA-interkalierenden, fluoreszierenden Reporters, wie z.B. SYBR Green, kann die Fluoreszenz-Emission während eines jeden PCR-Zyklus der PCR-Reaktion als Maß für die Amplifikation der Ausgangsmatrize gemessen werden. Während der exponentiellen Phase nimmt hierbei die Fluoreszenzstärke direkt proportional mit der Menge des PCR-Produktes zu. Je höher die

Kopienzahl der Ausgangsmatrize ist, desto eher kann eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenz detektiert werden.

Quantitative PCRs wurden mit Hilfe des QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kits von Qiagen im ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Für die Reverse Transkriptase Reaktion der eingesetzten RNA und die nachfolgende PCR wurde folgendes Programm gewählt:

| Zeit   | Temperatur | Anmerkung                                  |
|--------|------------|--|
| 30 min | 50°C       | Reverse Transkription                      |
| 15 min | 95°C       | Aktivierung der Hot StarTaq DNA-Polymerase |
| 15 sec | 94°C       | DNA-Denaturierung                          |
| 30 sec | 54°C       | Hybridisierung                             |
| 30 sec | 72°C       | Elongation                                 |

Es wurden 40 Zyklen gefahren.

Da sich der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green nicht sequenzspezifisch in doppelsträngige DNA anlagert, wurde anschließend eine Schmelzpunkt-Analyse (*melting point analysis*) durchgeführt, um zwischen korrektem Produkt und Artefakten, wie z.B. Primer-Dimeren, unterscheiden zu können:

| Zeit   | Temperatur |
|--------|------------|
| 15 sec | 95°C       |
| 20 sec | 54°C       |
| 15 sec | 95°C       |

 20 min

Die Aufwärmzeit von 54°C auf 95°C wurde auf 20 min eingestellt. In diesem Zeitrahmen wird die Abnahme der Fluoreszenz detektiert, da SYBR Green nur an doppelsträngige DNA bindet. Da eine Dissoziation kurzer, unspezifischer DNA-Fragmente wesentlich schneller erfolgt, als die des gewünschten PCR-Produktes, kann auf diese Weise der Erfolg der PCR überprüft werden.

### 2.1.6 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Ansätze wurden in der Regel aufgereinigt, da im PCR-Puffer enthaltene Salze beim weiteren Umgang mit der bei der PCR amplifizierten DNA störend wirken können. Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte gemäß Herstellerangaben (Qiaquick PCR Purification Kit / Qiagen). Zur Überprüfung der Aufreinigung wurde ein Zehntel des eluierten PCR-Produktes auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen.

### 2.1.7 Ligation

Für die Ligation wurden der restriktionsenzymatisch gespaltene Vektor sowie die zu inserierende DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:6 eingesetzt nach folgendem Schema eingesetzt:

---

|                           |                  |
|---------------------------|------------------|
| Insert-DNA                | 13,5 – 5 $\mu$ l |
| Vektor-DNA                | 2,5 – 15 $\mu$ l |
| 10 x Puffer               | 3 $\mu$ l        |
| T <sub>4</sub> DNA Ligase | 1 $\mu$ l        |
| Wasser                    | ad 30 $\mu$ l    |

---

Sämtliche Ligationsansätze wurden entweder 1 h bei 22°C oder 16 h bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde die Ligase bei 65°C für 10 min inaktiviert.

### 2.1.8 Isolation von mRNA aus eukaryotischen Zellen

Die Isolation von mRNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mittels des  $\mu$ MACS-mRNA-Isolations-Kits von Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach) gemäß Herstellerangaben. Es wurden ausschließlich RNase-freie Reagenzien und Materialien verwendet.

### 2.1.9 Reverse Transkription (RT-PCR)

Zur reversen Transkription von isolierter mRNA in cDNA wurde das SuperScript™ III-First-Strand-Synthesis-Kit von Invitrogen verwendet. Pro Ansatz wurden 1 pg bis 500 ng mRNA eingesetzt. Als Primer wurden oligo(dT)<sub>20</sub>-Primer verwendet, die in der Lage sind, mit einem

Großteil der isolierten mRNAs über deren 3'Poly-A-Schwanz zu hybridisieren. Die cDNA-Synthese erfolgte gemäß Herstellerangaben. Für nachfolgende PCRs auf spezifische Gene wurden 2 bis 8  $\mu$ l des cDNA-Ansatzes eingesetzt.

#### **2.1.10 Analytische Agarosegele**

Zur gelelektrophoretischen DNA-Analyse wurde die DNA üblicherweise in einem 1–2% Agarosegel (1-2% Agarose in TAE-Puffer: 40 mM Tris pH 8, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, 0,5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid) aufgetrennt. Die Proben wurden vor der Ladung auf das Gel mit Glycerin-haltigem Ladepuffer (Promega, Mannheim) versetzt und anschließend bei 80-100 mA in einer Gelelektrophese-Kammer (DNA-Pocket-Bloc UV / Biozym, Oldendorf) aufgetrennt. Die Visualisierung der Banden erfolgte über die Anregung des in die DNA-interkalierenden Ethidiumbromids mit UV-Licht ( $\lambda = 254$  nm).

#### **2.1.11 Präparative Agarosegele und Gelextraktionen**

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA über Agarose-Gele wurde neben der DNA-Analyse auch zur selektiven Elution von DNA-Fragmenten nach restriktionsenzymatischer Spaltung genutzt. Gewünschte DNA-Fragmente konnten über die Größen-spezifische Auftrennung im Agarose-Gel identifiziert und anschließend aus diesem ausgeschnitten und eluiert werden. Die Elution der DNA erfolgte gemäß Herstellerangaben (Zymoclean Gel DNA Recovery Kit / Zymo Research, Orange, USA).

#### **2.1.12 Transformation chemokompetenter Bakterien**

Der Transfer exogener DNA in chemokompetente Bakterien erfolgte über die Permeabilisierung der bakteriellen Zellmembran mit  $\text{CaCl}_2$  bei 0°C. Zur Transformation wurden chemokompetente Bakterien des Stammes DH5 $\alpha$  verwendet. Nach vorsichtigem Auftauen der Zellsuspension auf Eis wurden 500 ng bis 1  $\mu$ g der zu transformierenden DNA zugegeben und die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Durch einen Hitzeschock für 30 sec bei 42°C wurde die DNA-Aufnahme gestoppt und die Transformationsansätze dann kurz auf Eis abgekühlt. Die Bakteriensuspension wurde mit 1 ml antibiotikafreiem LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C und 220 rpm (Thermomixer Comfort / Eppendorf) inkubiert. 50  $\mu$ l der Bakteriensuspension wurden zur positiven Selektion auf Platten mit Antibiotika-haltigem

LB-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Positive Klone wurden anschließend über Plasmid-Isolation und Restriktionsanalyse identifiziert.

### **2.1.13 Transformation elektrokompenter Bakterien**

Die elektrische Transformation ist im Vergleich zur chemischen wesentlich effizienter. Die Einschleusung der Fremd-DNA erfolgt mittels Elektroporation. Die bakterielle Zellsuspension wird hierbei unter hoher Spannung einem kurzen elektrischen Puls ausgesetzt. Dies führt zur Ausbildung winziger Poren in der Plasmamembran der Zellen, durch welche die exogene DNA direkt ins Zytoplasma aufgenommen wird und in den Zellkern gelangen kann.

Zur Transformation wurden elektrokompente Bakterien des Stammes BL-21 (DE3) Gold verwendet. Nach Auftauen der bakteriellen Zellsuspension auf Eis und Zugabe von 1 µg DNA erfolgte der Puls bei 2,5 kV (Gene Pulser Xcell / BIO-RAD, München). Die Bakterien wurden im Anschluss in 1 ml LB-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Zur positiven Selektion der Bakterien mit dem gewünschten Plasmid wurden 50 µl der Suspension auf Petrischalen mit Antibiotika-haltigem LB-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus mehreren Einzelkolonien wurde anschließend die Plasmid-DNA isoliert und positive Klone über Restriktionsanalyse identifiziert.

### **2.1.14 Kryokonservierung von Bakterien**

Zur dauerhaften Lagerung der verschiedenen Bakterienstämme wurden Glycerinstammkulturen – sogenannte Kryokonserven – angelegt. Hierzu wurden 500 µl einer in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Bakterienkultur mit 500 µl Glycerin gemischt und die Lösung vorsichtig homogenisiert. Auf diese Weise war eine Lagerung der Bakterien bei -80°C möglich.

## **2.2 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen**

Die Kultivierung eukaryontischer Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen, um eventuelle Kontaminationen der Kulturen mit Bakterien, Hefen oder Pilzen zu vermeiden. Aus diesem Grund wurden alle Arbeiten in Zellkulturlaboratorien an speziellen Sterilarbeitsbänken

(HeraSafe / Heraeus, Hanau) durchgeführt. Es wurden ausschließlich gammabestrahlte Zellkulturmaterialien, wie Kulturschalen (Greiner, Solingen), Kulturflaschen (Greiner), Pipetten (Costar, Corning/USA) und Zentrifugenröhrchen (Greiner) verwendet. Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C in 5% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in einem Inkubator (HeraCell / Heraeus) kultiviert. Die für die Zellkultur verwendeten Medien (DMEM, RPMI 1640) und Supplemente wie Penicillin/Streptomycin, fötales Kälberserum (FKS), Puromycin und G418 wurden von der Firma PAA Laboratories (Pasching, Österreich) bezogen.

### **2.2.2 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen**

Zur Kryokonservierung eukaryontischer Zellen wurde dem Kulturmedium neben 20% fötalem Kälberserum 10% Dimethylsulfoxid (DMSO / Roth) zugesetzt, um die Kristallbildung von Wasser beim Einfrieren zu vermeiden. Die Zellen wurden in einer Dichte von maximal 2-3x10<sup>7</sup>-Zellen/ml in das Medium aufgenommen und auf -80°C abgekühlt. Die langfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

Zur Rekultivierung der gelagerten Zellen wurde die entsprechende Kryokonserven zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen mit vorgewärmtem Medium überführt. Anschließend wurde über Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min das DMSO-haltige Medium entfernt. Das Zellpellet wurde in frischem, vorgewärmtem Medium aufgenommen und in ein Kulturgefäß gegeben.

### **2.2.3 Herstellung und Lagerung von Zellpellets**

Zur Herstellung von Zellpellets wurden die entsprechenden Zellen in ein 15 ml-Röhrchen überführt und durch Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm pelletiert. Adhärente Zellen wurden zuvor mit einem Zellschaber (Sarsted, Nümbrecht) vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren.

## 2.2.4 Transfektion

### 2.2.4.1 Transiente Transfektionen

Zur transienten Transfektion von HEK 293T-Zellen wurde Lipofectamin 2000 (Invitrogen) und für NIH/3T3-Zellen sowie MEF-Zellen Optifect (Invitrogen) eingesetzt, zwei Lipid-basierende Transfektionsreagenzien. Die Transfektion der Zellen erfolgt hierbei über die Komplexierung der exogenen DNA mit den Lipiden im Reagenz. Durch anschließende Fusion der Liposom-DNA-Komplexe mit der Zellmembran wird die DNA in das Zellinnere entlassen. Die Zellen wurden ausgesät und nach 12 h gemäß Herstellerprotokoll transfiziert.

### 2.2.4.2 Selektion und Kultivierung stabiler Transfektanten

Zur Selektion von stabilen Transfektanten wurden MEF *ATG5 knock out* Zellen nach Transfektion 36 h in 6-Loch-Platten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf zwei 15 cm Schalen verteilt und zur Selektion positiver Klone in Selektionsmedium (Serum-haltiges Medium mit 0,5 mg/ml G418) für 14 Tage kultiviert. Angewachsene Klone wurden anschließend in größerem Maßstab auf Selektionsmedium hochgezogen und mittels Western-Blot auf die Expression von ATG5 getestet.

## 2.2.5 Thymuspräparation

Die Mäuse wurden durch CO<sub>2</sub>-Asphyxiation getötet, mit 70%-igem Ethanol desinfiziert und der Thymus isoliert. Dann wurde der Thymus in eine 35/10 mm Petrischale (Greiner) mit 2 ml PBS überführt. Durch Zerreiben des Organs durch ein 70 µm Zellsieb (BD Biosciences) wurde eine homogene Zellsuspension erstellt und eventuelle Sedimentreste entfernt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt und die Petrischale mit 4 ml PBS nachgespült. Die Zellen wurden anschließend für 5 min bei 1500 rpm und 6°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde zur Lyse der enthaltenen Erythrocyten in 2 ml 0,83% NH<sub>4</sub>Cl-Puffer resuspendiert. Nach 2-minütiger Inkubation der Zellen bei RT wurde der Lyse-Vorgang durch die Zugabe von 10 ml PBS abgestoppt. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in Medium (RPMI; 10% FCS; 200 mM Glutamin; 0,05%, β-Mercaptoethanol; 50 µg/ml Penicillin/Streptomycin) oder PBS aufgenommen.

### 2.2.6 Fötale Thymusorgankultur (FTOC)

Die fötale Thymusorgankultur ist eine Methode, die es ermöglicht, die Reifung und Differenzierung von T-Zellen *in vitro* zu untersuchen. Darüber hinaus bietet sie den Vorteil, dass man die T-Zellentwicklung auf einfache Weise durch Zugabe von Reagenzien in das Kulturmedium beeinflussen kann.

Am Trächtigkeitstag 15 wurden Mäuseweibchen durch CO<sub>2</sub>-Asphyxiation getötet, mit 70 % Ethanol desinfiziert und die Föten aseptisch isoliert. Die Thymuslappen der Föten wurden entnommen und von Geweberesten befreit. Für die Kultivierung wurden je zwei Thymuslappen auf eine Membran aus Polycarbonat mit einer Porengröße von 0,4 µm in 24-Loch Transwellplatten (Corning Inc., Lowell, USA) platziert und mit 0,4 ml AIM V Medium (Invitrogen) inklusive 50 µM β-Mercaptoethanol befüllt. Die Thymuslappen wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für fünf Tage inkubiert. Am Tag 5 wurden die Proben mit anti-CD3, dem Superantigen *Staphylococcus enterotoxin B* (SEB) oder Dexamethason für die angegebenen Zeitwerte stimuliert. Für die anschließende RT-PCR-Analyse wurden die Thymuslappen zwischen zwei geschliffenen Glasobjektträgern in kaltem PBS zerrieben, um eine Zellsuspension herzustellen. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation (4000 rpm, 5 min) pelletiert.

### 2.2.7 Herstellung von Retro- und Lentiviren

Viraler Gentransfer ist ein effektiver Weg, um genetisches Material stabil in eine Vielzahl von Zellen einzuschleusen. Der Unterschied zwischen Retro- und Lentiviren besteht darin, dass Lentiviren in der Lage sind, auch ruhende Zellen zu infizieren, während Retroviren nur sich teilende Zellen infizieren können. Die Herstellung von Retro- und Lentiviren erfolgte nach folgendem Protokoll:

HEK293T-Zellen dienten als Verpackungszelllinie und wurden am Tag vor der Transfektion in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Es wurde eine Transfektion mit Lipofectamin 2000 mit drei verschiedenen Plasmiden durchgeführt (jeweils 10 µg DNA pro Schale), um virale Partikel synthetisieren zu lassen. Neben dem viralen Transfektor mit dem Zielgen wurde das Plasmid mit der Kodierung für Hüllproteine (*Envelope*) und das Plasmid, welches Strukturproteine und reverse Transkriptase kodiert, transfiziert. Nach 16 h wurde frisches Medium auf die Zellen gegeben und am zweiten und dritten Tag nach der Transfektion das Medium mit den enthaltenen Retroviren abgenommen. Das Retrovirus-haltige Medium wurde

filtriert (0,45 µm, PVDF-Membran) und anschließend wurden die Viren durch Zentrifugation (100000g, 1 h, 4°C) aufkonzentriert. Das so erhaltene Viruspellet wurde sorgfältig mit PBS resuspendiert und in Aliquots bei -80°C gelagert.

### **2.2.8 Transduktion von Zielzellen mit Viruspartikeln**

Die generierten Viruspartikel wurden zur Transduktion der Zielzellen eingesetzt. In den Zielzellen wird mittels der Reversen Transkriptase die virale RNA in DNA umgeschrieben und in das Genom integriert, woraufhin das Zielprotein bzw. die shRNA produziert wird. Zusätzlich wurde durch 8 µg/ml Polybren die Effektivität der Transduktion gesteigert. Pro Ansatz wurden die Zellen mit jeweils einem Aliquot der Viruspartikel für eine Stunde bei 2000 rpm (Multifuge, Heraeus) und 25°C zentrifugiert. Die Zellen wurden dann für 16 h bei 37°C unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere Analysen kultiviert.

### **2.2.9 Immunfluoreszenzmikroskopie von adhärennten Zellen**

Um Proteine zu analysieren, die intrazellulär exprimiert bzw. gespeichert werden, wurden Zellen zunächst fixiert und permeabilisiert, bevor sie mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt wurden.

Dazu wurden je  $5 \times 10^4$  Zellen pro Loch auf einer 12 Loch-Platte ausgesät. In jedem Loch befindet sich ein Deckglas, so dass die Zellen sich an das Deckglas anheften können. Die Zellen wurden dann bei Bedarf mit dem entsprechenden Plasmid transfiziert (siehe Abschnitt 2.3.1) und über Nacht weiter kultiviert. Nachdem das Medium abgesaugt worden war, wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit einer 3,7% Formaldehydlösung fixiert. Die Permeabilisation der Zellen erfolgte mit Blockpuffer (4% BSA, 0,05 % Saponin in PBS) für 30 min unter leichtem Schwenken. Anschließend wurde der Puffer abgesaugt und der primäre Antikörper (in Blockpuffer gelöst) dazugegeben. Die Inkubation wurde ü.N. bei 4°C durchgeführt. Der Blockpuffer und nicht in die Zellen diffundierter Antikörper wurden abgesaugt und danach die Zellen mit PBS gewaschen. Nun wurde der sekundäre Antikörper (gelöst in Blockpuffer), welcher spezifisch an den primären Antikörper bindet und an einen Farbstoff gekoppelt ist, hinzugegeben. Der Farbstoff fluoresziert bei Anregung mit Licht der entsprechenden Emissionwellenlänge und kann unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Die Inkubation betrug 1h bei RT und leichtem Schwenken. Anschließend wurden

die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, die Deckgläser mitsamt den Zellen mit Hilfe von *Fluorescent Mounting Medium* (DakoCytomation, Hamburg) auf einem Objektträger fixiert und nach ca. 1 h Trocknung mit dem Fluoreszenzmikroskop (Leica) untersucht.

### 2.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur schnellen und effizienten Analyse von Struktur, Größe sowie der intra- und extrazellulären Proteinexpression einzelner Zellen. Das Prinzip des Durchflusszytometers (*Fluorescence-activated-cell-sorter*, FACS) beruht auf der Markierung von Zellen mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen und deren Anregung in einem laminaren Zellstrom über monochromatisches Laserlicht. Über die unterschiedlichen Emissionsspektren der Fluorochrome kann so eine Charakterisierung der intra- sowie extrazellulären Zusammensetzung von Zellen erfolgen. Zusätzlich konnten über das Vorwärtsstreulicht (*Forwardscatter*, FSC) und das Seitwärtsstreulicht (*Sidescatter*, SSC) die relative Größe und Granularität auch von unmarkierten Zellen ermittelt werden. Für die FACS-Messungen wurde ein FACScalibur der Firma BD Biosciences verwendet.

#### 2.3.1 Nachweis von Apoptose nach Nicoletti

Der Nachweis von Apoptose nach Nicoletti (Nicoletti et al., 1991) ermöglicht es, mit Hilfe eines propidiumiodidhaltigen, hypotonen Puffers in einer Zellpopulation den Prozentsatz der apoptotischen Kerne zu ermitteln. Der Farbstoff Propidiumiodid ist ein nicht-membranpermeables Fluorochrom und kann nur in Zellen mit geschädigter Zellmembran eindringen und dort in die DNA interkalieren. Daher werden die Zellen mit einem hypotonen Puffer lysiert. Apoptotische Zellen sind im Durchflusszytometer auf Grund ihrer degradierten DNA anhand eines breiten hypodiploiden Höchstwertes (*Sub-G<sub>1</sub>-peak*) identifizierbar.

Für den Zytotoxizitätstest nach Nicoletti wurden je  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und 5 min bei 1500 rpm und 20°C zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und in 250  $\mu$ l hypotonem Citrat-Puffer (0,1% Na-Citrat; 0,1% Triton X-100; 2  $\mu$ g/ml Propidiumiodid) aufgenommen und mindestens 30 min bei 4°C unter Licht-Ausschluss inkubiert. Die so vorbereiteten Proben wurden dann im FACScalibur der Firma BD Biosciences gemessen.

### 2.3.2 Cytometric Bead Array (CBA)

Der *Cytometric Bead Array* (CBA) ist eine Methode zur quantitativen Messung von löslichen Substanzen, wie z.B. phosphorylierten Proteinen in Zelllysaten. Für jedes Protein gibt es eine Population von *Capture-Beads* (Polymerkügelchen) mit unterschiedlicher Fluoreszenzintensität. Der *Protein-Capture-Bead*-Komplex bindet wiederum einen spezifischen Detektions-Antikörper mit einer anderen Fluoreszenzintensität. Vom Prinzip handelt es sich um einen "Sandwich-ELISA", wobei der *Capture*-Antikörper aber nicht an einer Mikrotiterplatte bindet. Die Messung erfolgt über die Durchflusszytometrie. Über eine Eichgerade können außer qualitativen auch quantitative Ergebnisse erzielt werden.

Für die Bestimmung der phosphorylierten Form der Proteine in der vorliegenden Studie wurde der *CBA-Kit* der Firma BD Biosciences verwendet. Hierzu wurde nach Produktanleitung zuerst das *Zytometer-Setup* erstellt, indem je 50 µl *Zytometer-Setup Beads* in die Röhren A, B und C pipettiert wurden. In Röhren B kamen 50 µl der FITC-Positiv-Kontrolle, in Röhren C PE-Positiv-Kontrolle hinzu. Nach Inkubation erfolgte die Zugabe von 450 µl Waschpuffer in Röhren A und 400 µl in B und C. Mit diesen Mischungen war die Zytometer-Einstellung möglich.

Zur Quantifizierung war es zusätzlich erforderlich, eine Verdünnungsreihe der Proteinstandards zu erstellen. Hierfür wurde der lyophilisierte phosphorylierte Protein Standard mit 200 µl Verdünnungspuffer rekonstituiert und nach Inkubation von 15 min ein Top-Standard mit Verdünnungspuffer in einer Konzentration von 5 ng/ml hergestellt. Es folgte das Anlegen einer Verdünnungsreihe von 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 und 1:256 und einer Negativ-Kontrolle. Für die Präparation der Studienproben wurden zuerst 50 µl des Mastermix aus je 10 µl der einzelnen *Capture Beads* hergestellt. Danach wurden je 50 µl der Proben hinzupipettiert und für 4 h im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von je 50 µl PE-Detektionsreagenz erfolgte eine erneute Inkubation für 1,5 Stunden. Die Proben wurden dann mit 1 ml Waschpuffer gewaschen und abzentrifugiert. Zum Messen wurden nochmals 300 µl Waschpuffer hinzugegeben. Die so vorbereiteten Proben wurden dann nach Herstellerangaben im FACScalibur der Firma BD Biosciences gemessen.

### 2.3.3 Acridine-Orange-Färbung

Acridine-Orange ist ein pH-Indikator, der zum Anfärben von Lysosomen verwendet werden kann. In saurem Milieu emittiert Acridine-Orange oranges bis rotes Licht (lysosomaler pH-Wert: ~5,0), während es bei neutralem pH-Wert grün erscheint (zytoplasmatischer pH-Wert:

~7,0). Nach Induktion von Autophagie kommt es zur vermehrten Bildung von Lysosomen in den Zellen. Folglich steigt der rote Anteil von Acridine-Orange, was mittels FACS gemessen werden kann. Deshalb dient die Färbung der Lysosomen als indirekter Nachweis der Autophagie.

Zum Nachweis von Autophagie wurden die Zellen für 20 min mit Acridine-Orange (1 µg/ml) unter normalen Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert und mit PBS dreimal gewaschen. Die Zellfärbung wurde dann direkt im FACS gemessen und ausgewertet.

## **2.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.4.1 Konzentrationsbestimmungen von Proteinen nach Bradford**

Der Bradford-Test wurde zur Quantifizierung unbekannter Proteinkonzentrationen in Proteingemischen genutzt. Hierbei wird die Eigenschaft des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau (CBB) ausgenutzt, der in Gegenwart von Proteinen eine Rotverschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm zeigt (Compton und Jones, 1985). Der Grund für diese Verschiebung ist die Stabilisierung der unprotonierten Sulfonat-Form des Farbstoffes durch eine Komplexbildung mit kationischen Seitenketten der Proteine. Um eine Lösung mit unbekannter Proteinkonzentration zu bestimmen, muss zunächst eine Eichgerade mit definierten Proteinkonzentrationen erstellt werden. Die entsprechende Funktionsgleichung liefert dann die unbekannte Proteinkonzentration.

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurden in einer Halbmikroküvette (Sarstedt) 980 µl des Bradford-Reagenzes (1:5 in Wasser verdünnt / BIO-RAD) mit 20 µl der Probe versetzt. Der Inhalt der Küvette wurde homogenisiert und für 5 bis 10 min Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 595 nm (Perkin Elmer, UV /VIS Spectrometer Lambda 20) gemessen. Die Proteinkonzentration konnte dann mit Hilfe einer Eichgeraden ermittelt werden.

### **2.4.2 Konzentrationsbestimmungen von Proteinen über BCA**

Über den BCA-Test (Bicinchinon-Säure-Test / Pierce, Bonn) konnten unbekannte Proteinkonzentrationen colorimetrisch quantifiziert werden. Die BCA-Methode zeichnet sich, im Gegensatz zum Bradford-Test, durch eine hohe Empfindlichkeit und eine geringe Störanfälligkeit gegenüber Detergenzien aus. Lediglich Komplexbildner und

Reduktionsmittel stören die Reaktion, nicht jedoch Detergenzien wie Triton-X. Der Nachweis beruht darauf, dass die in der Probe enthaltenen Proteine im alkalischen, kupferhaltigen Medium das  $\text{Cu}^{+2}$  zu  $\text{Cu}^{+1}$  reduzieren (Biuret-Reaktion). Das einwertige Kupferion bildet mit zwei Molekülen BCA (Bicinchinon-Säure) violette Chelatkomplexe. Durch photometrische Messung der Absorption bei 562 nm kann so mit Hilfe einer durch einen Standard ermittelten Eichkurve die Proteinkonzentration in den zu testenden Proben bestimmt werden. Der BCA-Test wurde mit Hilfe eines BCA Protein Assay Kits von Pierce entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

### **2.4.3 Herstellung zytoplasmatischer Zell-Lysate**

Zur Analyse zytoplasmatischer Proteine in Zell-Lysaten wurden die Zellen in einem Puffer mit physiologischer Salzkonzentration (30 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% Triton X-100; 1 mM PMSF; 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aprotinin; 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Chymostatin; 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Leupeptin; 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Pepstatin A; 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  in PBS) lysiert. Das nicht-ionische Detergenz Triton X-100 im Puffer führt zur Auflösung der Plasmamembran, indem es über seinen hydrophoben Teil in die Lipidmembran der Zelle interkaliert und Lipide sowie Proteine solubilisiert. Zur Lyse wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen in 10  $\mu\text{l}$  Lysepuffer aufgenommen und 15-30 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 15 min bei 14000 rpm und 4°C wurde die lösliche Fraktion in ein frisches Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und die restliche Zelldebris verworfen. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte über einen BCA-Test (Pierce). Die Lysate wurden zur Denaturierung in 5 x Ladepuffer (50 mM Tris-HCl pH 6,8; 200 mM DTT; 10% SDS; 0,25% Bromphenol-Blau; 50% Glycerin) aufgenommen und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. So gewonnene Proteinlysate wurden anschließend über SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und analysiert.

### **2.4.4 Herstellung von Gesamtzellextrakten**

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden je  $10^6$  Zellen in 10  $\mu\text{l}$  eines stark salzhaltigen Lysepuffers (PBS-basierend mit 300 mM NaCl; 2 mM EDTA; 10 mM NaF; 10% Glycerin; 1% Triton X-100; 1 mM PMSF, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aprotinin; 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Leupeptin; 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Pepstatin A; 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Chymostatin; 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) aufgenommen, welcher neben der Solubilisation zytoplasmatischer Proteine auch eine Lyse der Kerne erlaubt. Anschließend wurde mit den Proben wie bei der Herstellung zytoplasmatischer Proteinlysate verfahren.

### 2.4.5 Fraktionierte Zellyse

Mittels dieser Zellyse ist es möglich, die löslichen Bestandteile des Zytoplasmas von den löslichen Bestandteilen des Zellkerns zu separieren, ohne den Zellkern dabei zu zerstören. Puffer A ist ein hypotonischer Puffer, so dass Wasser in die Zelle strömt und diese zum Platzen bringt; dabei bleibt der Zellkern aufgrund seiner stabileren Doppelmembran intakt, lediglich gut lösliche Bestandteile der Kernmembran und assoziierte Proteine können in die zytosolische Fraktion gelangen. Beim zweiten Schritt wird ein hypertoner Puffer zu den Zellkernen gegeben und Wasser strömt aus dem Kern. Dadurch werden lösliche Komponenten aus dem Zellkern extrahiert. Des Weiteren wurden, bedingt durch die bei 410 mM Salz hohe Ionenstärke, auch Zellbestandteile solubilisiert, die unter hypotonen Bedingungen unlöslich waren.

Die, wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, hergestellten Zellpellets wurden abhängig nach Menge der Zellen in Puffer A resuspendiert, 10 min zur Lyse auf Eis inkubiert und 2 min bei 4°C zentrifugiert (2750 rpm, Eppendorffzentrifuge). Der Überstand stellt die zytosolische Fraktion dar. Das Pellet wurde dann mit dem äquivalenten Volumen von Puffer A in Puffer B resuspendiert, für weitere 20 min auf Eis stehen gelassen und erneut zentrifugiert (2 min, 4°C, 13000 rpm, Eppendorffzentrifuge). Der Überstand stellt die Kern-Fraktion dar. Die zytosolische- und die Kern-Fraktion wurden dann mittels SDS-PAGE und Western-Blot weiter untersucht.

#### Puffer A

10 mM Hepes                      pH 7,9  
 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 10 mM KCl  
 0,5 mM DTT  
 0,2 mM PMSF  
 1 µg/ml Aprotinin  
 1 µg/ml Chymostatin  
 1 µg/ml Leupeptin  
 1 µg/ml Pepstatin A  
 0,4 mM NaVO<sub>4</sub>

#### Puffer B

20 mM Hepes                      pH 7,9  
 420 mM NaCl  
 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,2 mM EDTA  
 0,5 mM DTT  
 0,2 mM PMSF  
 1 µg/ml Aprotinin  
 1 µg/ml Chymostatin  
 1 µg/ml Leupeptin  
 1 µg/ml Pepstatin A  
 0,4 mM NaVO<sub>4</sub>

#### 2.4.6 Koimmunpräzipitation von Proteinen über Protein G-Sepharose

Die Koimmunpräzipitation wurde zur gezielten Anreicherung von Proteinen aus Zell-Lysaten und zum Nachweis physiologischer Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt. Bei der Koimmunpräzipitation mittels Protein G-Sepharose wird ausgenutzt, dass an diese über nicht-kovalente Bindungen Antikörper gebunden werden können, mit deren Hilfe anschließend eine Aufreinigung spezifischer Proteine und deren Interaktionspartner in Proteingemischen erreicht werden kann.

Zur Vorbereitung der Koimmunpräzipitation wurde die Protein G-Sepharose mit dem gewünschten Antikörper markiert. Hierzu wurden der Protein G-Sepharose 2-5  $\mu\text{g/ml}$  Antikörper zugesetzt und der Ansatz für 1 h bei RT auf dem Überkopf-Probenrotator inkubiert. Pro Ansatz wurden Gesamtextrakt-Zelllysate aus  $2 \times 10^7$  Zellen auf ein Gesamtvolumen von 1 ml mit Lysepuffer aufgefüllt, mit 20  $\mu\text{l}$  Antikörper-gekoppelter Protein G-Sepharose gemischt und für 4 h bei 4°C auf einem Probenrotator inkubiert. Danach wurden die Proben dreimal mit 750  $\mu\text{l}$  Lysepuffer gewaschen und für 5 min in 1 x Ladepuffer bei 100°C aufgeköcht. Nach Auftrennung auf einem SDS-Polyacrylamidgel wurden die Ansätze über Western Blot weiter analysiert.

#### 2.4.7 Pull-down-Analysen

Um Interaktionspartner für das Gadd45 $\beta$ -Protein zu finden, wurde das GST-Gadd45 $\beta$ -Fusionsprotein an Glutathionsepharose gebunden. Zuvor wurde das Zelllysate mit 20  $\mu\text{l}$  Beads und 10  $\mu\text{g}$  GST für 1 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert (Pierce). Dazu wurde zu 20  $\mu\text{l}$  beads 5-10  $\mu\text{g}$  Fusionsprotein (als Kontrolle 5-10  $\mu\text{g}$  GST) gegeben und mit dem Überstand des *preclears* bei 4°C komplettiert. Die Bindung folgte dann auf einem Überkopfschüttler für mindestens 2 h. Anschließend wurden die Beads für 1 min bei 6000 rpm (Eppendorfzentrifuge) abzentrifugiert und dreimal mit Lysepuffer gewaschen. Die so erhaltenen Beads wurden dann mit 20  $\mu\text{l}$  SDS-Probenpuffer versetzt und bei 96°C für 5 min denaturiert und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

#### 2.4.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, das aus einer aliphatischen Kette von

12 C-Atomen mit einer hydrophilen Sulfatgruppe besteht. Die aliphatische Kette des SDS lagert sich über hydrophobe Wechselwirkungen entlang der Aminosäurenketten der Proteine an. Auf diese Weise bilden sich linear gestreckte SDS-Protein-Komplexe, deren Oberflächen nach außen gerichtete negative Sulfatgruppen aufweisen. Durch die negative Ladung des SDS wird die Eigenladung des Proteins überdeckt (1,4 g SDS / 1 g Protein). Alle Proteine sind damit über ein konstantes Ladung/Masse-Verhältnis vergleichbar. Die Retardierung eines Proteins im Gel ist somit proportional zum Logarithmus der relativen Molekülmasse geworden. Damit kann die relative Molekülmasse eines Proteins anhand eines Protein-Standards ermittelt werden.

Zur Trennung von Proteingemischen im diskontinuierlichen SDS-Gel wurden die Proteine erst über ein 5%-iges Sammelgel (pH 6,8) fokussiert und anschließend über ein 12% oder 15% Trenngel (pH 8,8) aufgetrennt. Für die Elektrophorese wurde das Mini-Protean 3 Cell System von BIO-RAD eingesetzt. Die Gele wurden hierzu vertikal in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt und diese mit Laufpuffer (0,1% SDS; 25 mM Tris; 192 mM Glycin) aufgefüllt. Die Proteinproben wurden mit SDS-Auftragspuffer versetzt, 5 min bei 96°C aufgeköcht und auf das Sammelgel geladen. Die Elektrophorese erfolgte anschließend bei 80 Volt im Sammelgel und 120 bis 180 Volt im Trenngel. Zur Molekulargewichtskontrolle wurde ein vorgefärbter Protein-Größenstandard (Fermentas) verwendet.

|                             | <b>Sammelgel (5%)</b> | <b>Trenngel (12%)</b> | <b>Trenngel (15%)</b> |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                             | 10 ml                 | 30 ml                 | 30 ml                 |
| 30% Acrylamid Mix (BIO-RAD) | 1,7 ml                | 12 ml                 | 14 ml                 |
| Wasser                      | 6,8 ml                | 9,9 ml                | 6,9 ml                |
| 1 M Tris pH 6,8             | 1,25 ml               | -                     | -                     |
| 1,5 M Tris pH 8,8           | -                     | 7,5 ml                | 7,5 ml                |
| 10% SDS                     | 100 µl                | 300 µl                | 300 µl                |
| 10% APS                     | 100 µl                | 300 µl                | 300 µl                |
| Temed                       | 10 µl                 | 12 µl                 | 12 µl                 |

#### 2.4.9 Western Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden für nachfolgende Analysen mittels des „Tank-Blot“-Verfahrens elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran oder eine Polyvinylidenfluorid (PVDF; Amersham Bioscience, Freiburg) übertragen. Dabei wird

ausgenutzt, dass die durch das SDS negativ geladenen Proteine zur Anode und damit aus dem Gel auf die Membran wandern. Dazu wurde in eine mit Transferpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin) gefüllte Blotkammer (BIO-RAD) eine Transfereinheit eingehängt. Die Membran und das aufliegende Gel wurden mit je einem in Transferpuffer getränkten 3MM-Papier (Whatman) sowohl unterschichtet als auch abgedeckt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 100 V und RT. Im Anschluss wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran durch Inkubation in Blockierungslösung (5% Milch; 0,2% Tween-20 in PBS) für 1 h unter leichtem Schütteln abgesättigt. Die Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper (1  $\mu\text{g/ml}$  in Blockierungslösung) erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min in PBST (PBS; 0,2 % Tween-20) gewaschen und dann für 1 h bei RT mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiertem sekundärem Antikörper (100 ng/ml in Blockierungslösung) inkubiert. Nach erneutem Waschen (dreimal in PBST) erfolgte die Detektion. Hierfür wurden die Detektionsreagenzien A und B (ECL / Amersham Bioscience) zu gleichen Teilen gemischt und die Membran für 1 min in der Lösung inkubiert. Nach Exposition des Films (ECL Hyperfilm / Amersham Bioscience) wurde dieser entwickelt (Curix 60 / AGFA, Köln).

#### **2.4.10 Coomassie-Blau-Färbung**

Mittels Coomassie-Blau-Färbung wurden Proteine im SDS-Polyacrylamidgel unspezifisch angefärbt und fixiert. Die Fixierung der aufgetrennten Proteine wurde durch 30-minütige Inkubation des Gels bei RT in einer Färbelösung (0,25 g Coomassie Brilliant Blue; 20% Methanol; 5% Essigsäure) erzielt, die den Triphenylmethan-Textilfarbstoff – Coomassie Brilliant Blue R250 (0,1%) – enthält. Dieser färbt zunächst das gesamte Trenngel blau. Danach wurde das Gel in eine Entfärber-Lösung (20% Ethanol, 10% Essigsäure) überführt und solange bei RT auf dem Schüttler inkubiert bis der Gelhintergrund farblos erschien. Anschließend wurden die Gele in Wasser aufbewahrt und nach elektronischer Speicherung auf dem Geltrockner getrocknet.

#### **2.4.11 Kinase-Test**

Die Kinaseaktivität von p38 kann man *in vitro* durch Zugabe von  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ ATP messen, da die Kinasen  $\gamma$ -Phosphatgruppen von ATP auf sein Substrat überträgt. Dafür wurde gereinigte und aktivierte p38-Kinase mit dem jeweiligen Substrat in einem Reaktionsansatz zusammengebracht. Der Reaktionsmix enthielt für jede Probe 100  $\mu\text{M}$  ATP, 1  $\mu\text{g}$  geeignetes Substrat, 20

$\mu$ l Kinasepuffer (10 mM  $MgCl_2$ , 25 mM  $\beta$ -Glycerophosphat, 25 mM HEPES pH 7.5, 5 mM Benzamidin, 0,5 mM Dithiothreitol (DTT) und 1 mM Natriumorthovanadat) und 5  $\mu$ Ci  $^{32}P$ - $\gamma$ ATP. Jeder Reaktionsansatz wurde dann für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 6  $\mu$ l 5x SDS-Probenpuffer (155 mM Tris-HCL pH 6.8, 5% SDS, 50% Glycerin, 25%  $\beta$ -Mercaptoethanol) beendet und anschließend bei 96°C für 5 min denaturiert. Die Proben wurden dann zur weiteren Analyse auf ein SDS-Gel aufgetragen, welches nach der Elektrophorese getrocknet wurde. Die phosphorylierten Proteine wurden mittels Röntgenfilm (ECL Hyperfilm / Amersham Bioscience) detektiert.

## **2.5 Herstellung und Aufreinigung rekombinanter Proteine**

### **2.5.1 Expressionsstudien rekombinanter Proteine**

Vor Beginn der Aufreinigung rekombinanter Proteine wurden Expressionsstudien in kleinerem Maßstab durchgeführt, um sowohl den Zeitpunkt der höchsten Proteinexpression in der Zelle als auch die Lokalisation des gewünschten Fusionsproteins zu bestimmen. Hierzu wurden entsprechende Bakterien des Stammes BL-21 (DE3) Gold in 5 ml Antibiotikahaltigem LB-Medium inokuliert. Nach Inkubation der Bakterien über Nacht bei 37°C und 220 rpm (Certomat Bs-1 / B.Braun Biotech International) wurde die Absorption der Bakteriensuspension bei 600 nm (Perkin Elmer, UV/VIS Spectrometer Lambda 20) ermittelt und die Bakteriendichte auf eine  $OD_{600}$  von 0,5 mit frischem LB-Medium eingestellt. Nach einem weiteren 30-minütigen Inkubationsschritt wurde in der Hälfte des Ansatzes die Proteinexpression mit 0,2–0,5 mM Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid (IPTG / Roth) induziert. Während der Induktion der Proteinexpression wurden in definierten Zeitintervallen aus dem stimulierten sowie dem unstimulierten Ansatz zur Kontrolle Proben entnommen. Die entnommenen Proben wurden für 10 min bei 6000 rpm und 4°C abzentrifugiert und die Bakterienpellets in 100  $\mu$ l PBS aufgenommen. Zum Verdau der bakteriellen Zellwand wurde den Proben 1,5 mg/ml Lysozym zugesetzt und diese für 30 min bei 4°C inkubiert. Der Bakterienaufschluss erfolgte über dreimaliges Schockgefrieren der Bakterien in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen der Zellen bei 37°C im Wasserbad (A 100 / Landa). Durch Zugabe von 0,1  $\mu$ g/ml DNase und Inkubation für 30 min bei RT auf dem Schüttler (Welabo) wurde die Bakterien-DNA verdaut. Die Proben wurden im Folgenden für 30 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration über den BCA-Test wurden die

einzelnen Ansätze in 5 x Ladepuffer resuspendiert und 5 min bei 100°C gekocht. Zur Analyse der Proteinexpression wurden 30-50 µg der Proben auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und so die löslichen Proteine über Coomassie-Blau-Färbung detektiert. Um die unlöslichen Proteine zu solubilisieren wurden die Proteinpellets in 1 x Ladepuffer aufgeköcht und ebenfalls über SDS-Page und Coomassie-Blau-Färbung analysiert.

### **2.5.2 Expression rekombinanter Proteine**

Für die Induktion der Proteinexpression und anschließende Aufreinigung des rekombinanten Proteins wurden 200-800 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium mit den entsprechenden Bakterien des Stammes BL-21 (DE3) Gold inokuliert und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Die Bakterienkultur wurde mit frischem LB auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 verdünnt und für weitere 30 min weiter inkubiert. Die Proteinexpression des gewünschten Fusionsproteins wurde mit IPTG in der aus den Ergebnissen der Expressionsstudien ermittelten Konzentration und unter den entsprechenden optimalen Bedingungen induziert. Nach der Induktion wurden die Bakterienzellen für 10 min bei 6000 rpm (SLA 3000 Rotor / Sorvall) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 40 ml PBS resuspendiert. Die Bakterien wurden über Ultraschall (1 min, 70% Power / Sonopuls Bandelin) aufgeschlossen und für 1 h bei 20000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Fusionsprotein im Weiteren je nach Lokalisation aus der löslichen oder der unlöslichen Phase aufgereinigt.

### **2.5.3 Dialyse**

Die Dialyse ist eine sehr schonende Methode zum Umpuffern. Dabei ist es wichtig Schwermetallionen durch Vorbehandlung des Dialyseschlauches zu entfernen. Hierzu wurde der Dialyseschlauch vor Erstgebrauch für 2 h bei 60°C in 1M NaCO<sub>3</sub> und 20 mM EDTA behandelt. Nach kurzem Waschen mit Wasser wurde der Schlauch zur Dialyse verwendet. Dabei wurde die Probe gegen das 100fache Volumen Dialysepuffer bei 4°C für mindestens 2 Stunden dialysiert, anschließend die sich im Schlauch befindliche Probe entnommen und für weitere Analysen verwendet.

#### **2.5.4 Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels GSH-Affinitätschromatographie**

Die Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie (Amersham Bioscience) wurde zur Aufreinigung mit Glutathion S-Transferase (GST)-markierter Proteine eingesetzt. Die Aufreinigung GST-markierter Proteine aus Proteingemischen erfolgt über die Bindung der Glutathion-S-Transferase an ihr Substrat Glutathion, welches wiederum durch Kopplung an Sepharose immobilisiert ist. Nach Trennung des gewünschten Proteins vom Proteingemisch kann dieses anschließend durch die Zugabe von freiem, reduziertem Glutathion, welches kompetitiv an die Glutathion-S-Transferase bindet, eluiert werden.

Zur Aufreinigung GST-markierter Proteine aus Proteingemischen wurde dieses mittels HPLC mit einer Flussrate von 0,7 ml/min über Nacht auf eine Glutathion-Sepharose-Säule (XK 16/20 / Pharmacia) mit 5 ml Gelvolumen aufgetragen. Nach Durchlauf der Auftragslösung wurde die Säule mit PBS gespült, um unspezifisch gebundene Proteine auszuwaschen. An der Säule spezifisch gebundene Proteine wurden mit einem Glutathion-haltigen Elutionspuffer (50 mM Tris; 40 mM reduziertes Glutathion; pH 8,0) eluiert und das Eluat anschließend mittels SDS-PAGE und Coomassie-Blau-Färbung analysiert. Bei erfolgreicher Auftrennung wurde das aufgereinigte Protein gegen PBS über Nacht bei 4°C dialysiert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### **2.5.5 Aufreinigung 6xHis-markierter Proteine mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie**

6xHis-markierte Proteine wurden über Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA / Qiagen) Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die in der 6xHistidin-Markierung enthaltenen Imidazolringe sind in der Lage, an Nickel-Ionen zu binden, die ihrerseits durch die stabile Bindung an eine Sepharose-gekoppelte NTA-Matrix immobilisiert sind. Da die Interaktion zwischen der Histidin-Markierung und dem Ni-NTA nicht von der Tertiär-Struktur des aufzureinigenden Proteins abhängt, ermöglicht dies auch eine Aufreinigung des rekombinanten Proteins unter denaturierenden Bedingungen. Die Elution des aufzureinigenden Proteins erfolgt über einen sauren Imidazol-haltigen Puffer. Durch die pH-Reduktion werden die Histidin-Reste protoniert und können somit nicht mehr an die Nickel-Ionen binden. Zugewetztes, freies Imidazol kompetitiert zusätzlich um die Nickel-Bindungsstellen und beschleunigt damit die Elution.

Zur Aufreinigung rekombinanter Proteine über Ni-NTA wurden 200 ml einer Übernachtskultur der entsprechenden Bakterien des Stammes BL-21 (DE3) Gold mit frischem LB auf eine  $OD_{600}$  von 0,5 verdünnt und nochmals für 30 min inkubiert. Die Expression des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von 2 mM IPTG und weiterer Inkubation des Ansatzes für 4 h bei 37°C induziert. Die Bakteriensuspension wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 6000 rpm (SLA 3000 Rotor / Sorvall) pelletiert und in 30 ml Lyse-Puffer (100 mM  $NaH_2PO_4$ ; 8 M Harnstoff; 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) aufgenommen. Die Zellen wurden mit Ultraschall (4 x 1 min, 70% Power / Sonopuls Bandelin) aufgeschlossen und dann für 1 h bei 20000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde nun mindestens 1 h mit 5 ml äquilibrierter Ni-Sepharose bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend auf eine Säule (Amersham Biosciences) gegeben und zweimal mit je 15 ml Wasch-Puffer (100 mM  $NaH_2PO_4$ ; 8 M Harnstoff; 10 mM Tris/HCl, pH 6,3) gewaschen. Zur Elution spezifisch gebundener Proteine wurde 20 ml Elutions-Puffer (100 mM  $NaH_2PO_4$ ; 8 M Harnstoff; 250 mM Imidazol; 10 mM Tris/HCl, pH 4,5) zugegeben und nach Durchlauf in 2-ml-Fractionen gesammelt. Die Proteinkonzentrationen in den einzelnen Fractionen wurden über den Bradford-Test ermittelt. Zur Analyse der Aufreinigung wurde jeweils eine Probe in 5 x Ladepuffer aufgenommen, 5 min bei 100°C gekocht und anschließend auf einem SDS-Polyacrylamidgel und nachfolgender Coomassie-Blau-Färbung analysiert.

### **2.5.6 Renaturierung von rekombinanten Fusionsproteinen**

Die Überexpression rekombinanter Proteine in bakteriellen Expressionssystemen führt oft zur Bildung Protease-resistenter Aggregate aus missgefaltetem Protein, sogenannten Einschlusskörpern oder *inclusion bodies* (IBs). Diese aggregieren oftmals im Zytoplasma des Bakteriums, seltener auch im Periplasma, und sind vermutlich insbesondere auf die limitierende Anzahl an Faltungshelfern, wie Chaperone, in der Zelle zurückzuführen. Zur Aufreinigung von Proteinen aus unlöslichen Einschlusskörpern wurden diese erst solubilisiert und die denaturierten Proteine anschließend gefaltet.

Das gelöste und aufgereinigte Fusionsprotein (siehe Abschnitt 2.5.7) wurde dann mit Hilfe einer sequenziellen Dialyse renaturiert. Hierzu erfolgte die Dialyse im ersten Schritt gegen 4 M Harnstoff in PBS. Dann wurde jeweils die Hälfte des Dialysepuffers verworfen und mit

PBS aufgefüllt. Dies wurde dreimal wiederholt. Im letzten Schritt erfolgte die Dialyse gegen reines PBS.

## **2.6. Produktion polyklonaler Antikörper im Huhn**

### **2.6.1 Immunisierung**

Zur Immunisierung wurden zwei Hühner verwendet. Als Antigen diente rekombinantes, über Affinitätschromatographie aufgereinigtes His-Gadd45 $\beta$ . Das Antigen wurde zusammen mit TiterMax Gold Adjuvans (Sigma) *subkutan* injiziert. Dies bewirkt eine verlangsamte Antigenfreisetzung und zusätzlich eine Aktivierung akzessorischer Zellen. 200  $\mu$ g Fusionsprotein wurden in 500  $\mu$ l des Adjuvans emulgiert (PBS/TiterMax-Emulsion, 1:1, v/v) und *subkutan* injiziert. Zwei weitere *subkutane* Immunisierungen mit je 200  $\mu$ g Fusionsprotein folgten im Abstand von je 14 Tagen. Ein Tag nach der letzten Immunisierung wurden die Eier gesammelt.

### **2.6.2 Isolierung von polyklonalen Hühner-Antikörpern**

Polyklonale Hühner-Antikörper (IgY-Ak) wurden nach Polson *et al.* (1985) aus dem Hühnereigelb gereinigt. Um die IgY-Ak von den restlichen Proteinen zu isolieren, wurden Fällungsschritte mit PEG und Ammoniumsulfat durchgeführt.

Das Eigelb wurde vom Eiklar getrennt und das Dotter-Volumen in einem Glasmesszylinder bestimmt. Ein Volumen PBS wurde hinzu gegeben und die Lösung für 10 min gerührt. Zur Präzipitation wurden zu einem Teil Dotterlösung ein Teil 7% (w/v) PEG-6000 Lösung hinzu gegeben und 20 min gerührt. Die Suspension wurde zentrifugiert (20 min/12000g/4°C) und der Überstand abgenommen.

Der Überstand, welcher die IgY Ak enthält, wurde filtriert und das Volumen bestimmt. Zum Fällen der IgY Ak wurde 8,5% PEG-6000 zugegeben und durch Rühren gelöst. Die Suspension wurde zentrifugiert (20 min/12000g/4°C) und das Pellet, welches die IgY Ak enthält, in 2,5-fachem Dottervolumen eiskaltem PBS aufgenommen. Zum Aussalzen und zur weiteren Reinigung der IgY Ak wurde 40% (w/v) Ammoniumsulfat zugegeben und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend drei Mal mit einer 40% Ammoniumsulfatlösung gewaschen. Danach wurde das Pellet in PBS aufgenommen und über Nacht gegen PBS bei 4°C dialysiert.

## **2.7. Histochemische Untersuchungen**

### **2.7.1 Herstellung von Paraffinschnitten**

Die Mäuse wurden durch CO<sub>2</sub>-Asphyxiation getötet, mit 70%-igem Ethanol desinfiziert und die Thymi entnommen. Die präparierten Thymi wurden dann über Nacht in 4% Paraformaldehyd fixiert und durch eine aufsteigende Methanolreihe (25%, 50%, 75%, 100%) wurde das Gewebe entwässert. Zur vollständigen Entfernung des Alkohols wurde dreimal 15 min in Xylol inkubiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Nach Aushärtung des Blocks wurde mit einem Rotationsmikrotom (Leitz, Wetzlar) 12 µm dünne Paraffinschnitte hergestellt. Die Schnitte wurden anschließend auf sialinisierte Objektträger überführt (Super Frost Plus, Merck) und trockneten über Nacht bei 60 C° im Trockenschrank. Die Lagerung der Schnitte und der Blöcke erfolgte bei 4°C.

### **2.7.2 *In situ* Hybridisierung**

Die Paraffinschnitte wurden mit Xylol entparaffiniert. Zur Rehydrierung wurde eine absteigende Alkoholreihe (96%, 80%, 70% je 3 Minuten) verwendet und abschließend 20 min mit PBS gewaschen. Zur Andauung der Proteinstrukturen wurden die Schnitte mit 20 µg/ml Proteinkinase K behandelt (15 min, 37°C) Die Enzymreaktion wurde durch eine 0,2% Lösung gestoppt. Anschließend wurden die Schnitte mit einer 4%igen Paraformaldehyd-lösung (20min, 4°C) fixiert. Daraufhin erfolgte eine Vorinkubation der Schnitte bei 70°C für 2 h in Hybridisierungslösung (50% Formamid, 10% Dextransulfat, 2x SSC (0,15 M Natriumchlorid, 0,015 M Natriumcitrat, 0,02% bovines Serumalbumin, Ficoll 4000 und Polyvinylpyrrolidon). Nun erfolgte die eigentliche Hybridisierung mit der Gadd45β-spezifischen DIG-markierten Sonde (1 ng/µl) über Nacht bei 70°C. Nachdem die Schnitte mehrmals gründlich mit 2 x SSC gewaschen worden waren, erfolgte eine Behandlung mit RNase A (30 min, 37°C), um Hintergrundfärbung durch überschüssige RNA-Sonde zu vermeiden. Anschließend wurden die Schnitte mit Blockierungslösung (Boehringer, Ingelheim) bedeckt. Die Sonde konnte dann durch das Anti-Digoxigenin-System (Roche, Mannheim) mit Hilfe der Farbstoffe NBT/BZIP sichtbar gemacht werden. Die Anwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### **2.7.3 Cortexfärbung im Thymus**

Zytokeratine kommen fast ausschließlich in Epithelzellen vor. Da der Thymuscortex, im

Gegensatz zur Medulla, aus einer Vielzahl von Epithelzellen besteht, kann der Cortex durch eine spezifische Färbung der Zytokeratine von der Medulla unterschieden werden. Hierzu wurde ein anti-Pan-Zytokeratin Antikörper (Sigma) verwendet.

Die wie in Abschnitt 2.7.2 behandelten Schnitte wurden zusätzlich wie folgt behandelt: Die Schnitte wurden für 3 Stunden mit 30 µg/ml Zytokeratinantikörper bei RT inkubiert. Anschließend wurde dreimalig mit PBS-Tween für 5 min gewaschen. Dann wurden die Schnitte mit dem StreptAB complex/HRP Duet System von Dakocytomation nach Herstellerangaben inkubiert. Um das Zytokeratin sichtbar zu machen, erfolgte abschließend eine Färbung mit 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) für 30 min und eine Einbettung in Aquatex (Merck, Darmstadt).

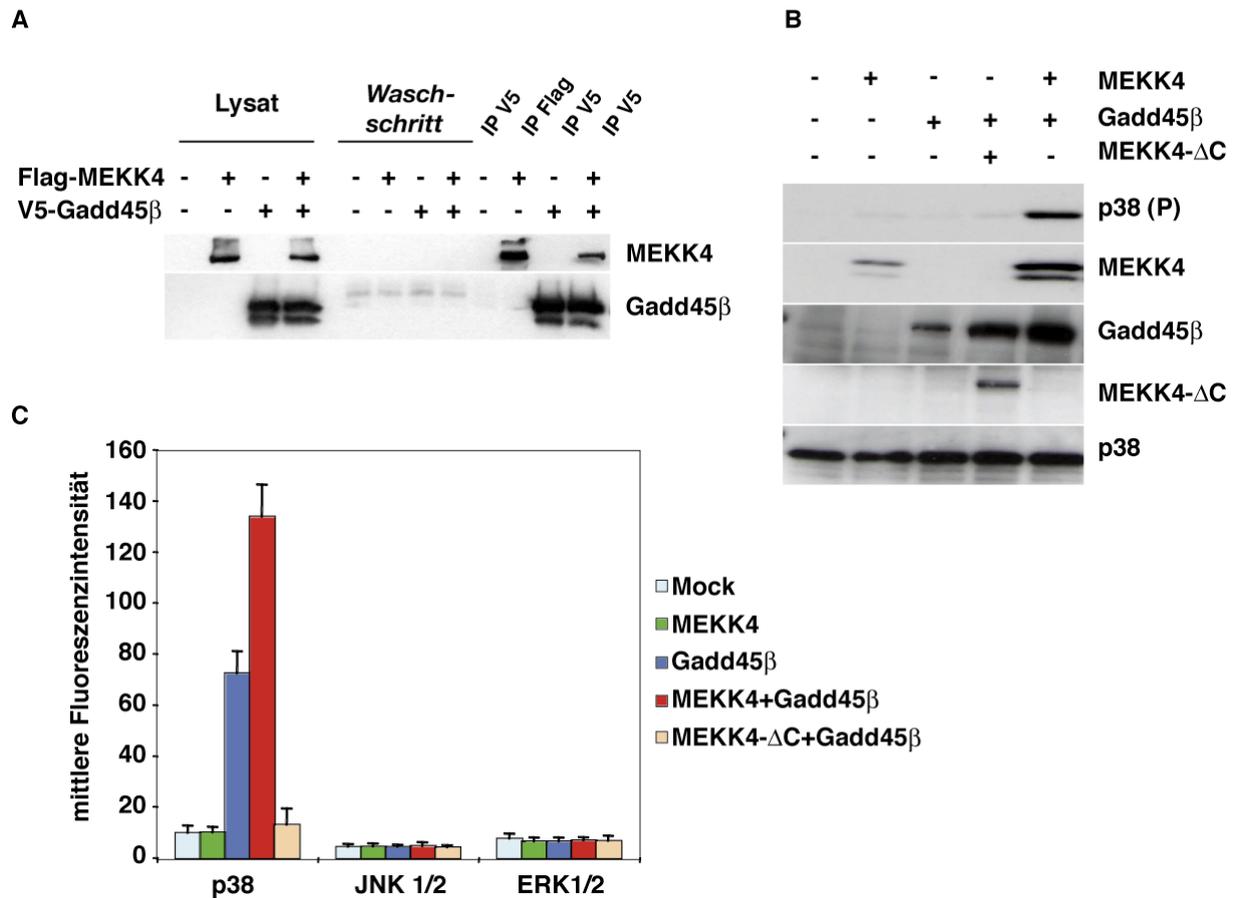
### III. Ergebnisse

#### 1 Der Gadd45 $\beta$ /MEKK4-Signalweg in der Autophagie

##### 1.1 Spezifische Interaktion von Gadd45 $\beta$ und MEKK4

Für die humanen Proteine Gadd45 $\beta$  und MEKK4 wurde beschrieben, dass sie miteinander interagieren und die Stresskinase p38 aktivieren können. Gadd45 $\beta$  bindet an MEKK4 und löst eine Konformationsänderung von MEKK4 aus, so dass MEKK4 in seine aktive Form überführt wird. Aktivierte MEKK4 ist in der Lage MKK3 bzw. MKK6 zu phosphorylieren und somit die MAP-Kinasenkaskade in Gang zu setzen und letztlich p38 zu aktivieren. Diese Interaktion war bislang noch nicht in der Maus verifiziert. Deshalb wurde versucht die Interaktion von Gadd45 $\beta$  und MEKK4 auch mit den Mausproteinen zu bestätigen.

Wenn Gadd45 $\beta$  und MEKK4 in der Zelle direkt miteinander interagieren oder in einem Proteinkomplex vorliegen, sollte es möglich sein, diese beiden Proteine durch Immunpräzipitation (IP) aus dem Zelllysate zu isolieren. Hierzu wurden NIH/3T3-Zellen transient mit Plasmiden kotransfiziert, die V5 markiertes Gadd45 $\beta$ - und Flag-markiertes MEKK4 exprimieren. Die IP wurde entweder mit einem V5- oder einem Flag spezifischen Antikörper durchgeführt, um die gegenseitige Bindung der beiden Proteine unabhängig von dem jeweiligen Antikörper zu zeigen. Wie in Abbildung 7a zu sehen ist, kann durch die IP eines der beiden Proteine in kotransfizierten Zellen, jeweils das andere Protein isoliert werden und so im Western-Blot nachgewiesen werden. Die als Kontrolle dienenden Einfachtransfektionen mit dem V5-Gadd45 $\beta$ -, dem Flag-MEKK4 oder dem V5-Leer-Vektor mit der entsprechenden Immunpräzipitation zeigen keine MEKK4- bzw. Gadd45 $\beta$ -Bande. Somit wurde die Spezifität der IP gewährleistet und gleichzeitig die Abhängigkeit der Präzipitation von MEKK4 durch Gadd45 $\beta$  belegt.



**Abbildung 7: Interaktionsstudien der Mausproteine von Gadd45 $\beta$  und MEKK4.** (A) Nach transienter Transfektion der angezeigten DNA-Konstrukte in NIH/3T3-Zellen erfolgte in den Zelllysaten entweder eine IP gegen V5 oder gegen Flag mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern. Anschließend wurde eine Western-Blot-Analyse mit diesen Antikörpern durchgeführt. (B) Nach transienter Transfektion mit den angezeigten DNA-Konstrukten in NIH/3T3-Zellen erfolgte eine Analyse der gezeigten Proteinen mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern im Western-Blot (V5: Gadd45 $\beta$ , Flag: MEKK4, Myc: MEKK4 $\Delta$ C). p38 diente als Ladekontrolle. (C) CBA-Analyse von transient transfizierten NIH/3T3-Zellen mit den angezeigten Plasmiden. Die Abbildung zeigt den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

## 1.2 Spezifische Aktivierung von p38 durch Gadd45 $\beta$ und MEKK4

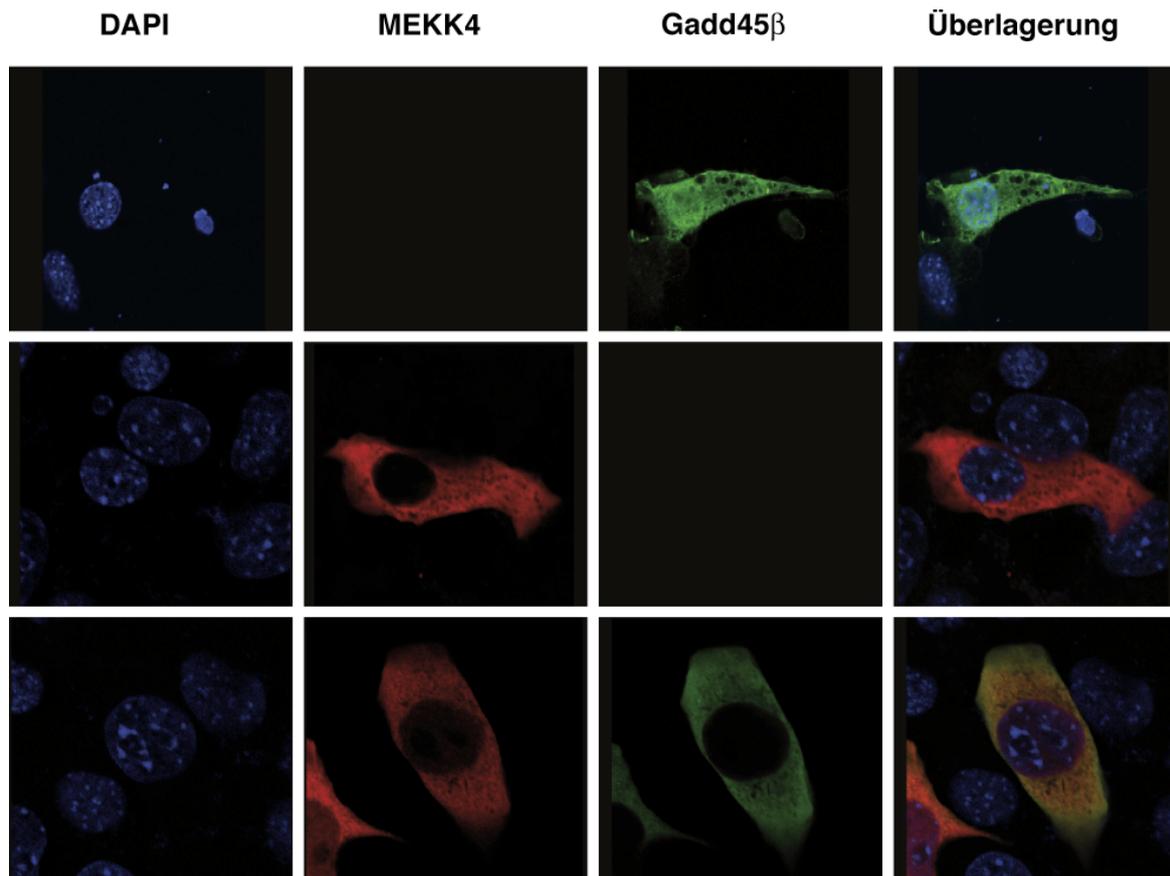
Wie aus der Literatur hervorgeht (Takekawa und Saito, 1998), aktivieren die humanen Proteine MEKK4 und Gadd45 $\beta$  die MAP-Kinasen JNK und p38. Deshalb wurde versucht zu klären, ob die Mausproteine von MEKK4 und Gadd45 $\beta$  in der Lage sind die MAP-Kinase p38 zu aktivieren. Hierzu wurden NIH/3T3-Zellen mit Konstrukten, die V5 markiertes Gadd45 $\beta$  und Flag markiertes MEKK4 exprimieren, transfiziert. Zusätzlich diente eine MEKK4-Variante, der die Kinasedomäne fehlt und somit nicht in der Lage ist, ihr Substrat zu phosphorylieren, als Negativkontrolle (MEKK4- $\Delta$ C). Wie in Abbildung 7b zu erkennen ist, kam es in den mit Gadd45 $\beta$  und MEKK4 kotransfizierten Zellen zu einer starken Phosphorylierung von p38. Demgegenüber zeigten die nicht oder einzeln mit Gadd45 $\beta$  und

MEKK4- $\Delta$ C transfizierten Kontrollzellen keine Aktivierung von p38. Die Aktivierung von p38 ist also abhängig von Gadd45 $\beta$  und MEKK4.

Es stellte sich die Frage, ob die Aktivierung von MEKK4 durch Gadd45 $\beta$  an MEKK4 lediglich p38 aktiviert oder ob es auch zu einer Aktivierung von anderen MAP-Kinasen, wie die oben erwähnte JNK oder ERK, führt. Hierzu wurde in gleicher Weise NIH/3T3 Zellen mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert und auf die Aktivierung der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK, mit Hilfe eines CBA-Tests, hin untersucht. Der CBA-Test ist in der Lage, simultan die Phosphorylierung der MAP-Kinasen zu messen (siehe Kapitel 2.3.2). Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 7c dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass p38 in den mit MEKK4 mit Gadd45 $\beta$  kotransfizierten Zellen stark phosphoryliert wird, aber gleichzeitig nur eine basale Phosphorylierung von JNK bzw. ERK nachzuweisen ist. Die mit Gadd45 $\beta$  und MEKK4- $\Delta$ C kotransfizierten Zellen zeigen eine bis auf das Basalniveau reduzierte Phosphorylierung von p38, während mit Gadd45 $\beta$  einzel-transfizierte Zellen eine erhöhte Phosphorylierung von p38 zeigen, allerdings deutlich unter der Menge von mit MEKK4 mit Gadd45 $\beta$  kotransfizierten Zellen bleiben. Dass es in den nur mit Gadd45 $\beta$  transfizierten Zellen zu einer erhöhten p38 Phosphorylierung kommt, ist auf das in den NIH/3T3-Zellen vorkommende endogene MEKK4 zurückzuführen (Diplomarbeit, Eric Keil, HHU). Diese Experimente zeigen, dass die Aktivierung von p38 in den NIH/3T3-Zellen in Abhängigkeit von koexprimiertem Gadd45 $\beta$  und MEKK4 steht. Des Weiteren führt koexprimiertes Gadd45 $\beta$  und MEKK4 in den NIH/3T3-Zellen nicht zur Phosphorylierung der MAPK JNK und Erk.

### 1.3 Subzelluläre Lokalisation von Gadd45 $\beta$ und MEKK4

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzuntersuchungen wurde nun versucht die subzelluläre Lokalisation von Gadd45 $\beta$  und MEKK4 in einer Mauszelllinie zu bestimmen. Hierzu wurden NIH/3T3-Zellen transient entweder mit den Plasmiden für V5 markiertem Gadd45 $\beta$  oder HA markiertem MEKK4 einzeln oder zusammen transfiziert. Die Abbildung 8 zeigt, dass einzeln überexprimiertes V5-Gadd45 $\beta$  sowohl im Zellkern als auch im Zytosol zu finden war, während einzeln überexprimiertes HA-MEKK4 ausschließlich im Zytosol der Zelle lokalisiert war. In Zellen, die sowohl V5-Gadd45 $\beta$  als auch HA-MEKK4 exprimieren, kommt es zu einer Veränderung der Lokalisation von V5-Gadd45 $\beta$ . Es ist nun überwiegend im Zytosol zu finden, während hingegen die Lokalisation von MEKK4 unverändert bleibt. Des Weiteren ist



**Abbildung 8: Die subzelluläre Lokalisation von Gadd45 $\beta$  und MEKK4.** NIH/3T3-Zellen wurden transient mit den angezeigten Plasmiden transfiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt (V5: Gadd45 $\beta$ , Flag: MEKK4). Zur Lokalisation des Zellkerns erfolgte eine Färbung mit DAPI (blau).

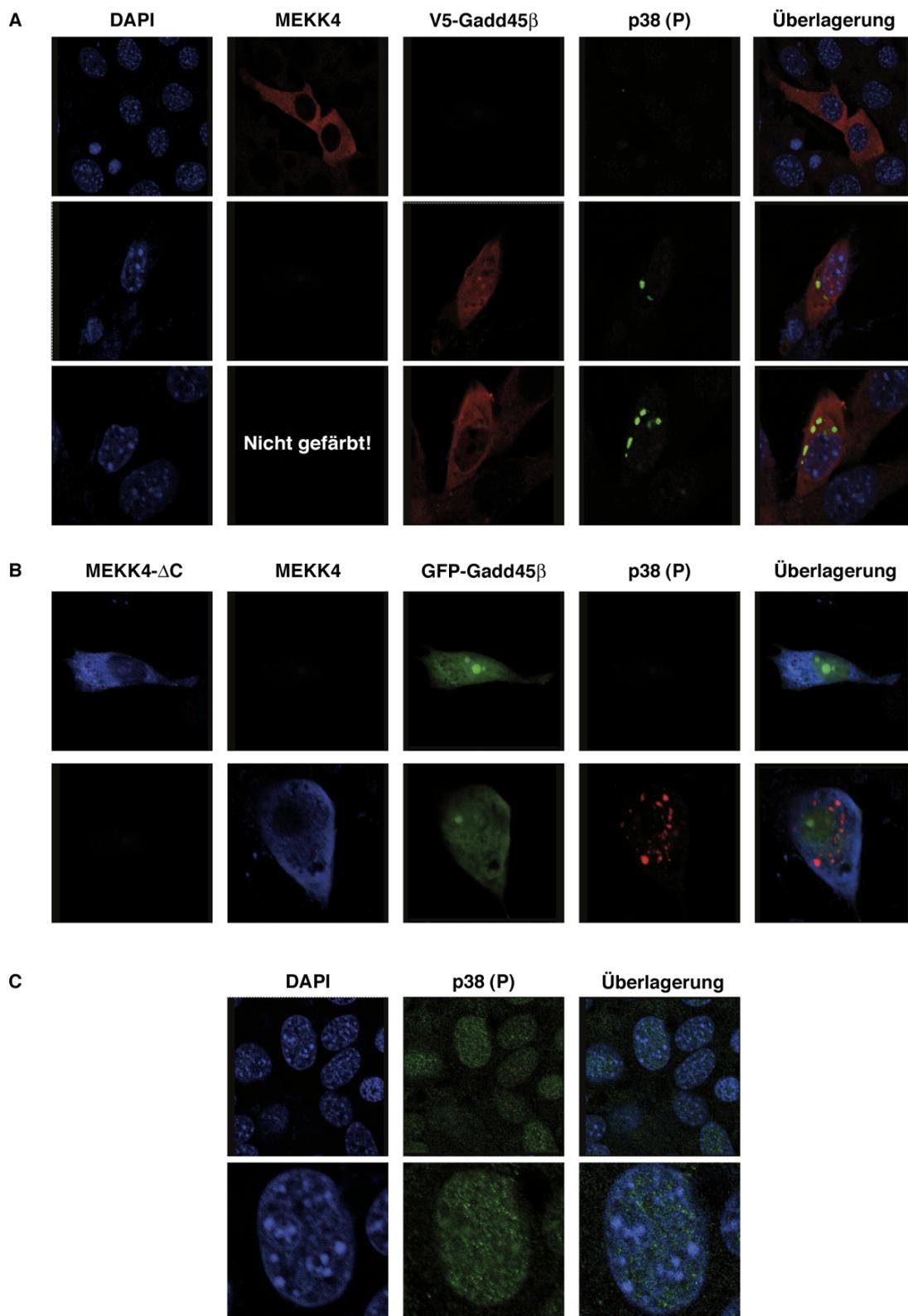
eine fast vollständige Kolo­kalisierung im Zy­tosol von V5-Gadd45 $\beta$  und HA-MEKK4 in kotransfizierten Zellen zu erkennen. Diese Ergebnisse deuten ebenfalls auf eine Interaktion der beiden Proteine hin und bestätigen so die weiter oben beschriebenen Resultate.

#### 1.4 Die Aktivierung von p38 durch Gadd45 $\beta$ /MEKK4 führt zu einer zytosolischen Lokalisation von aktivierter p38

Aus den vorangegangenen Experimenten ging hervor, dass eine Koexpression von Gadd45 $\beta$  und MEKK4 die MAPK p38 spezifisch aktiviert. Daher würde die Erui­erung der subzellulären Lokalisation von aktivierter p38 möglicherweise Aufschluss über den physiologischen Kontext dieser Signaltransduktion geben. Denn die subzelluläre Lokalisation von aktivierter p38 ist abhängig vom physiologischen Kontext, weil die Lokalisation in direktem Zusammenhang mit dem zu aktivierenden Substrates von p38 steht. Es gibt sowohl Berichte, nach denen p38 nach Aktivierung im Zellkern lokalisiert ist und hier beispielsweise

Transkriptionsfaktoren aktiviert, als auch Belege dafür, dass aktivierte p38 im Zytoplasma nachzuweisen ist und hier Substrate wie andere Proteinkinasen aktiviert (Gaestel, 2008; Zarubin und Han, 2005).

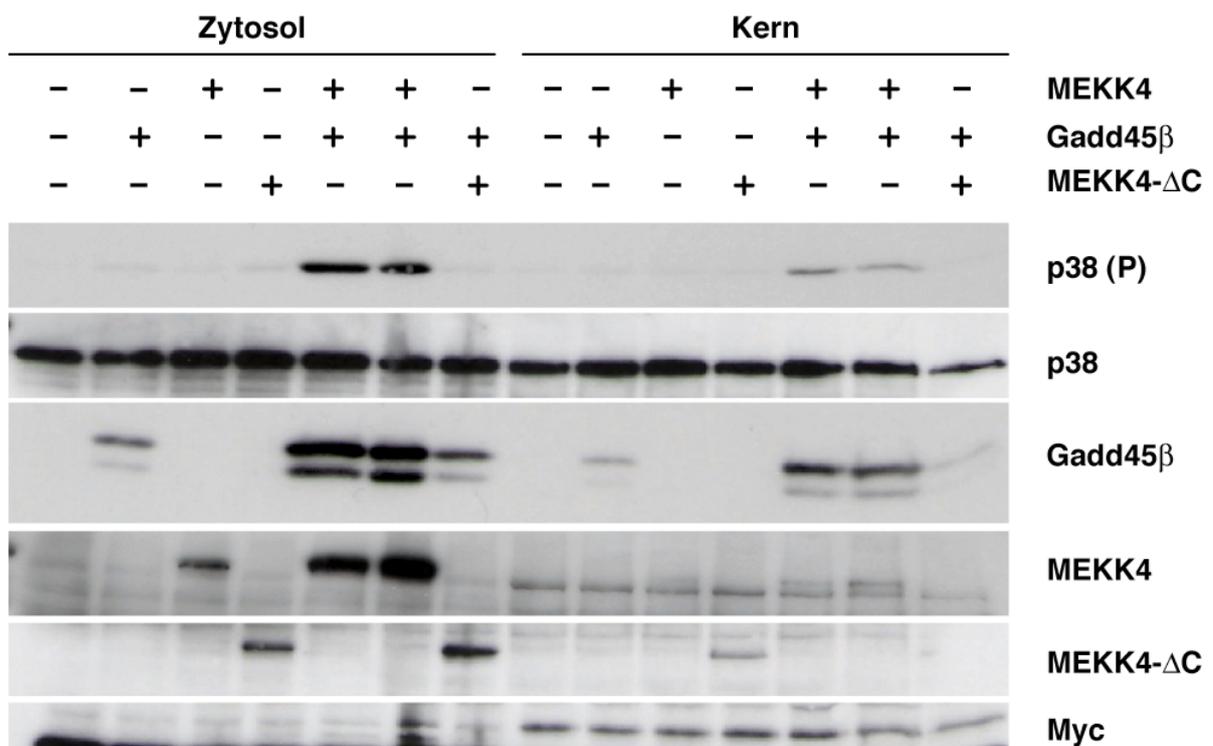
Deshalb wurde nun versucht, die subzelluläre Lokalisation von phosphorylierter p38 in NIH/3T3-Zellen nach Überexpression von Gadd45 $\beta$  und MEKK4 zu ermitteln. Hierzu wurden NIH/3T3-Zellen transient mit Plasmiden transfiziert, die V5-markiertes Gadd45 $\beta$  und HA-markiertes MEKK4 kodieren. Aufgrund des Mangels von geeigneten Zweitantikörpern für die Immunfluoreszenz standen nur maximal drei Farben für die Detektion von intrazellulären Strukturen zur Verfügung. Da aber für die Färbung von Zellkern, p38(P), Gadd45 $\beta$  und MEKK4 vier Farben vonnöten wären, diente die Translokation von Gadd45 $\beta$  vom Zellkern in das Zytoplasma, infolge der gleichzeitigen Überexpression von Gadd45 $\beta$  und MEKK4, als Hinweis für die Expression von MEKK4. Daher konnte auf eine eigene Färbung von MEKK4 verzichtet werden. Abbildung 9a zeigt, dass in den mit Gadd45 $\beta$  und MEKK4 kotransfizierten Zellen p38 im Zytoplasma in punktförmigen Strukturen lokalisiert ist. Zur Verifizierung dieses Befundes wurde auf die Färbung des Zellkerns verzichtet und zusätzlich als Negativkontrolle MEKK4- $\Delta$ C verwendet. Da in dieser Konfiguration die Detektion von MEKK4 bzw. MEKK4- $\Delta$ C in blau erfolgte, wurde aufgrund technischer Zwänge statt V5-markiertes GFP-markiertes Gadd45 $\beta$  exprimiert. Bei der Verwendung von GFP-Gadd45 $\beta$  bei gleichzeitiger Überexpression von MEKK4 erfolgte keine Veränderung der Lokalisation von GFP-Gadd45 $\beta$  aus dem Zellkern in das Zytoplasma. Jedoch zeigt sich auch hier, dass in mit Gadd45 $\beta$  und MEKK4 kotransfizierten Zellen die phosphorylierte p38 in punktförmigen Strukturen lokalisiert ist. Demgegenüber die Koexpression von Gadd45 $\beta$  und MEKK4- $\Delta$ C zu keiner Phosphorylierung führt (Abbildung 9b). Im Gegensatz dazu konnte eine nukleäre Lokalisation von aktivierter p38 nach UV-Bestrahlung beobachtet werden (Abbildung 9c). Die Bestrahlung von Zellen mit UV ist ein bekannter Stimulus, um p38 zu aktivieren (Jinlian et al., 2007) und diente als Kontrollexperiment.



**Abbildung 9: Die subzelluläre Lokalisation von phosphorylierter p38.** (A, B) NIH-3T3-Zellen wurden transient mit den angezeigten Plasmiden transfiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt (V5: Gadd45 $\beta$ , Flag: MEKK4, Myc: MEKK4 $\Delta$ C). (A) Zur Lokalisation des Zellkerns erfolgte eine Färbung mit DAPI (blau). Aufgrund von technischen Gegebenheiten konnte keine Färbung von MEKK4 in mit Gadd45 $\beta$  und MEKK4 kotransfizierten Zellen erfolgen. (C) NIH-3T3-Zellen wurden mit UV-Licht stimuliert, anschließend fixiert und mit phospho-spezifischen p38 Antikörper gefärbt (grün). Zur Lokalisation des Zellkerns erfolgte eine Färbung mit DAPI (blau).

Zur Bestätigung der subzellulären Lokalisation von p38 wurde nun additiv eine weitere Methode angewendet, um die subzelluläre Lokalisation von Proteinen zu detektieren. Hierzu wurden in gleicher Weise wie zuvor NIH/3T3-Zellen transient transfiziert und mit Hilfe der fraktionierten Zelllyse wurden zytosolische von nukleären Proteinen getrennt. Anschließend erfolgte eine Western-Blot-Analyse von p38, MEKK4- $\Delta$ C, Gadd45 $\beta$  und MEKK4. Der Transkriptionsfaktor Myc diente als Zellkernmarker. Das Ergebnis bestätigt die Befunde der Immunfluoreszenz-Experimente (Abbildung 10). Auch ist zu beobachten, dass es durch die Koexpression von Gadd45 $\beta$  und MEKK4 zu einer Phosphorylierung von p38 fast ausschließlich im Zytosol kommt, während inaktive p38 sowohl im Zytosol als auch im Zellkern in äquivalenten Mengen zu finden ist.

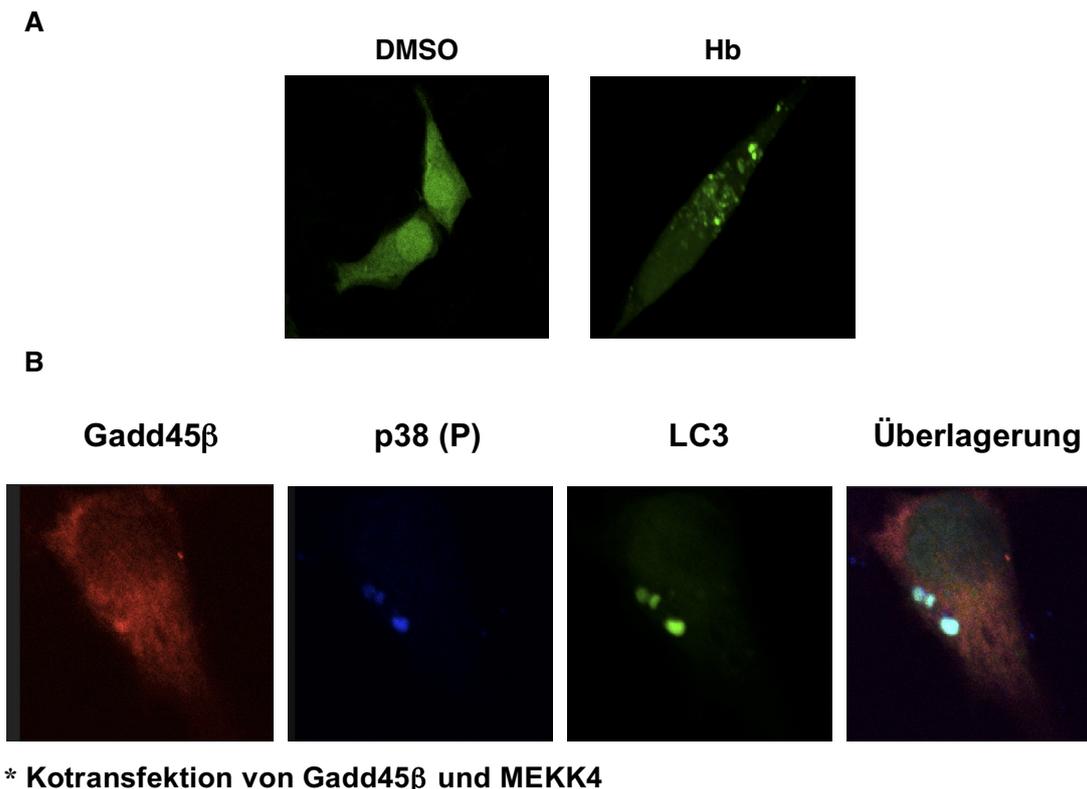
D



**Abbildung 10: Die subzelluläre Lokalisation von phosphorylierter p38.** NIH-3T3-Zellen wurden transient mit den angezeigten Plasmiden transfiziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels Western-Blot mit den entsprechenden Antikörpern analysiert (V5: Gadd45 $\beta$ , Flag: MEKK4, Myc: MEKK4 $\Delta$ C). Der Transkriptionsfaktor Myc diente als Kernmarker.

## **1.5 Aktivierung von p38 durch Gadd45 $\beta$ /MEKK4 führt zu einer Kollokalisierung von p38 mit dem Autophagiemarker LC3-II**

Aus den vorangegangenen Versuchen kann geschlossen werden, dass die Aktivierung von p38 durch die Koexpression von Gadd45 $\beta$  und MEKK4 verantwortlich für die Lokalisation von p38(P) in punktförmigen Strukturen im Zytosol ist. Demzufolge wurde nun vermutet, dass p38 in diesem Zusammenhang ein im Zytosol lokalisiertes Substrat aktiviert. Deshalb sollte im Folgenden versucht werden, den physiologischen Kontext dieser Aktivierung zu ermitteln. Diese punktförmigen Strukturen zeigten Ähnlichkeit mit Autophagosomen. Autophagosomen kann man durch überexprimiertes GFP-LC3 identifizieren und sichtbar machen (Mizushima, 2004). LC3 kommt in zwei unterschiedlichen Formen vor, zum einem das autophagisch inaktive LC3-I und zum anderem das autophagisch aktive LC3-II. Die autophagisch aktive Form ist ein Spaltprodukt von LC3-I und ist ausschließlich in den Autophagosomen und damit in punktförmigen Strukturen zu finden, während LC3-I diffus in der Zelle lokalisiert ist. Deshalb deuten punktförmige GFP-LC3-II Strukturen auf autophagische Aktivität hin. Als Kontrollexperiment wurden NIH/3T3-Zellen mit einem GFP-LC3-Plasmid transfiziert und für 4 h unter Hungerbedingungen gesetzt. Zellen, die unter Hungerbedingungen kultiviert, werden zeigen starke autophagische Aktivität (Mizushima, 2004). Anhand von Abbildung 11a ist zu erkennen, dass es in Zellen, die unter Hungerstress gesetzt wurden, zur Bildung von Autophagosomen kommt. Die Autophagosomen sind als punktförmige Strukturen zu erkennen. Demgegenüber war in Zellen, die unter Normalbedingungen kultiviert wurden, GFP-LC3 diffus verteilt, da keine Spaltung von LC3-I zu LC3-II stattgefunden hatte. Um herauszufinden, ob durch Gadd45 $\beta$  und MEKK4 aktivierte p38 mit GFP-LC3-II kollokalisiert und damit in Autophagosomen lokalisiert ist, wurden NIH/3T3-Zellen mit V5-Gadd45 $\beta$ -, HA-MEKK4- und GFP-LC3-Konstrukten kotransfiziert und mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Abbildung 11b zeigt, dass in Zellen, die Gadd45 $\beta$  und MEKK4 exprimieren, phosphorylierte p38 (blau) mit GFP-LC3-II in Autophagosomen (grün) kollokalisiert. Dies war ein erster Hinweis, dass der Gadd45 $\beta$ /MEKK4-Signalweg eine Rolle bei der Autophagieregulation spielt.



\* **Kotransfektion von Gadd45 $\beta$  und MEKK4**

**Abbildung 11: Aktivierte p38 kolokalisiert mit dem Autophagiemarker LC3.** (A) NIH/3T3-Zellen wurden transient mit einem GFP-LC3 kodierendem Plasmid transfiziert. Zur Induktion der Autophagie wurden die Zellen für 1h unter Hungerbedingungen (Hb) kultiviert und die Zellen anschließend fixiert. (B) Immunfluoreszenzfärbung von V5-Gadd45 $\beta$  (rot), GFP-LC3 (rot) und phospho-p38 (blau). MEKK4, Gadd45 $\beta$  und GFP-LC3 wurden in NIH/3T3-Zellen nach transienter Transfektion exprimiert. Anschließend wurde V5-Gadd45 $\beta$  und endogenes phospho-p38 gefärbt. Aufgrund von technischen Gegebenheiten erfolgte keine Färbung von MEKK4.

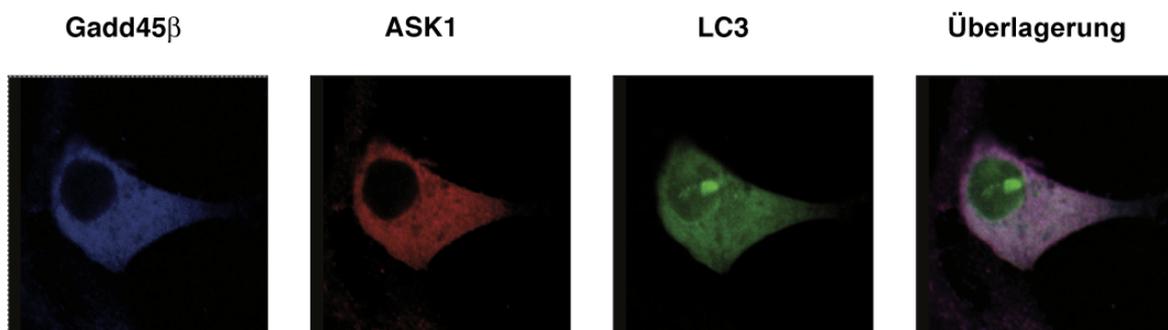
## 1.6 Die Lokalisation von p38 in punktförmigen Strukturen ist spezifisch für die Aktivierung von p38 durch Gadd45 $\beta$ und MEKK4

Aus der Literatur geht hervor, dass p38 Einfluss auf die Regulation den autophagischen Prozess nimmt. Allerdings sind weder das Substrat von p38 noch der Hintergrund der p38 Aktivierung bekannt (Corcelle et al., 2007; Simone, 2007). Es stellt sich also die Frage, ob die Regulation der Autophagie durch p38 über die Aktivierung durch Gadd45 $\beta$  und MEKK4 erfolgt. Deshalb wurde nun die Spezifität der Kolokalisation von Autophagosomen mit phosphorylierten p38, die durch den Gadd45 $\beta$ /MEKK4-Signalweg aktiviert wurde, untersucht. Hierzu diente die Interaktion von Gadd45 $\beta$  mit der MAP-3K ASK1 (*apoptosis signaling-regulating kinase*) die ebenfalls zur Phosphorylierung von p38 führt, als Kontrolle (Nagai et al., 2007). Falls es ebenfalls zur Kolokalisation von phosphorylierter p38 mit Autophagosomen, infolge der Aktivierung durch die Interaktion von ASK1 mit Gadd45 $\beta$ ,

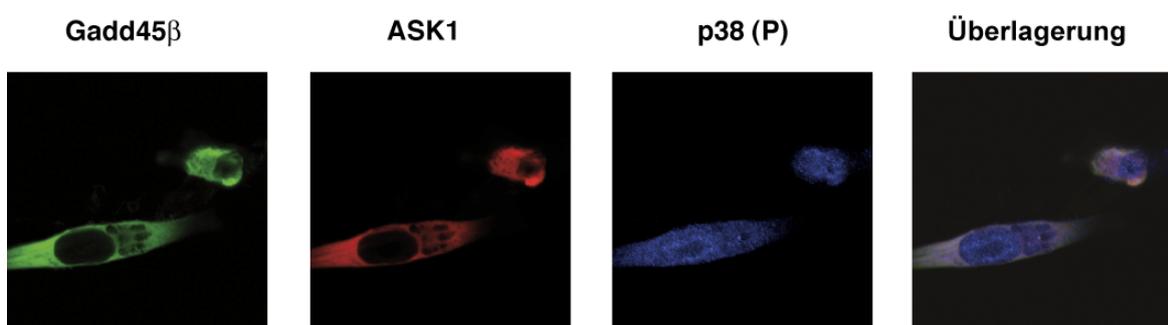
käme, wäre die Regulation der Autophagie über p38 nicht spezifisch für den Gadd45 $\beta$ /MEKK4-Signalweg, sondern eher ein genereller Mechanismus.

Zu diesem Zweck wurden NIH/3T3-Zellen mit Gadd45 $\beta$ -, ASK1- und GFP-LC3-Konstrukten kotransfiziert und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. In Gadd45 $\beta$  und ASK1 kotransfizierten Zellen kommt es zu einer Kolokalisation von ASK1 und Gadd45 $\beta$  im Zytosol. Gleichfalls führt die Koexpression von Gadd45 $\beta$  und ASK1 zu einer Translokation von Gadd45 $\beta$  vom Zellkern in das Zytosol. Dies ist ein guter Hinweis, ähnlich wie bei der Interaktion von Gadd45 $\beta$  mit MEKK4, auf die Interaktion von Gadd45 $\beta$  mit ASK1 in den Zellen. Allerdings kann in mit Gadd45 $\beta$  und ASK1 kotransfizierten Zellen keine Bildung von Autophagosomen nachgewiesen werden (Abbildung 12a). Nun stellt sich die Frage, ob die

A



B

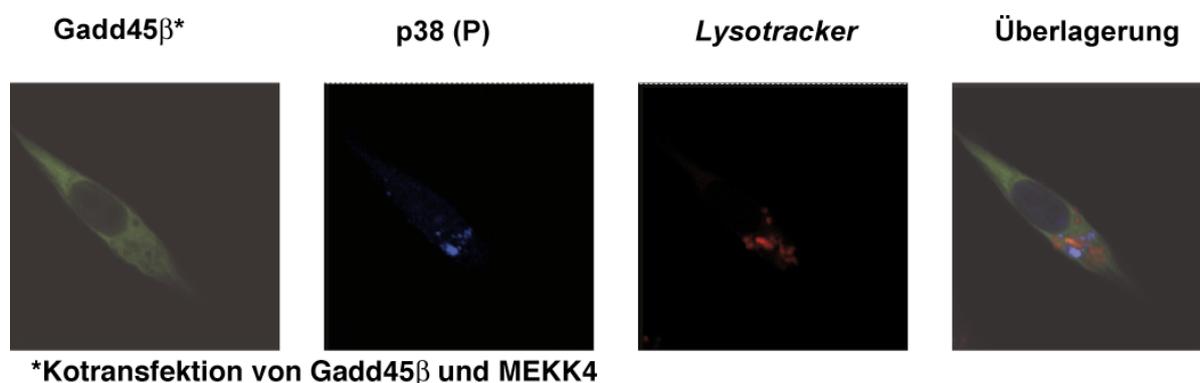


**Abbildung 12: Die Phosphorylierung von p38 durch Gadd45 $\beta$  und ASK1 führt nicht zur Bildung von punkt-artigen Strukturen.** (A) NIH/3T3-Zellen wurden transient mit GFP-LC3 (grün), V5-Gadd45 $\beta$  (blau) und HA-ASK1 (rot) kodierendem Plasmiden transfiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt. (B) Immunfluoreszenzfärbung von V5-Gadd45 $\beta$  (grün), HA-ASK1 (rot) und phospho-p38 (blau). ASK1 und Gadd45 $\beta$  wurden in NIH/3T3-Zellen nach transienter Transfektion exprimiert. Anschließend wurde V5-Gadd45 $\beta$ , HA-ASK1 und endogenes phospho-p38 mit spezifischen Antikörpern gefärbt.

Lokalisation von durch Gadd45 $\beta$  und ASK1 aktivierter p38 auch in punktförmigen Strukturen zu beobachten ist. Wie in Abbildung 12b zu erkennen ist, aktiviert die Koexpression von Gadd45 $\beta$  und ASK1 in den NIH/3T3-Zellen p38 (blau), allerdings ist phosphorylierte p38 sowohl im Zytosol als auch im Zellkern lokalisiert. Also führt die Koexpression von Gadd45 $\beta$  und ASK1 zur Phosphorylierung von p38, jedoch nicht zur Lokalisation von phosphorylierter p38 in punktförmigen Strukturen im Zytosol. Sondern p38 verteilt sich diffus im Zytosol und Zellkern. Die zeigt, dass die Lokalisation von p38(P) in punktförmigen Strukturen durch den Gadd45 $\beta$ /MEKK4-Signalweg induziert wird und spezifisch für die Interaktion von Gadd45 $\beta$  und MEKK4 ist.

### 1.7 Die Aktivierung von p38 durch Gadd45 $\beta$ und MEKK4 führt zu einer Inhibition der Autophagie

Der Prozess der Autophagie ist in drei Schritte unterteilt (Initiation, Elongation und Maturation; siehe Einleitung). Da die Koloakalisation von aktivierter p38 mit Autophagosomen, induziert durch den Gadd45 $\beta$ /MEKK4-Signalweg, nachgewiesen werden konnte, scheint sowohl die Initiation, als auch die Elongation der Autophagie bereits stattgefunden zu haben. Im folgenden Experiment sollte die Frage geklärt werden, ob gleichfalls die Phase der Maturation induziert wurde. Die Maturation zeichnet sich unter anderem dadurch aus, dass es hier zu einer Fusion des Autophagosoms mit einem Lysosom zum Autolysosom kommt. Deshalb wurde der Farbstoff LysoTracker verwendet, um Lysosomen anzufärben. Hierzu wurden NIH/3T3-Zellen mit Gadd45 $\beta$  und MEKK4

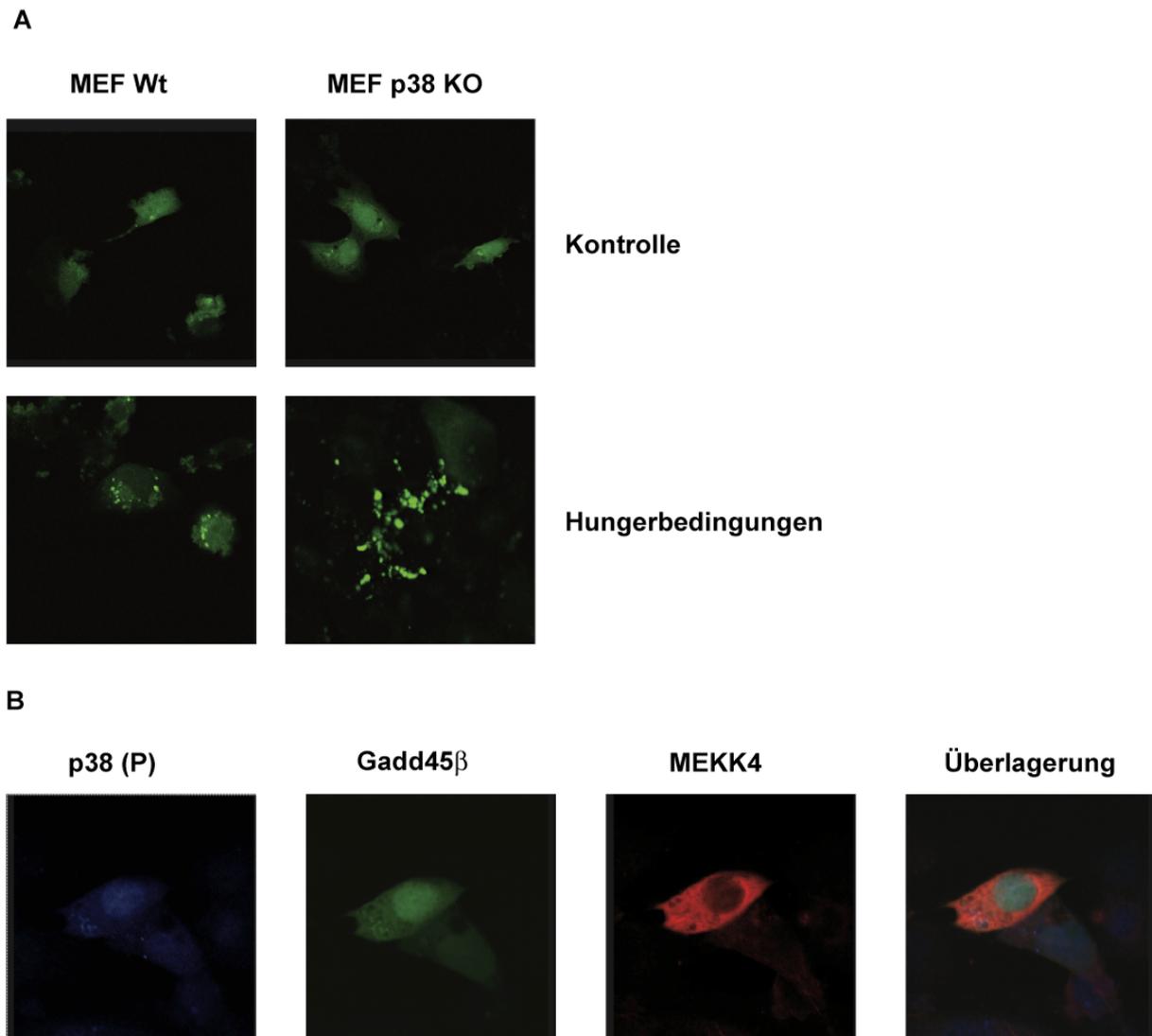


**Abbildung 13: Die Aktivierung von p38 durch Gadd45 $\beta$  und MEKK verhindert die Maturation der Autophagie.** NIH/3T3-Zellen wurden transient mit V5-Gadd45 $\beta$  (grün) und HA-MEKK4 (nicht gefärbt) kodierenden Plasmiden transfiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit den entsprechenden Epitop-spezifischen Antikörpern gefärbt. Die Lysosomen wurden mit dem Farbstoff LysoTracker sichtbar gemacht.

kotransfiziert und anschließend die Lysosomen gefärbt. In Abbildung 13 ist zu erkennen, dass es zur Bildung von punktförmigen Strukturen der durch Gadd45 $\beta$  und MEKK4 aktivierten p38 kommt, die aber nicht mit den Lysosomen kolokalisieren. Dies deutet darauf hin, dass die Fusion der Autophagosomen mit den Lysosomen gestört ist und somit die Autophagie inhibiert.

Falls die These zutreffend ist, sollte in Abwesenheit von p38 der autophagische Prozess vermehrt aktiviert werden und der Gadd45 $\beta$ /MEKK4-Signalweg keinen Einfluss mehr auf den autophagischen Prozess haben. Um diese These zu verifizieren wurden embryonale Mausfibroblasten (MEFs), die defizient für p38 $\alpha$  sind, verwendet. Hierzu wurden die MEFs entweder unter Hungerbedingungen oder unter normalen Kulturbedingungen gehalten. Durch den Mangel an Nährstoffen kommt es zu einer Aktivierung der Autophagie. Falls p38 zur Inhibition der Autophagie führt, sollte es zu einer vermehrten Bildung von Autophagosomen in den defizienten MEFs nach Stimulation, im Gegensatz zu stimulierten Wildtyp MEFs, kommen. Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt Abbildung 14a. Hier ist zu erkennen, dass eine deutlich vermehrte Bildung von Autophagosomen in den p38-defizienten MEFs, im Gegensatz zu den Wildtyp MEFs, unter Hungerbedingungen zu beobachten ist. Das Fehlen von p38 wirkt sich also stimulierend auf die Bildung von Autophagosomen aus und bestätigt die oben aufgestellte These.

Als nächstes wurde untersucht, ob das Substrat von p38 nach der Aktivierung durch Gadd45 $\beta$  und MEKK4 für die zytosolische Lokalisation in punktförmigen Strukturen von p38 verantwortlich ist. Hierzu wurden NIH/3T3-Zellen mit Gadd45 $\beta$  und MEKK4 kotransfiziert, um die spezifische Aktivierung durch beide Moleküle zu gewährleisten. Anschließend wurde die Aktivierung des Substrates von p38 durch den Inhibitor SB203580 verhindert. SB203580 blockiert nicht die Phosphorylierung von p38, sondern durch die antagonistische Bindung an das katalytische Zentrum die Bindung anderer Substrate von p38 und letztlich deren Aktivierung (Kumar et al., 1999). Deshalb kann mit einem phospho-spezifischen Antikörper weiterhin p38(P) nachgewiesen werden. Abbildung 14b zeigt, dass nach der Inhibition von p38 durch den Inhibitor SB203580 eine veränderte Lokalisation von phosphorylierter p38 erkennbar ist. Denn das durch den Gadd45 $\beta$ /MEKK4-Signalweg aktivierte p38 ist nicht mehr in punktförmigen Strukturen lokalisiert, sondern diffus in der ganzen Zelle verteilt. Letztlich bedeutet dies, dass die subzelluläre Lokalisation von p38 in punktförmigen Strukturen abhängig von der Substratbindung ist.



**Abbildung 14: p38 wirkt sich inhibitorisch auf den Prozess der Autophagie aus. (A)** p38 $\alpha$ -defiziente MEFs wurden mit einem GFP-LC3-kodierenden Plasmid transient transfiziert und anschließend unter Hungerbedingungen für 1 h kultiviert. Die Zellen wurden dann fixiert und mikroskopisch untersucht. **(B)** NIH/3T3-Zellen wurden transient mit GFP-Gadd45 $\beta$  (grün) und HA-MEKK4 (rot) kodierendem Plasmiden transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen zur Inhibition von p38 mit 500 nM SB203580 behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

## 1.8 Identifizierung von ATG5 als Substrat von p38

Die weiter oben dargestellten Ergebnisse zeigen, dass durch Gadd45 $\beta$ /MEKK4 aktivierte p38 mit der Regulation der Autophagie in Zusammenhang steht. Im Folgenden wurde nun versucht das Substrat von p38 in diesem physiologischen Kontext zu identifizieren. Die von p38 phosphorylierten Substrate weisen eine bestimmte Aminosäuresequenz auf, ein TP-Motiv, d.h. nach einem Threonin, welches phosphoryliert wird, folgt immer ein Prolin. Anhand dieses Motivs wurde nun versucht, durch Computer-gestützte Sequenzanalysen von

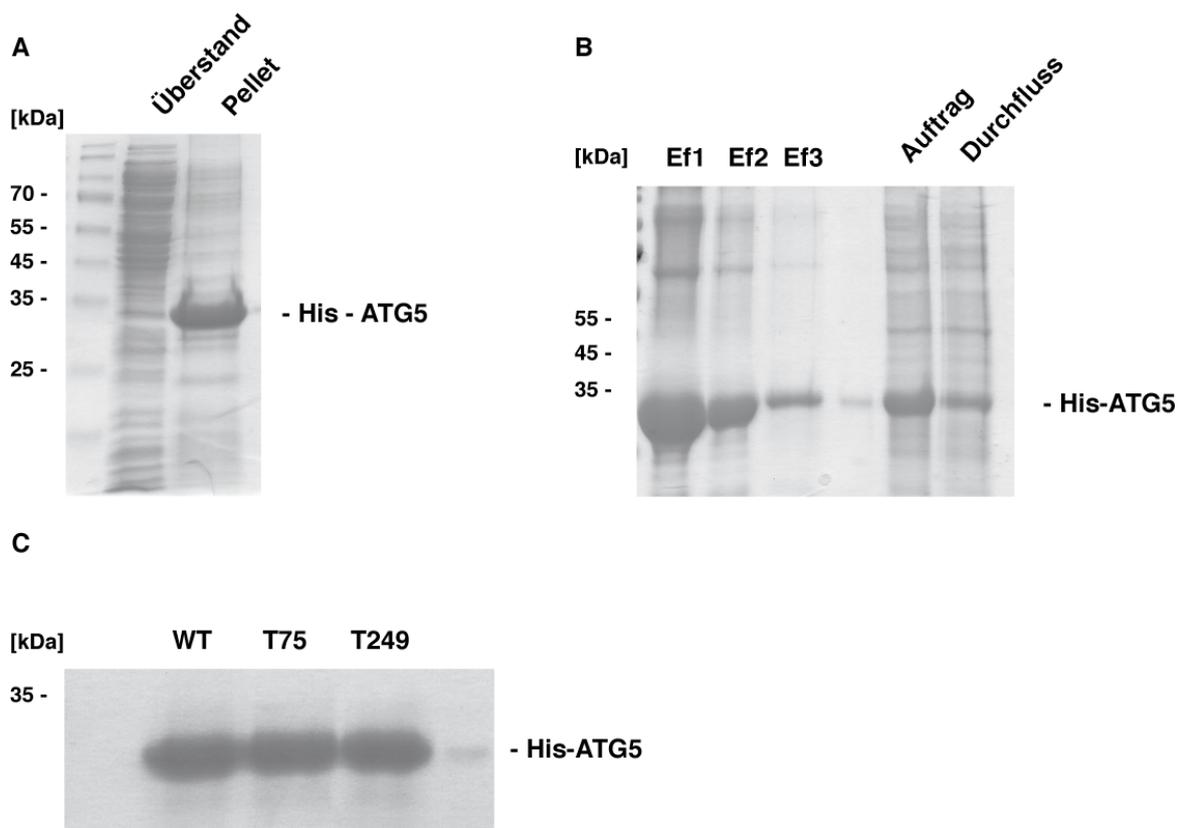
bekanntem Regulatoren der Autophagie das putative Substrat von p38 zu identifizieren. Von den analysierten Proteinsequenzen (ATG4, 5, 6, 8) beinhaltet nur die ATG5-Aminosäuresequenz das erforderliche Motiv. Nach dem Threonin 75 und Threonin 249 der Sequenz von murinem ATG5 folgt jeweils ein Prolin, womit ATG5 zwei putative Phosphorylierungsstellen von p38 besitzt. Interessanterweise sind diese putativen Phosphorylierungsstellen evolutionär hochkonserviert (siehe Abbildung 15). Um diesen Befund nun mit empirisch ermittelten Daten zu stützen, wurde mit Hilfe eines in vitro Kinase-Tests die mögliche Phosphorylierung von ATG5 durch p38 untersucht.

Zu diesem Zweck wurde His<sub>6</sub> markiertes ATG5 rekombinant in *E. coli* exprimiert und das Protein mittels einer NiNTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Als erstes wurden

|                   |             |             |            |              |             |            |            |            |          |          |     |  |
|-------------------|-------------|-------------|------------|--------------|-------------|------------|------------|------------|----------|----------|-----|--|
|                   |             |             | 20         |              |             |            | 40         |            |          |          | 60  |  |
| Bos taurus        | MTDDKDVLRD  | VWFGRIPTCF  | TLYQDEITE  | --           | REAEPYYL    | LLPR---    | VS         | YLTLVTDKVK | KHFQKVMR | 61       |     |  |
| Homo sapiens      | MTDDKDVLRD  | VWFGRIPTCF  | TLYQDEITE  | --           | REAEPYYL    | LLPR---    | VS         | YLTLVTDKVK | KHFQKVMR | 61       |     |  |
| Mus musculus      | MTDDKDVLRD  | VWFGRIPTCF  | TLYQDEITE  | --           | REAEPYYL    | LLPR---    | VS         | YLTLVTDKVK | KHFQKVMR | 61       |     |  |
| Sus scrofa        | MTDDKDVLRD  | VWFGRIPTCF  | TLYQDEITE  | --           | REAEPYYL    | LLPR---    | VS         | YLTLVTDKVK | KHFQKVMR | 61       |     |  |
| Gallus gallus     | MTDDKDVLRD  | VWFGRIPTCF  | TLYQDEITE  | --           | REAEPYYL    | LLPR---    | IS         | YLTLVTDKVK | KHFQKVMR | 61       |     |  |
| Ganio rerio       | MADDKDVLRD  | VWFGRI PACF | TLSPDEITE  | --           | REAEPYYL    | LLPR---    | VS         | YLTLVTDKVK | KHFQKVMR | 61       |     |  |
| Rattus norvegicus | MTDDKDVLRD  | VWFGRIPTCF  | TLYQDEITE  | --           | REAEPYYL    | LLPR---    | VS         | YLTLVTDKVK | KHFQKVMR | 61       |     |  |
| D. melanogaster   | MAHDREVLRM  | IWEGQIGICF  | QADRDEIVG- | --           | IKPEPFYL    | MISR---    | LS         | YPLVTDKVR  | KYFSRYIS | 61       |     |  |
| S. cerevisiae     | MNDIKQLL--  | -WNGELNLV   | SIDPSFLMKG | SPREIAVLRI   | RVPRETYLVN  |            |            | YMLIWNKIK  | S-FLSFD  | 64       |     |  |
|                   |             |             | 80         |              |             |            | 100        |            |          |          | 120 |  |
| Bos taurus        | QEDIS-EIWF  | EYEGTPLKWH  | YPIGLLFDLL | -            | ASSSALPWN   | -----      | -          | ITVHF---   | K        | SFPEKDLL | 113 |  |
| Homo sapiens      | QEDIS-EIWF  | EYEGTPLKWH  | YPIGLLFDLL | -            | ASSSALPWN   | -----      | -          | ITVHF---   | K        | SFPEKDLL | 113 |  |
| Mus musculus      | QEDVS-EIWF  | EYEGTPLKWH  | YPIGLLFDLL | -            | ASSSALPWN   | -----      | -          | ITVHF---   | K        | SFPEKDLL | 113 |  |
| Sus scrofa        | QEDIS-EIWF  | EYEGTPLKWH  | YPIGLLFDLL | -            | ASSSALPWN   | -----      | -          | ITVHF---   | K        | SFPEKDLL | 113 |  |
| Gallus gallus     | QEEVN-EIWF  | EYEGTPLKWH  | YPIGLLFDLH | -            | ASNTALPWS   | -----      | -          | ITVHF---   | K        | NFPEKDLL | 113 |  |
| Ganio rerio       | AEDVE-EMWF  | EHEGTPLKWH  | YPIGVLFDLH | -            | ASNSALPWN   | -----      | -          | ITVHF---   | K        | NFPEQDLL | 113 |  |
| Rattus norvegicus | QEDVS-EIWF  | EYEGTPLKWH  | YPIGLLFDLL | -            | ASSSALPWN   | -----      | -          | ITVHF---   | K        | SFPEKDLL | 113 |  |
| D. melanogaster   | AEHQDGA VWF | DFNGTPLRLH  | YPIGVLYDLH | H            | PEEDSTPWC   | -----      | -          | LTIH---    | S        | KFPEDMLV | 115 |  |
| S. cerevisiae     | LTDSEKYFWF  | EHNKTPIPWN  | YPVGVLFDC  | AGKSATFTTS   | FENQVKDVL   | FLRIHLVMD  | SLPPTIIP   | 132        |          |          |     |  |
|                   |             |             | 140        |              |             |            | 160        |            |          |          | 180 |  |
| Bos taurus        | HCPSKDVIEA  | HFMSCVKEAD  | -          | ALKHKSQVI    | NEMQKQKDHKQ | LWMGLQDRF  | DQFWAINRKL | MEYPAEEN   | 180      |          |     |  |
| Homo sapiens      | HCPSKDAIEA  | HFMSCMKEAD  | -          | ALKHKSQVI    | NEMQKQKDHKQ | LWMGLQDRF  | DQFWAINRKL | MEYPAEEN   | 180      |          |     |  |
| Mus musculus      | HCPSKDAVEA  | HFMSCMKEAD  | -          | ALKHKSQVI    | NEMQKQKDHKQ | LWMGLQDRF  | DQFWAINRKL | MEYPP EEN  | 180      |          |     |  |
| Sus scrofa        | HCPSKDVIEA  | HFMSCVKEAD  | -          | ALKHKSQVI    | SDMQRKDHKQ  | LWMGLQDRF  | DQFWAINRKL | IEYPP EEN  | 180      |          |     |  |
| Gallus gallus     | HCHSKDVIEA  | HFMACI KEAD | -          | ALKHKSQVI    | NEMQKQKDHKQ | LWMGLQDKF  | EQFWAINRKL | MEYPP EDS  | 180      |          |     |  |
| Ganio rerio       | HCSTNSVIEA  | HFMSCI KEAD | -          | ALKHKGQVI    | NDMQKQKDHKQ | LWMGLQDKF  | DQFWAMNRKL | MEYPT EEG  | 180      |          |     |  |
| Rattus norvegicus | HCPCKDAVEA  | HFMSCVKEAD  | -          | ALKHKSQVI    | NEMQRKDHKQ  | LWMGLQNDLT | S-----     | -----      | 163      |          |     |  |
| D. melanogaster   | KLNSKELLES  | HYMSCLKEAD  | -          | VLKHRGLVI    | SAMQKQKDHQ  | LWLGLVNEKF | DQFWAVNRRL | MEPYGDLE   | 182      |          |     |  |
| S. cerevisiae     | IASSKTQAEK  | FWFHQWKQVC  | F          | ILNGSSKAI    | MSLSVNEARK  | FWGSVITRNF | QDFIEISNKI | SSSRP---   | 197      |          |     |  |
|                   |             |             | 220        |              |             |            | 240        |            |          |          | 260 |  |
| Bos taurus        | GFRYIPFRIY  | QTTTERPFIQ  | KLFRP-VSTD | QLLHTLGDLL   | KEVCPSAVAP  | EDGEKKNQVM | I--HGIE-   | 244        |          |          |     |  |
| Homo sapiens      | GFRYIPFRIY  | QTTTERPFIQ  | KLFRP-VAAD | QLLHTLGDLL   | KEVCPSAIDP  | EDGEKKNQVM | I--HGIE-   | 244        |          |          |     |  |
| Mus musculus      | GFRYIPFRIY  | QTTTERPFIQ  | KLFRP-VAAD | QLLHTLGDLL   | REVCPASAVAP | EDGEKRSQVM | I--HGIE-   | 244        |          |          |     |  |
| Sus scrofa        | GFRYIPFRIY  | QTTTERPFIQ  | KLFRP-VAAD | QLLHTLGDLL   | REVCPASAVAP | EDGEKKSQVM | I--HGIE-   | 244        |          |          |     |  |
| Gallus gallus     | GFRYIPFRIY  | QATTERPFIQ  | KLFRP-IASG | QLLHTLGDLL   | KDVCPSAITP  | EDGEKTTQVM | I--HGIE-   | 244        |          |          |     |  |
| Ganio rerio       | GFRYIPFRIY  | QTMSDRPFIQ  | TLFRP-VSSE | GQALTLGDLL   | KELFPAAI--  | EDEPKKFQVM | I--HGIE-   | 242        |          |          |     |  |
| Rattus norvegicus | -----       | -----       | -          | FGP--STG     | NSWNTL---   | ---QKKMDFV | I--SLL EY  | 188        |          |          |     |  |
| D. melanogaster   | SFKNIPLR IY | -TDDDFTYTQ  | KLISP-ISVG | GQKKSADLM    | AELSTPV---  | ---RRAVGCR | T--HGIDL   | 240        |          |          |     |  |
| S. cerevisiae     | --RHIPLI IQ | TSRTSGTF--  | RISQPTISMT | GVNPTLKDIE   | GDI---LDV   | KEGINGNDVM | VICQGIEI   | 257        |          |          |     |  |
|                   |             |             | 280        |              |             |            | 300        |            |          |          |     |  |
| Bos taurus        | --PMLETPLQ  | WLSEHLSYP-  | -          | DNFLHISII    | P-----      | QPT D-     | 275        |            |          |          |     |  |
| Homo sapiens      | --PMLETPLQ  | WLSEHLSYP-  | -          | DNFLHISII    | P-----      | QPT D*     | 276        |            |          |          |     |  |
| Mus musculus      | --PMLETPLQ  | WLSEHLSYP-  | -          | DNFLHISIV    | P-----      | QPT D-     | 275        |            |          |          |     |  |
| Sus scrofa        | --PMLETPLQ  | WLSEHLSYP-  | -          | DNFLHISIV    | P-----      | QPT D-     | 275        |            |          |          |     |  |
| Gallus gallus     | --PMLETPLQ  | WLSEHMSYP-  | -          | DNFLHISII    | P-----      | RPT D-     | 275        |            |          |          |     |  |
| Ganio rerio       | --PMLETPIQ  | WLSEHLSHP-  | -          | DNFLHISII    | P-----      | APS D-     | 273        |            |          |          |     |  |
| Rattus norvegicus | IRPQLNG-LS  | FRSCSVLWQP  | M          | DISCIPL E I- | -----       | -S         | 217        |            |          |          |     |  |
| D. melanogaster   | HE--ETQLQ   | WMSEHLSYP-  | -          | DNFLHLSV-    | -----       | DYK DV     | 269        |            |          |          |     |  |
| S. cerevisiae     | PWHMLLYDLY  | --SKLRSF--  | -          | DGFLYITLV    | PIKGGDKASS  | EL         | 294        |            |          |          |     |  |

**Abbildung 15: Sequenzanalyse von ATG5.** Die Proteinsequenzen von ATG5 wurden bei verschiedenen Spezies auf das Vorhandensein von putativen p38-Phosphorylierungsstellen untersucht. Es wurden zwei potentielle Phosphorylierungsstellen gefunden (roter Kasten).

kompetente *E.coli* Bakterien des Stammes *BL21 gold* mit dem entsprechenden Plasmid transformiert und anschließend mit IPTG stimuliert, um die Produktion von His<sub>6</sub>-ATG5 zu induzieren. Hierbei stellte sich heraus, dass das exprimierte ATG5 in sogenannten *inclusion bodies* vorliegt (siehe Abbildung 16a). *Inclusion bodies* enthalten das Protein in nicht nativer, sondern denaturierter Form, weil die Proteine in Proteinaggregaten vorliegen und somit unlöslich werden. Der Grund für die Aggregation des rekombinant exprimierten Zielproteins liegt in der hohen Expressionsrate begründet. Um das denaturierte Protein wieder in Lösung zu bringen, verwendet man chaotrope Salze in sehr hoher Konzentration (hier Harnstoff, siehe Kapitel 2.5.5), die in der Lage sind, die Proteinaggregate aufzubrechen und das Protein zu solubilisieren. Eine Besonderheit von Poly-Histidin-Markern ist, dass sie auch unter denaturierenden Bedingungen an die Nickel-Matrix binden können und deshalb leicht vor der Renaturierung aufgereinigt werden können. (siehe Kapitel 2.5.5; Abbildung 16b). Anschließend erfolgt eine Renaturierung, um das Protein in die native und biologisch aktive

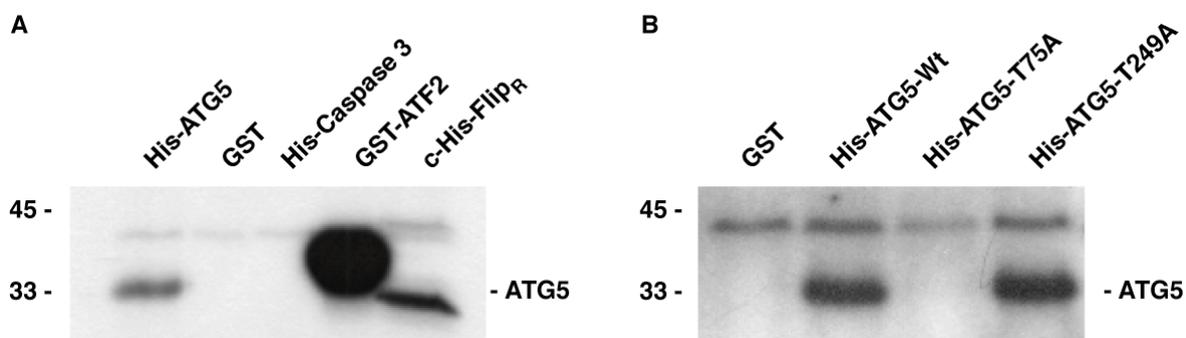


**Abbildung 16: Aufreinigung von His-markiertem ATG5.** (A) Das pET-15b-Konstrukt wurde nach Transformation in *E.coli* BL21 (DH3) gold bei 37°C mit 1 mM IPTG über Nacht induziert. Anschließend erfolgte die Lyse der *E.coli*-Zellen mittels Ultraschall. Nach Zentrifugation des Lysats wurde die unlösliche Fraktion in 8M Harnstoff solubilisiert. Es wurden jeweils Proben der löslichen als auch der unlöslichen Fraktion mittels SDS-PAGE analysiert. (B) Das mit 8 M Harnstoff gelöste Pellet wurde unter denaturierenden Bedingungen mittels NiNTA aufgereinigt und in Elutionsfraktionen (Ef) gesammelt. (C) Jeweils 5 µg aufgereinigtes und renaturiertes ATG5 Protein wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

Form zu überführen. Dies wurde durch eine sequenzielle Dialyse erreicht. Das aufgereinigte ATG5 wurde für einen Kinase-Test verwendet. Mit Hilfe dieses Tests ist es möglich, die Phosphorylierung eines möglichen Substrates von p38 nachzuweisen (siehe Kapitel 2.4.11). Anhand von Abbildung 17a ist zu erkennen, dass aktivierte p38 in der Lage ist ATG5 zu phosphorylieren, aber auch die Positivkontrollen ATF-2 und c-Flip<sub>R</sub>, während die Negativkontrollen GST- und His-markierte Caspase-3 durch p38 nicht phosphoryliert werden. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Phosphorylierung von ATF-2 im Gegensatz zu ATG5 und c-Flip<sub>R</sub> wesentlich stärker phosphoryliert wird. Dennoch erfolgt eine eindeutige Phosphorylierung von ATG5 durch p38 und somit ist die Annahme bestätigt, dass ATG5 ein Substrat von p38 ist.

### 1.9 Threonin 75 der murinen Aminosäuresequenz von ATG5 wird von p38 phosphoryliert

Mit Hilfe des vorangegangenen Experiments gelang es, den Nachweis der Phosphorylierung von ATG5 durch p38 zu erbringen. Da aber ATG5 zwei putative Phosphorylierungsstellen besitzt, sollte im Folgenden geklärt werden, welche dieser Phosphorylierungsstellen von p38 phosphoryliert werden. Hierzu wurde die Aminosäuresequenz mit Hilfe einer Punktmutation in der cDNA so verändert, dass das entsprechende Threonin an Stelle 75 bzw. 249 der Maus-Sequenz gegen ein Alanin ausgetauscht wurde, um die Phosphorylierung von ATG5 durch p38 zu unterbinden. Die mutierten Proteine, ATG5-T75A und ATG5-T249A, wurden ebenfalls rekombinant in *E. coli* exprimiert und anschließend auf die gleiche Weise wie ATG5 Wildtyp aufgereinigt (Abbildung 16d). Wie in Abbildung 17b zu erkennen ist, wird ATG5-T75A nicht mehr durch p38 phosphoryliert, während hingegen ATG5-T249A weiterhin phosphoryliert werden kann. Folglich erfolgt die Phosphorylierung von ATG5 durch p38 ausschließlich an Threonin 75 der murinen Aminosäuresequenz.



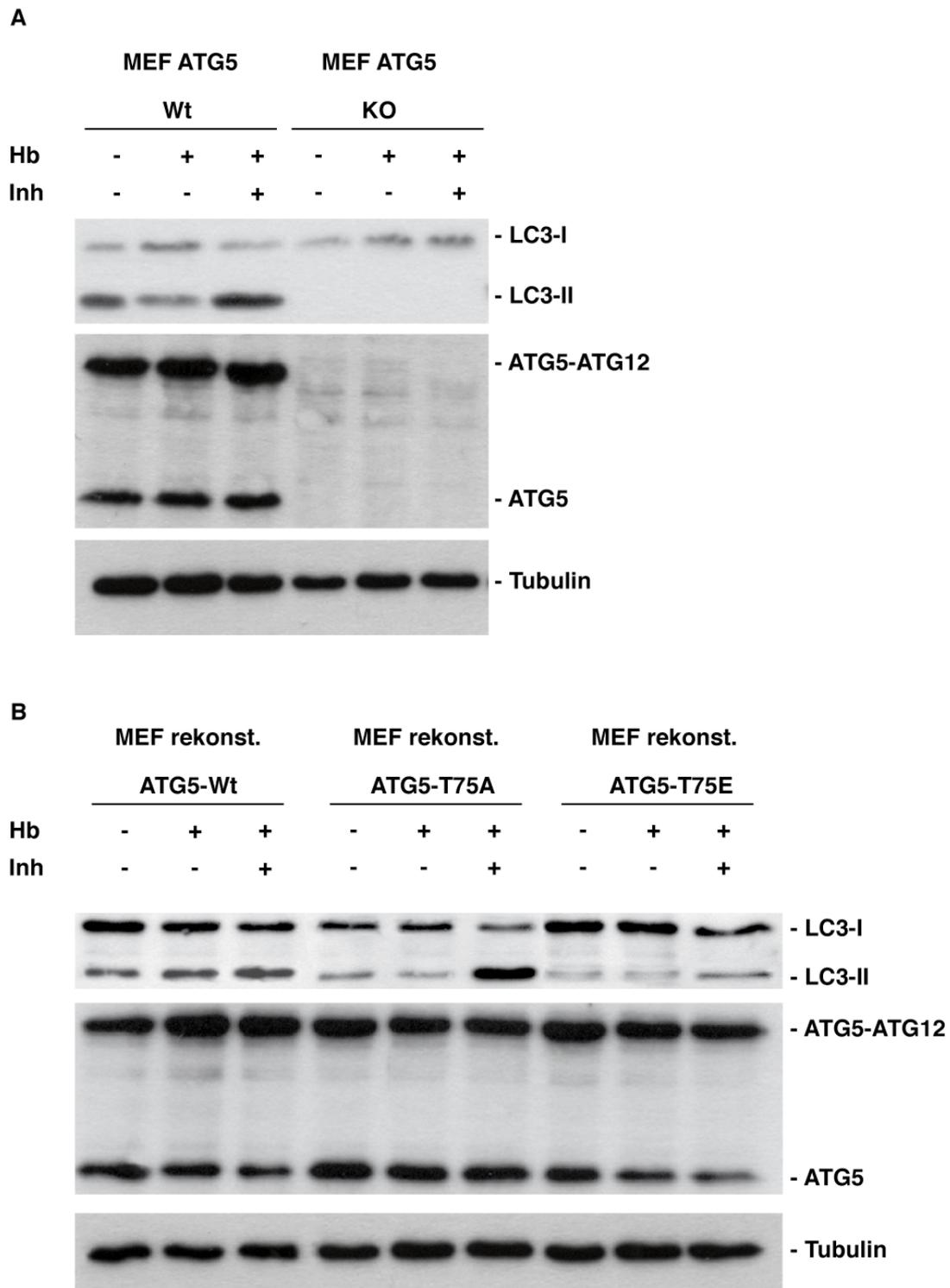
**Abbildung 17: p38 phosphoryliert ATG5 spezifisch an Threonin 75.** (A,B) Die dargestellten rekombinanten Proteine (je 5 µg) wurden mit Hilfe eines Kinasetests auf die Substratfähigkeit für p38 analysiert. GST und Caspase 3 dienen als Negativkontrollen, während ATF2 und c-Flip<sub>R</sub> als Positivkontrollen fungierten.

## 1.10 Phosphorylierung von ATG5 an Threonin 75 inhibiert den Prozess der Autophagie

Nach Identifizierung der Phosphorylierungsstelle von ATG5 wurde im Folgenden untersucht, auf welche Weise die Phosphorylierung von ATG5 den Prozess der Autophagie beeinflusst. Hierzu wurden ATG5-defiziente MEFs mit den verschiedenen ATG5-Proteinen rekonstituiert, indem sie stabil mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert wurden. Es wurde Wildtyp-ATG5 und das weiter oben beschriebene ATG5-T75A verwendet, welches nicht mehr in der Lage ist, durch p38 phosphoryliert zu werden. Weiterhin wurde eine Mutante generiert, die die Aminosäure Threonin 75 durch ein Glutamat ersetzt (ATG-T75E). Durch die Substitution der Aminosäure Threonin mit der sauren Aminosäure Glutamat wird der Effekt der zusätzlichen negativen Ladung durch die Phosphorylierung an Threonin 75 imitiert, so dass diese Mutante von ATG5 konstitutiv aktiv ist. Die rekonstituierten MEFs wurden für eine Stunde unter Hungerbedingungen gesetzt, um Autophagie zu induzieren, und anschließend einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Dazu diente die Spaltung von LC3-I in LC3-II als Indiz für autophagische Aktivität. Denn in stark autophagisch aktiven Zellen kommt es zur Anreicherung von LC3-II.

Von den ATG5-defizienten MEF ist bekannt, dass sie keinerlei autophagische Aktivität mehr besitzen ist (Kuma et al., 2004). Deshalb erfolgt auch keine Spaltung von LC3-I in LC3-II. Um dies zu verifizieren, wurde als erstes ein Kontrollexperiment durchgeführt, indem Wildtyp-MEFs und die ATG5-defizienten MEFs unter Hungerbedingungen gesetzt und anschließend auf ihre autophagische Aktivität mittels Western-Blot-Analyse hin untersucht wurden. Im Zuge des autophagischen Prozesses kommt es zu einer Degradation der in den Autophagosomen enthaltenen Proteine. Folglich wird LC3-II, welches im Gegensatz zum LC3-I innerhalb der Autophagosomen lokalisiert ist, abgebaut. Dies kann zu einer Verringerung des LC3-II-Proteins führen und deshalb in Western-Blot-Analysen fälschlicherweise eine geringere autophagischer Aktivität vortäuschen, obwohl die Autophagie im Gegenteil stark aktiviert ist. Um dies zu vermeiden, wurde ein Inhibitor-Cocktail eingesetzt, der die Verschmelzung der Autophagosomen mit den Lysosomen und damit auch den Abbau von LC3-II verhindert. Deshalb reichert sich LC3-II in den mit dem Inhibitor-Cocktail behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen und den unter normalen Bedingungen kultivierten Kontrollzellen an (Abbildung 18a). Weiterhin ist zu beobachten, dass es unter Hungerbedingungen zu einer Akkumulation von LC3-II in den Wildtyp-MEFs kommt, während ATG5-defiziente MEFs keinerlei LC3-II aufweisen. Dies

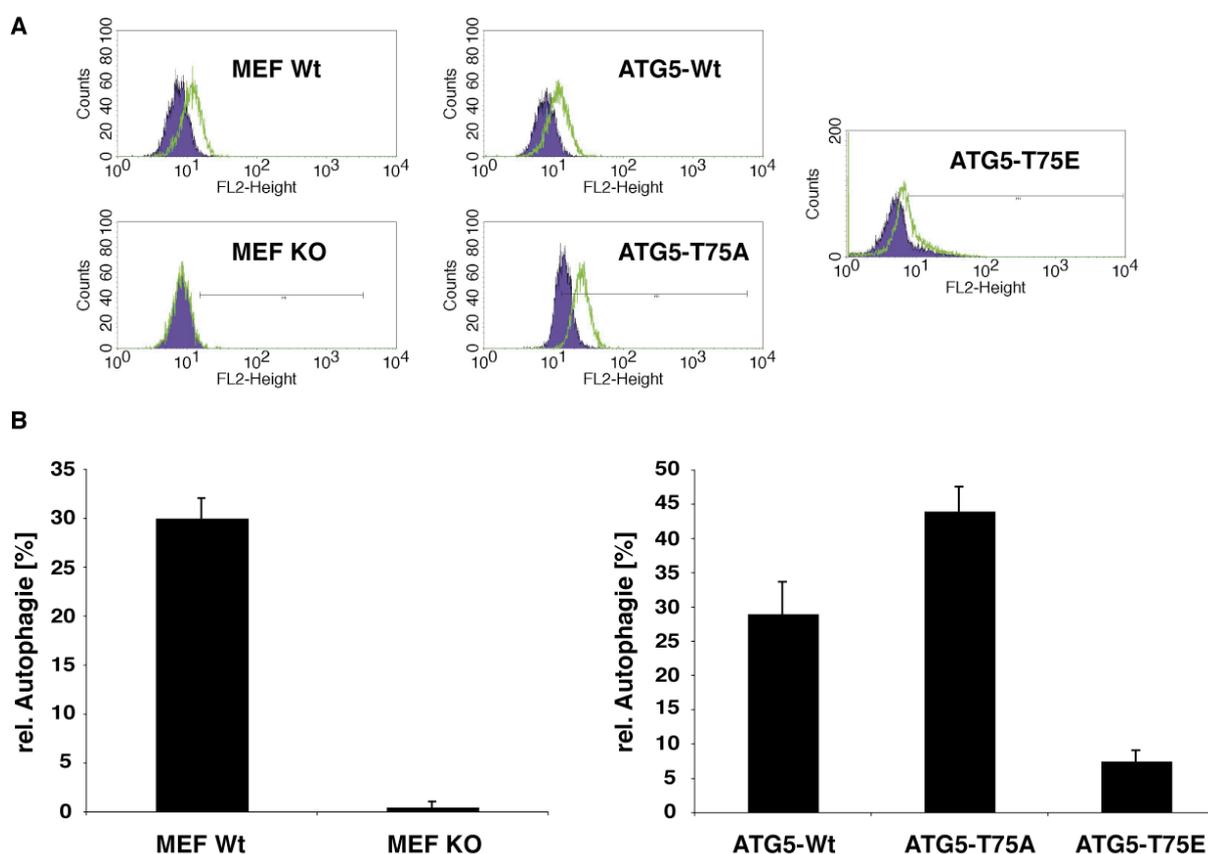
zeigt deutlich, dass es unter Hungerbedingungen zu einer Induktion von Autophagie in Wildtyp-MEFs kommt, während ATG5-defiziente MEFs nicht in der Lage sind, Autophagie zu aktivieren. Deshalb stellt diese Zelllinie ein geeignetes Modellsystem dar, um die Auswirkungen der verschiedenen, weiter oben beschriebenen ATG5-Mutanten auf den autophagischen Prozess zu untersuchen. Dazu wurden die rekonstituierten MEFs unter Hungerbedingungen gesetzt und mittels Western-Blot auf die Prozessierung von LC3 hin untersucht. In Abbildung 18b ist zu erkennen, dass Zellen mit rekonstituiertem nativen ATG5 ähnlich wie Wildtyp-MEFs wieder LC3-I in LC3-II umwandeln und autophagische Aktivität erlangen. Demgegenüber besaßen die mit dem ATG5-T75E Protein rekonstituierten MEFs nur eine sehr geringe Prozessierung von LC3. Dahingegen zeigen die mit dem ATG5-T75A Protein rekonstituierten MEFs eine deutlich erhöhte Spaltung von LC3-I und somit eine starke Anreicherung von LC3-II. Des Weiteren deutet sich ein unterschiedlicher Proteingehalt von ATG5 und dessen Mutanten in den rekonstituierten MEFs an. Denn die Wildtypform von ATG5 und ATG5-T75E ist im Vergleich zu ATG5-T75A in geringeren Mengen nachweisbar. Ein weiterer Unterschied liegt darin, dass die Zellen mit ATG5-Wt und ATG5-A75E, die unter Hungerbedingungen und der Zugabe des Inhibitor-Cocktails kultiviert wurden, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen eine geringere Menge von ATG5 aufweisen. Im Gegensatz dazu kommt das ATG5-T75A in nahezu gleichen Mengen in den rekonstituierten MEFs vor, unabhängig davon, ob die Zellen unter Hungerbedingungen oder normalen Bedingungen kultiviert wurden.



**Abbildung 18: Die Phosphorylierung von ATG5 führt zu einer verminderten LC3-Spaltung.** (A) Wildtyp-MEFs und ATG5-defiziente MEFs wurden unter Hungerbedingungen (Hb) gesetzt und anschließend mittels Western-Blot mit anti-LC3 und anti-ATG5 Antikörpern analysiert. Tubulin diente als Ladekontrolle. Ein Inhibitorcocktail (Inh) mit je 10 µg/ml E64d und Pepstatin A wurde in den angezeigten Proben während der Kultur der Zellen unter Hungerbedingungen zugesetzt. (B) Die mit Wildtyp bzw. mutiertem ATG5 rekonstituierten defizienten MEFs wurden unter Hungerbedingungen gesetzt und anschließend mittels Western-Blot mit den angezeigten Antikörpern analysiert. Tubulin diente als Ladekontrolle. Ein Inhibitorcocktail (Inh) mit je 10 µg/ml E64d und Pepstatin A wurde in den angezeigten Proben während der Kultur der Zellen unter Hungerbedingungen zugesetzt.

Zur Verifizierung und Quantifizierung der gemachten Beobachtungen erfolgten zusätzliche Analysen. Die bisher gezeigten Daten lassen nur eine qualitative, bestenfalls eine semiquantitative Beurteilung zu. Um aber die These zu erhärten, dass die Phosphorylierung von ATG5 durch p38 zu einer Inhibition des autophagischen Prozesses führt, wurden quantitative Analysen des Prozesses der Autophagie durchgeführt. Hierzu diente der Acridine-Orange-Test, mit dem es möglich ist, den Prozess der Autophagie zu messen.

Die Zellen wurden unter Hungerbedingungen gesetzt, anschließend mit Acridine-Orange gefärbt und dann mittels der Durchflusszytometrie gemessen (siehe Kapitel II.2.3.3). Hierbei konnten die bereits gezeigten Daten bestätigt werden, da auch hier eine erhöhte autophagische Aktivität bei den ATG-T75A MEFs und eine verringerte autophagische Aktivität bei den ATG5-T75E zu beobachten war. So erwiesen ATG-T75A MEFs eine relative Autophagierate von ca. 43%, während bei den ATG5-Wt MEFs lediglich eine relative Autophagierate von ca.



**Abbildung 19: Die Phosphorylierung von ATG5 führt zu einer verminderten Autophagierate. (A,B)** ATG5<sup>-/-</sup> und Wildtyp MEFs bzw. mit ATG5 und dessen Mutanten rekonstituierten defizienten MEFs wurden unter Hungerbedingungen für 4 h kultiviert und anschließend mittels Acridine-Orange-Tests analysiert. Die Messung erfolgte mittels FACS. **(A)** Original-FACS-Diagramme eines repräsentativen Experimentes. **(B)** Quantitative Auswertung des Acridine-Orange-Test. Die Werte repräsentieren das statistische Mittel und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

25% detektiert wurde. Weiterhin zeigte sich bei den ATG5-T75E MEFs eine verringerte relative Autophagierate von 9% (Abbildung 19).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sich die Phosphorylierung von ATG5 inhibitorisch auf den Prozess der Autophagie auswirkt. Denn wenn ATG5 nicht mehr phosphoryliert werden kann, kommt es zu einer vermehrten Anreicherung von LC3-II und einer erhöhten Autophagierate, während hingehend eine konstitutive Phosphorylierung von ATG5 zu einer fast kompletten Inhibition der Autophagie führt.

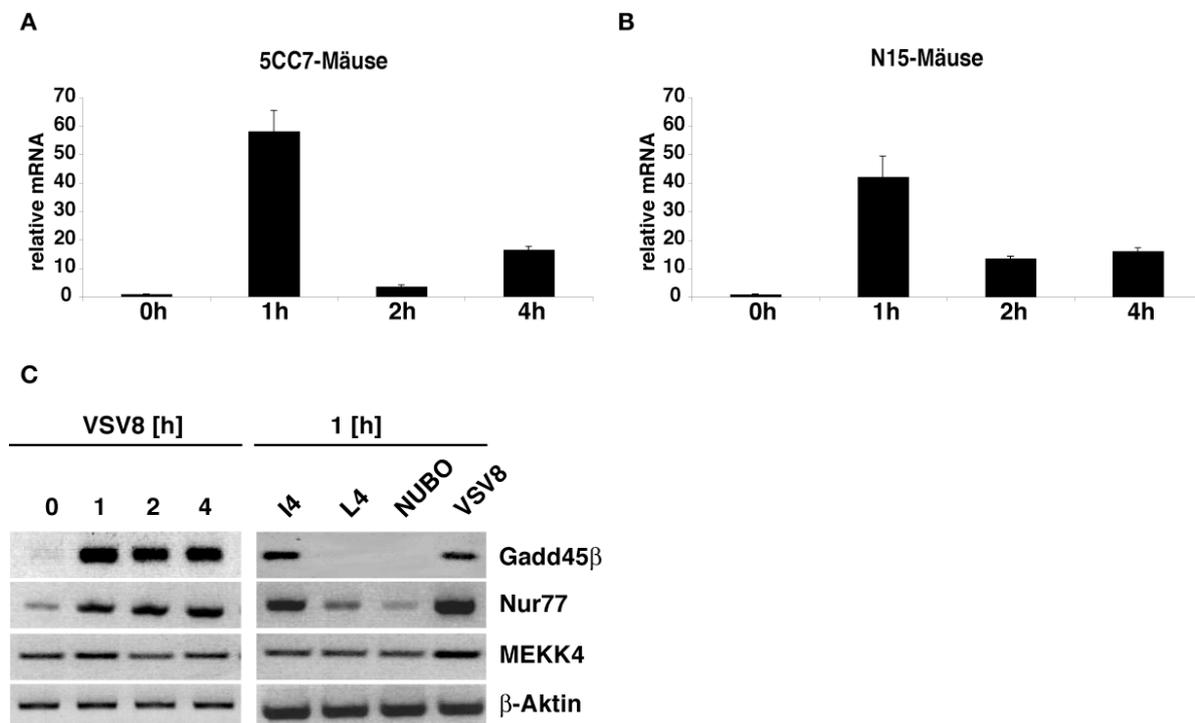
## 2 Der Gadd45 $\beta$ /MEKK4-Signalweg während der negativen Selektion

In DNA-Chip-Analysen von MHC Klasse I und MHC Klasse II reduzierten TCR transgenen Mäusen wurde beobachtet, dass Gadd45 $\beta$  eines der am stärksten hochregulierten Gene, während der negativen Selektion war (Schmitz et al., 2003). Ausgehend von diesen Analysen dienten die folgenden Experimente der Erforschung der Rolle von Gadd45 $\beta$  während der negativen Selektion im Thymus.

### 2.1 Spezifische Hochregulation von Gadd45 $\beta$ während der negativen Selektion

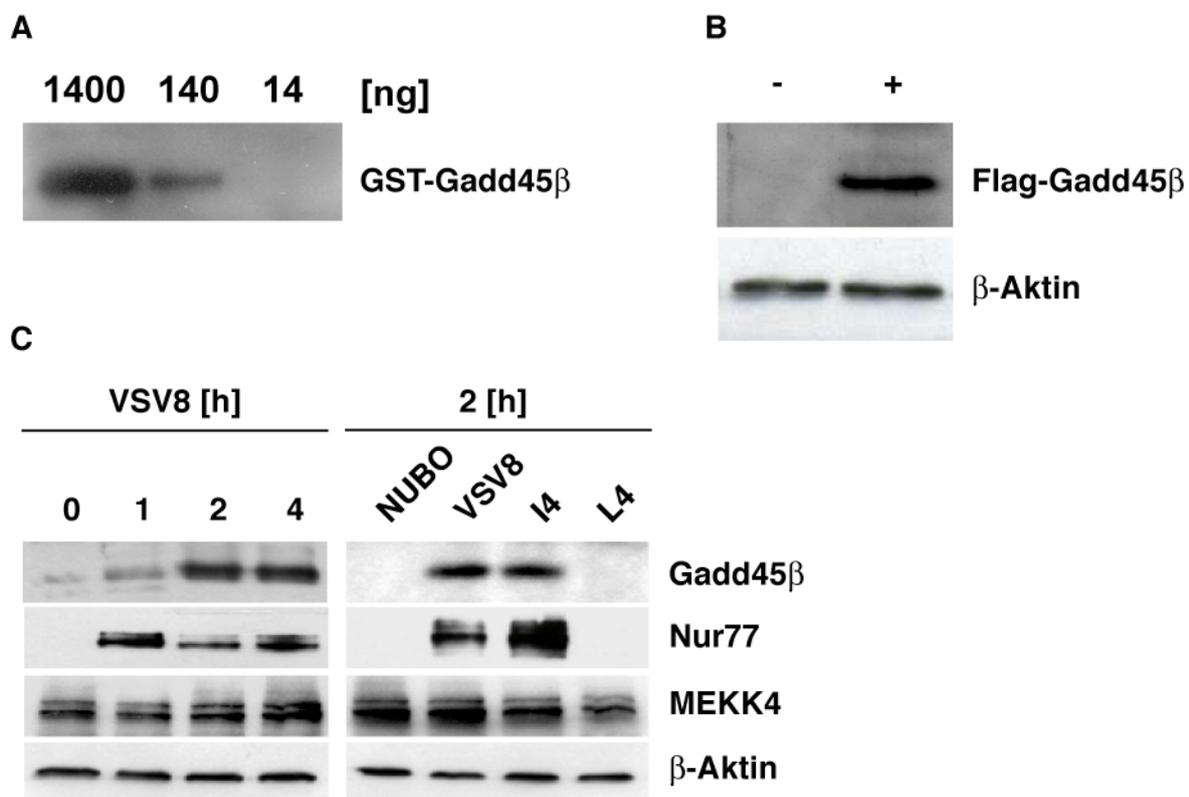
Es wurde versucht die Befunde der DNA-Chip-Analysen mit anderen Methoden zu verifizieren. Hierzu wurde die Methode der *Real-Time-PCR* (qPCR) verwendet. Mit dieser Methode ist es möglich, die Expression der mRNA von Interesse zu quantifizieren. Deshalb wurden 5CC7- und N15-transgene Mäuse mit spezifischen Peptiden stimuliert, um die T-Zellen zu aktivieren und den Prozess der negativen Selektion in Gang zu setzen. Der MHC Klasse II restringierte 5CC7-TCR ist spezifisch für das Peptid PCC (*pigeon cytochrome c*; siehe Kapitel II.1.1). Deshalb wurden den Mäusen eine PCC-Peptidlösung für ein, zwei und vier Stunden oder als Kontrolle PBS injiziert. qPCR-Analysen der RNA der Thymuslysate nach Stimulation der Mäuse zeigen, dass die Gadd45 $\beta$ -mRNA ihr Expressionsmaximum bereits nach einer Stunde erreichte und danach wieder runterreguliert wurde (Abbildung 20a). Ein ähnliche Expressionskinetik der mRNA von Gadd45 $\beta$  ergab sich, wenn MHC Klasse I restringierte N15-TCR transgene Mäuse mit dem an den TCR spezifisch bindenden viralen Peptid VSV8 (*vesicular stomatitis virus nucleoprotein 8*; siehe Kapitel II.1.1) stimuliert wurden (Abbildung 20b). Dies bedeutet, dass das Gadd45 $\beta$ -Gen bereits sehr früh angeschaltet wird und ein sogenanntes *Immediate-Early*-Gen ist. Ergänzend zu diesen

Untersuchungen wurde mit Hilfe von RT-PCR-Analysen die Genexpression von Gadd45 $\beta$ , MEKK4, Nur77 und  $\beta$ -Aktin in mit VSV8 für eine, zwei und vier Stunden stimulierten N15-transgenen Mäusen untersucht (Abbildung 20c). Hierbei konnte die Expression des Gadd45 $\beta$  Gens in ähnlicher Weise wie zuvor gezeigt werden. Interessanterweise erfolgt im Thymus der Mäuse eine konstitutive Expression von MEKK4. Nur77 diente als Marker für die negative Selektion, während  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle diente.



**Abbildung 20: Hochregulation von Gadd45 $\beta$  während der negativen Selektion. (A,B)** *Real Time-PCR*-Analyse zur quantitativen Bestimmung der mRNA-Expression von Gadd45 $\beta$  in N15- bzw. 5CC7-Mäusen nach Stimulation mit 25  $\mu$ g VSV8 (N15-Mäuse) bzw. 25  $\mu$ g PCC (5CC7-Mäuse) für die angegebenen Zeiten. Die Daten wurden gegen GAPDH als Ladekontrolle normalisiert und zeigen ein repräsentatives Experiment von vier Analysen. **(C)** Linke Seite: N15-transgene Mäuse wurden mit 25  $\mu$ g VSV8 für die angegebenen Zeitwerte stimuliert. Anschließend erfolgte eine RT-PCR-Analyse der RNA-Extrakte der den Mäusen entnommenen Thymi mit spezifischen Primern für Gadd45 $\beta$ , Nur77, MEKK4 und  $\beta$ -Aktin. Rechte Seite: N15-transgene Mäuse wurden mit 25  $\mu$ g I4 bzw. VSV8 (negative Selektion) oder mit 25  $\mu$ g L4 bzw. NUBO (positive Selektion) für 1 h stimuliert. Anschließend wurde die RNA der entnommenen Thymi präpariert und mittels RT-PCR auf die Expression der angegeben Gene hin analysiert.

Nun wurde versucht herauszufinden, ob Gadd45 $\beta$  spezifisch während der negativen Selektion oder auch während der positiven Selektion hochreguliert wird. Dazu wurden die N15-transgenen Mäuse mit verschiedenen Peptiden stimuliert. Die Peptide I4 und VSV8 haben eine hohe Affinität zu dem transgenen T-Zellrezeptor und lösen deshalb negative Selektion aus, während die Peptide L4 und NUBO (*NADH ubiquinone oxidoreductase*; siehe Kapitel II.1.1), aufgrund ihrer geringeren Affinität zum T-Zellrezeptor positive Selektion induzieren (Sasada et al., 2001; Sasada et al., 2000). In Mäusen, die *in vivo* mit einem dieser Peptide stimuliert werden, wird dann entweder positive oder negative Selektion induziert. Den so für eine Stunde stimulierten Mäusen wurde anschließend der Thymus entnommen und dann mittels RT-PCR die mRNA Expression von Gadd45 $\beta$ , MEKK4, Nur77 und  $\beta$ -Aktin

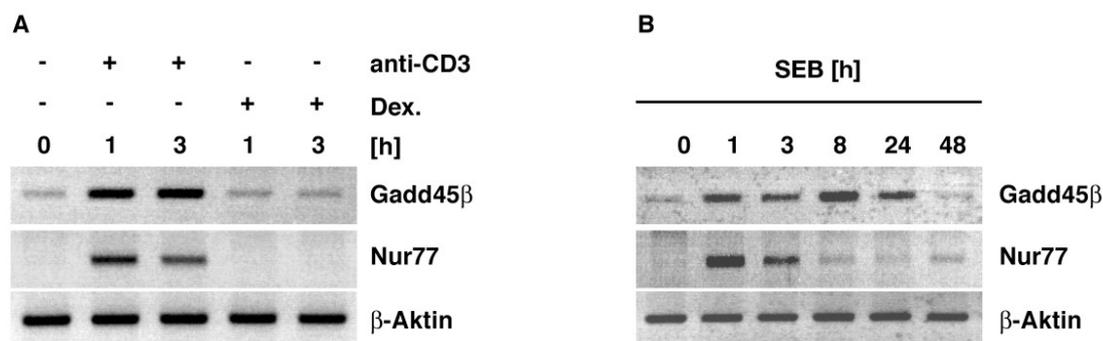


**Abbildung 21: Nachweis des Gadd45 $\beta$ -Protein mit einem selbst generierten Hühner-Antikörper.** (A,B) Hühner wurden mit aufgereinigtem His-markiertem Gadd45 $\beta$ -Protein immunisiert und aus den Dottern der von ihnen gelegten Eiern wurden polyklonale Antikörper gewonnen. Diese wurden mittels Western-Blot-Analyse auf ihre Spezifität für das Gadd45 $\beta$ -Protein untersucht. (A) Western-Blot-Analyse von in den angegebenen Mengen aufgereinigtem GST-markiertem Gadd45 $\beta$ -Protein. Der Nachweis des GST-Gadd45 $\beta$ -Proteins erfolgte mit Hilfe des aufgereinigten Gadd45 $\beta$ -Hühnerantikörpers. (B) NIH/3T3-Zellen wurden mit einem Flag-Gadd45 $\beta$  exprimierenden Plasmid (+) bzw. mit einem Leervektor (-) transfiziert und die Zellen nach 24 h mittels Western-Blots analysiert. Der Nachweis des Gadd45 $\beta$ -Proteins erfolgte mit Hilfe des aufgereinigten Gadd45 $\beta$ -Hühnerantikörpers.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. (C) Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Proteinexpression in N15-Mäusen wie in Abbildung 20c.

bestimmt. Bemerkenswerterweise erfolgte die Genexpression von Gadd45 $\beta$  spezifisch nur während der negativen und nicht während der positiven Selektion. MEKK4 wurde im Thymus konstitutiv exprimiert und durch die Aktivierung des TCR nicht beeinflusst (Abbildung 20c; rechte Seite).

Zur weiteren Bestätigung dieser Ergebnisse wurde versucht, auch die Expression des Proteins von Gadd45 $\beta$  mittels eines spezifischen Antikörpers im Western-Blot nachzuweisen. Da kein geeigneter Antikörper gegen Gadd45 $\beta$  zur Verfügung stand, wurden polyklonale Antikörper im Huhn generiert und aufgereinigt (Abbildung 21 a,b). Dazu wurden Hühner mit rekombinantem und aufgereinigtem His<sub>6</sub>-markiertem Gadd45 $\beta$  immunisiert. Die in Hühnern produzierten Antikörper gelangen auch in großer Menge in den Dotter von Hühnereiern. Deswegen erfolgte die Gewinnung von polyklonalen Antikörpern aus dem Eigelb der Hühnereier. Nach Präparation und Aufreinigung der Antikörper aus den Hühnereiern erfolgte ein erster Test für die Spezifität der Antikörper hinsichtlich der Gadd45 $\beta$ -Detektion im Western-Blot. Um die Detektion der His<sub>6</sub>-Markierung durch einen His<sub>6</sub>-spezifische Antikörper auszuschließen, wurde aufgereinigtes GST-markiertes Gadd45 $\beta$ -Protein in den Mengen 14 ng, 140 ng und 1,4  $\mu$ g auf ein SDS-Gel aufgetragen und die gewonnenen Hühnerantikörper in Western-Blot-Analysen eingesetzt. Das Gadd45 $\beta$ -Protein konnte bis zu einer Konzentration von 140 ng sicher nachgewiesen werden. NIH/3T3 Zellen wurden transient mit einem Flag-Gadd45 $\beta$  überprimierenden Plasmid transient transfiziert. Nach 24 h erfolgte eine Western-Blot-Analyse mit dem Gadd45 $\beta$ -Hühnerantikörper. Der Gadd45 $\beta$ -Hühnerantikörper erkannte in guter Qualität das exprimierte Flag-Gadd45 $\beta$  (Abbildung 21b). In den mit einem Leervektor transfizierten Kontrollzellen konnte keine Bande beobachtet werden. Dies zeigt, dass der gewonnene Gadd45 $\beta$ -Hühnerantikörper spezifisch das Gadd45 $\beta$ -Protein erkennt. Der Gadd45 $\beta$ -Hühnerantikörper wurde nun zur Detektion von endogenem Gadd45 $\beta$  verwendet. Hierzu wurden N15-transgene Mäuse das VSV8 Peptid injiziert und nach ein, zwei und vier Stunden die Thymi entnommen und mittels Western-Blot-Analyse auf die Expression von Gadd45 $\beta$ , MEKK4, Nur77 und  $\beta$ -Aktin hin untersucht. Es erfolgte eine Hochregulation des Gadd45 $\beta$ - und des Nur77-Proteins nach Induktion der negativen Selektion durch die Aktivierung des TCR. Die Proteinexpression von MEKK4 im Thymus konnte unabhängig vom Stimulus nachgewiesen werden (Abbildung 21c, rechte Seite). Ebenfalls wurde die Proteinexpression von Gadd45 $\beta$  in Abhängigkeit von negativer bzw. positiver Selektion auslösender Peptide in den N15-transgenen Mäusen untersucht. Auch

können die Befunde der RNA-Analysen bestätigt werden. Die Expression von Gadd45 $\beta$  erfolgte ausschließlich nach der Induktion der negativen und nicht der positiven Selektion (Abbildung 21c, linke Seite).



**Abbildung 22: Hochregulation von Gadd45 $\beta$  während der negativen Selektion. (A,B)** RT-PCR-Analyse zur Bestimmung der mRNA-Expression von Gadd45 $\beta$ , Nur77 und als Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin in den embryonalen Föten von C57BL/6-Mäusen nach Stimulation mit anti-CD3 und *Staphylococcus enterotoxin B* (SEB) zur Induktion der negativen Selektion. Dexamethason (Dex.) diente zur Induktion von TCR-unabhängiger Apoptose.

Alle bisherigen Untersuchungen fanden in transgenen Mäusen statt, die generell ein sehr geeignetes Tiermodell für die Untersuchung der negativen und positiven Selektion darstellen. Da die Regulation der negativen Selektion im Thymus sehr komplex ist, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es durch die transgenen Veränderungen des T-Zellrezeptors der Mäuse nicht auch zu einer Veränderung der Regulation der negativen Selektion in diesen Mäusen kommt. Um dies auszuschließen, wurde ein weiteres anerkanntes Modell zur Untersuchung der negativen Selektion verwendet, die sogenannte fötale Thymusorgankultur (FTOC). Die Thymi von fötalen Embryonen lassen sich mit relativ geringen Aufwand kultivieren und leicht mit verschiedenen Substanzen stimulieren. Unreife Thymozyten, die über ihren CD3/TCR-Komplex stimuliert werden, sterben durch Apoptose infolge der negativen Selektion. Zur Induktion der negativen Selektion wurden die FTOC deshalb für ein und drei Stunden mit einem anti-CD3-Antikörper behandelt. RT-PCR-Analysen zeigten, dass Gadd45 $\beta$  in einer ähnlichen Kinetik wie der bekannte Marker für negative Selektion Nur77 hochreguliert wurde (Abbildung 22a). Ein Kontrollversuch mit dem Corticosteroid Dexamethason zur Induktion von TCR-unabhängiger Apoptose zeigte keine Hochregulation von Gadd45 $\beta$  und Nur77 (Abbildung 22a). Dexamethason löst Apoptose in Thymozyten nicht über TCR-Bindung, sondern über die Aktivierung des Glucocorticoidrezeptors aus.

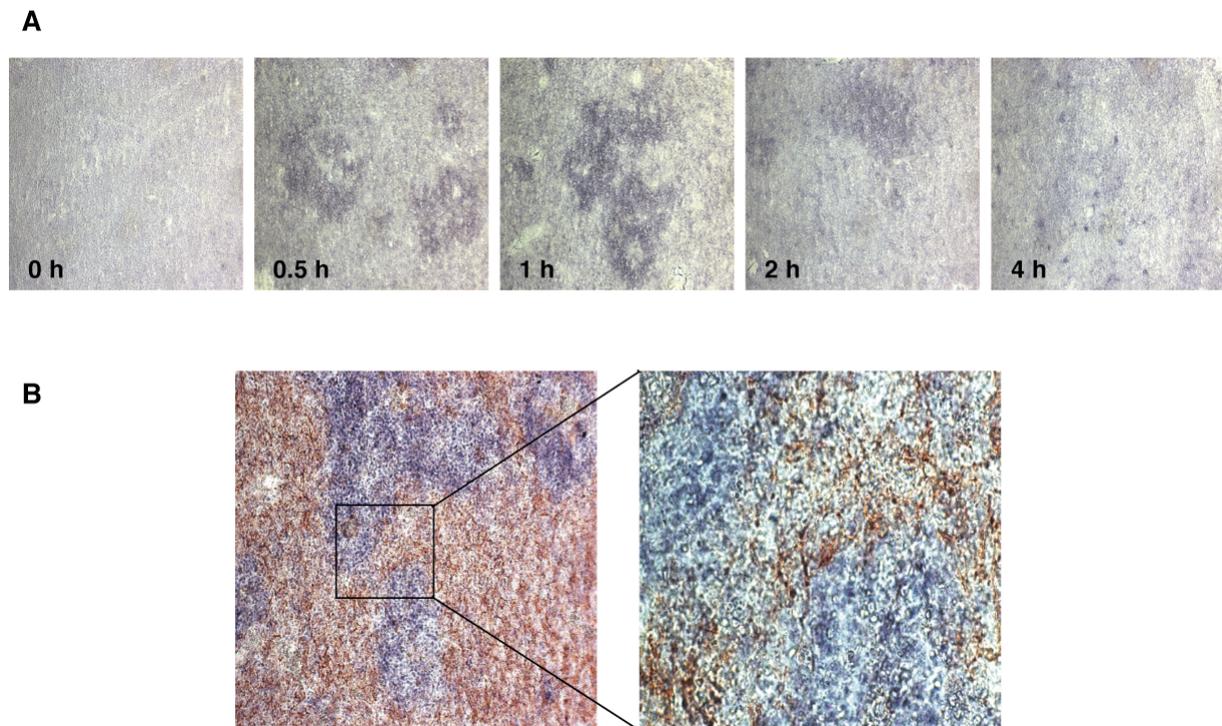
Als weitere Kontrolle der spezifischen Hochregulation von Gadd45 $\beta$  während der negativen Selektion, wurden FTOC mit dem Superantigen *Staphylococcus enterotoxin B* (SEB) stimuliert. SEB hat ebenfalls eine starke Affinität für den T-Zellrezeptor und löst den Prozess der negativen Selektion in den FTOC aus. In Abbildung 22b kann man erkennen, dass SEB bereits nach 1 h die Expression der mRNA von Gadd45 $\beta$  induzierte, was bis 24 h nahezu konstant blieb. Nur77 hingegen war nur transient exprimiert und schon nach 8 h nur noch in sehr geringen Mengen nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Hochregulation von Gadd45 $\beta$  in Abhängigkeit der Stimulation des TCR nachweisen lässt. Gleichfalls konnte die Spezifität der Induktion von Gadd45 $\beta$  während der negativen Selektion anhand von unterschiedlichen Modellen dokumentiert werden.

## 2.2 Gadd45 $\beta$ ist in der Medulla des Thymus lokalisiert

Die voran gegangenen Ergebnisse zeigten deutlich, dass Gadd45 $\beta$  spezifisch während der negativen Selektion induziert wird. Ein weiterer Beweis, um dies zu stützen, wäre es, wenn die Expression von Gadd45 $\beta$  in der Medulla des Thymus lokalisiert wäre, weil in der Medulla Zellen lokalisiert sind, wie z.B. dendritische Zellen und medulläre Epithelzellen, die negative Selektion auslösen können (Kyewski and Klein, 2006). Hierzu wurde eine *in situ* Hybridisierung durchgeführt. Mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung ist es möglich, durch die Verwendung einer spezifischen, Digoxigenin-konjugierten RNA-Sonde die mRNA des zu untersuchenden Protein sichtbar zu machen. N15-transgene Mäuse wurden mit VSV8 zur Induktion der negativen Selektion stimuliert und die Thymi entnommen. Dann erfolgte die Einbettung in Paraffin, um Organschnitte anzufertigen. Anschließend erfolgte zum Nachweis der Lokalisation der Gadd45 $\beta$ -mRNA die RNA-RNA-Hybridisierung. Die Sonde wurde mit einem Digoxigenin-spezifischen Antikörper und abschließender NBT/BZIP-Färbung (blau) sichtbar gemacht. Die Lokalisation der mRNA von Gadd45 $\beta$  konnte in distinkten blauen Arealen detektiert werden. Dabei konnte die größte Expression 1 h nach Stimulation beobachtet werden (Abbildung 23a). Diese Areale deuten auf eine Lokalisation von Gadd45 $\beta$  in der Medulla des Thymus hin. Um dies zu verifizieren, wurde der Cortex des Thymus mit einem Zytokeratin-Antikörper angefärbt. Zytokeratin kommt in großer Menge in den Epithelzellen vor, die ein sehr dichtes Netz bilden. Im Gegensatz dazu enthält die Medulla des Thymus nur Epithelzellen in geringeren Mengen, so dass die Färbung dieser Zellen im Hintergrund nicht sichtbar ist. Als Gegenfärbung zu der Gadd45 $\beta$ -mRNA erfolgte die

Färbung von Zytokeratin in rot. Es konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation der Gadd45 $\beta$ -mRNA sich nicht mit der Cortexfärbung überlagert (Abbildung 23b). Folglich ist der Nachweis gelungen, dass Gadd45 $\beta$  fast ausschließlich in der Medulla des Thymus exprimiert wird und deshalb als ein Markermolekül für die negative Selektion im Thymus dienen kann.

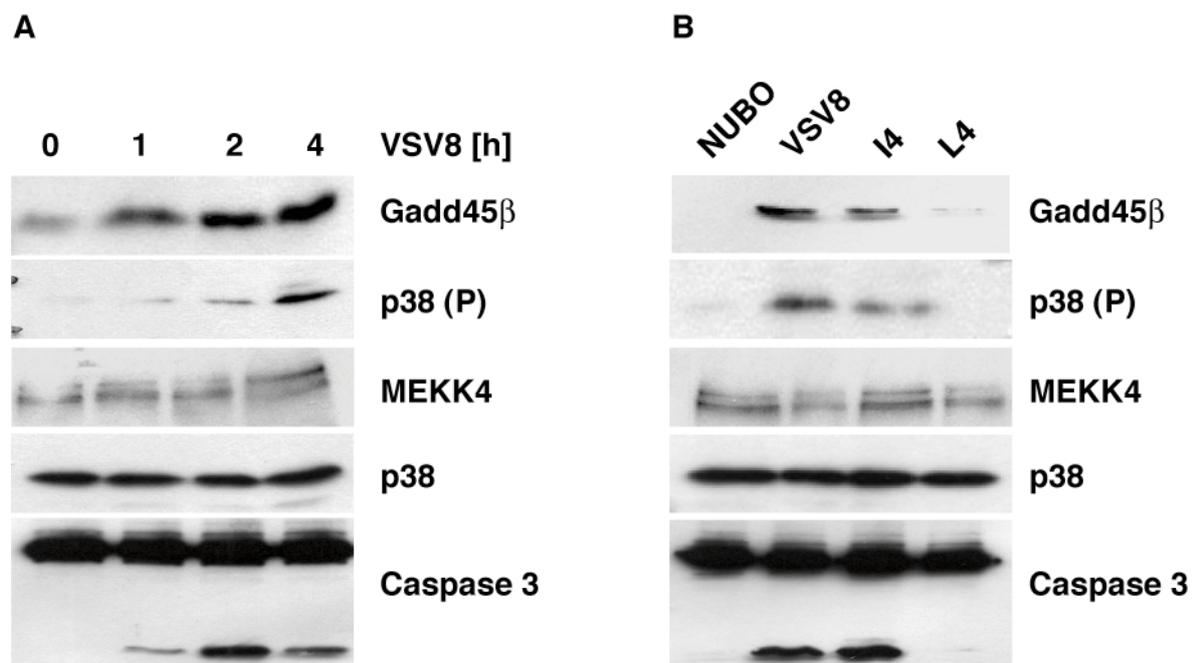


**Abbildung 23: Expression der mRNA von Gadd45 $\beta$  in der Medulla des Thymus.** (A) *In situ* Hybridisierung von Gadd45 $\beta$  im Thymus von N15-Mäusen nach VSV8-Stimulation für die angegebenen Zeitwerte. Die Färbung der Gadd45 $\beta$ -mRNA erfolgte mittels einer spezifischen DNA-Sonde mit dem Farbstoff NBT/BZIP in blau. (B) *In situ* Hybridisierung von Gadd45 $\beta$  wie in (A) von N15-Mäusen nach VSV8-Stimulation für eine Stunde. Zusätzlich wurde zur Kennzeichnung des Thymuscortexes ein spezifischer pan-Zytokeratin Antikörper verwendet und mit dem Farbstoff AEC gefärbt (rot).

### 2.3 Die Koexpression von endogene Gadd45 $\beta$ und MEKK4 während der negativen Selektion führt zu einer Aktivierung von p38

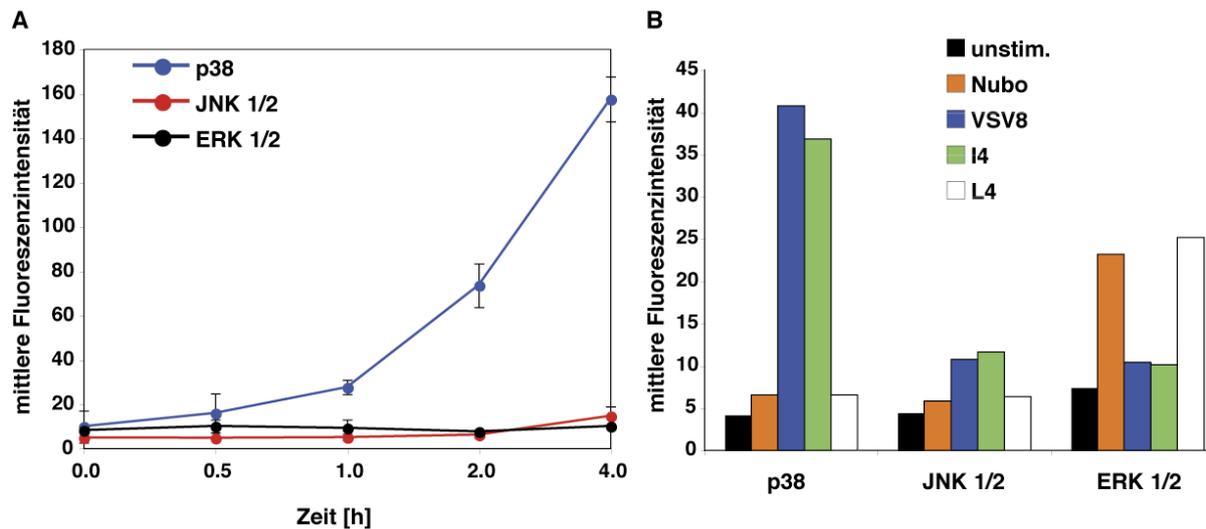
Die oben gemachten Beobachtungen zeigten eindeutig, dass die Induktion von Gadd45 $\beta$  im Thymus spezifisch für die negative Selektion ist. Es stellte sich deshalb die Frage, welche Funktion Gadd45 $\beta$  in der Regulation der negativen Selektion ausübt. Wie bereits in den Abbildungen 20c und 21c ersichtlich, wird MEKK4 konstitutiv im Thymus exprimiert. Da bereits im Kapitel III.1.1 und III.1.2 dargelegt wurde, dass MEKK4 und Gadd45 $\beta$  miteinander interagieren und die MAP-Kinase p38 aktivieren, liegt der Schluss nahe, dass eine Koexpression von endogenem MEKK4 und Gadd45 $\beta$  im Thymus zu einer Aktivierung

von p38 führt. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurden N15-Mäuse mit VSV8 zur Induktion der negativen Selektion stimuliert und die Thymus-Lysate mittels Western-Blot auf die Aktivierung von p38 hin analysiert. Anhand von Abbildung 24a ist zu erkennen, dass es im Zuge der Hochregulation von Gadd45 $\beta$  auch zu einer Aktivierung von p38 kommt, die mit der konstitutiven Expression von MEKK4 einhergeht. Weiterhin zeigt Abbildung 24b, dass diese Aktivierung von p38 spezifisch für die negative Selektion ist, da die Stimulation der N15-Mäuse mit den Peptiden L4 und NUBO, die positive Selektion auslösen, nicht zu einer Aktivierung von p38 führte. Zusätzlich konnte eine Aktivierung von Caspase-3 ausschließlich nach Gabe der negativ selektierenden Peptide beobachtet werden. Dies korrelierte sowohl mit der Expression von Gadd45 $\beta$ , als auch mit der Aktivierung von p38. Caspase-3 diente hier als Marker für Apoptose. Somit ist dies ein erster Hinweis darauf, dass sowohl die Hochregulation von Gadd45 $\beta$  als auch die Aktivierung von p38 im Zuge der negativen Selektion im Thymus in die Regulation der Apoptose eingreifen.



**Abbildung 24: Aktivierung von p38 und Caspase-3 im Thymus führt zur Induktion der negativen Selektion.** (A) Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Proteinexpression von Gadd45 $\beta$ , p38 (P), p38, MEKK4 und aktiver Caspase-3 in N15-Mäusen nach Stimulation mit dem VSV8-Peptid für die angegebenen Zeitwerte. (B) Western-Blot-Analyse wie in A. Die Mäuse wurden mit den angegebenen positiv (NUBO, L4) bzw. negativ (VSV8, I4) selektierenden Peptiden für 1 h stimuliert.

In Abbildung 7c wurde die Spezifität der Aktivierung von p38 durch Gadd45 $\beta$  und MEKK4 gezeigt. Im Folgenden sollte getestet werden, ob es während der negativen und positiven Selektion zu einer Aktivierung auch von anderen MAP-Kinasen kommt. Hierzu wurden N15-



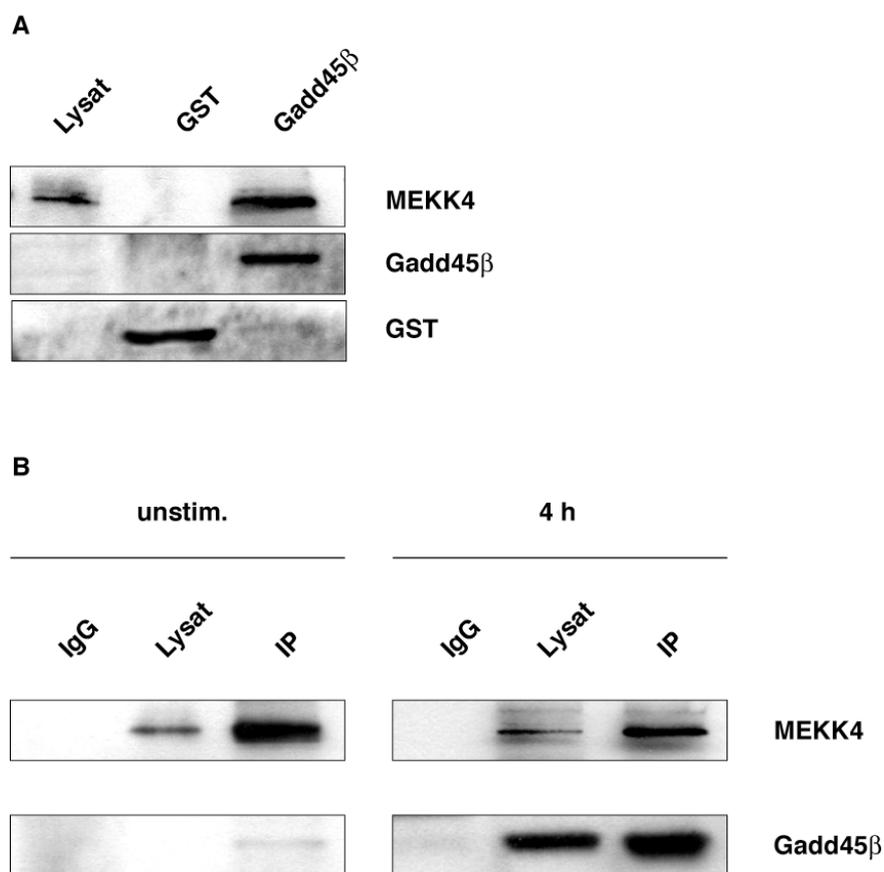
**Abbildung 25: p38 wird sehr stark während der negativen Selektion aktiviert. (A)** CBA-Analyse zur Bestimmung der Phosphorylierung der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK im Thymus von N15-Mäusen nach Stimulation mit VSV8 für die angegebenen Zeitwerte. Die Abbildung zeigt den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten. **(B)** CBA-Analyse zur Bestimmung der Phosphorylierung der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK im Thymus von N15-Mäusen nach Stimulation für 1 h mit den angegebenen Peptiden. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Mäuse mit VSV8 für verschiedene Zeitwerte stimuliert und die Aktivierung der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK mittels eines CBA-Tests analysiert. Es zeigte sich, dass es im Zuge der negativen Selektion zu einer massiven Aktivierung von p38 kam, während in geringerem Maße JNK aktiviert wurde. Dagegen wurde ERK durch die VSV8 Stimulation nicht aktiviert (Abbildung 25a). Nach Induktion der positiven Selektion durch die Peptide NUBO und L4 kam es lediglich zu einer Aktivierung von ERK und nicht zur Aktivierung von JNK bzw. p38 (Abbildung 25b).

In Kapitel III.1.1 konnte gezeigt werden, dass Gadd45 $\beta$  und MEKK4 miteinander interagieren und dies zu einer Aktivierung von p38 führt. Dies wurde erreicht, indem in NIH/3T3-Zellen sowohl Gadd45 $\beta$  als auch MEKK4 überexprimiert wurde. Durch die Induktion der negativen Selektion kommt es zu einer Koexpression von endogenen Gadd45 $\beta$  und MEKK4. Folglich sollten diese beiden Proteine im Thymus miteinander interagieren und ursächlich p38 aktivieren. Um dies zu verifizieren, wurden 5CC7-Mäuse zur Induktion der negativen Selektion mit dem Peptid PCC stimuliert und die Thymuszellen zur Bestimmung der Interaktion von Gadd45 $\beta$  und MEKK4 mittels IP analysiert.

Als erstes erfolgte der Nachweis der Bindung von endogenem MEKK4 an rekombinantes GST-Gadd45 $\beta$  mittels *pull-down*-Tests. Dabei wurde im Thymus von Wildtyp-Mäusen endogen exprimiertes MEKK4 spezifisch durch Gadd45 $\beta$  präzipitiert und im Western-Blot

nachgewiesen. Um eine Bindung von MEKK4 an GST auszuschließen, diente ein *pull-down* mit GST als Kontrolle. MEKK4 konnte nicht durch den GST *pull-down* präzipitiert werden (Abbildung 26a). Die Präzipitation von endogenem Gadd45 $\beta$  über endogenes MEKK4 konnte durch eine IP von MEKK4 in unstimulierten und mit PCC-stimulierten 5CC7-Mäusen beobachtet werden (Abbildung 26b). Nach der Stimulation der Mäuse erfolgte eine starke Expression von Gadd45 $\beta$ , welches dann mit hoher Effektivität zusammen mit MEKK4 präzipitiert werden konnte. Als Kontrolle diente eine IP mit unspezifischem Mausantikörper (IgG) um die unspezifische Bindung von MEKK4 sowohl an die Matrix als auch an den Antikörper auszuschließen.



**Abbildung 26: Spezifische Interaktion von Gadd45 $\beta$  und MEKK4 im Thymus.** (A) *Pull-down*-Analyse mit GST-Gadd45 $\beta$  bzw. GST (je 2  $\mu$ g Protein) in Thymuslysaten von unstimulierten C57BL/6-Mäusen zur Bestimmung der spezifischen Interaktion von Gadd45 $\beta$  mit MEKK4. Als Kontrolle diente GST, um die Präzipitation MEKK4 durch GST auszuschließen. (B) Immunpräzipitation von endogenem MEKK4 in Thymuslysaten von unstimulierten bzw. für 4 h mit PCC stimulierten 5CC7-Mäusen zur Bestimmung der spezifischen Interaktion von Gadd45 $\beta$  mit MEKK4. Unspezifische Antikörper (IgG) dienten als Kontrolle.

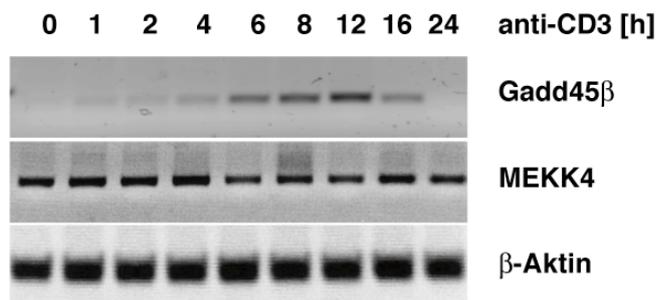
Diese Befunde deuteten daraufhin, dass die Interaktion von Gadd45 $\beta$  mit MEKK4 ursächlich für die Aktivierung von p38 während der negativen Selektion verantwortlich ist. Da aber in

diesem System der direkte Beweis der Aktivierung von p38 durch Gadd45 $\beta$  und MEKK4 nicht zu erbringen war, wurden die folgenden Experimente in einer geeigneten Zelllinie durchgeführt. Denn durch den Einsatz von *short hairpin* RNA (shRNA, siehe Kapitel III.2.4) in Zellen ist es möglich, die Expression von endogenem Gadd45 $\beta$  gezielt zu unterbinden und so eine direkte Verbindung der Hochregulation von Gadd45 $\beta$  und der damit verbundenen putativen Aktivierung von p38 herzustellen.

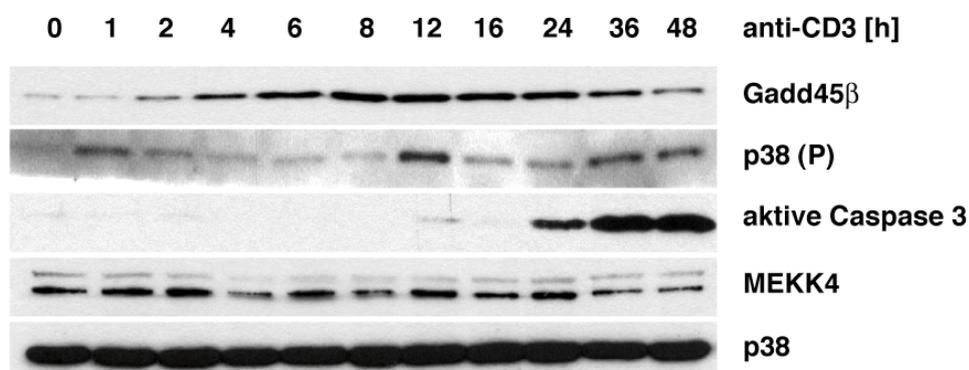
#### 2.4 Die Koexpression von Gadd45 $\beta$ und MEKK4 in CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen führt zu einer verlängerten Aktivierung von p38

Die lymphoide Zelllinie Thy278 eignet sich sehr gut, um den Prozess der negativen Selektion zu untersuchen. Denn sie zeichnet sich durch die Koexpression der beiden Korezeptoren CD4 und CD8 aus. Die Koexpression von CD4 und CD8 tritt im Organismus ausschließlich in unreifen T-Zellen auf. Deshalb sind die Thy278-Zellen biochemisch diesen Zellen im Thymus

**A**



**B**

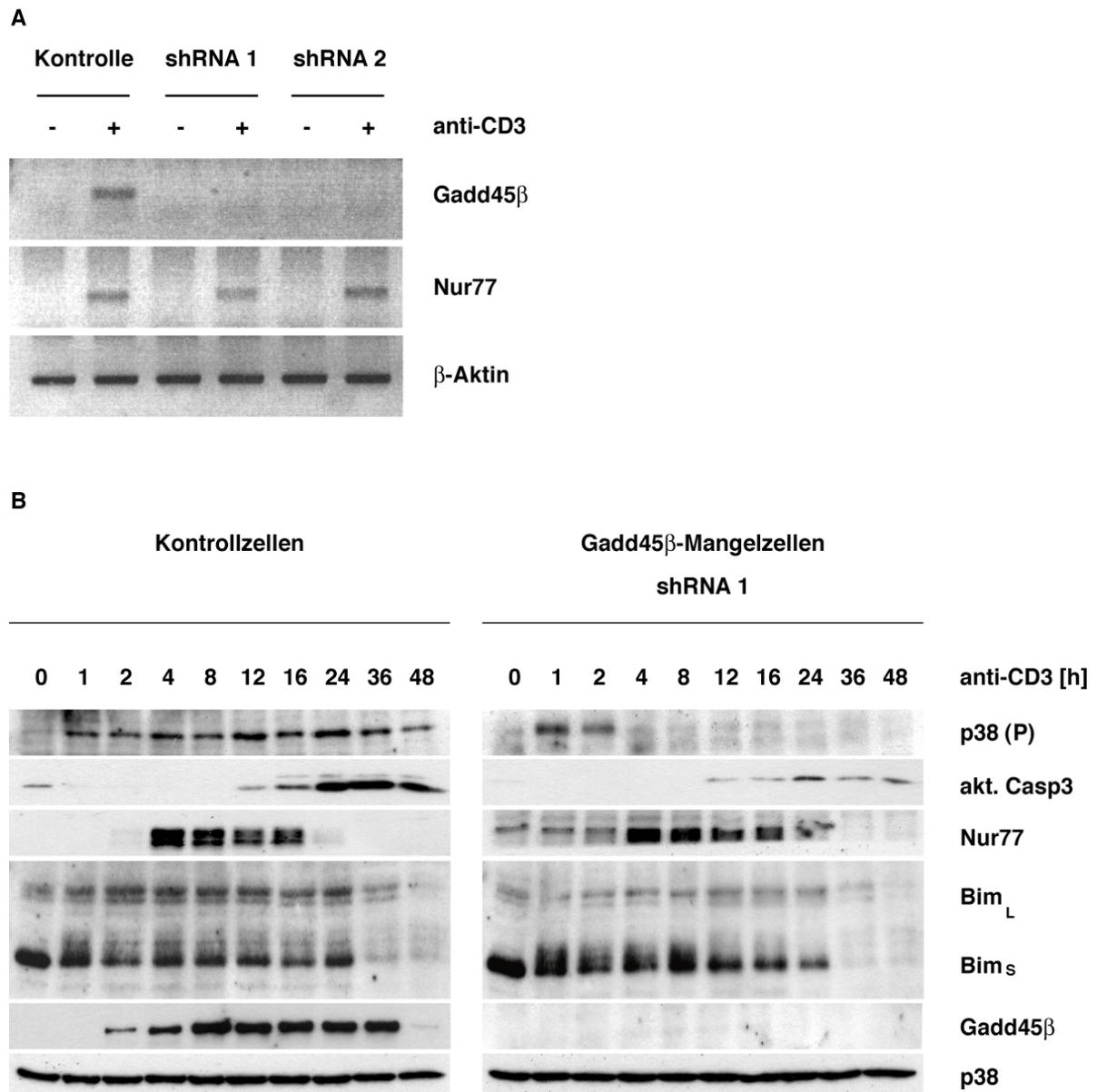


**Abbildung 27: Expression von MEKK4 und Gadd45 $\beta$  in Thy278-Zellen.** (A) RT-PCR-Analyse zur Bestimmung der mRNA-Expression von Gadd45 $\beta$ , MEKK4 und  $\beta$ -Aktin in Thy278-Zellen nach CD3-Stimulation für die angegebenen Zeitwerte. (B) Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Proteinexpression von Gadd45 $\beta$ , p38 (P), p38, MEKK4 und aktiver Caspase-3 in Thy278-Zellen nach CD3-Stimulation für die angegebenen Zeitwerte.

sehr ähnlich, die den Prozess der negativen Selektion durchlaufen, und können deshalb als ein Modell zu Untersuchung der negativen Selektion in einer Zelllinie dienen (Schmitz et al., 2006).

Als erstes wurde untersucht, ob in den Thy278-Zellen eine Expression von Gadd45 $\beta$  und MEKK4 nach CD3-Stimulation erfolgt. Hierzu wurden die Zellen mit anti-CD3 Antikörper inkubiert und die Transkription der beiden Gene mittels RT-PCR analysiert. Ähnlich wie im Thymus der Mäuse wurde MEKK4 konstitutiv transkribiert. Die Transkription von Gadd45 $\beta$  hingegen war erst nach TCR-Stimulation zu beobachten (Abbildung 27a). Die gemachten Beobachtungen konnten gleichfalls auf Proteinebene bestätigt werden, indem die Thy278-Zellen mittels Western-Blot analysiert wurden (Abbildung 27b). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es im Zuge der TCR-Aktivierung zu einer Aktivierung von Caspase-3 nach 24 h kam. Ebenfalls wurde p38 durch die Stimulation mit dem anti-CD3 Antikörper schon nach einer kurzen Inkubationszeit von 1 h aktiviert und blieb auch noch nach 48 h aktiv.

Da die Expression von Gadd45 $\beta$  und MEKK4 in den Thy278-Zellen in einer ähnlichen Kinetik für Gadd45 $\beta$  wie in den *in vivo* Modellen abläuft und MEKK4 konstitutiv exprimiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Thy278-Zellen zur Untersuchung der Aktivierung von p38 durch Gadd45 $\beta$  und MEKK4 eignen. Um den direkten Beweis zu erbringen, dass die Aktivierung von p38 während der negativen Selektion in Abhängigkeit der Interaktion von Gadd45 $\beta$  mit MEKK4 steht, wurde nun durch den Einsatz sogenannter RNA-Interferenz (RNAi) die Expression von Gadd45 $\beta$  in den Thy278-Zellen blockiert. RNAi wird vermittelt durch die Bindung einer kurzen RNA mit einer Länge von ca. 21 Nukleotiden an eine komplementäre mRNA-Sequenz. Diese RNA-Moleküle werden siRNA (*short interfering RNA*) oder shRNA (*short hairpin RNA*) genannt. Die entstandene doppelsträngige RNA wird im RISC-Komplex (*RNA-induced silencing complex*) abgebaut und verhindert so die Translation der mRNA. Zum Einsatz kamen deshalb Lentiviren, die Gadd45 $\beta$ -spezifische shRNAs exprimieren, welche in den RISC eingebaut werden und die Expression von Gadd45 $\beta$  reprimieren. Zusätzlich tragen die Viren eine Selektionskassette, so dass die erfolgreich infizierten Zellen von den nicht infizierten Zellen durch ein Selektionsmedium, isoliert werden können. Die so generierten Thy278-Zellen wurden dann auf das Vorhandensein der Gadd45 $\beta$ -mRNA mittels RT-PCR untersucht. Um eine sichere Aussage hinsichtlich der Funktion von Gadd45 $\beta$  zu machen, wurden zwei shRNA-Sequenzen verwendet (shRNA1 und 2), die an unterschiedlichen Stellen der mRNA von Gadd45 $\beta$



**Abbildung 28: Die Repression von Gadd45β führt zu einer verkürzten p38-Aktivierung.** (A) RT-PCR-Analyse zur Bestimmung der mRNA-Expression der angegebenen Gene in Thy278-Zellen nach CD3-Stimulation für die angegebenen Zeitwerte. Die Zellen wurden zur stabilen Repression von Gadd45β mit shRNA (shRNA1 und shRNA 2) exprimierenden Lentiviren infiziert, als Kontrolle diente shRNA ohne Zielsequenz (Kontrolle). (B) Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Proteinexpression der angegebenen Proteine in Thy278-Zellen nach CD3-Stimulation für die angegebenen Zeitwerte. Die Zellen wurden zur stabilen Repression von Gadd45β mit shRNA1 (Mangelzellen) exprimierenden Lentiviren infiziert, als Kontrolle diente shRNA ohne Zielsequenz (Kontrollzellen).

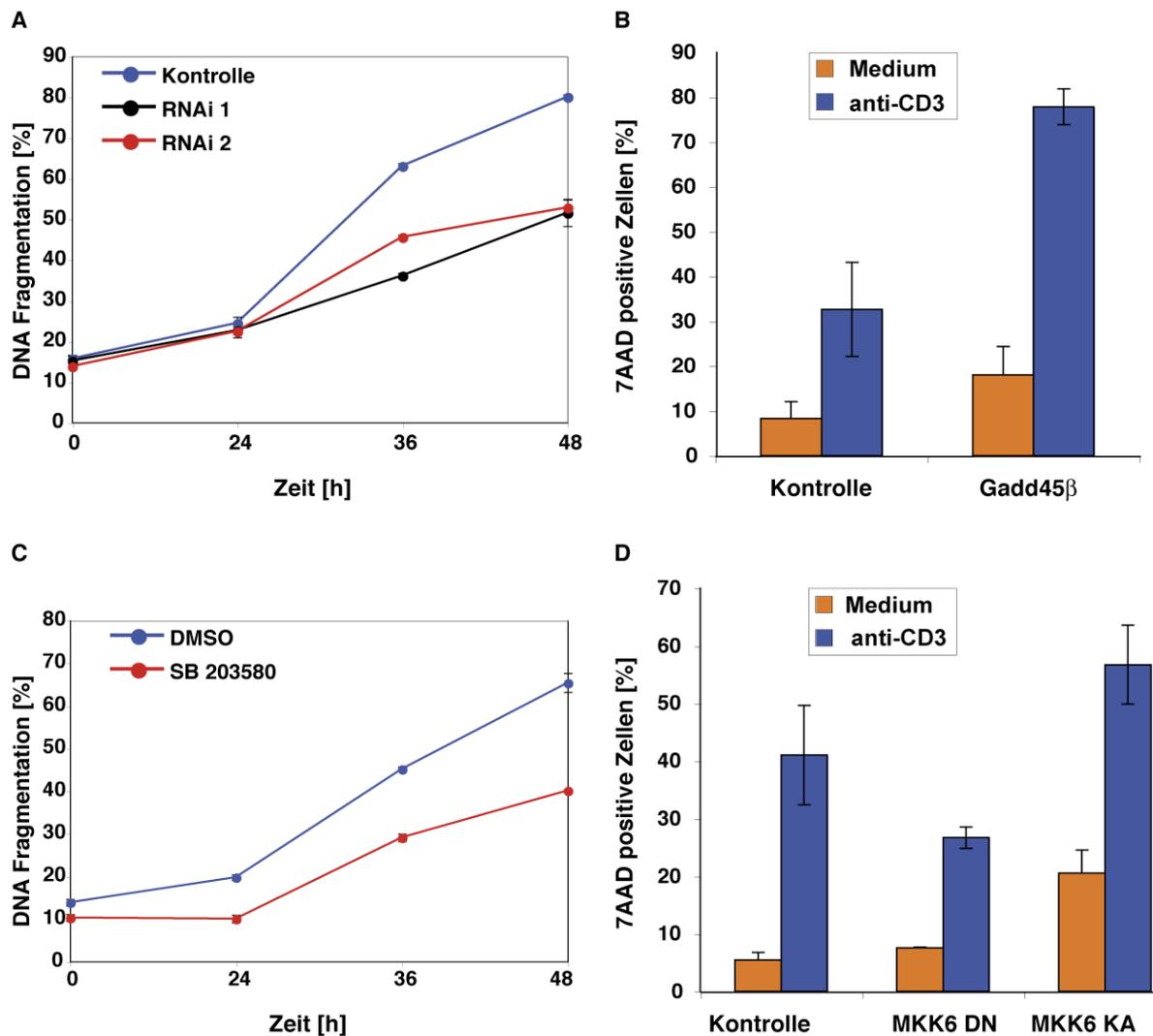
binden. Weiterhin wurden Thy278-Kontrollzellen generiert, die eine shRNA exprimiert, welche an keine bekannte mRNA bindet. Es zeigte sich, dass sowohl shRNA1 als auch shRNA2 im Stande waren, die Expression der mRNA von Gadd45β fast vollständig zu verhindern, während es in den Kontrollzellen zu einer normalen Expression der Gadd45β-mRNA kam (Abbildung 28a). Das Gleiche galt für das Protein von Gadd45β, das nahezu

gänzlich reprimiert wurde (Abbildung 28b). Western-Blot-Analysen erwiesen, dass sich Gadd45 $\beta$ -Mangelzellen hinsichtlich der Protein-Expression in zwei Punkten von den Kontrollzellen unterschieden. Erstens führte die Stimulation der Mangelzellen mit anti-CD3 zu einer verkürzten und transienten Aktivierung von p38 und zweitens war die Aktivierung von Caspase-3 im Vergleich zu den Kontrollzellen nach CD3-Stimulation deutlich reduziert. Demgegenüber wurden andere Regulatoren der negativen Selektion wie Nur77 und Bim unverändert exprimiert. Dies spricht dafür, dass Gadd45 $\beta$  die Aktivierung von p38 durch die Interaktion mit MEKK4 einen bisher unbekanntem Signalweg der negativen Selektion reguliert.

## **2.5 Die Aktivierung von p38 durch den Gadd45 $\beta$ /MEKK4-Signalweg nach TCR-Stimulation führt in CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zum Zelltod**

Die bisher erhaltenen Ergebnisse sprechen für eine pro-apoptotische Wirkung von Gadd45 $\beta$ , weil es nach Stimulation mit CD3 in den Gadd45 $\beta$ -Mangelzellen zu einer verringerten Aktivierung von Caspase-3 kommt. Deshalb wurden die Gadd45 $\beta$ -Mangelzellen und deren Kontrollzellen nach CD3-Stimulation mittels Nicoletti-Tests analysiert. Im Vergleich zu den Kontrollzellen war in den Gadd45 $\beta$ -Mangelzellen eine ca. 30% geringere Apoptoserate zu beobachten (Abbildung 29a). Daher sollte es im umgekehrten Fall, also bei der Überexpression von Gadd45 $\beta$  in den Thy278-Zellen zu einer erhöhten Apoptoserate kommen. Hierzu wurden Thy278-Zellen mit Gadd45 $\beta$  exprimierenden Retroviren infiziert. Die Überexpression von Gadd45 $\beta$  in den Thy278-Zellen führte zu einem leichten Anstieg der Apoptose schon in den unstimulierten Zellen, während die Todesrate nach CD3-Stimulation im Vergleich zu den Kontrollzellen stark ansteigt (Abbildung 29b). Dies bestätigte die pro-apoptotische Wirkung von Gadd45 $\beta$  in diesem Zellsystem eindrucksvoll.

Letztlich wurde hierdurch die Wirkung von Gadd45 $\beta$  im Hinblick auf die Regulation der Apoptose geklärt. Es spricht einiges dafür, dass dies im Zusammenhang mit der verkürzten p38-Aktivierung durch die Repression von Gadd45 $\beta$  steht. Um diese Vermutung zu beweisen, wurde die Wirkung von aktiver p38 nach TCR-Stimulation in den Thy278-Zellen untersucht. Hierzu wurde die Kinaseaktivität von p38 durch die Behandlung der Thy278-Zellen mit dem Inhibitor SB203580 unterdrückt. Die Thy278-Zellen, in welchen die Kinaseaktivität von p38 durch SB203580 nach TCR-Stimulation inhibiert war, zeigten eine um 20% erniedrigte Apoptoserate (Abbildung 29c). Sie war in ähnlich hohem Maße verringert wie in den



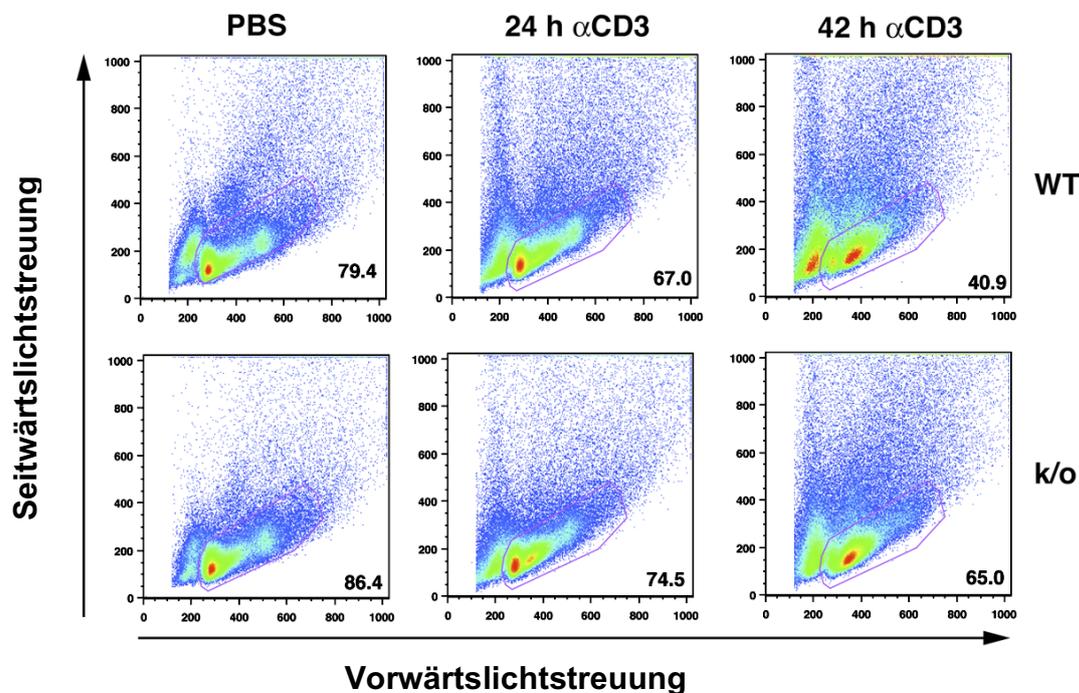
**Abbildung 29: Die Expression von Gadd45 $\beta$  und die Aktivierung von p38 in Thy278-Zellen führt zur einer erhöhten Apoptoserate. (A)** Nicoletti-Analyse zur Bestimmung der DNA-Fragmentierung von mit anti-CD3 stimulierten Kontroll- bzw. Gadd45 $\beta$ -Mangelzellen für die angegebenen Zeitwerte. **(B)** 7AAD-Assay zur Bestimmung von Zelltod in mit anti-CD3 stimulierten Thy278-Zellen. Die Zellen wurden zur Überexpression von Gadd45 $\beta$  mit Retroviren infiziert und nach 36 h mit anti-CD3 stimuliert. Die Messung der 7AAD positiven Zellen erfolgte nach weiteren 24 h. **(C)** Nicoletti-Analyse zur Bestimmung der DNA-Fragmentierung von mit anti-CD3 stimulierten Thy278-Zellen für die angegebenen Zeitwerte. Der p38-Inhibitor SB203580 wurde nach 1h nach der Stimulation hinzu gegeben. **(D)** 7AAD-Assay zur Bestimmung von Zelltod in den Thy278-Zellen. Die Zellen wurden zur Inhibition (MKK6 DN) bzw. Aktivierung (MKK6 KA) von p38 mit den entsprechenden Retroviren infiziert und nach 36 h mit anti-CD3 stimuliert. Die Messung der 7AAD positiven Zellen erfolgte nach weiteren 24 h.

Gadd45 $\beta$ -Mangelzellen. Zur Verifizierung dieses Befunds wurde nun auf eine andere Weise die Aktivierung der Substrate von p38 verhindert. Hierzu wurden zwei Mutanten von MKK6 verwendet. Als Analog zu einem Inhibitor wurde das dominant negative MKK6 (MKK6 DN) mittels Retrovirus in die Thy278-Zellen gebracht. MKK6 DN bindet zwar an p38, kann diese aber nicht phosphorylieren. Da MKK6-DN durch Überexpression im Überschuss vorhanden

ist, kommt es zu einer kompetitiven Verdrängung des endogenen MKK6 durch die inaktive Form von MKK6 und damit zur Inhibition von p38. Die konstitutiv aktive Form von MKK6 (MKK6 KA) hingegen aktiviert p38 dauerhaft. In den Thy278-Zellen, in denen p38 durch die Expression von MKK6 DN inhibiert war, konnte eine verringerte Apoptoserate nach CD3-Stimulation im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet werden. Stattdessen wiesen mit MKK6 KA-transduzierte Thy278-Zellen schon in unstimulierten Zustand eine leicht erhöhte Apoptoserate auf. Nach TCR-Stimulation lag die Apoptoserate in den Zellen mit konstitutiv aktivierter p38 um etwa 25% höher (Abbildung 29d).

## 2.6 Gadd45 $\beta$ -defiziente Thymozyten zeigen ein verändertes CD4/CD8 Differenzierungsmuster und geringere Sensitivität gegenüber TCR-induzierter Apoptose

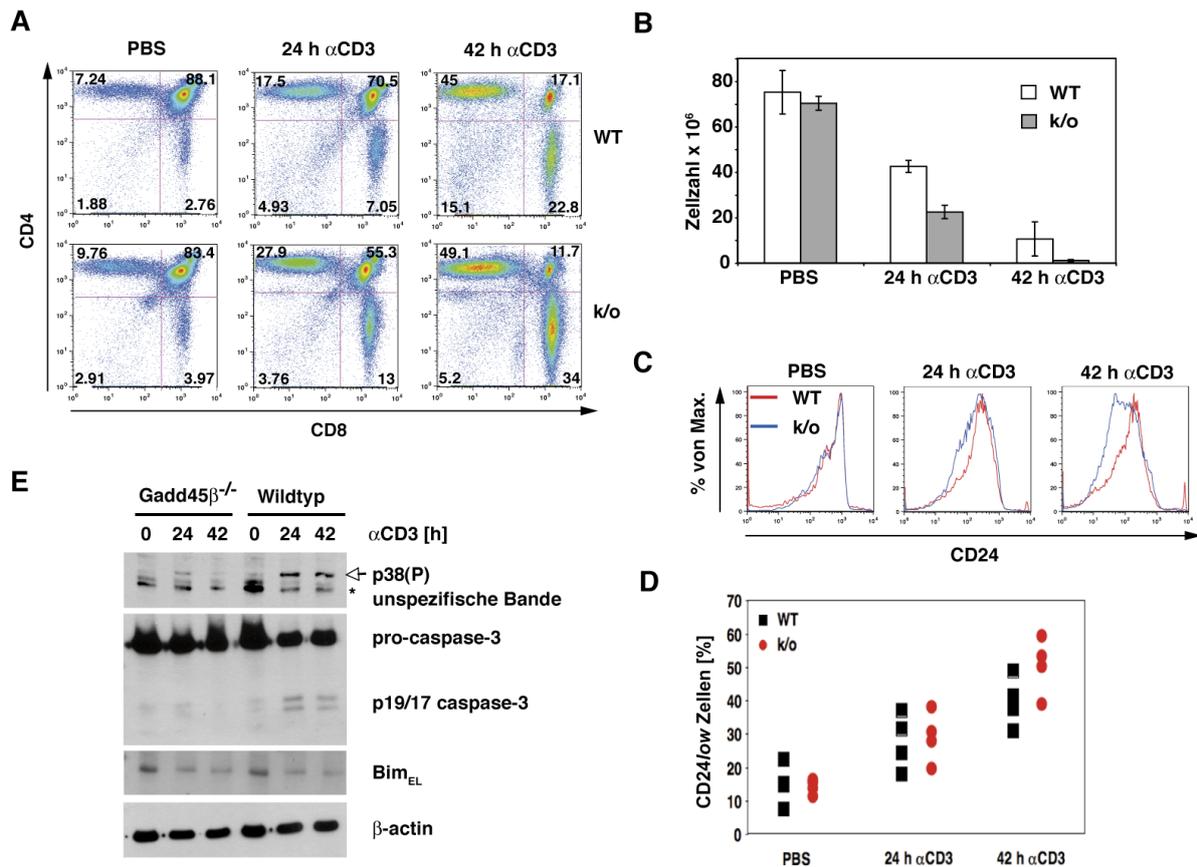
Abschließend wurde die Rolle von Gadd45 $\beta$  *in vivo* untersucht. Dazu wurde Gadd45 $\beta$ -defizienten- und Wildtyp-Mäusen entweder anti-CD3 Antikörper oder zur Kontrolle PBS *i.v.* injiziert. Nach 24 h bzw. 42 h wurden die Thymi entnommen und mittels FACS auf die Expression von CD4, CD8 und CD24 analysiert. CD24 wird nur in unreifen T-Zellen exprimiert und dient somit als ein Marker für den Reifestatus von Thymozyten. Es zeigte sich,



**Abbildung 30: Gadd45 $\beta$ -defiziente Thymozyten zeigen erhöhte Resistenz gegenüber TCR-induzierter Apoptose.** Gadd45 $\beta$ -defiziente und C57BL/6 Wildtyp-Mäuse wurden für 24 und 42 h mit 200  $\mu$ g anti-CD3 durch *i.v.* Injektion stimuliert. Anschließend erfolgte eine morphologische Analyse zur Bestimmung der Zellvitalität mittels FACS.

dass die Gadd45 $\beta$ -defizienten Thymozyten im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen nach der TCR-Stimulation einen erhöhten Anteil an lebenden Zellen aufwiesen (Abbildung 30). Des Weiteren konnte eine erhöhte Anzahl an CD4 bzw. CD8 einzelpositiven Thymozyten nach der TCR-Stimulation nachgewiesen werden. Besonders hoch fiel der Unterschied 24 h nach der Stimulation aus (Abbildung 31a). Dies deutete auf eine beschleunigte Reifung der Thymozyten hin. Übereinstimmend mit dieser Vermutung konnte eine schnellere Depletion der doppeltpositiven Thymozyten in den Gadd45 $\beta$ -defizienten Mäusen gemessen werden (Abbildung 31b). Zusätzlich konnte eine verringerte Expression von CD24 in den CD4 einzelpositiven Thymuszellen der Gadd45 $\beta$ -defizienten Mäusen detektiert werden (Abbildung 31 c,d). Um den Einfluss der fehlenden Expression von Gadd45 $\beta$  in den *knock-out* Mäusen im Hinblick auf den Signalmechanismus der negativen Selektion zu untersuchen, wurden Thymi der mit anti-CD3 stimulierten Mäusen auf die Aktivierung von p38 und Caspase-3 mittels Western-Blot hin analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Thymozyten der Gadd45 $\beta$ -defizienten Mäusen ähnlich wie die Thy278-Zellen eine verringerte Aktivierung von Caspase-3 aufwiesen. Ebenfalls wie in den Thy278-Zellen konnte eine verkürzte und verringerte p38 Aktivierung detektiert werden, während die Expression von Bim in den *knock-out* Mäusen unverändert blieb (Abbildung 31e).

Diese Befunde lassen schlussfolgern, dass Gadd45 $\beta$  für die TCR-induzierte Apoptose von Thymozyten notwendig ist und damit zur negativen Selektion beiträgt. Darüber hinaus kann in Abwesenheit von Gadd45 $\beta$  durch die verkürzte Aktivierung von p38 ein negativ selektionierendes TCR-Signal in ein positiv selektionierendes umgewandelt werden.



**Abbildung 31: Gadd45β-defiziente CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Thymozyten zeigen eine veränderte Differenzierungskinetik.** (A) Gadd45β-defiziente und C57BL/6 Wildtyp-Mäuse wurden für 24 h und 42 h mit 200 µg anti-CD3-Antikörper durch i.v. Injektion stimuliert. Anschließend erfolgte eine Färbung der CD4- und CD8-Expression der Thymozyten und die Messung mittels FACS. Die Abbildung zeigt, ein repräsentatives FACS-Profil. (B) Die absolute Zahl aller Thymozyten wurde bestimmt und davon die relative Zahl der CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Thymozyten berechnet. Die Zahlen repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. (C) Mäuse wurden wie in (A) behandelt und dann die Thymozyten auf die Expression von CD24 mittels FACS untersucht. CD24 Histogramme der CD4 einzelpositiven Zellen. (D) Zusammenstellung des prozentualen Anteils der CD24<sup>low</sup> exprimierenden Zellen aus vier unabhängigen Experimenten. (E) Mäuse wurden wie in (A) behandelt und die Thymi der Mäuse mittels Western-Blot-Analyse nach p38 (P), Caspase-3, Bim und β-Aktin hin untersucht.

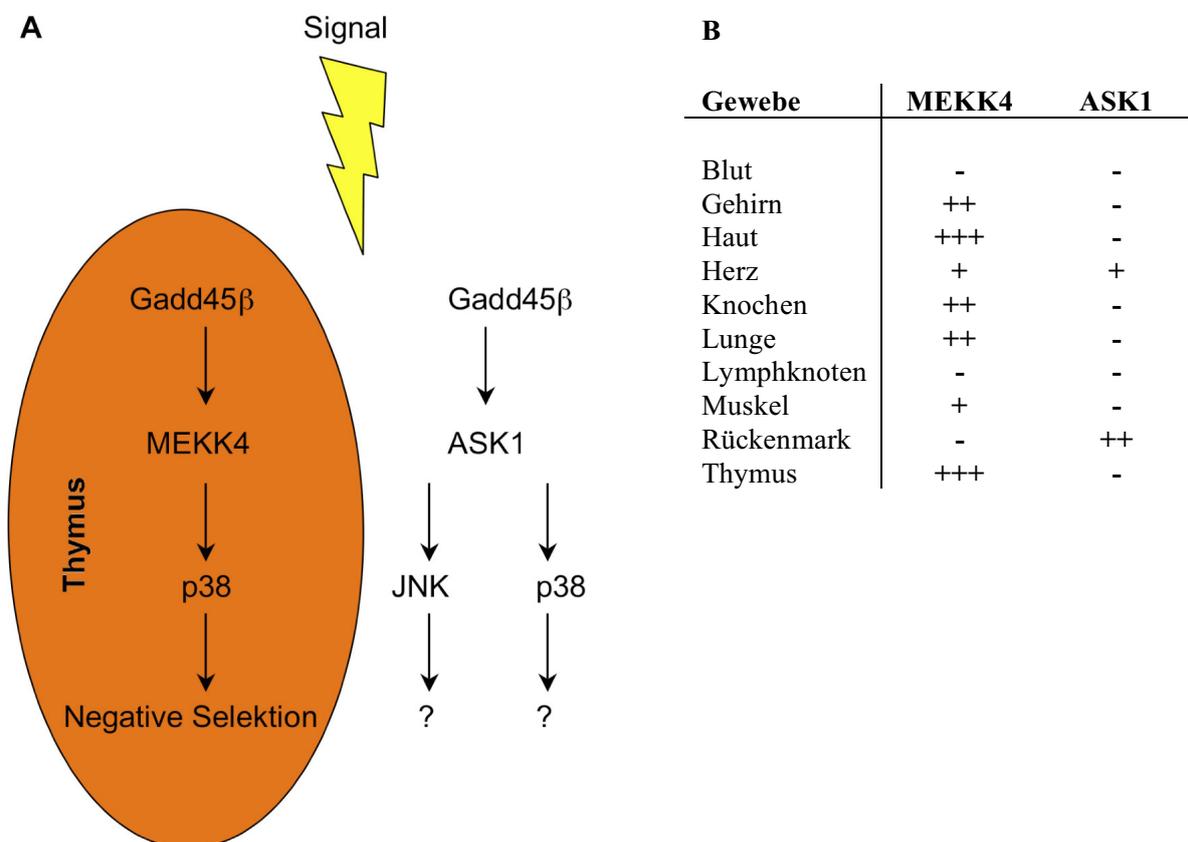
## IV. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den verschiedenen Aspekten der durch Gadd45 $\beta$  regulierten Signalwege. Der Fokus bestand darin, herauszufinden, in welchem physiologischen Kontext das als Stresssensor bekannte Protein seine Wirkung entfaltet. In der Literatur wurden bereits verschiedene Signalwege und Wirkweisen von Gadd45 $\beta$  diskutiert. Gadd45 $\beta$  ist im Wesentlichen an der Regulation von zwei wichtigen zellbiologischen Prozessen beteiligt. Einmal ist dies die Zellzykluskontrolle, die über die Interaktion von Gadd45 $\beta$  mit cdc2 gesteuert wird, und zum anderen die Regulation der Apoptose, die aus der Kontrolle der Aktivierung der beiden MAP-Kinasen JNK und p38 resultiert. In beiden Fällen wird die Expression von Gadd45 $\beta$ , welches in der Regel nicht konstitutiv exprimiert wird, infolge von Zellstress induziert. Letztlich ist die Rolle von Gadd45 $\beta$  innerhalb dieser Signalmechanismen noch nicht ausreichend verstanden. Um hier weiter führende Einblicke zu erhalten, erfolgten die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente.

### 1 Gadd45 $\beta$ und MEKK4 als Regulatoren von MAP-Kinasen

Für die humanen Proteine von Gadd45 $\beta$  und der MAP-3K MEKK4 konnte eine Interaktion und eine daraus resultierende Aktivierung von p38 gezeigt werden. Die Interaktion der murinen Proteine ist vor dieser Arbeit noch nicht untersucht. Die hier vorgestellten Daten, zeigen erstmals die Interaktion und auch die Aktivierung von p38 durch die Interaktion der murinen Proteine von Gadd45 $\beta$  und MEKK4. Jedoch wurde keine Aktivierung von anderen MAPKs wie JNK bzw. ERK beobachtet. Während die Tatsache, dass ERK nicht durch Gadd45 $\beta$  und MEKK4 aktiviert wird, durch bereits publizierten Daten gestützt wird (Liebermann et al., 2007), gibt es andere Studien, die über eine Gadd45 $\beta$ - und MEKK4-abhängige Aktivierung von JNK berichten. Denn es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Gadd45 $\beta$  zu einer Aktivierung von JNK und p38 führt, während es nicht zu einer Aktivierung von ERK kommt (Takekawa und Saito, 1998). Allerdings fehlt für diese Daten die physiologische Relevanz, da lediglich die Phosphorylierung von JNK durch Gadd45 $\beta$  in einem *in vitro* Kinase-Assay demonstriert wurde.

In Gadd45 $\beta$ -defizienten Mäusen kommt es in den peripheren Th1-T-Zellen nach TCR-Stimulation zu einer verringerten Aktivierung von p38 und JNK (Lu et al., 2004), während nach TCR-Stimulation in Th1-T-Zellen aus MEKK4-defizienten Mäusen lediglich eine verringerte Aktivierung von p38 und nicht von JNK beobachtet werden konnte (Chi et al., 2004). Jedoch weisen die MEKK4- und Gadd45 $\beta$ -defizienten Mäuse auch einen gemeinsamen Phänotyp auf. Denn CD4<sup>+</sup>-Zellen von diesen Mäusen produzieren weniger IFN $\gamma$  nach TCR-Stimulation. Dies steht in Zusammenhang mit einer geringeren Aktivierung von p38, einem bekanntem Regulator der Produktion von IFN $\gamma$  in T-Zellen (Rincon et al., 1998). Daraus kann man schließen, dass die mögliche Aktivierung von JNK durch Gadd45 $\beta$  nicht über die Interaktion mit MEKK4 induziert wird, sondern unabhängig davon ist. Hierzu



**Abbildung 32: Modell zur Aktivierung von JNK und p38 durch Gadd45 $\beta$ .** (A) Putative zell- und gewebespezifische Aktivierung von JNK und p38 durch die Interaktion von Gadd45 $\beta$  mit den verschiedenen MAP-3Ks MEKK4 und ASK1. Nach der Hochregulation von Gadd45 $\beta$  durch ein Signal kommt es, abhängig von dem Zelltyp, zur Interaktion mit entweder ASK1 oder MEKK4. Während die Interaktion von Gadd45 $\beta$  mit MEKK4 lediglich zu Aktivierung von p38, z.B. im Thymus, führt, kann über die Interaktion von Gadd45 $\beta$  mit ASK1 sowohl p38 als auch JNK aktiviert werden. (B) ASK1 und MEKK4 werden in der Regel konstitutiv exprimiert, jedoch ist dies Zell- bzw. Gewebetyp-spezifisch. Datenbankanalyse (UniGene) der Genexpression von MEKK4 und ASK1. Die Genexpression wurde anhand sogenannter ESTs (*expressed sequence tags*) detektiert.

passen die hier gezeigten Befunde, dass es durch eine Hochregulation von Gadd45 $\beta$  im Thymus zu einer MEKK4-abhängigen Aktivierung von p38 kommt. Die Aktivierung von JNK, genauso wenig wie die Aktivierung von ERK, konnte in diesem physiologischen Zusammenhang nicht beobachtet werden. Als weitere Gadd45 $\beta$ -interagierende Kinase wurde die MAP-3K ASK1 beschrieben (Papa et al., 2004a). ASK1 ist in der Lage über die Phosphorylierung von MKK3/6, sowohl JNK als auch p38 zu aktivieren (Takeda et al., 2008). Ein möglicher alternativer Signalweg zur Aktivierung von JNK durch Gadd45 $\beta$  könnte daher über die Interaktion von ASK1 mit Gadd45 $\beta$  induziert werden (Abbildung 32a). MEKK4 und ASK1 werden in der Regel konstitutiv exprimiert. Jedoch trifft dies nicht auf alle Gewebe zu. Z.B. zeigen Datenbankanalysen (EST-Analyse, UniGene-Datenbank), dass das ASK1-Gen nicht im Thymus exprimiert wird, während die Genexpression von MEKK4 nachgewiesen werden konnte (Abbildung 32b). Möglicherweise ist die unterschiedliche Aktivierung von JNK und p38 durch Gadd45 $\beta$  auf diesen Umstand zurückzuführen.

Zur besseren Beurteilung der Funktion von aktiver p38 in der Zelle wurden in NIH/3T3-Zellen Lokalisationsstudien von p38 nach Aktivierung durch verschiedene Stimuli durchgeführt. Ein klassischer Stimulus zur Aktivierung von p38 ist die Exposition von Zellen mit UV-Strahlen. Phosphorylierte p38 konnte nach UV-Bestrahlung von NIH-3T3-Zellen im Zellkern detektiert werden (Hagemann und Blank, 2001). Die Detektion von aktiver p38 ausschließlich im Zellkern lässt vermuten, dass das zu aktivierende Substrat von p38 ebenfalls im Zellkern lokalisiert ist und dort seine Funktion ausübt. Hier kommen z.B. Transkriptionsfaktoren in Betracht. Es sind mehrere Transkriptionsfaktoren bekannt, wie z.B. ATF-2 oder p53, die von p38 aktiviert werden (Hagemann und Blank, 2001). Die Lokalisation von durch Gadd45 $\beta$  und MEKK4 phosphorylierter p38 wurde jedoch in punktförmigen Strukturen im Zytosol nachgewiesen. Dagegen führte die Interaktion von Gadd45 $\beta$  mit ASK1, einer anderen MAP-3K, zu einer Lokalisation von phosphorylierter p38 sowohl im Zytosol als auch im Zellkern. Deshalb deutet eine ausschließliche Lokalisation von phosphorylierter p38 im Zytosol in definierten Strukturen daraufhin, dass das Substrat von p38 auch seine Funktion im Zytosol erfüllen wird. Deshalb sind im Zellkern aktive Proteine, wie die eben genannten Transkriptionsfaktoren, auszuschließen. Weiterhin ist daraus zu schließen, dass die Lokalisation von p38 in punktförmigen Strukturen spezifische durch den Gadd45 $\beta$ /MEKK4-Signalweg induziert wird. Denn die induzierte Phosphorylierung von p38 durch ASK1 und Gadd45 $\beta$  hat eine abweichende Lokalisation, nämlich sowohl im Zellkern als auch im Zytosol.

## 2 Rolle von Gadd45 $\beta$ und MEKK4 in der Autophagie

Zur Identifizierung der zytosolischen Strukturen von p38 wurden verschiedene Markerfärbungen durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass phosphorylierte p38 mit der autophagischen aktiven Form von LC3 kolokalisiert. Dies bedeutet, dass durch den Gadd45 $\beta$ /MEKK4-Signalweg aktivierte p38, innerhalb oder an der Außenseite von Autophagosomen lokalisiert ist. Deshalb liegt der Schluss nahe, dass p38 an der Regulation der Autophagie beteiligt ist.

p38 wurde bereits mit der Autophagie in Verbindung gebracht, jedoch sind weder die genaue Funktion, noch der Mechanismus der Aktivierung von p38 im Zusammenhang mit der Autophagieregulation bekannt. Weiterhin fehlen Analysen zu den Substraten der p38. Auch ist die Rolle von p38 in der Autophagie umstritten. Es gibt sowohl Berichte, die von einer inhibitorischen Funktion bezüglich der Autophagie ausgehen (Corcelle et al., 2007; Corcelle et al., 2006), als auch Publikationen, die eher eine positive Regulation des autophagischen Prozesses durch p38 postulieren (Cui et al., 2007; Tang et al., 2008b). All diese Studien können zwar eine Rolle der Regulation der Autophagie durch p38 belegen, jedoch fehlen Untersuchungen zu den vorgeschalteten Aktivatoren und den Substraten von p38. Zumindest scheint es im Falle des Morbus Alexander zu einer Inhibition von mTOR und damit zu einer Aktivierung der Autophagie zu kommen, die in direkten Zusammenhang mit der Aktivierung von p38 steht (Tang et al., 2008a; Tang et al., 2008b). Aufgrund einer spontanen Genmutation kommt es zu einer Akkumulation des sauren Gliafaserproteins GFAP (*glial fibrillary acidic protein*). Diese Akkumulation führt ursächlich zu einer Induktion der Autophagie in den betroffenen Zellen, der Aktivierung von p38 und der Inhibition von mTOR. Allerdings konnte innerhalb dieser Studien lediglich gezeigt werden, dass die Aktivierung von p38 vor der Inhibition von mTOR erfolgt. Ob die Aktivierung von p38 ursächlich für die Inhibition von mTOR verantwortlich ist und ein direkter mechanistischer Zusammenhang zwischen der Aktivierung von p38 und der Inhibition von mTOR besteht, konnte nicht demonstriert werden. Deshalb bleibt die Frage nach dem Substrat und dem mechanistischen Zusammenhang, in der p38 in die Regulation des autophagischen Prozesses eingreift, weiter offen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit ist es erstmals gelungen, mit ATG5 ein Substrat von p38 während des autophagischen Prozesses zu identifizieren. Weiterhin konnte Threonin 75 als

Phosphorylierungsstelle von murinem ATG5 ermittelt werden. Mit Hilfe von Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass sich die Phosphorylierung von ATG5 inhibitorisch auf die Autophagie auswirkt. Denn die mit konstitutiv „phosphoryliertem“ ATG5 rekonstituierten ATG5-defizienten MEFs zeigten eine verringerte autophagische Aktivität, während die mit einer phosphorylierungsdefizienten ATG5-Mutante rekonstituierte ATG5-defizienten MEFs eine deutlich erhöhte Autophagierate aufwies.

ATG5 ist essentiell für den Prozess der Autophagie und wesentlich für die Funktion von ATG5 ist die Konjugation von ATG5 an ATG12 (Mizushima et al., 2001). Der ATG5-ATG12-Komplex ist für die Rekrutierung von LC3-PE an die Membran des entstehenden Autophagosomes, auch PAS (*phagophore assembly site*) genannt, verantwortlich (Matsushita et al., 2007; Suzuki et al., 2001). Anhand der hier gezeigten Western-Blot-Analysen konnte eine geringere Menge von gespaltenem LC3 in den mit der phosphorylierungsdefizienten ATG5-Mutante rekonstituierten ATG5-defizienten MEFs unter Hungerbedingungen nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung von ATG5 entscheidend die Funktion des ATG5-ATG12-Komplexes negativ beeinflusst und somit die Funktion der LC3 Prozessierung verhindert. Möglicherweise destabilisiert die zusätzliche negative Ladung der Phosphatgruppe den Komplex und hebt die Enzymwirkung ganz oder teilweise auf. Die Bildung des ATG5-ATG12-Komplexes ist konstitutiv und findet unabhängig von der Induktion der Autophagie statt. Deswegen liegt der größte Teil des ebenfalls konstitutiv exprimierten ATG5 im Komplex und nur in geringen Mengen ungebunden vor. Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied von ungebundenen ATG5 in den konstitutiv „phosphorylierenden“ Zellen, im Vergleich mit den Wildtyp bzw. der inaktiven Form von ATG5 exprimieren Zellen, festgestellt werden. Deshalb scheint es durch die Phosphorylierung nicht zu einer Dissoziation des Komplexes zu kommen. Allerdings besteht der funktionsfähige Komplex von ATG5-ATG12 noch aus einer dritten Komponente, nämlich dem ATG16 (Mizushima et al., 2003). ATG16 ist verantwortlich für die Oligomerisierung des gesamten Komplexes durch Eigenbindung. Da dieser hochmolekulare Komplex nicht mittels der durchgeführten Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden kann, kann keine Aussage hinsichtlich des Einflusses der Phosphorylierung von ATG5 durch p38 auf die Oligomerisierung mittels ATG16 getroffen werden. Weiterhin ist eine Delokalisation des ATG5-ATG12-Komplexes durch die Phosphorylierung vorstellbar. ATG5 ist nämlich für die Bindung des ATG5-ATG12-Komplexes an die Membran des PAS verantwortlich (Mizushima et al., 2001). Die ATG5-vermittelte Bindung des Komplexes an die PAS ist

ebenfalls essentiell für den Prozess der Autophagie. Folglich könnte eine Phosphorylierung von ATG5 die Bindung an die PAS verhindern, und damit auch die Funktion des Gesamtkomplexes wesentlich beeinflussen. Letztlich ist der durch die Phosphorylierung von ATG5 hervorgerufene Effekt im Detail noch nicht vollständig aufgeklärt und bedarf in Zukunft weitergehender Analysen.

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten zeigen jedoch eindeutig, dass p38 durch die Phosphorylierung von ATG5 inhibitorisch in die Autophagieregulation eingreift. Es konnte dargelegt werden, dass die nicht mehr durch p38 zu phosphorylierende Mutante von ATG5 den autophagischen Prozess positiv beeinflusst und so den autophagischen Prozess stimuliert. Konstitutiv „phosphoryliertes“ ATG5 führte hingegen zu einer deutlichen Inhibition der Autophagie.

### **3 Rolle von Gadd45 $\beta$ während der Apoptose**

Die Rolle von Gadd45 $\beta$  in der Apoptose wird in der Literatur kontrovers diskutiert, da es sowohl Berichte für eine pro- als auch eine antiapoptotische Wirkung von Gadd45 $\beta$  gibt (Liebermann *et al.*, 2007). Ein allgemeiner Konsens scheint darin zu bestehen, dass der Einfluss von Gadd45 $\beta$  auf die Apoptoseregulation vom Zelltyp und dem physiologischen Kontext abhängt. Die hier gezeigte geringere Aktivierung von Caspase-3 und eine damit verbundene geringere Apoptose in Abwesenheit von Gadd45 $\beta$  nach TCR-Stimulation von CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Zellen und der damit verbundenen transienten Aktivierung von p38 legen eine eindeutige pro-apoptotische Funktion von Gadd45 $\beta$  dar. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen zeigen Gadd45 $\beta$ -überexprimierende HeLa-Zellen eine erhöhte Zelltodrate (Takekawa und Saito, 1998). Obwohl die Expression von Gadd45 $\beta$  konsistent zu einer p38 Aktivierung führt, ist die Induktion von Zelltod durch Gadd45 $\beta$  vom Zelltyp abhängig. Denn Knochenmarkszellen von Gadd45 $\beta$ -defizienten Mäusen zeigen eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich mit Knochenmarkszellen von Wildtypmäusen (Gupta *et al.*, 2006a; Gupta *et al.*, 2006b). Allerdings zeigen CD4<sup>+</sup>-Zellen, die Gadd45 $\beta$  stabil überexprimieren, keinen vermehrten Zelltod (Yang *et al.*, 2001). Auch in NIH/3T3-Zellen, die Gadd45 $\beta$  überexprimieren, konnte keine erhöhte Zelltodrate gemessen werden (Daten nicht dargestellt). Weiterhin kommt es gleichfalls zu einer anti-apoptotischen Funktion von Gadd45 $\beta$  in Zusammenhang mit JNK-Inhibition in Leberzellen (De Smaele *et al.*, 2001; Papa *et al.*, 2008).

Diese Daten lassen den Schluss zu, dass Gadd45 $\beta$  sowohl eine pro- als auch eine anti-apoptotische Funktion ausüben kann. Abhängig scheint diese Funktion vom jeweiligen physiologischen Kontext und den unterschiedlichen Interaktionspartnern, wie z.B. MEKK4 bzw. MKK4/7, zu sein.

#### **4 Rolle von Gadd45 $\beta$ und MEKK4 im Thymus während der negativen Selektion**

Für den Gadd45 $\beta$ /MEKK4-Signalweg konnte bereits ein Einfluss auf die Regulation des Immunsystems gezeigt werden. In peripheren CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen, NK-Zellen und in dendritischen Zellen ist die Expression von Gadd45 $\beta$  und MEKK4 notwendig für die effiziente Produktion von Zytokinen, wie z.B. IFN $\gamma$  (Chi et al., 2004; Lu et al., 2004; Yang et al., 2001). Die Produktion von inflammatorischen IFN $\gamma$  ist in Th1-Zellen von Gadd45 $\beta$ - bzw. MEKK4-defizienten Mäusen deutlich reduziert. Weiterhin sind Gadd45 $\beta$ -defiziente Mäuse wesentlich empfindlicher gegenüber experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE), was dem Umstand einer erhöhte Proliferationsrate sowie einem verringerten Zelltod in Gadd45 $\beta$ -defizienten T-Zellen zugeschrieben wird (Liu et al., 2005). Allerdings könnte eine alternative Erklärung für diesen Phänotyp der Gadd45 $\beta$ -defizienten Mäusen in einem Defekt beim Erwerb der zentralen Toleranz begründet liegen, welcher letztlich zu Autoimmunität führen könnte. Entsprechend dieser Hypothese konnte eine massive Hochregulation von Gadd45 $\beta$ , einhergehend mit konstitutiv exprimiertem MEKK4, in verschiedenen Modellen der negativen Selektion sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt werden.

Des Weiteren wurde der Expressionsort der Genexpression als die Medulla des Thymus identifiziert, was ein weiterer Hinweis für die Rolle von Gadd45 $\beta$  bei den Selektionsprozessen im Thymus ist. Funktionelle Anhaltspunkte für die Funktion von Gadd45 $\beta$  während des Erwerbes der zentralen Toleranz kamen von Experimenten mit viral transduzierten Thymozyten. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die Überexpression von Gadd45 $\beta$ , als auch die konstitutive Aktivierung von p38 durch MKK6, zu einer erhöhten Zelltodrate in CD3-stimulierten doppeltpositiven Thymozyten führte. Weiterhin konnte eine verringerte Zelltodrate nach der Inhibition von p38 sowohl durch den Einsatz eines Inhibitors als auch durch die Blockierung von p38 mit inaktivem MKK6 beobachtet werden. Zusätzlich zeigen Thymozyten aus Gadd45 $\beta$ -defizienten Mäusen eine erhöhte Vitalität und eine reduzierte Menge an aktiver Caspase-3. Daher kann der Befund, dass Gadd45 $\beta$ -defiziente

---

Mäuse eine erhöhte Autoimmunität erwerben, auch in der veränderten klonalen Deletion im Thymus begründet liegen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass eine verlängerte p38-Aktivierung durch den Gadd45 $\beta$ /MEKK4-Signalweg entscheidend für die Aktivierung von Caspase-3 und damit für die Auslösung der Apoptose ist. Denn in Gadd45 $\beta$ -defizienten Thymozyten kommt es nur zu einer transienten Aktivierung von p38 und zu einer verringerten Apoptoserate. Da es in Abwesenheit von Gadd45 $\beta$  trotzdem zu einer, wenn auch nur verkürzten Aktivierung von p38 kommt, bedeutet dies, dass die Aktivierung von p38 in dieser frühen Phase der negativen Selektion unabhängig vom Gadd45 $\beta$ /MEKK4-Signalweg induziert wird, d.h. der Gadd45 $\beta$ /MEKK4-Signalweg ist nicht der einzige Aktivierungsmechanismus von p38. Jedoch sind die unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen von p38 unabhängig und nicht redundant, sondern additiv. Als ein möglicher zusätzlicher Aktivierungsmechanismus von p38 kommt ein alternativer Mechanismus in Frage, der p38 nicht über die MAP-Kinasen-Kaskade aktiviert (Salvador et al., 2005). Hieran ist vermutlich die durch den TCR aktivierte Tyrosinkinase Lck beteiligt, welche die Tyrosinkinase Zap70 phosphoryliert. Das aktive Zap70 wiederum ist notwendig um eine Autophosphorylierung von p38 zu induzieren. Dieser vorgestellte Mechanismus kann ohne transkriptionelle Kontrolle und damit quasi sofort nach Aktivierung des TCR eingeschaltet werden, während der Gadd45 $\beta$ /MEKK4-Signalweg erst durch die Induktion der Genexpression von Gadd45 $\beta$  in Gang gebracht wird. Dies erklärt auch den zeitlichen Unterschied der p38 Aktivierung durch diese beiden Aktivierungsmechanismen.

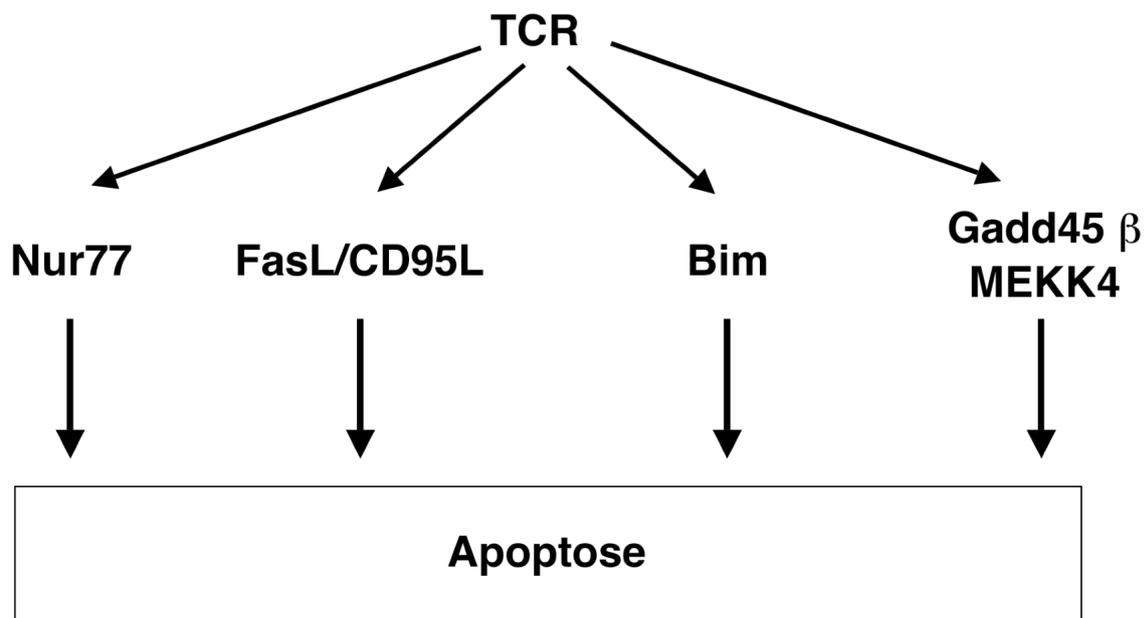
Nach der Rekombination der TCR  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette beeinflussen die Signale, welche nach TCR-Stimulation in den Zellen ausgelöst werden, die Genexpression und damit die Entwicklung der Thymozyten. Abhängig von der Bindungsstärke an den TCR werden unterschiedliche Signalkaskaden ausgelöst, was letztlich zur Differenzierung (positive Selektion) oder Apoptose (negative Selektion) der Thymozyten führt (Starr *et al.*, 2003). Obwohl die einzelnen Signalwege nur wenig charakterisiert sind, weiß man, dass die MAP-Kinasen eine entscheidende Rolle während dieser Prozesse spielen. Einerseits wird die Aktivierung von ERK mit der positiven Selektion in Verbindung gebracht (Fischer et al., 2005; Gallo et al., 2007; Starr et al., 2003). Andererseits sind p38, JNK und ERK5 in der negativen Selektion impliziert (Sohn et al., 2008; Starr et al., 2003). Doch scheint diese klare Abtrennung und distinkte Einordnung der Regulation der T-Zelldifferenzierung durch die

MAP-Kinasen eine zu vereinfachte Sicht der Dinge zu sein. Beispielsweise wurde auch die Aktivierung von ERK, während der negativen Selektion beobachtet (Mariathasan et al., 2001). Denkbar ist, dass die Regulation der T-Zelldifferenzierung von der Länge und der Stärke der Aktivierung der MAPK-Kinase abhängt. Denn eine geringe und anhaltende ERK Aktivierung führt zum Auslösen der negativen Selektion, während ein kurzes und starkes Signal von aktivem ERK zum programmierten Zelltod führt. Die Stärke und Länge der ERK-Aktivierung hängt von unterschiedlichen GTP-Austauschfaktoren, die das G-Protein RAS und letztlich ERK nach TCR-Stimulation aktivieren. Beispielsweise führt die Deletion des GTP-Austauschfaktors RasGRP zu einer fehlerhaften Ausführung der positiven Selektion (Dower et al., 2000; Ebinu et al., 2000), während Mutationen des Grb2-SOS-Signalweges die negative Selektion beeinflussen (Gong et al., 2001). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Ort der Aktivierung von ERK innerhalb der Zelle einen wesentlichen Einfluss auf die Auslösung der negativen oder positiven Selektion hat. Die Lokalisation von aktivem ERK an der Plasmamembran führt zur positiven Selektion, während die Aktivierung von ERK am Golgi-Apparat zur Auslösung der negativen Selektion beiträgt (Daniels et al., 2006). Zumindest scheint für den ERK-Signalweg nicht nur die bloße Aktivierung von ERK von Bedeutung, sondern es sind sowohl die Stärke und Länge als auch die Lokalisation der Aktivierung von ERK wichtig für die Steuerung der negativen und positiven Selektion im Thymus.

Die für die ERK-Signalwege dargelegten Regulationsmechanismen können in ähnlicher Weise auch für die Signalwege gelten, die für die Aktivierung von p38 während der T-Zelldifferenzierung verantwortlich sind. Die Untersuchungen in den Gadd45 $\beta$ -defizienten Mäusen haben gezeigt, dass es nach TCR-Stimulation zu einer erhöhten Zahl von einzelpositiven Thymozyten kommt. Einhergehend mit diesem Befund konnte eine verringerte CD24-Expression beobachtet werden. Diese Daten deuten auf eine schnellere Reifung der Thymozyten hin, weil CD24 nur in erhöhtem Maße in unreifen T-Zellen exprimiert wird und es zu einer schnelleren Differenzierung der doppelpositiven in einzelpositive Thymozyten kommt. Doch wie beeinflusst und beschleunigt das Fehlen von Gadd45 $\beta$  die Reifung der Thymozyten, wenn Gadd45 $\beta$  eine pro-apoptische Funktion, während der negativen Selektion ausübt? Vermutlich konvertieren das Fehlen von Gadd45 $\beta$  und die verkürzte p38 Aktivierung den Prozess der negativen zur positiven Selektion hin.

Übereinstimmend mit dieser These ist p38 in entscheidender Weise an der Regulation von verschiedenen Stadien der Thymozytenentwicklung beteiligt. So beeinflusst p38 die Entwicklung der CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>-Thymozyten als auch die positive Selektion der CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Thymozyten zu reifen einzelpositiven T-Zellen (Diehl et al., 2000; Fernandez, 2000; Hsu et al., 2003). Die Aktivität von p38 ist während der Thymozytenentwicklung streng reguliert und die Inhibition der p38-Aktivierung ist entscheidend für die T-Zellreifung (Diehl et al., 2000). Deshalb kann die transiente Aktivierung von p38 aufgrund des Fehlens von Gadd45 $\beta$  und generell die Stärke und Dauer der Aktivität von p38 ähnlich wie bei der Aktivität von ERK die Verschiebung von der Apoptose hin zur Differenzierung der Thymozyten erklären. In ähnlicher Weise konnte eine Verschiebung der negativen hin zur positiven Selektion in Rlk/Itk doppelt-defizienten Mäusen beobachtet werden (Schaeffer et al., 2000). Diese beiden Proteine sind Mitglieder der Tec-Kinasenfamilie, welche die Regulation der TCR-induzierten Signalwege wesentlich beeinflussen. Weiterhin konnte diese Art der Konversion von negativer hin zur positiven Selektion im Thymus von Mäusen, die eine verringerte Anzahl sogenannter ITAMs besitzen, gezeigt werden (Holst et al., 2008). ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) sind Tyrosin-Phosphorylierungsmotive des TCR-CD3-Komplexes und essentiell für die Rekrutierung und Aktivierung der Tyrosinkinase Lck und ZAP70 (Underhill and Goodridge, 2007).

Bim und Nur77 sind einige der wenigen bekannten Moleküle, die entscheidend die negative Selektion im Thymus regulieren (Bouillet und Strasser, 2002; Calnan et al., 1995a). Die molekulare Funktion im Rahmen der negativen Selektion von Bim ist nahe liegend, da Bim ein pro-apoptotisches Bcl-2 Familienmitglied ist (Marsden and Strasser, 2003). Die Aktivität von Bim wird durch posttranslationale Modifizierung von den MAP-Kinasen JNK und ERK beeinflusst. Die Phosphorylierung von drei N-terminalen Serinresten des Bim-Proteins durch ERK führt zu einem verstärkten proteasomalen Abbau von Bim, während die Phosphorylierung von Bim an Threonin 112 zu einer Verstärkung des pro-apoptotischen Potentials von Bim beiträgt (Hubner et al., 2008). Die molekulare Funktion von Nur77 konnte nicht so klar gezeigt werden. Bekannt ist, dass Nur77, als Mitglied der Steroidrezeptor-Superfamilie, die Kontrolle über die Transkription von einigen pro-apoptotischen Signalproteinen ausübt. Hierbei induziert Nur77 sowohl die Transkription der Gene der Todesrezeptoren CD95 und TRAIL als auch die Transkription der pro-apoptotischen Gene NDGI1 und NDGI2 (Rajpal et al., 2003). Allerdings wurde kürzlich auch gezeigt, dass Nur77 Apoptose im Thymus über einen transkriptions-unabhängigen Signalweg induziert, indem es



**Abbildung 33: Modell der Regulation der negativen Selektion im Thymus.**

vom Zellkern zum Mitochondrium transloziert, wo es Bcl-2 bindet und durch Exposition der BH3-Domäne von Bcl-2 dieses in ein pro-apoptotisches Molekül verwandelt (Thompson und Winoto, 2008). Anhand der in dieser Arbeit gezeigten Daten konnte kein Einfluss des Gadd45 $\beta$ /MEKK4-p38 Signalweges im Hinblick auf die Expression von Nur77 und Bim gefolgert werden. Daher scheint der hier vorgestellte neue Gadd45 $\beta$ /MEKK4-p38 Signalweg unabhängig von Nur77 und Bim die negative Selektion im Thymus zu regulieren. Verschiedene zum Zelltod führende Signalwege werden vermutlich parallel während der negativen Selektion ausgeführt und sind nicht redundant (Abbildung 33). Dies könnte ein verstärkter Sicherungsmechanismus sein, um potentielle, den Organismus schädigende autoimmune T-Zellen rechtzeitig zu eliminieren. Eine alternative Erklärung für die Aktivierung verschiedener Todesmechanismen könnte in der unterschiedlichen Signalstärke und oder in den unterschiedlichen Signalgebern begründet liegen. Ein Beispiel hierfür ist die durch CD95 ausgelöste Apoptose während der negativen Selektion. Denn nur hohe, nicht aber niedrige Antigenkonzentrationen lösen CD95 induzierten Zelltod aus (Kishimoto et al., 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Deletion des Todesrezeptor DR3 zu einer beeinträchtigten Apoptose von Thymozyten nach CD3-Stimulation führt, während über SEB-induzierter Zelltod unbeeinflusst abläuft (Wang et al., 2001).

Die hier vorgestellten Daten konnten den Gadd45 $\beta$ /MEKK4-Signalweg als einen bisher unbekanntem Signalweg zur Regulation der negativen Selektion im Thymus identifizieren und

es wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die durch den Gadd45 $\beta$ /MEKK4-Signalweg induzierte verlängerte p38-Aktivierung ein wichtiger Faktor für die Elimination von potentiellen autoreaktiven Thymozyten darstellt.

## IV. Zusammenfassung

Die Familie der Gadd45-Proteine besteht aus drei Mitgliedern, die unter verschiedenen stressauslösenden Bedingungen induziert werden. Als Stress-Sensoren wurden Gadd45-Proteine mit der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose in Verbindung gebracht. Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass murines Gadd45 $\beta$  an die Mitogen-aktivierte Protein (MAP) Kinase-Kinase-Kinase MEKK4 bindet und hierdurch spezifisch die p38 MAP-Kinase, nicht aber JNK- oder ERK-Kinasen aktiviert. Interessanterweise war aktivierte p38 nicht wie erwartet im Zellkern lokalisiert, wo sie üblicherweise Transkriptionsfaktoren phosphoryliert, sondern in punktförmigen Strukturen des Zytoplasma. Diese Strukturen konnten als Autophagosomen identifiziert werden. Als Substrat von p38 auf den Autophagosomen konnte ATG5, ein für die Autophagie essentielles Protein, ermittelt werden. Es zeigte sich, dass p38 murines ATG5 an Threonin 75 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung wirkt sich inhibitorisch auf den Prozess der Autophagie aus.

Zusätzlich wurden Untersuchungen durchgeführt, um die Rolle von Gadd45 $\beta$  während der negativen Selektion und der TCRinduzierten Apoptose in Thymozyten zu untersuchen. Die Hochregulation von Gadd45 $\beta$  konnte in verschiedenen Modellsystemen der negativen Selektion nachgewiesen werden. Außerdem gelang durch *in situ* Hybridisierungs-Analysen der Nachweis, dass Gadd45 $\beta$  hauptsächlich in der Medulla des Thymus lokalisiert ist. Die Expression von Gadd45 $\beta$  wurde ausschließlich während der negativen und nicht während der positiven Selektion im Thymus beobachtet. Dabei vermittelt Gadd45 $\beta$  eine lang anhaltende Aktivierung von p38 und der Caspase-3. RNA Interferenz-Experimente und Untersuchungen in Gadd45 $\beta$ -defizienten Mäusen zeigten, dass p38 in Abwesenheit von Gadd45 $\beta$  nur transient aktiviert wird und dies mit einer verminderten Caspase-3-Aktivierung einhergeht. Des Weiteren kommt es in Abwesenheit von Gadd45 $\beta$  zu einer verringerten Apoptoserate nach TCR-Stimulation in Thymozyten, im Gegensatz dazu führt überexprimiertes Gadd45 $\beta$  zu erhöhtem Zelltod. Dieser Effekt konnte mit der Aktivierung von p38 in Verbindung gebracht werden. Da die Inhibition von p38 ebenfalls zu verringertem Zelltod der Thymozyten nach TCR-Stimulation führte. Die Apoptose-Induktion durch Gadd45 $\beta$  war unabhängig von Nur77 und Bim, zwei bekannten Mediatoren der negativen Selektion in Thymozyten. Diese Arbeit konnte deshalb einen neuen, bislang unbekanntem Signalweg der Apoptose in Thymozyten aufklären.

## V. Summary

The Gadd45 family consists of three evolutionary conserved proteins, which are activated by different stress-inducing factors. They are involved in the regulation of the cell cycle and apoptosis. In this work, it was shown for the first time that murine Gadd45 $\beta$  interacts with the murine kinase MEKK4 and thereby activates specifically the mitogen-activated protein kinase p38. Strikingly, no activation of the other MAP kinases, JNK and ERK, was observed. Additionally, p38, which was activated by the Gadd45 $\beta$ /MEKK4 pathway, was localized in dot-like structures in the cytosol and not in the nucleus, where p38 is known to activate transcription factors. These dot-like structures were identified as autophagosomes by colocalisation with the specific autophagy marker LC3-II. Subsequently, ATG5, an essential factor for autophagy, was identified as a substrate of p38 in the autophagosomes. Mutational analyses of ATG5 showed that p38 phosphorylates murine ATG5 at the amino acid threonine 75 and that the phosphorylation of ATG5 significantly inhibits the autophagic process.

In addition, the role of Gadd45 $\beta$  in negative selection in the thymus and during TCR-induced apoptosis was analysed. In different models of negative selection it was shown that Gadd45 $\beta$  is highly upregulated. Strikingly, Gadd45 $\beta$  is confined to the medulla of the thymus, which is the localisation of the stromal cells with the strongest potential to negatively select developing thymocytes. Expression of Gadd45 $\beta$  appears to be specific for negative selection as negatively but not positively selecting peptides or dexamethasone, a TCR-independent apoptosis agonist, induce Gadd45 $\beta$  expression. Overexpression of Gadd45 $\beta$  or activation of the p38 pathway promotes TCR-mediated apoptosis in a CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cell line, while inhibition of p38 activity impairs apoptosis. Furthermore, Gadd45 $\beta$ -deficient thymocytes show only transient p38 activation and reduced caspase activation. Taken together, evidence is provided that Gadd45 $\beta$  and p38 are components of a novel signaling pathway in negative selection.

## VI. Literaturverzeichnis

- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* *404*, 193-197.
- Alam, A., Braun, M. Y., Hartgers, F., Lesage, S., Cohen, L., Hugo, P., Denis, F., and Sekaly, R. P. (1997). Specific activation of the cysteine protease CPP32 during the negative selection of T cells in the thymus. *J Exp Med* *186*, 1503-1512.
- Albert, M. L., Jegathesan, M., and Darnell, R. B. (2001). Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nat Immunol* *2*, 1010-1017.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* *87*, 171.
- Amanullah, A., Azam, N., Balliet, A., Hollander, C., Hoffman, B., Fornace, A., and Liebermann, D. (2003). Cell signalling: cell survival and a Gadd45-factor deficiency. *Nature* *424*, 741; discussion 742.
- Ashford, T. P., and Porter, K. R. (1962). Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol* *12*, 198-202.
- Attisano, L., and Wrana, J. L. (2000). Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol* *12*, 235-243.
- Azam, N., Vairapandi, M., Zhang, W., Hoffman, B., and Liebermann, D. A. (2001). Interaction of CR6 (GADD45gamma) with proliferating cell nuclear antigen impedes negative growth control. *J Biol Chem* *276*, 2766-2774.
- Baldwin, T. A., and Hogquist, K. A. (2007). Transcriptional analysis of clonal deletion in vivo. *J Immunol* *179*, 837-844.
- Bardwell, L. (2006). Mechanisms of MAPK signalling specificity. *Biochem Soc Trans* *34*, 837-841.
- Blackburn, C. C., Augustine, C. L., Li, R., Harvey, R. P., Malin, M. A., Boyd, R. L., Miller, J. F., and Morahan, G. (1996). The nu gene acts cell-autonomously and is required for differentiation of thymic epithelial progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 5742-5746.
- Bouchier-Hayes, L., Lartigue, L., and Newmeyer, D. D. (2005). Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* *115*, 2640-2647.
- Bouillet, P., Purton, J. F., Godfrey, D. I., Zhang, L. C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J. M., and Strasser, A. (2002). BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* *415*, 922-926.
- Bouillet, P., and Strasser, A. (2002). BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* *115*, 1567-1574.
- Calnan, B. J., Szychowski, S., Chan, F. K., Cado, D., and Winoto, A. (1995a). A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity* *3*, 273-282.
- Calnan, B. J., Szychowski, S., Chan, F. K., Cado, D., and Winoto, A. (1995b). A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity* *3*, 273-282.

- Casrouge, A., Beaudoin, E., Dalle, S., Pannetier, C., Kanellopoulos, J., and Kourilsky, P. (2000). Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J Immunol* *164*, 5782-5787.
- Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* *410*, 37-40.
- Chao, D. T., and Korsmeyer, S. J. (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* *16*, 395-419.
- Chen, L., Linsley, P. S., and Hellstrom, K. E. (1993). Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol Today* *14*, 483-486.
- Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., Colman, P. M., Day, C. L., Adams, J. M., and Huang, D. C. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* *17*, 393-403.
- Chen, P., Hutter, D., Yang, X., Gorospe, M., Davis, R. J., and Liu, Y. (2001). Discordance between the binding affinity of mitogen-activated protein kinase subfamily members for MAP kinase phosphatase-2 and their ability to activate the phosphatase catalytically. *J Biol Chem* *276*, 29440-29449.
- Chi, H., Lu, B., Takekawa, M., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (2004). GADD45beta/GADD45gamma and MEKK4 comprise a genetic pathway mediating STAT4-independent IFNgamma production in T cells. *Embo J* *23*, 1576-1586.
- Clayton, L. K., Ghendler, Y., Mizoguchi, E., Patch, R. J., Ocain, T. D., Orth, K., Bhan, A. K., Dixit, V. M., and Reinherz, E. L. (1997). T-cell receptor ligation by peptide/MHC induces activation of a caspase in immature thymocytes: the molecular basis of negative selection. *Embo J* *16*, 2282-2293.
- Codogno, P., and Meijer, A. J. (2006). Atg5: more than an autophagy factor. *Nat Cell Biol* *8*, 1045-1047.
- Compton, S. J., and Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* *151*, 369-374.
- Corcelle, E., Djerbi, N., Mari, M., Nebout, M., Fiorini, C., Fenichel, P., Hofman, P., Poujeol, P., and Mograbi, B. (2007). Control of the autophagy maturation step by the MAPK ERK and p38: lessons from environmental carcinogens. *Autophagy* *3*, 57-59.
- Corcelle, E., Nebout, M., Bekri, S., Gauthier, N., Hofman, P., Poujeol, P., Fenichel, P., and Mograbi, B. (2006). Disruption of autophagy at the maturation step by the carcinogen lindane is associated with the sustained mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity. *Cancer Res* *66*, 6861-6870.
- Cuervo, A. M., Bergamini, E., Brunk, U. T., Droge, W., Ffrench, M., and Terman, A. (2005). Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy* *1*, 131-140.
- Cui, Q., Tashiro, S., Onodera, S., Minami, M., and Ikejima, T. (2007). Oridonin induced autophagy in human cervical carcinoma HeLa cells through Ras, JNK, and P38 regulation. *J Pharmacol Sci* *105*, 317-325.
- Danial, N. N., and Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* *116*, 205-219.
- Daniels, M. A., Teixeira, E., Gill, J., Hausmann, B., Roubaty, D., Holmberg, K., Werlen, G., Hollander, G. A., Gascoigne, N. R., and Palmer, E. (2006). Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* *444*, 724-729.

- Davis, M. M., and Bjorkman, P. J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* *334*, 395-402.
- Degterev, A., and Yuan, J. (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 378-390.
- De Smaele, E., Zazzeroni, F., Papa, S., Nguyen, D. U., Jin, R., Jones, J., Cong, R., and Franzoso, G. (2001). Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature* *414*, 308-313.
- Denault, J. B., and Salvesen, G. S. (2002). Caspases. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 21*, Unit 21 28.
- Deng, Y., Ren, X., Yang, L., Lin, Y., and Wu, X. (2003). A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell* *115*, 61-70.
- DeRyckere, D., Mann, D. L., and DeGregori, J. (2003). Characterization of transcriptional regulation during negative selection in vivo. *J Immunol* *171*, 802-811.
- Dhanasekaran, D. N., Kashef, K., Lee, C. M., Xu, H., and Reddy, E. P. (2007). Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene* *26*, 3185-3202.
- Di George, A. M., Lischner, H. W., Dacou, C., and Arey, J. B. (1967). Absence of the thymus. *Lancet* *I*, 1387.
- Diehl, N. L., Enslin, H., Fortner, K. A., Merritt, C., Stetson, N., Charland, C., Flavell, R. A., Davis, R. J., and Rincon, M. (2000). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway arrests cell cycle progression and differentiation of immature thymocytes in vivo. *J Exp Med* *191*, 321-334.
- Dong, C., Li, Q., Lyu, S. C., Krensky, A. M., and Clayberger, C. (2005). A novel apoptosis pathway activated by the carboxyl terminus of p21. *Blood* *105*, 1187-1194.
- Dunn, W. A., Jr. (1990a). Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* *110*, 1923-1933.
- Dunn, W. A., Jr. (1990b). Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* *110*, 1935-1945.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., and Kaufmann, S. H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* *68*, 383-424.
- Edinger, A. L., and Thompson, C. B. (2003). Defective autophagy leads to cancer. *Cancer Cell* *4*, 422-424.
- Elledge, S. J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* *274*, 1664-1672.
- Fas, S. C., Fritsching, B., Suri-Payer, E., and Krammer, P. H. (2006). Death receptor signaling and its function in the immune system. *Curr Dir Autoimmun* *9*, 1-17.
- Fehling, H. J., and von Boehmer, H. (1997). Early alpha beta T cell development in the thymus of normal and genetically altered mice. *Curr Opin Immunol* *9*, 263-275.
- Fengsrud, M., Roos, N., Berg, T., Liou, W., Slot, J. W., and Seglen, P. O. (1995). Ultrastructural and immunocytochemical characterization of autophagic vacuoles in isolated hepatocytes: effects of vinblastine and asparagine on vacuole distributions. *Exp Cell Res* *221*, 504-519.
- Fernandez, E. (2000). Thymocyte development past the CD4(+)CD8(+) stage requires an active p38 mitogen-activated protein kinase. *Blood* *95*, 1356-1361.

- Fesik, S. W. (2000). Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 103, 273-282.
- Fingar, D. C., and Blenis, J. (2004). Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 23, 3151-3171.
- Fiorini, E., Schmitz, I., Marissen, W. E., Osborn, S. L., Touma, M., Sasada, T., Reche, P. A., Tibaldi, E. V., Hussey, R. E., Kruisbeek, A. M., *et al.* (2002). Peptide-induced negative selection of thymocytes activates transcription of an NF-kappa B inhibitor. *Mol Cell* 9, 637-648.
- Fischer, A. M., Katayama, C. D., Pages, G., Pouyssegur, J., and Hedrick, S. M. (2005). The role of erk1 and erk2 in multiple stages of T cell development. *Immunity* 23, 431-443.
- Fischer, U., Janicke, R. U., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10, 76-100.
- Gaestel, M. (2008). Specificity of signaling from MAPKs to MAPKAPKs: kinases' tango nuevo. *Front Biosci* 13, 6050-6059.
- Gallo, E. M., Winslow, M. M., Cante-Barrett, K., Radermacher, A. N., Ho, L., McGinnis, L., Iritani, B., Neilson, J. R., and Crabtree, G. R. (2007). Calcineurin sets the bandwidth for discrimination of signals during thymocyte development. *Nature* 450, 731-735.
- Gerwins, P., Blank, J. L., and Johnson, G. L. (1997). Cloning of a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MEKK4, that selectively regulates the c-Jun amino terminal kinase pathway. *J Biol Chem* 272, 8288-8295.
- Ghendler, Y., Teng, M. K., Liu, J. H., Witte, T., Liu, J., Kim, K. S., Kern, P., Chang, H. C., Wang, J. H., and Reinherz, E. L. (1998). Differential thymic selection outcomes stimulated by focal structural alteration in peptide/major histocompatibility complex ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10061-10066.
- Green, D. R. (2005). Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 121, 671-674.
- Greenwald, R. J., Freeman, G. J., and Sharpe, A. H. (2005). The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23, 515-548.
- Grossmann, J. (2002). Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis* 7, 247-260.
- Gupta, M., Gupta, S. K., Hoffman, B., and Liebermann, D. A. (2006a). Gadd45a and Gadd45b protect hematopoietic cells from UV-induced apoptosis via distinct signaling pathways, including p38 activation and JNK inhibition. *J Biol Chem* 281, 17552-17558.
- Gupta, S. (2003). Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Int J Oncol* 22, 15-20.
- Gupta, S. K., Gupta, M., Hoffman, B., and Liebermann, D. A. (2006b). Hematopoietic cells from gadd45a-deficient and gadd45b-deficient mice exhibit impaired stress responses to acute stimulation with cytokines, myeloablation and inflammation. *Oncogene* 25, 5537-5546.
- Hagemann, C., and Blank, J. L. (2001). The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cell Signal* 13, 863-875.
- Hara, H., Takeda, A., Takeuchi, M., Wakeham, A. C., Itie, A., Sasaki, M., Mak, T. W., Yoshimura, A., Nomoto, K., and Yoshida, H. (2002). The apoptotic protease-activating factor 1-mediated pathway of apoptosis is dispensable for negative selection of thymocytes. *J Immunol* 168, 2288-2295.

- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.
- Haufel, T., Dormann, S., Hanusch, J., Schwieger, A., and Bauer, G. (1999). Three distinct roles for TGF-beta during intercellular induction of apoptosis: a review. *Anticancer Res* 19, 105-111.
- Hoffman, B., and Liebermann, D. A. (2007). Role of gadd45 in myeloid cells in response to hematopoietic stress. *Blood Cells Mol Dis* 39, 344-347.
- Holst, J., Wang, H., Eder, K. D., Workman, C. J., Boyd, K. L., Baquet, Z., Singh, H., Forbes, K., Chruscinski, A., Smeyne, R., *et al.* (2008). Scalable signaling mediated by T cell antigen receptor-CD3 ITAMs ensures effective negative selection and prevents autoimmunity. *Nat Immunol* 9, 658-666.
- Hoyer-Hansen, M., and Jaattela, M. (2007). Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ* 14, 1576-1582.
- Hsing, A. Y., Kadomatsu, K., Bonham, M. J., and Danielpour, D. (1996). Regulation of apoptosis induced by transforming growth factor-beta1 in nontumorigenic rat prostatic epithelial cell lines. *Cancer Res* 56, 5146-5149.
- Hsu, S. C., Wu, C. C., Han, J., and Lai, M. Z. (2003). Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in different stages of thymocyte development. *Blood* 101, 970-976.
- Huang, F. P., Platt, N., Wykes, M., Major, J. R., Powell, T. J., Jenkins, C. D., and MacPherson, G. G. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* 191, 435-444.
- Hubner, A., Barrett, T., Flavell, R. A., and Davis, R. J. (2008). Multisite phosphorylation regulates Bim stability and apoptotic activity. *Mol Cell* 30, 415-425.
- Izquierdo, M., Grandien, A., Criado, L. M., Robles, S., Leonardo, E., Albar, J. P., de Buitrago, G. G., and Martinez, A. C. (1999). Blocked negative selection of developing T cells in mice expressing the baculovirus p35 caspase inhibitor. *Embo J* 18, 156-166.
- Jackson, J. G., and Pereira-Smith, O. M. (2006). p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and GADD45 during replicative senescence of normal human fibroblasts. *Cancer Res* 66, 8356-8360.
- Jin, S., Antinore, M. J., Lung, F. D., Dong, X., Zhao, H., Fan, F., Colchagie, A. B., Blanck, P., Roller, P. P., Fornace, A. J., Jr., and Zhan, Q. (2000). The GADD45 inhibition of Cdc2 kinase correlates with GADD45-mediated growth suppression. *J Biol Chem* 275, 16602-16608.
- Jinlian, L., Yingbin, Z., and Chunbo, W. (2007). p38 MAPK in regulating cellular responses to ultraviolet radiation. *J Biomed Sci* 14, 303-312.
- Johnson, G. L., and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.
- Kappler, J. W., Roehm, N., and Marrack, P. (1987). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49, 273-280.
- Kasler, H. G., and Verdin, E. (2007). Histone deacetylase 7 functions as a key regulator of genes involved in both positive and negative selection of thymocytes. *Mol Cell Biol* 27, 5184-5200.
- Kaufmann, S. H., and Earnshaw, W. C. (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 256, 42-49.

- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kim, J., Scott, S. V., and Klionsky, D. J. (2000). Alternative protein sorting pathways. *Int Rev Cytol* 198, 153-201.
- Kishimoto, H., Surh, C. D., and Sprent, J. (1998). A role for Fas in negative selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 187, 1427-1438.
- Kisielow, P., and von Boehmer, H. (1995). Development and selection of T cells: facts and puzzles. *Adv Immunol* 58, 87-209.
- Klionsky, D. J. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 931-937.
- Kondo, M., Weissman, I. L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.
- Krammer, P. H., Arnold, R., and Lavrik, I. N. (2007). Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 7, 532-542.
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T., and Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032-1036.
- Kumar, S., Jiang, M. S., Adams, J. L., and Lee, J. C. (1999). Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 263, 825-831.
- Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F. R., Miller, J. F., and Heath, W. R. (1997). Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* 186, 239-245.
- Kyewski, B., and Klein, L. (2006). A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* 24, 571-606.
- Lagna, G., Hata, A., Hemmati-Brivanlou, A., and Massague, J. (1996). Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* 383, 832-836.
- Lauber, K., Blumenthal, S. G., Waibel, M., and Wesselborg, S. (2004). Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* 14, 277-287.
- Launay, S., Hermine, O., Fontenay, M., Kroemer, G., Solary, E., and Garrido, C. (2005). Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* 24, 5137-5148.
- Lavrik, I. N., Golks, A., and Krammer, P. H. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 115, 2665-2672.
- Levine, B. (2007). Cell biology: autophagy and cancer. *Nature* 446, 745-747.
- Levine, B., and Deretic, V. (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 7, 767-777.
- Levine, B., and Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6, 463-477.
- Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27-42.

- Levine, B., and Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* *115*, 2679-2688.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* *94*, 491-501.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* *91*, 479-489.
- Liebermann, D. A., and Hoffman, B. (2007). Gadd45 in the response of hematopoietic cells to genotoxic stress. *Blood Cells Mol Dis* *39*, 329-335.
- Liston, A., and Rudensky, A. Y. (2007). Thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* *19*, 176-185.
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* *86*, 147-157.
- Liu, L., Tran, E., Zhao, Y., Huang, Y., Flavell, R., and Lu, B. (2005). Gadd45 beta and Gadd45 gamma are critical for regulating autoimmunity. *J Exp Med* *202*, 1341-1347.
- Liu, X., Dai, S., Zhu, Y., Marrack, P., and Kappler, J. W. (2003). The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunity* *19*, 341-352.
- Lu, B., Ferrandino, A. F., and Flavell, R. A. (2004). Gadd45beta is important for perpetuating cognate and inflammatory signals in T cells. *Nat Immunol* *5*, 38-44.
- Lutz, M. B., and Schuler, G. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* *23*, 445-449.
- Luzio, J. P., Pryor, P. R., and Bright, N. A. (2007). Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* *8*, 622-632.
- Macian, F., Im, S. H., Garcia-Cozar, F. J., and Rao, A. (2004). T-cell anergy. *Curr Opin Immunol* *16*, 209-216.
- Macias-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P. A., Pirone, R., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1996). MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* *87*, 1215-1224.
- Maga, G., and Hubscher, U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* *116*, 3051-3060.
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *8*, 741-752.
- Mariathasan, S., Zakarian, A., Bouchard, D., Michie, A. M., Zuniga-Pflucker, J. C., and Ohashi, P. S. (2001). Duration and strength of extracellular signal-regulated kinase signals are altered during positive versus negative thymocyte selection. *J Immunol* *167*, 4966-4973.
- Marsden, V. S., and Strasser, A. (2003). CONTROL OF APOPTOSIS IN THE IMMUNE SYSTEM: Bcl-2, BH3-Only Proteins and More. *Annu Rev Immunol* *21*, 71-105.
- Massague, J., and Wotton, D. (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo J* *19*, 1745-1754.

- Matsuki, Y., Zhang, H. G., Hsu, H. C., Yang, P. A., Zhou, T., Dodd, C. H., Cecconi, F., Gruss, P., Tadakuma, T., and Mountz, J. D. (2002). Different role of Apaf-1 in positive selection, negative selection and death by neglect in foetal thymic organ culture. *Scand J Immunol* 56, 174-184.
- Matsushita, M., Suzuki, N. N., Obara, K., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., and Inagaki, F. (2007). Structure of Atg5-Atg16, a complex essential for autophagy. *J Biol Chem* 282, 6763-6772.
- McCarty, N., Paust, S., Ikizawa, K., Dan, I., Li, X., and Cantor, H. (2005). Signaling by the kinase MINK is essential in the negative selection of autoreactive thymocytes. *Nat Immunol* 6, 65-72.
- Mita, H., Tsutsui, J., Takekawa, M., Witten, E. A., and Saito, H. (2002). Regulation of MTK1/MEKK4 kinase activity by its N-terminal autoinhibitory domain and GADD45 binding. *Mol Cell Biol* 22, 4544-4555.
- Miyake, Z., Takekawa, M., Ge, Q., and Saito, H. (2007). Activation of MTK1/MEKK4 by GADD45 through induced N-C dissociation and dimerization-mediated trans autophosphorylation of the MTK1 kinase domain. *Mol Cell Biol* 27, 2765-2776.
- Mizushima, N. (2004). Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2491-2502.
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21, 2861-2873.
- Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* 116, 1679-1688.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., and Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-1075.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* 152, 657-668.
- Moroy, T., and Karsunky, H. (2000). Regulation of pre-T-cell development. *Cell Mol Life Sci* 57, 957-975.
- Moulian, N., and Berrih-Aknin, S. (1998). Fas/APO-1/CD95 in health and autoimmune disease: thymic and peripheral aspects. *Semin Immunol* 10, 449-456.
- Nagai, H., Noguchi, T., Takeda, K., and Ichijo, H. (2007). Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *J Biochem Mol Biol* 40, 1-6.
- Nakano, H. (2004). Signaling crosstalk between NF-kappaB and JNK. *Trends Immunol* 25, 402-405.
- Nakao, A., Imamura, T., Souchelnytskyi, S., Kawabata, M., Ishisaki, A., Oeda, E., Tamaki, K., Hanai, J., Heldin, C. H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. (1997). TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *Embo J* 16, 5353-5362.
- Nakatogawa, H., Ichimura, Y., and Ohsumi, Y. (2007). Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* 130, 165-178.
- Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6, 1028-1042.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., and Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139, 271-279.

- Oberhammer, F., Fritsch, G., Pavelka, M., Froschl, G., Tiefenbacher, R., Purchio, T., and Schulte-Hermann, R. (1992). Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in the regressing liver by transforming growth factor-beta 1 occurs without activation of an endonuclease. *Toxicol Lett 64-65 Spec No*, 701-704.
- Padovan, E., Casorati, G., Dellabona, P., Meyer, S., Brockhaus, M., and Lanzavecchia, A. (1993). Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells. *Science 262*, 422-424.
- Palmer, E. (2003). Cell death and immunity: Negative selection - clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol 3*, 383-391.
- Pantelouris, E. M. (1971). Observations on the immunobiology of 'nude' mice. *Immunology 20*, 247-252.
- Papa, S., Zazzeroni, F., Bubici, C., Jayawardena, S., Alvarez, K., Matsuda, S., Nguyen, D. U., Pham, C. G., Nelsbach, A. H., Melis, T., *et al.* (2004a). Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. *Nat Cell Biol 6*, 146-153.
- Papa, S., Zazzeroni, F., Fu, Y. X., Bubici, C., Alvarez, K., Dean, K., Christiansen, P. A., Anders, R. A., and Franzoso, G. (2008). Gadd45beta promotes hepatocyte survival during liver regeneration in mice by modulating JNK signaling. *J Clin Invest 118*, 1911-1923.
- Papa, S., Zazzeroni, F., Pham, C. G., Bubici, C., and Franzoso, G. (2004b). Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. *J Cell Sci 117*, 5197-5208.
- Peter, M. E., and Krammer, P. H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ 10*, 26-35.
- Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E. F., Meijer, A. J., and Codogno, P. (2000). Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem 275*, 992-998.
- Petiot, A., Pattingre, S., Arico, S., Meley, D., and Codogno, P. (2002). Diversity of signaling controls of macroautophagy in mammalian cells. *Cell Struct Funct 27*, 431-441.
- Petros, A. M., Nettesheim, D. G., Wang, Y., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Mack, J., Swift, K., Matayoshi, E. D., Zhang, H., Thompson, C. B., and Fesik, S. W. (2000). Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. *Protein Sci 9*, 2528-2534.
- Rajpal, A., Cho, Y. A., Yelent, B., Koza-Taylor, P. H., Li, D., Chen, E., Whang, M., Kang, C., Turi, T. G., and Winoto, A. (2003). Transcriptional activation of known and novel apoptotic pathways by Nur77 orphan steroid receptor. *Embo J 22*, 6526-6536.
- Rieux-Laucat, F., Fischer, A., and Deist, F. L. (2003). Cell-death signaling and human disease. *Curr Opin Immunol 15*, 325-331.
- Rincon, M., Enslin, H., Raingeaud, J., Recht, M., Zapton, T., Su, M. S., Penix, L. A., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (1998). Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *Embo J 17*, 2817-2829.
- Salvador, J. M., Mittelstadt, P. R., Guszczynski, T., Copeland, T. D., Yamaguchi, H., Appella, E., Fornace, A. J., Jr., and Ashwell, J. D. (2005). Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nat Immunol 6*, 390-395.
- Salvesen, G. S., and Abrams, J. M. (2004). Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene 23*, 2774-2784.

- Samraj, A. K., Keil, E., Ueffing, N., Schulze-Osthoff, K., and Schmitz, I. (2006). Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem* *281*, 29652-29659.
- Sanderson, N., Factor, V., Nagy, P., Kopp, J., Kondaiah, P., Wakefield, L., Roberts, A. B., Sporn, M. B., and Thorgeirsson, S. S. (1995). Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 2572-2576.
- Sasada, T., Ghendler, Y., Neveu, J. M., Lane, W. S., and Reinherz, E. L. (2001). A naturally processed mitochondrial self-peptide in complex with thymic MHC molecules functions as a selecting ligand for a viral-specific T cell receptor. *J Exp Med* *194*, 883-892.
- Sasada, T., Ghendler, Y., Wang, J. H., and Reinherz, E. L. (2000). Thymic selection is influenced by subtle structural variation involving the p4 residue of an MHC class I-bound peptide. *Eur J Immunol* *30*, 1281-1289.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* *17*, 1675-1687.
- Schaeffer, E. M., Broussard, C., Debnath, J., Anderson, S., McVicar, D. W., and Schwartzberg, P. L. (2000). Tec family kinases modulate thresholds for thymocyte development and selection. *J Exp Med* *192*, 987-1000.
- Schmitz, I., Clayton, L. K., and Reinherz, E. L. (2003). Gene expression analysis of thymocyte selection in vivo. *Int Immunol* *15*, 1237-1248.
- Schmitz, I., Kirchhoff, S., and Krammer, P. H. (2000). Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol* *32*, 1123-1136.
- Schmitz, I., Meyer, C., and Schulze-Osthoff, K. (2006). CD95 ligand mediates T-cell receptor-induced apoptosis of a CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> double positive thymic lymphoma. *Oncogene* *25*, 7587-7596.
- Schneider-Stock, R., Diab-Assef, M., Rohrbeck, A., Foltzer-Jourdainne, C., Boltze, C., Hartig, R., Schonfeld, P., Roessner, A., and Gali-Muhtasib, H. (2005). 5-aza-Cytidine Is a Potent Inhibitor of DNA Methyltransferase 3a and Induces Apoptosis in HCT-116 Colon Cancer Cells via Gadd45- and p53-Dependent Mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* *312*, 525-536.
- Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M. F., and Ohashi, P. S. (1999). Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* *17*, 829-874.
- Seder, R. A., Paul, W. E., Davis, M. M., and Fazekas de St Groth, B. (1992). The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4<sup>+</sup> T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* *176*, 1091-1098.
- Selvakumaran, M., Lin, H. K., Sjin, R. T., Reed, J. C., Liebermann, D. A., and Hoffman, B. (1994). The novel primary response gene MyD118 and the proto-oncogenes myb, myc, and bcl-2 modulate transforming growth factor beta 1-induced apoptosis of myeloid leukemia cells. *Mol Cell Biol* *14*, 2352-2360.
- Shi, Y. (2004a). Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci* *13*, 1979-1987.
- Shi, Y. (2004b). Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell* *117*, 855-858.
- Shores, E. W., Van Ewijk, W., and Singer, A. (1991). Disorganization and restoration of thymic medullary epithelial cells in T cell receptor-negative scid mice: evidence that receptor-bearing lymphocytes influence maturation of the thymic microenvironment. *Eur J Immunol* *21*, 1657-1661.

- Simone, C. (2007). Signal-dependent control of autophagy and cell death in colorectal cancer cell: the role of the p38 pathway. *Autophagy* 3, 468-471.
- Smith, M. L., Ford, J. M., Hollander, M. C., Bortnick, R. A., Amundson, S. A., Seo, Y. R., Deng, C. X., Hanawalt, P. C., and Fornace, A. J., Jr. (2000). p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. *Mol Cell Biol* 20, 3705-3714.
- Sohn, S. J., Lewis, G. M., and Winoto, A. (2008). Non-redundant function of the MEK5-ERK5 pathway in thymocyte apoptosis. *Embo J* 27, 1896-1906.
- Sohn, S. J., Thompson, J., and Winoto, A. (2007). Apoptosis during negative selection of autoreactive thymocytes. *Curr Opin Immunol* 19, 510-515.
- Starr, T. K., Jameson, S. C., and Hogquist, K. A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21, 139-176.
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *Embo J* 20, 5971-5981.
- Takeda, K., Noguchi, T., Naguro, I., and Ichijo, H. (2008). Apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress and immune response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48, 199-225.
- Takekawa, M., Posas, F., and Saito, H. (1997). A human homolog of the yeast Ssk2/Ssk22 MAP kinase kinase kinases, MTK1, mediates stress-induced activation of the p38 and JNK pathways. *Embo J* 16, 4973-4982.
- Takekawa, M., and Saito, H. (1998). A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell* 95, 521-530.
- Takekawa, M., Tatebayashi, K., Itoh, F., Adachi, M., Imai, K., and Saito, H. (2002). Smad-dependent GADD45beta expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF-beta. *Embo J* 21, 6473-6482.
- Takekawa, M., Tatebayashi, K., and Saito, H. (2005). Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinase kinases. *Mol Cell* 18, 295-306.
- Tang, G., Yue, Z., Talloczy, Z., and Goldman, J. E. (2008a). Adaptive autophagy in Alexander disease-affected astrocytes. *Autophagy* 4, 701-703.
- Tang, G., Yue, Z., Talloczy, Z., Hagemann, T., Cho, W., Messing, A., Sulzer, D. L., and Goldman, J. E. (2008b). Autophagy induced by Alexander disease-mutant GFAP accumulation is regulated by p38/MAPK and mTOR signaling pathways. *Hum Mol Genet* 17, 1540-1555.
- ten Dijke, P., Miyazono, K., and Heldin, C. H. (2000). Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *Trends Biochem Sci* 25, 64-70.
- Thompson, J., and Winoto, A. (2008). During negative selection, Nur77 family proteins translocate to mitochondria where they associate with Bcl-2 and expose its proapoptotic BH3 domain. *J Exp Med* 205, 1029-1036.
- Thorburn, A. (2008). Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis* 13, 1-9.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C. M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440-1443.

- Tsukada, M., and Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 333, 169-174.
- Ungefroren, H., Groth, S., Ruhnke, M., Kalthoff, H., and Fandrich, F. (2005). Transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor/ALK5-dependent activation of the GADD45beta gene mediates the induction of biglycan expression by TGF-beta. *J Biol Chem* 280, 2644-2652.
- Vairapandi, M., Azam, N., Balliet, A. G., Hoffman, B., and Liebermann, D. A. (2000). Characterization of MyD118, Gadd45, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interacting domains. PCNA impedes MyD118 AND Gadd45-mediated negative growth control. *J Biol Chem* 275, 16810-16819.
- Vairapandi, M., Balliet, A. G., Hoffman, B., and Liebermann, D. A. (2002). GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *J Cell Physiol* 192, 327-338.
- van Ewijk, W. (1991). T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu Rev Immunol* 9, 591-615.
- Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., Brodianski, V. M., Kemper, O. C., Kollet, O., *et al.* (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9, 267-276.
- Wada, Y., Ohsumi, Y., and Anraku, Y. (1992). Genes for directing vacuolar morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and characterization of two classes of vam mutants. *J Biol Chem* 267, 18665-18670.
- Wang, E. C., Thern, A., Denzel, A., Kitson, J., Farrow, S. N., and Owen, M. J. (2001). DR3 regulates negative selection during thymocyte development. *Mol Cell Biol* 21, 3451-3461.
- Werlen, G., Hausmann, B., Naeher, D., and Palmer, E. (2003). Signaling life and death in the thymus: timing is everything. *Science* 299, 1859-1863.
- Wyllie, A. H. (1997). Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 53, 451-465.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. (1973). Cell death in the normal neonatal rat adrenal cortex. *J Pathol* 111, 255-261.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
- Wyllie, A. H., Morris, R. G., Smith, A. L., and Dunlop, D. (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142, 67-77.
- Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-704.
- Yang, J., Zhu, H., Murphy, T. L., Ouyang, W., and Murphy, K. M. (2001). IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR- induced, IFN-gamma production. *Nat Immunol* 2, 157-164.
- Yang, Q., Manicone, A., Coursen, J. D., Linke, S. P., Nagashima, M., Forgues, M., and Wang, X. W. (2000). Identification of a functional domain in a GADD45-mediated G2/M checkpoint. *J Biol Chem* 275, 36892-36898.

- Yoo, J., Ghiassi, M., Jirmanova, L., Balliet, A. G., Hoffman, B., Fornace, A. J., Jr., Liebermann, D. A., Bottinger, E. P., and Roberts, A. B. (2003). Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation. *J Biol Chem* 278, 43001-43007.
- Zarubin, T., and Han, J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15, 11-18.
- Zhan, Q., Antinore, M. J., Wang, X. W., Carrier, F., Smith, M. L., Harris, C. C., and Fornace, A. J., Jr. (1999). Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 18, 2892-2900.
- Zhan, Q., Lord, K. A., Alamo, I., Jr., Hollander, M. C., Carrier, F., Ron, D., Kohn, K. W., Hoffman, B., Liebermann, D. A., and Fornace, A. J., Jr. (1994). The gadd and MyD genes define a novel set of mammalian genes encoding acidic proteins that synergistically suppress cell growth. *Mol Cell Biol* 14, 2361-2371.
- Zhang, H., Xiong, Y., and Beach, D. (1993). Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Biol Cell* 4, 897-906.
- Zhang, W., Hoffman, B., and Liebermann, D. A. (2001). Ectopic expression of MyD118/Gadd45/CR6 (Gadd45beta/alpha/gamma) sensitizes neoplastic cells to genotoxic stress-induced apoptosis. *Int J Oncol* 18, 749-757.
- Zhang, Y., and Derynck, R. (1999). Regulation of Smad signalling by protein associations and signalling crosstalk. *Trends Cell Biol* 9, 274-279.
- Zhang, Y., Feng, X., We, R., and Derynck, R. (1996). Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature* 383, 168-172.
- Zhou, T., Cheng, J., Yang, P., Wang, Z., Liu, C., Su, X., Bluethmann, H., and Mountz, J. D. (1996). Inhibition of Nur77/Nurr1 leads to inefficient clonal deletion of self-reactive T cells. *J Exp Med* 183, 1879-1892.
- Zinkernagel, R. M., and Doherty, P. C. (1974). Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 251, 547-548.

## VII. Abkürzungen

|            |  |
|------------|--|
| Abb.       | Abbildung  |
| AK         | Antikörper   |
| Apaf-1     | <i>apoptotic protease activating factor 1</i>                  |
| APS        | Ammoniumpersulfat  |
| AS         | Aminosäure   |
| ATF        | <i>activating transcription factor</i>                         |
| ATG        | <i>autophagy related gene</i>                                  |
| ATP        | Adenosintriphosphat  |
| Bak        | <i>Bcl-2 antagonist killer</i>                                 |
| Bax        | <i>Bcl-2 associated protein X</i>                              |
| Bcl-2      | <i>B-cell lymphoma 2</i>                                       |
| Bcl-xL     | <i>Bcl-2-like 1 large</i>                                      |
| Beclin-1   | <i>coiled-coil, myosin like Bcl-2 interacting protein</i>      |
| BH         | Bcl-2-Homologie  |
| Bid        | <i>BH3-interacting death agonist</i>                           |
| Bim        | <i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>                |
| BSA        | Rinderserumalbumin   |
| CARD       | Caspase-Rekrutierungs-Domäne                                   |
| CBB        | Coomassie Brilliant Blau                                       |
| CD         | cluster of differentiation                                     |
| c-FLIP     | <i>Cellular FLICE-inhibitory protein</i>                       |
| c-Myc      | <i>cellular myelocytomatosis viral oncogene</i>                |
| CRD        | cysteinreiche Domäne   |
| C-Terminus | Carboxylterminus   |
| Da         | Dalton   |
| DAPI       | 4',6-Diamidino-2-phenylindol                                   |
| DD         | Todesdomäne, <i>death domain</i>                               |
| DED        | Todeseffektordomäne, <i>death effector domain</i>              |
| DISC       | Tod induzierender Signalkomplex, <i>death inducing complex</i> |
| DMSO       | Dimethylsulfoxid   |
| DN         | doppelt negatives Stadium                                      |
| DNA        | Desoxyribonukleinsäure   |
| DP         | doppelt positives Stadium                                      |
| DR         | Todesrezeptor, <i>death receptor</i>                           |
| DTT        | Dithiothreitol   |
| E.coli     | Escherischia coli  |

---

|                  |   |
|------------------|---|
| ECL              | <i>enhanced chemiluminescence</i>                     |
| ELISA            | <i>enzyme-linked immunoabsorbant assay</i>            |
| ER               | endoplasmatisches Retikulum                           |
| ERK              | <i>extracellular signal related kinase</i>            |
| FACS             | <i>fluorescence activated cell sorter</i>             |
| FADD             | <i>FAS-associated death domain protein</i>            |
| FADD             | „Fas-associated death domain protein“                 |
| FCS              | Fötale Kälberserum                                    |
| FITC             | Fluorescein-5-isothiocyanat                           |
| Gadd             | Growth Arrest and DNA-Damage inducible gene           |
| GAPDH            | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase              |
| GDP              | Guanosindiphosphat                                    |
| GSH              | reduziertes Glutathion                                |
| GST              | Glutathion-S-Transferase                              |
| GTP              | Guanosintriphosphat                                   |
| h                | Stunde  |
| His              | Histidin  |
| IAP              | <i>inhibitor of apoptosis</i>                         |
| IF               | Immunfluoreszenz                                      |
| IgG              | Immunglobulin der Klasse G                            |
| IP               | Immunpräzipitation                                    |
| IPTG             | Isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid                 |
| JNK              | Jun-Kinase  |
| kb               | Kilobasen   |
| kDa              | Kilodalton  |
| LC3              | <i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i> |
| MAPK             | Mitogen-aktivierte Proteinkinase                      |
| MEKK             | MAPK Kinase Kinase                                    |
| min              | Minute  |
| MKK              | MAPK Kinase   |
| mRNA             | Boten ( <i>messenger</i> )-Ribonukleinsäure           |
| mTor             | <i>mammalian target of rapamycin</i>                  |
| MW               | Molekulargewicht                                      |
| Myd              | Myeloid Differentiation Gene                          |
| NAD <sup>+</sup> | Nicotinamidadenindinukleotid                          |
| NF- $\kappa$ B   | <i>nuclear factor kappa-B</i>                         |
| NGF              | Nervenwachstumsfaktor                                 |
| Ni-NTA           | Nickel-Nitrilotriessigsäure                           |
| N-Terminus       | Aminoterminus   |

---

|              |   |
|--------------|---|
| NUBO         | NADH <i>ubiquinone oxidoreductase</i>                 |
| PBS          | <i>phosphate buffered saline</i>                      |
| PCC          | <i>pigeon cytochrome c</i>                            |
| PCR          | Polymerase-Kettenreaktion                             |
| PE           | Phosphatidylethanolamin                               |
| PI           | Propidiumiodid  |
| pI           | isoelektrischer Punkt                                 |
| PT           | Permeabilitäts-Transition                             |
| PVDF         | Polyvinylidendifluorid                                |
| qPCR         | quantitative PCR                                      |
| RNA          | Ribonukleinsäure                                      |
| rpm          | <i>rounds per minute</i>                              |
| RT           | Raumtemperatur  |
| RT-PCR       | Reverse Transkriptase-PCR                             |
| SDS          | Natriumdodecylsulfat                                  |
| SDS-PAGE     | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese  |
| sec          | Sekunde   |
| tBid         | trunkiertes Bid                                       |
| TCR          | T-Zell-Rezeptor                                       |
| TGF          | Transforming Growth Faktor                            |
| TRAIL        | <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor</i> |
| ü.N.         | über Nacht  |
| UV-Strahlung | Ultraviolettstrahlung                                 |
| VSV          | <i>vesicular stomatitis virus nucleoprotein</i>       |
| WB           | Western Blot  |
| WT           | Wildtyp   |

Für die Bezeichnung von Aminosäuren wurde der Ein-Buchstabencode verwendet.

## VIII. Anhang

### *Publikationen*

Keil, E., Ueffing, N., Tront, J., Krueger, A., Reinherz, E., Hofman, B., Liebermann, D., Schulze-Osthoff, K., Schmitz, I. *Sustained activation of p38<sup>MAPK</sup> by Gadd45b defines a novel pathway mediating negative selection of thymocytes*. *Immunity*, submitted.

Keil, E., Ueffing, N., Schulze-Osthoff, K., Schmitz, I. *Regulation of autophagy by the Gadd45b-MEKK4-p38 pathway*. In Vorbereitung.

Keil, E., Ueffing, N., Samraj A., Schulze-Osthoff, K., Schmitz, I. *A role of PLCg1 in T-cell survival*. In Vorbereitung.

Samraj, A., Keil, E., Ueffing, N., Schulze-Osthoff, K., Schmitz, I. *Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis*. *J Biol Chem*, 2006.**281**(40):p. 29652-9.

Ueffing, N., Keil, E., Freund, C., Kuhne, R., Schulze-Osthoff, K., and Schmitz, I. (2008). *Mutational analyses of c-FLIP<sub>R</sub>, the only murine short FLIP isoform, reveal requirements for DISC recruitment*. *Cell Death Differ* 15, 773-782.

Ueffing, N., Schuster, M., Keil, E., Schulze-Osthoff, K., and Schmitz, I. (2008). *Up-regulation of c-FLIP short by NFAT contributes to apoptosis resistance of short-term activated T cells*. *Blood* 112, 690-698.

### *Präsentationen auf wissenschaftlichen Tagungen*

4. Klausurtagung des GRK 1033, 22.-23.11.2007, Schloss Mickeln, Düsseldorf: Analysen zur Aktivierung von p38 durch den Gadd45beta-MEKK4 Signalweg. Eric Keil, Nana Ueffing, Klaus Schulze-Osthoff, Ingo Schmitz (Vortrag).

37th Annual Meeting of the German Society for Immunology, 5.-8.9.2007, Heidelberg: Expression profiling identifies Gadd $\beta$  as a novel mediator of negative selection. Keil E, Ueffing N, Clayton L, Reinherz E, Schulze-Osthoff K, Schmitz I (Vortrag und Poster).

37th Annual Meeting of the German Society for Immunology, 5.-8.9.2007, Heidelberg: Structural and mutational analyses of c-FLIP<sub>R</sub> reveal requirements for DISC recruitment. Ueffing N, Keil E, Freund C, Kühne R, Schulze-Osthoff K, Schmitz I (Vortrag und Poster).

„Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses“, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 22.6.2007: A role for PLCg1 in negative selection. Eric Keil, Nana Ueffing, Ajoy Samraj, Klaus Schulze-Osthoff, Ingo Schmitz (Poster).

3. Klausurtagung des GRK 1033, 21.-22.11.2006, Bonn-Bad Godesberg: Analysen zur Aktivierung von p38 durch den Gadd45 $\beta$ -MEKK4 Signalweg (Vortrag).

1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology - 16th European Congress of Immunology - ECI, 6.-9.9.2006, Paris: A role for PLCg1 in negative selection. Eric Keil, Nana Ueffing, Ajoy Samraj, Klaus Schulze-Osthoff, Ingo Schmitz (Poster).

„Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses“, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 25.6.2005: Analysen zur Interaktion von murinem Gadd45 $\beta$  und MEKK4. Eric Keil, Klaus Schulze-Osthoff, Ingo Schmitz (Poster).

***Forschungsaufenthalt im Ausland***

Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dan Liebermann, *Fels Cancer Institute & Department of Biochemistry, Temple University of Philadelphia* (USA)

## **Danksagung**

Ich danke allen, die zum Gelingen der Doktorarbeit beigetragen haben.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Ingo Schmitz für die interessante Aufgabenstellung, intensive wissenschaftliche und experimentelle Betreuung bedanken. Für die motivierenden Worte, für fruchtbare wissenschaftliche Diskussionen und die unendliche Geduld bin ich sehr dankbar.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff für die Möglichkeit, in seinem Institut die Doktorarbeit anzufertigen, seinen wissenschaftlichen Rat, sowie für das Korrekturlesen der Arbeit.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. William Martin, für die bereitwillige Übernahme des Koreferates.

Bei Herrn Prof. Dr. Dan Liebermann und seiner Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die herzliche Gastfreundschaft und die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Frank Eßman für die Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bei einigen Projekten bedanken, von ihm habe ich so manchen „Kniff“, der den Laboralltag ungemein erleichterte, abschauen können.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Medizin für ihre stetige Hilfsbereitschaft und ein gutes Arbeitsklima. Insbesondere bei den „innocent Ingo's“ - Brigit, Daniel, Enie, Marc und Nana - möchte ich mich sowohl für ein äußerst angenehmes und motivierendes Arbeitsklima, als auch für eine Menge Spaß innerhalb und außerhalb des Labors, bedanken. Hervorheben möchte ich die sehr gute und partnerschaftliche Zusammenarbeit mit Nana, meiner „Kodoktorandin“, auf sie konnte ich mich immer verlassen. Ebenfalls extra erwähnen möchte ich noch Denise, Carina, Marc und Sabine mit denen ich außerhalb der Uni viele schöne Stunden verbracht habe.

Der wohl größte Dank gilt meinen Eltern, die mich in jeder Situation unterstützt haben und natürlich bei meiner Jessica. Wir haben uns im Kern etwas bewahrt, das für die Zukunft hoffen läßt.

Des Weiteren möchte ich mich bei all meinen Freunden und meiner Familie für die Unterstützung und das Verständnis bedanken, die mir nicht nur während der Anfertigung dieser Arbeit beigestanden haben.

Zum Schluss möchte ich mich bei den Labormäusen, den unschuldigen Opfern meiner wissenschaftlichen Arbeit, entschuldigen. Diesen Teil der Arbeit habe ich gehasst.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

Eric Keil