

Bedeutung von I κ B- ζ für die Regulation hepatozellulärer Prozesse

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Stephan Kober
aus Wuppertal

Düsseldorf, Juli 2012

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

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

Referent: Herr Prof. Dr. S. Wesselborg

Korreferent : Herr Prof. Dr. W. Martin

Tag der mündlichen Prüfung:

Für meinen Sohn

Caspar

still geboren am 01.07.2010

Es geschieht,
dass eine kleine Seele
die Erde nur streift.
Ihr Ankommen und Gehen
fallen in eins.

Ihr kurzes Verweilen ist nicht
umsonst,
denn sie verändert die Erde.

Sie hinterlässt Spuren
in den Herzen derer,
die sie erwartet haben.

Mögen diese Spuren
in die Zukunft führen.

Doris Kellner

1 Einleitung	1
1.1 Der Nuklearfaktor-kappa B (NF-κB)	1
1.1.1 Die NF-κB/Rel-Proteinfamilie	1
1.1.2 Die IκB-Proteinfamilie	2
1.1.3 Aktivierung des NF-κB-Signalweges	8
1.1.3.1 Der klassische NF-κB-Aktivierungsweg	8
1.1.3.2 Der alternative NF-κB-Aktivierungsweg	9
1.2 Jak/STAT-Signaltransduktionsweg	10
1.2.1 <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i> , STAT3	12
1.2.2 Bedeutung von STAT3 für hepatozelluläre Prozesse	13
1.2.3 Aktivierung von STAT3 durch den IL-6R/gp130-Rezeptorkomplex	14
1.2.4 Regulation des IL-6 abhängigen STAT3-Signaltransduktionsweg	15
1.3 Apoptose	17
1.3.1 Der extrinsische Apoptose-Signalweg	21
1.3.2 Der intrinsische Apoptose-Signalweg	22
1.3.3 Die Bcl-2-Proteinfamilie	24
1.4 Zielsetzung	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Materialien	27
2.1.1 Chemikalien	27
2.1.2 Bakterienstämme	27
2.1.3 Eukaryontische Zelllinien	27
2.1.4 Oligonukleotide	28
2.1.5 Plasmide	29
2.1.6 Antikörper	30
2.1.7 Enzyme und rekombinante Proteine	31
2.1.8 Puffer	31
2.1.9 Reagenzien	33
2.1.10 Reaktionskits	34
2.2 Molekularbiologische Methoden	35
2.2.1 Transformation von <i>E.coli</i> -Stämmen	35
2.2.2 Herstellung einer Glycerinkultur	35
2.2.3 Plasmidpräparation	36
2.2.4 Polymerasen-Kettenreaktion	36
2.2.5 Quantitative Real Time PCR	37

2.2.6 Restriktion und Dephosphorylierung von DNA	37
2.2.7 Ligation	38
2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese	38
2.2.9 Gelelution	38
2.2.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
2.2.11 DNA-Sequenzierung	39
2.2.12 RNA Isolation aus eukaryontischen Zellen	39
2.1.13 Spezifische Unterdrückung der Expression von Genen	39
2.3 Biochemische Methoden	39
2.3.1 Herstellung von Gesamzell-Lysaten	39
2.3.2 Herstellung nukleärer Zelllysate	40
2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	40
2.3.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.3.5 Western-Blot Analyse	41
2.3.6 Enzym linked Immunosorbent Assay (ELISA)	41
2.3.7 Ko-Immunpräzipitation	41
2.3.8 Bestimmung der DNA-Bindungsaktivität von STAT3	42
2.3.9 Bestimmung der Caspase-Aktivität	42
2.3.10 Reporteranalysen zur Untersuchung der SOCS3- Promotoraktivität	43
2.3.11 Reporteranalysen zur Bestimmung der STAT3-Trans- aktivierungsaktivität	44
2.4 Zellbiologische Methoden	44
2.4.1 Transfektion eukaryontischer Zellen	44
2.4.2 Generierung einer stabilen I κ B- ζ Zelllinie	44
2.4.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	45
2.4.4 Messung der Propidiumjodid-Aufnahme	45
2.4.5 Nicoletti-Assay	46
2.4.6 TMRE-Assay	46
2.5 Auswertung	47
3 Ergebnisse	48
3.1 I κ B- ζ reguliert die STAT3-Aktivität	48
3.1.1 Das Fusionsprotein mCherry-STAT3 ist biologisch aktiv	48
3.1.2 I κ B- ζ interagiert mit STAT3	50
3.1.3 I κ B- ζ verstärkt die Aktivität von STAT3	52

3.1.4 Die SOCS3-Promotoraktivität wird durch I κ B- ζ verstärkt.....	54
3.1.5 I κ B- ζ führt zu einer verstärkten SOCS3-Transkription	57
3.1.6 Der SOCS3 Protein-Level wird nicht durch I κ B- ζ beeinflusst.....	59
3.2 I κ B- ζ wirkt apoptotisch	60
3.2.1 Die transiente Expression von I κ B- ζ führt zu einem verstärkten Zelltod .. 60 in HepG2 Zellen	
3.2.2 I κ B- ζ induziert die Apoptose in stabilen, I κ B- ζ exprimierenden.....	62
HepG2 Tet-On Zellen	
3.2.3 IL-6 führt zu einer Verstärkung des apoptotischen Effekts von I κ B- ζ	65
3.2.4 I κ B- ζ hat keinen Einfluss auf den Zellzyklus	67
3.2.5 I κ B- ζ führt zu einem Verlust der mitochondrialen Membranintegrität.....	68
und Induktion der Caspase-9-Aktivität	
3.2.6 Die I κ B- ζ induzierte Apoptose wird über Bim und Mcl-1 vermittelt.....	71
3.2.7 STAT3 ist an der I κ B- ζ vermittelten Apoptose beteiligt	75
3.2.8 Die Bim-Expression ist abhängig von STAT3	77
3.2.9 Der Proteinkinase-Inhibitor SB203580 inhibiert die I κ B- ζ induzierte.....	79
Apoptose	
3.2.10 p38 hat keinen Einfluss auf die I κ B- ζ induzierte Apoptose	82
3.2.11 Die Kinasen CK1 δ , GAK, GSK3 β und RIPK2 haben keinen	84
Einfluss auf die I κ B- ζ induzierte Apoptose	
4 Diskussion	86
4.1 I κ B- ζ interagiert mit STAT3	87
4.1.1 Einfluss von I κ B- ζ auf das STAT3-Zielgen SOCS3	88
4.2 Einfluss von I κ B- ζ auf die hepatozelluläre Apoptose.....	90
4.2.1 I κ B- ζ induziert die Apoptose	90
4.2.2 Der verstärkende Effekt von IL-6	92
4.2.3 Verlust der mitochondrialen Membranintegrität sowie eine	93
gesteigerte Caspase-9-Aktivität durch I κ B- ζ	
4.2.4 Bedeutung der Bcl-2-Proteine Bim und Mcl-1 für die I κ B- ζ induzierte	93
Apoptose	
4.2.5 Die Rolle von STAT3 in der I κ B- ζ induzierten Apoptose.....	97
4.2.6 Die Verwendung von SB203580 führt zu einer Inhibition der	99
Apoptose	
5 Zusammenfassung	101
6 Abbildungsverzeichnis	105

7 Abkürzungsverzeichnis	107
8 Literaturverzeichnis.....	110
9 Anhang	120

1 Einleitung

1.1 Der Nuklearfaktor-kappa B (NF-κB)

Bei NF-κB handelt es sich um einen im Organismus ubiquitär vorkommenden pleiotropen Transkriptionsfaktor, der die Expression einer Vielzahl von Genen sowohl induzieren als auch inhibieren kann. Er wurde erstmals im Jahre 1986 in reifen B-Lymphozyten als Transkriptionsfaktor identifiziert, welcher in der Enhancer-Region der Gene für die leichte Kette κ der Immunglobuline bindet.^{1, 2} Eine Reihe von verschiedenen extrazellulären und intrazellulären Stimuli können zur Aktivierung von NF-κB führen. Dazu zählen vor allem die inflammatorischen Zytokine `Tumor necrosis factor alpha` (TNFα) und Interleukin (IL)-1β, bakterielle und virale Pathogene sowie z.B. durch UV Strahlung oder Sauerstoffradikale verursachter zellulärer Stress. Neben einer zentralen Stellung in der angeborenen und erworbenen Immunantwort, ist NF-κB außerdem für viele weitere physiologische Prozesse, wie Apoptose, Proliferation, zelluläre Stressantwort, Differenzierung und Zelladhäsion, von Bedeutung.^{3,4}

1.1.1 Die NF-κB/Rel-Proteinfamilie

Hinter dem Begriff NF-κB verbirgt sich nicht ein einzelnes Protein, sondern eine Gruppe von Homo- und Heterodimeren, die sich aus den fünf verschiedenen NF-κB /Rel-Proteinen zusammensetzen. Die Familie der NF-κB/Rel-Proteine umfasst in Säugetieren folgende Mitglieder: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p100/p52 (NF-κB-2) und p105/p50 (NF-κB-1), welche durch die Gene *RELA*, *RELB*, *REL*, *NF-κB1* und *NF-κB2* codiert werden.⁵ Allerdings wird klassischerweise mit der Bezeichnung NF-κB das prädominante Dimer, bestehend aus p50/p65, umschrieben. Die tatsächliche Zusammensetzung des NF-κB Dimers ist jedoch abhängig vom zellulären Kontext und der Art des aktivierenden Signals.

Strukturell zeichnen sich die Mitglieder der NF-κB/Rel-Proteinfamilie durch das Vorhandensein einer N-terminalen, etwa 300 Aminosäuren langen, sogenannten `Rel-homology domain` (RHD) aus. Diese hoch konservierte Domäne ist entscheidend für die Dimerisierung, DNA-Bindung und Kerntranslokation von NF-κB sowie für die Bindung von Inhibitorproteinen.⁶

Die C-terminale Region der Proteine ermöglicht eine Einteilung in zwei Gruppen. So verfügen die Proteine p65, RelB und c-Rel, welche in einer reifen Form exprimiert werden, über C-terminale Transaktivierungs-Domänen (TAD) und sind somit in der Lage die Transkription von Zielgenen zu induzieren. Im Gegensatz dazu werden die Proteine p50 und p52 in Form der Vorläufer-Proteine p105 und p100 exprimiert. Deren C-terminale Regionen sind anstelle von TAD durch mehrere Ankyrin-Wiederholungen charakterisiert, welche jedoch im Laufe des Reifungsprozesses abgespalten werden. Infolge der fehlenden TAD üben die p50- und p52-Homodimere, durch die Bindung an die Promotorregion von Zielgenen einen transkriptionseinhibierenden Effekt aus. In Kombination mit transaktivierenden NF- κ B-Proteinen können sie aber auch die Transkription induzieren.⁷

Fast alle Mitglieder der NF- κ B-Proteinfamilie sind dazu in der Lage, sowohl Homo- als auch Heterodimere zu bilden. Einzig RelB kann nur Heterodimere mit den Untereinheiten p100, p50 und p52 formen. Die Dimerisierung der Untereinheiten ist Voraussetzung für die Bindung an spezifische Sequenzmotive innerhalb der Promotoren von NF- κ B-Zielgenen. Dabei handelt es sich um die sogenannten κ B-Elemente, mit der Consensussequenz 5'-GGGRNWYYCC-3' (N: beliebige Base; R: Purin; W: Adenin oder Thymin; Y: Pyrimidin).^{8, 9} Röntgenstrukturanalysen von DNA gebundenen NF- κ B-Heterodimeren ergaben, dass die DNA von den jeweiligen Untereinheiten umschlossen wird. Dabei binden p50 und p52 an der ersten Hälfte der Consensussequenz (5'-GGGRN-3') und p65, RelB sowie c-Rel an die zweite Hälfte der Consensussequenz (5'-YYCC-3').^{10, 11} Aufgrund der kombinatorischen Vielfalt der NF- κ B-Dimere, sowie deren Erkennung spezifischer κ B-Elemente kommt es zur Transkription verschiedener Gruppen von NF- κ B abhängigen Genen, was zu vielfältigen Reaktionen der Zelle führt.

1.1.2 Die I κ B-Proteinfamilie

Durch die Assoziation mit I κ B-Proteinen wird die Aktivität von NF- κ B reguliert. Charakterisiert sind die Mitglieder der I κ B-Proteine durch sechs bis sieben C-terminale Ankyrin-Wiederholungen, mit deren Hilfe sie an der RHD der Rel/NF- κ B-Proteine binden. Dies kann abhängig vom jeweiligen I κ B-Protein zu einer Verstärkung oder aber Inhibition der NF- κ B-Aktivität führen.

Zur Familie der IκB-Proteine zählen 8 Mitglieder: IκBα, IκBβ, IκBε, IκB-ζ, IκB_{NS}, Bcl-3 sowie die Vorläuferproteine p100 und p105. Das am besten charakterisierte IκB-Protein stellt IκBα dar, welches präferentiell die Aktivität des p50/p65 Dimers reguliert. Zusammen mit den Proteinen IκBβ und IκBε wird IκBα zu den klassischen IκB-Proteinen gezählt, welche vorwiegend im Zytoplasma an NF-κB gebunden vorliegen.

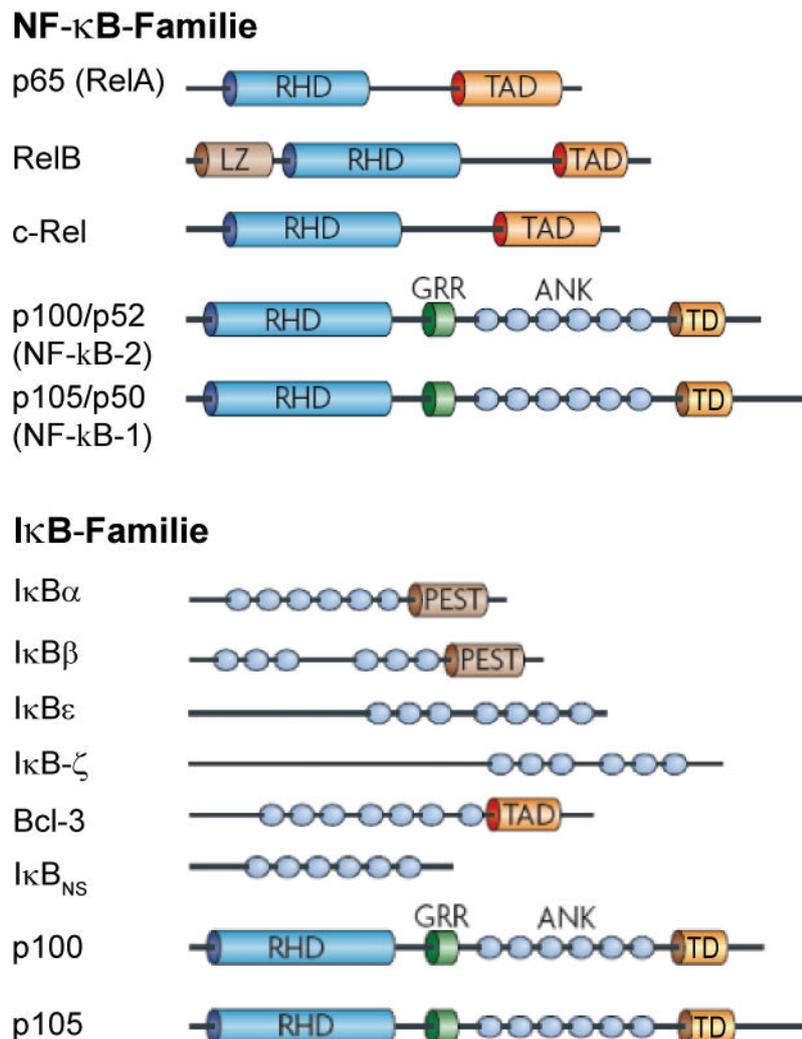


Abbildung 1. Schematische Darstellung der NF-κB- und IκB-Proteine (modifiziert nach ¹²). Dargestellt sind die funktionellen Domänen der einzelnen Proteine. Die Familie der NF-κB-Proteine besteht aus fünf Mitgliedern, p65 (RelA), RelB, c-Rel, p100/p52 (NF-κB-2) und p105/p50 (NF-κB-1), die durch eine `Rel-homology domain` (RHD) gekennzeichnet sind. Zusätzlich besitzen die Proteine p65, RelB und c-Rel eine Transaktivierungsdomäne, wodurch sie die Transkription von Zielgenen induzieren können. Bevor die Vorläuferproteine p100 und p105 proteasomal Prozessiert wurden, können sie aufgrund von Ankyrin-Wiederholungen als IκB-Proteine fungieren. Die Mitglieder der IκB-Proteinfamilie, zu der die Proteine IκBα, IκBβ, IκBε, IκB-ζ, IκB_{NS}, Bcl-3 zählen, sind durch 6-7 Ankyrin-Wiederholungen charakterisiert. ANK: Ankyrin-Wiederholungen; TD: Todesdomäne; GRR: Glycin-reiche Region; PEST: Prolin-Glutaminsäure-Serin-Threonin-reiche Domäne; TAD: Transaktivierungs-Domäne

Die Bindung der I κ B-Proteine an die NF- κ B Untereinheiten führt zu einer Maskierung des Kernlokalisierungssignals (*nuclear localization signal*, NLS) von NF- κ B, wodurch dessen Translokation in den Kern verhindert wird. Allerdings konnte für I κ B α gezeigt werden, dass die Maskierung der NLS im p50/p65-Dimer nur teilweise erfolgt. So ist die NLS von p65 maskiert, während die von p50 zugänglich ist. Dies führt zusammen mit den Nukleären-Export-Sequenzen (NES) von I κ B α und p65, zu einem konstanten Pendeln des Dimers zwischen Zytoplasma und Kern.¹³ Die NF- κ B-Aktivierung durch zahlreiche intra- wie auch extrazelluläre Stimuli resultiert in einer raschen Phosphorylierung, Polyubiquitinierung und anschließenden proteasomalen Degradation von I κ B α . Gleichzeitig stellt I κ B α aber auch ein Zielgen von NF- κ B dar und führt durch seine Neu-Synthese zu einem klassischen negativen Rückkopplungsmechanismus, der für die Terminierung des NF- κ B Signals verantwortlich ist. Das neu synthetisierte I κ B α transloziert dabei in den Kern und bindet an DNA gebundene NF- κ B Komplexe, welche aufgrund dessen von der DNA dissoziieren und wieder ins Zytoplasma transportiert werden. Damit eine korrekte Funktion dieses Mechanismus gewährleistet ist, wird bevorzugt NF- κ B gebundenes I κ B α degradiert.

I κ B β weist zu I κ B α , mit Ausnahme eines 40 Aminosäure langen Inserts zwischen den Ankyrin-Wiederholungen 3 und 4, eine hohe Sequenzhomologie und ähnliche Affinitäten bezüglich der NF- κ B-Untereinheiten auf. Zudem stellt es zusammen mit I κ B α die Hauptformen der I κ B-Proteine in den meisten Säugetierzellen dar.¹⁴ Während eine schnelle Degradation und Resynthese von I κ B α zu einer raschen, aber transienten NF- κ B-Aktivierung führt, ist die Kinetik der I κ B β Degradation und Resynthese langsamer und somit für eine lang anhaltende NF- κ B Aktivität wichtig. Weitere funktionelle Unterschiede bestehen darin, dass I κ B β nach NF- κ B Stimulation nicht vollständig degradiert wird und I κ B β /NF- κ B-Komplexe in ruhenden Zellen ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert sind.¹⁵

Analog zu I κ B α und I κ B β wird auch I κ B ϵ durch einen I κ B-Kinase (IKK)-abhängigen Mechanismus (s. 1.1.3) degradiert und die Neu-Synthese durch NF- κ B stimuliert.^{16, 17} Wie bei I κ B β ist der Ablauf dieses Prozesses wesentlich verlangsamt. I κ B ϵ wird primär in hämatopoetischen Zellen exprimiert und dessen Deletion führt zu schwerwiegenden funktionellen Störungen während der hämatopoetischen Differenzierung.^{18, 19} Die zeitlichen Unterschiede der Degradation von I κ B α , - β und - ϵ

sowie deren Zelltyp spezifische Expression sprechen eindeutig für die Übernahme von unterschiedlichen funktionellen Aufgaben dieser I κ B-Proteine.

Aufgrund von C-terminalen Ankyrin-Wiederholungen werden die Vorläuferproteine p100 und p105 ebenfalls zu der Familie der I κ B-Proteine gezählt. Die proteasomale Prozessierung von p105 kann sowohl konstitutiv als auch Stimulus abhängig erfolgen. Während die konstitutive Prozessierung zur Bildung von p50 führt, resultiert die Stimulus abhängige in einer vollständigen IKK abhängigen Degradation von p105, welches vor allem NF- κ B gebundenes p105 betrifft.^{7, 20, 21} Die Prozessierung von p100 zu p52 ist vorwiegend Stimulus abhängig und nimmt vor allem im alternativen NF- κ B-Aktivierungsweg eine zentrale Rolle ein (s. unten). Zudem fungiert p100, ähnlich den klassischen I κ B-Proteinen, als Inhibitor der NF- κ B Dimere.²²

Bcl-3 wird zusammen mit I κ B_{NS} und I κ B- ζ zu den atypischen I κ B-Proteinen gezählt, welche sich von den klassischen I κ B-Proteinen unter anderem durch ihre nukleäre Lokalisation unterscheiden. Zudem führt die NF- κ B-Aktivierung zu einer Induktion ihrer Expression.

Bcl-3 wurde erstmals bei Untersuchungen von chronisch lymphatischen B-Zell Leukämien entdeckt und ist zu dem durch eine vorhandene Transaktivierungsaktivität gekennzeichnet.²³ Im Kern liegt Bcl-3 assoziiert mit p50 und p52 Homodimere vor. Abhängig von seiner Konzentration, seinem Phosphorylierungsstatus und der Interaktion mit anderen Proteinen kann Bcl-3 inhibierende oder aktivierende Effekte ausüben. So kann die Interaktion mit DNA gebundenen p50 und p52 Homodimeren entweder zu einer direkten Induktion der Zielgen-Transkription führen oder zu einer Dissoziation dieses Komplexes, wodurch es transaktivierenden NF- κ B-Dimeren ermöglicht wird, an diese κ B-Elemente zu binden. Bcl-3 ist jedoch auch in der Lage, p50 und p52 Homodimere zu stabilisieren, wodurch der Zugang zu den κ B-Elementen für transaktivierende NF- κ B-Dimere blockiert und die Transkription der Zielgene inhibiert wird.^{24 7}

I κ B_{NS} wurde bei Untersuchungen der negativen Selektion von murinen Thymozyten identifiziert. Es assoziiert präferentiell mit p50 und nimmt dabei Einfluss auf dessen DNA-Bindungsaktivität.²⁵ Untersuchungen zeigten, dass I κ B_{NS} durch eine verminderte NF- κ B-Aktivität zu einer Inhibition von Toll-Like Rezeptor (TLR) abhängigen Genen führt und somit einen inhibierenden Einfluss auf Zytokin vermittelte Entzündungsprozesse ausübt.^{26, 27} Eine weitere Studie, bei der die

Deletion von $\text{I}\kappa\text{B}_{\text{NS}}$ zu einer verringerten Expression von IL-2 und Interferon (IFN)- γ in T-Zellen führte, belegt außerdem, dass $\text{I}\kappa\text{B}_{\text{NS}}$ abhängig vom Zelltyp unterschiedliche Funktionen ausübt.²⁸

Auf der Suche nach Genen, die durch entzündliche Prozesse verstärkt exprimiert werden, wurde $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ erstmals in Mäusen identifiziert. Abhängig von dem induzierenden Stimulus wird es auch als *‘molecule possessing ankyrin repeats induced by lipopolysaccharide’* (MAIL) oder *‘interleukin-1 inducible nuclear ankyrin-repeat protein’* (INAP) bezeichnet.^{29, 30} Infolge der Sequenzhomologie vor allem zu Bcl-3 sowie der sechs C-terminalen Ankyrin-Wiederholungen wurde $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ zur Familie der $\text{I}\kappa\text{B}$ -Proteine gezählt. In der N-terminalen Region von $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ befinden sich eine PEST-Domäne, eine NLS sowie eine Transaktivierungsdomäne. Die PEST Domäne, welche reich an Prolin, Glutaminsäure, Serin und Threonin ist und auch in $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und $-\beta$ vorzufinden ist, reguliert die Stabilität der $\text{I}\kappa\text{B}$ -Proteine und aufgrund der NLS ist $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ ein Kern residentes Protein.^{31, 32}

Im Gegensatz zu $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ wird $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ weder konstitutiv exprimiert, noch $\text{IKK}\alpha/\beta$ abhängig degradiert. Eine starke Expression des murinen $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ erfolgt sofort nach der Stimulation mit TLR-Liganden oder IL-1 β , jedoch nicht durch TNF α . Besonders in lymphatischen Organen wie der Milz oder den Lymphknoten, die reich an immunkompetenten Zellen sind, wird $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ stark ausgeprägt.^{7, 29}

$\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ bindet präferentiell an p50. Obwohl eine Inhibition der DNA-Bindung von p50/p65- und p50/p50-Dimeren durch $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ beobachtet wurde, kann es gleichzeitig ebenso als Koaktivator von p50 fungieren. So zeigte eine Studie, dass $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ nach LPS-Stimulation mit p50 assoziiert und zum κB -Element des IL-6 Promotors rekrutiert wird. Dementsprechend wiesen LPS stimulierte $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ defiziente Zellen eine stark verminderte Expression von IL-6 auf.^{33, 34} Die Funktion als Koaktivator wurde außerdem zum einen durch die Beobachtungen bestätigt, dass die Deletion von $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ zu einer massiv verminderten Expression NF- κB regulierter Gene führt, die ebenfalls in p50 defizienten Zellen nicht ausgeprägt werden. Zum anderen zeigten Untersuchungen mit Gal-4-Fusionsproteinen, dass $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ nur in Kombination mit p50 über eine Transaktivität verfügt.^{31, 33}

Neben IL-6 werden noch weitere inflammatorische Zytokine, wie GM-CSF, MCP-1, und IL-8, $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ abhängig exprimiert und deuten somit auf dessen Rolle in der Regulation inflammatorischer Prozesse hin. In Übereinstimmung damit, entwickelten $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ defiziente Mäuse atopische Dermatitis ähnliche Hautläsionen, sowie chronische

Entzündungsprozesse in der Tunica conjunctiva (Bindehaut), welche mit einer massiven Infiltration von inflammatorischen Zellen und dem beinahe vollständigen Verlust von Becherzellen einherging.^{35, 36} Ob für die Prozesse eine fehlende Expression von bestimmten Zytokinen oder eine mangelnde Konzentration von bakterizid wirkenden Proteinen verantwortlich ist, konnte bisher nicht eindeutig aufgeklärt werden. Weiterführende Untersuchungen zeigten außerdem, dass humanes I κ B- ζ in der Lage ist die Expression von *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL) und *human beta-defensin 2* (hBD-2) zu induzieren. Bei beiden handelt es sich um antimikrobiell wirkende Proteine, die Bestandteil der humoralen Immunabwehr sind.³⁷ Somit ist I κ B- ζ nicht nur an inflammatorischen Prozessen beteiligt, sondern ebenso an der Regulation des angeborenen Immunsystems. Aber auch für das erworbene Immunsystem scheint I κ B- ζ von entscheidender Bedeutung zu sein, da Untersuchungen an Natürlichen Killer (NK)-Zellen aus I κ B- ζ defizienten Mäusen ergaben, dass I κ B- ζ essentiell für die zytotoxische Wirkung der NK-Zellen sowie für die Sekretion von IFN γ durch NK-Zellen ist. Dieses ist vor allem für die Bekämpfung viraler und intrazellulärer bakterieller Infektionen unabdingbar. Da NK-Zellen eine zentrale Rolle in der Immunabwehr gegen das Zytomegalie-Virus spielen, waren die I κ B- ζ defizienten Mäuse infolgedessen empfänglicher für Infektionen mit diesem Virus.^{38, 39}

Das humane I κ B- ζ wurde erstmals bei einem Screening von Apoptose-resistenten und sensitiven HeLa Zellen in unserem Institut identifiziert. Im Gegensatz zum murinen I κ B- ζ zeigte sich, dass die mRNA-Expression der humanen Form neben TLR-Liganden und IL-1 β auch durch TNF α induzierbar ist. Des Weiteren interagiert es mit p50 und p65 und inhibiert deren Bindung an die DNA sowie die transkriptionelle Aktivität von p65. Die Expression von I κ B- ζ konnte in verschiedenen humanen Geweben, wie Leber, Lunge und Leukozyten nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte außerdem eine Beteiligung von I κ B- ζ an apoptotischen Prozessen beobachtet werden. So führte die Überexpression von I κ B- ζ in HT1080 Zellen zur Induktion des Zelltodes. Umgekehrt wiesen I κ B- ζ Knock-down Zellen eine geringere Sensitivität gegenüber TNF α oder anti-CD95 auf.⁴⁰

Nach seiner Synthese ist I κ B- ζ im Zellkern lokalisiert, wo es in sogenannten Matrix-Assoziierten Deazetylase (MAD) Körperchen akkumuliert. Innerhalb dieser MAD-Körperchen konnte eine Kolo-kalisation von I κ B- ζ mit dem Korepressor SMRT und der Histon-Deazetylase 5 nachgewiesen werden. Zusammen mit der Beobachtung, dass

I κ B- ζ an der Trimethylierung von Histon 3 sowie der Bildung des Prä-Initiationskomplexes beteiligt ist, lassen diese Ergebnisse vermuten, dass I κ B- ζ über Chromatinmodulationen die Transkription von Zielgenen reguliert.^{40, 41}

1.1.3 Aktivierung des NF- κ B-Signalweges

In unstimulierten Zellen sind die NF- κ B-Dimere vorrangig im Zytoplasma lokalisiert, wo sie in Form von Komplexen hauptsächlich mit den I κ B-Proteinen I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ vorliegen. Die Bindung der I κ B-Proteine an die RHD der NF- κ B Untereinheiten führt zur Maskierung der NLS von NF- κ B, wodurch dessen Translokation in den Kern verhindert wird. Die durch zahlreiche intra- wie auch extrazelluläre Stimuli induzierte Phosphorylierung, Polyubiquitinierung und anschließender proteasomaler Degradation der I κ B-Proteine führt zur Freisetzung der NF- κ B-Dimere, welche in den Kern translozieren und die Transkription ihrer Zielgene induzieren. Es sind mehrere Signalwege bekannt, die zur Aktivierung von NF- κ B führen. Bei den am besten charakterisierten Signalwegen handelt es sich um den klassischen und den alternativen Signalweg.

1.1.3.1 Der klassische NF- κ B-Aktivierungsweg

Die Aktivierung von NF- κ B über den klassischen Aktivierungsweg erfolgt durch pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α oder über TLR-Liganden wie bakterielles Lipopolysaccharid und ist abhängig von der Phosphorylierung und anschließender proteasomalen Degradation der I κ B-Proteine. Vermittelt wird dieser Prozess durch den I κ B-Kinase (IKK)-Komplex, der aus den zwei katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β sowie der regulatorischen Untereinheit `NF- κ B essential modifier` (NEMO) besteht.⁴² Die Kinasen weisen eine 52%ige Sequenzhomologie auf und sind strukturell durch eine N-terminale Kinase-Domäne, der sich ein Leucin-Reißverschluss (`Leucin-Zipper`, LZ) anschließt, gekennzeichnet. C-terminal befindet sich neben einem Helix-Schleife-Helix (helix-loop-helix, HLH) Motiv die NEMO-binde-Domäne (NBD) mit der Consensussequenz Leu-Asp-Trp-Ser-Trp-Leu. Mit Hilfe des Leucin-Reißverschlusses bilden die Kinasen vorrangig Heterodimere, die Voraussetzung für die katalytische Aktivität der IKKs sind. So führt

eine Blockierung der Dimerbildung gleichzeitig zu einer Inhibition der Kinase-Aktivität.⁴³

Bei NEMO handelt es sich um ein 48kDa schweres Protein, das sowohl im N- als auch im C-Terminus spiralisierte α -Helices besitzt, welche vor allem für die Interaktion mit den IKKs von Bedeutung sind. Die C-terminale Region verfügt außerdem über einen Leucin-Reißverschluss und einen Zink-Finger. Während die C-terminale Region von NEMO für die Regulation der IKK-Aktivität und Interaktion mit weiteren Adapterproteinen verantwortlich ist, vermittelt die N-terminale Region die Interaktion mit den IKKs.

Für die Aktivität des IKK-Komplexes ist die Phosphorylierung von Serinresten in der Aktivierungsschleife (T-Loop), zumindest einer katalytischen Untereinheit, notwendig. Studien belegen, dass neben einer möglichen Transautophosphorylierung auch eine Phosphorylierung durch eine vorgeschaltete Proteinkinase in Frage kommt. Obwohl NEMO eine zentrale Schlüsselrolle in diesem Prozess zugeordnet werden konnte, ist der genaue Mechanismus allerdings noch nicht eindeutig aufgeklärt.

Innerhalb des aktiven IKK-Komplexes vermittelt vor allem IKK β die Phosphorylierung der N-terminalen Serinreste 32 und 36 von I κ B α . Auch I κ B β und I κ B ϵ werden durch den IKK-Komplex an spezifischen Serinresten phosphoryliert, die Kinetik dieses Prozesses ist jedoch wesentlich langsamer. Im Anschluss an die Phosphorylierung erfolgt die Ubiquitinierung der I κ B-Proteine durch den SCF ^{β TrCP}-E3Ubiquitin-Ligase-Komplex sowie deren proteasomale Degradation. Der Abbau der I κ B-Proteine führt zur Dissoziation der NF- κ B-Dimere, welche daraufhin in den Kern translozieren und die Transkription der Zielgene regulieren.⁴

1.1.3.2 Der alternative NF- κ B-Aktivierungsweg

In dem alternativen NF- κ B Aktivierungsweg, der vor allem durch Mitglieder der TNF-Zytokinfamilie wie CD40L oder Lymphotoxin- β induziert wird und unabhängig von IKK β und NEMO ist, nimmt die NF- κ B induzierende Kinase (NIK) eine zentrale Schlüsselstellung ein. Sie ist, durch die Phosphorylierung von Serinresten in der Aktivierungsschleife, für die Aktivierung der IKK α verantwortlich. Zudem fungiert sie als Adapterprotein und führt zu einer Rekrutierung der aktiven IKK α zu p100,⁴⁴ wo diese wiederum p100, welches in Form eines inaktiven Komplexes mit RelB im Zytoplasma vorliegt, an mehreren N- und C-terminalen Serinresten phosphoryliert.

Gefolgt wird dies von der Polyubiquitinierung p100s durch die SCF^{βTrCP}-E3-Ubiquitin-Ligase und anschließender partieller proteasomalen Prozessierung zu p52. Hierbei wird der Ankyrin beinhaltende C-Terminus abgespalten und das NF-κB-Dimer bestehend aus p52 und RelB ist nun in der Lage, in den Kern zu translozieren, wo es als Transkriptionsfaktor fungieren kann.⁴⁵

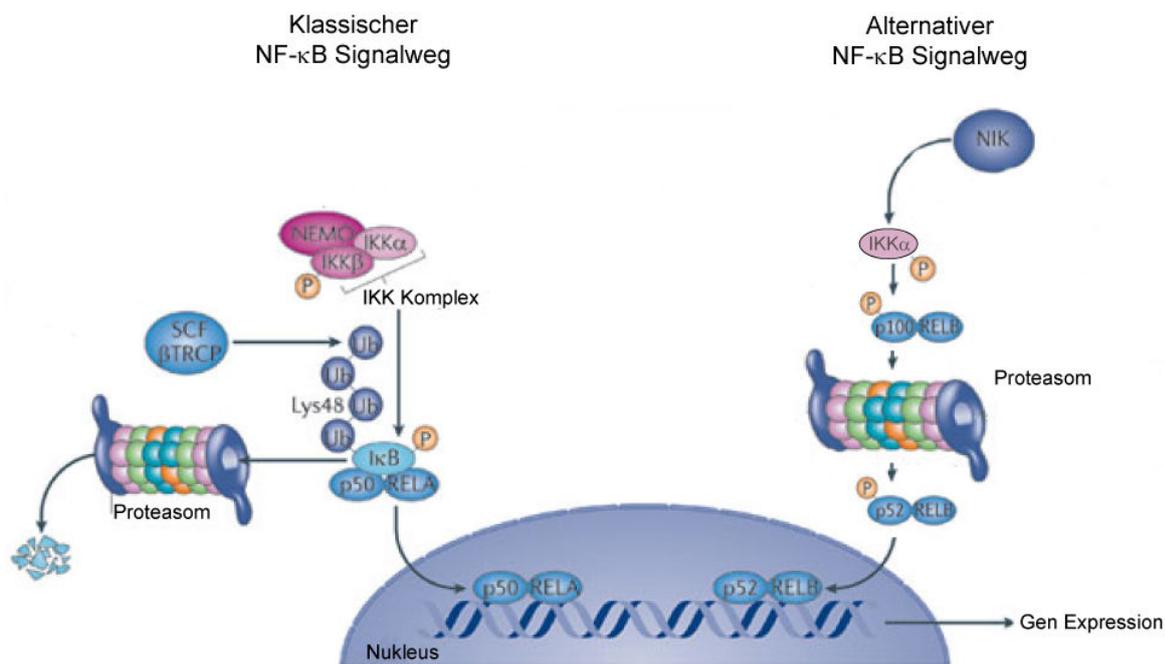


Abbildung 2. Die klassische und alternative Aktivierung des NF-κB-Signalweges (modifiziert nach⁴⁶). Die Aktivierung des klassischen NF-κB-Signalweges ist IKKβ abhängig und führt zu einer Phosphorylierung von IκBα an den Serinresten 32 und 36 sowie anschließender Ubiquitinierung die im proteasomalen Abbau resultiert. Das freigesetzte p50/p65-Dimer transloziert in den Zellkern und induziert die Transkription von Zielgenen. Beim alternativen NF-κB-Signalweg nimmt die NF-κB induzierende Kinase (NIK) eine Schlüsselstellung ein. Sie führt durch die Phosphorylierung von Serinresten in der Aktivierungsschleife von IKKα zu dessen Aktivierung und vermittelt zudem die Rekrutierung von aktivem IKKα zu p100, welches in einem Komplex mit RelB vorliegt. Nachfolgend phosphoryliert die IKKα p100, das daraufhin ubiquitiniert und proteasomal zu p52 prozessiert wird. Infolgedessen kann das p52/RelB-Dimer in den Zellkern translozieren und die Transkription von Zielgenen induzieren.

1.2 Jak/STAT-Signaltransduktionsweg

Der Janus Kinasen (Jak) abhängige STAT-Signaltransduktionsweg wurde bei Untersuchungen zur Interferon vermittelten Veränderung der transkriptionellen

Aktivität entdeckt.⁴⁷ STAT steht für `Signal Transducer and Activator of Transcription` und es handelt sich dabei um einen Zytokin-Rezeptor vermittelten Signaltransduktionsweg in Säugetierzellen. Die daran beteiligten STAT-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, welche durch eine Vielzahl verschiedener extrazellulärer Liganden wie Zytokine und Wachstumshormone aktiviert werden können.

Zu der STAT-Proteinfamilie zählen derzeit 7 Mitglieder: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6. Die Analyse von DNA gebundenen STAT1- und STAT3-Dimeren mittels Röntgenstruktur-Analysen, erlaubte eine Aufklärung ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten. Des Weiteren wurden diese Untersuchungen durch vergleichende Sequenzuntersuchungen sowie Mutagenese-Studien ergänzt. N-terminal beginnend weist die Struktur der STAT-Proteine eine `coiled-coil`-Domäne auf, die wichtig für die Interaktion mit dem Rezeptor sowie die DNA-Bindung ist.^{48, 49} Gefolgt wird diese von einer DNA-Bindungsdomäne, bestehend aus β -Faltblättern, die über eine Linker-Domäne, dessen Funktion unklar ist, mit dem C-terminalen Anteil des Proteins verbunden ist. Im C-terminalen Anteil befindet sich zudem die Transaktivierungs-Domäne, der eine SH2-Domäne vorhergeht. Innerhalb der Transaktivierungs-Domäne befinden sich Tyrosinreste, welche im Laufe der Rezeptor vermittelten Aktivierung der STAT-Proteine phosphoryliert werden.⁵⁰⁻⁵² Die Funktion der SH2-Domäne besteht in der Rekrutierung der STAT-Proteine zu den phosphorylierten Tyrosinresten des zytoplasmatischen Anteils des Rezeptors und ermöglicht außerdem die Dimerisierung der STAT-Moleküle.

In-vivo Studien mit STAT defizienten Mäusen zeigten, dass die STAT-Proteine vor allem im Immunsystem vielfältige Aufgaben übernehmen. So führte der Knock-out von STAT1 zu einem Verlust der Interferon (IFN) vermittelten Abwehr, infolgedessen die betroffenen Mäuse wesentlich anfälliger für virale Infektionen und intrazelluläre Pathogene waren.⁵³ Ebenso zeigten STAT2 defiziente Mäuse eine erhöhte Empfänglichkeit für virale Infektionen sowie eine fehlende Sensitivität der Zellen gegenüber IFN- α/β .⁵⁴ Aufgrund dessen, wird als wichtige Funktion von STAT2, die Bildung des Transkriptionskomplexes ISGF3, zusammen mit STAT1 und IRF9, angesehen. ISGF3 vermittelt die transkriptionelle Antwort der Zellen auf die IFN- α/β Stimulation. STAT4 und STAT6 defiziente Mäuse zeigen eine Störung der T-Helferzellen Differenzierung, wobei im Falle des STAT4 Knock-outs die Reifung der T_H1- und T_H2-Zellen gestört ist und bei STAT6 die der T_H2-Zellen.^{55, 56} Die Deletionen von STAT5a und STAT5b waren durch eine verringerte Proliferation der

T-Zellen geprägt. Außerdem konnte in den STAT5b Knock-out Mäusen eine verringerte Anzahl an Natürlichen Killerzellen (NK) beobachtet werden.^{57, 58}

1.2.1 *Signal Transducer and Activator of Transcription 3, STAT3*

Im Gegensatz zu den anderen STAT defizienten Mäusen, starben die STAT3 Knock-out Mäuse bereits in einem frühen Stadium der Embryogenese, wodurch die Bedeutung von STAT3 für die frühe Entwicklung verdeutlicht wird.⁵⁹ Ursprünglich wurde STAT3 als Transkriptionsfaktor in Hepatozyten, in denen er für die IL-6 vermittelte Expression von Akut-Phase Proteinen verantwortlich ist, identifiziert⁶⁰. Neben der Induktion des inflammatorischen Prozesses der Akut-Phase-Antwort, konnten eine Fülle von weiteren konditionellen *in-vivo* und *in-vitro* Studien eine Beteiligung von STAT3 an einer Vielzahl verschiedenster Prozesse nachweisen. Untersuchungen mit embryonalen Stammzellen beispielsweise zeigten, dass die Aktivität von STAT3 zum Erhalt der Pluripotenz dieser Zellen beiträgt.^{61, 62} Wiederum andere Untersuchungen offenbarten zudem eine entscheidende Rolle von STAT3 für die Regulation der Granulopoese und der Wundheilung der Haut.^{63, 64} Neben diesen physiologischen Funktionen die STAT3 im Organismus ausübt, ist es jedoch auch für eine Reihe verschiedener pathologischer Prozesse verantwortlich.

Aufgrund der Beteiligung an karzinogenen Prozessen, wird STAT3 auch als Onkogen betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die zelluläre Transformation durch die Src-Protein Kinase von STAT3 abhängig ist.⁶⁵ Durch die Substitution zweier Cystein-Reste in der SH2-Domäne wurde eine konstitutiv aktive STAT3-Mutante generiert, welche nach Transfektion in Fibroblasten zu einer zellulären Transformation führte. Die subkutane Injektion dieser Zellen führte zudem in Nacktmäusen zwei bis vier Wochen später zur Bildung eines Tumors.⁶⁶ Ein tumorfördernder Effekt von STAT3 spiegelt sich ebenso darin wieder, dass in einer Reihe von Tumorzelllinien und humanen Tumoren konstitutiv aktives STAT3 nachgewiesen werden konnte.⁶⁷

Begünstigt wird die STAT3 vermittelte Tumorgenese durch die Expression anti-apoptotischer Proteine, die in den Tumorzellen die Initiierung der Apoptose verhindern und infolgedessen zu einem unkontrollierten Wachstum beitragen. Bei diesen Proteinen handelt es sich unter anderem um Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie, Bcl-2, Bcl-X_L und Mcl-1.⁶⁸⁻⁷⁰ Neben der Inhibition der Apoptose durch

die STAT3 induzierte Expression dieser Gene, kann die STAT3-Aktivität außerdem zu einer verstärkten Ausprägung von Cyclin-D1 führen, wodurch es zu einer verstärkten Proliferation der Tumorzellen kommt.⁷¹

1.2.2 Bedeutung von STAT3 für hepatozelluläre Prozesse

In der Leber ist STAT3 besonders für inflammatorische und regenerative Prozesse sowie für die Hepatoprotektion von entscheidender Bedeutung.

Abhängig vom verwendeten Leberschädigungsmodell konnten sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften von STAT3 beobachtet werden. STAT3 defiziente Mäuse wiesen im Vergleich zu den Kontrollmäusen, bei einer Injektion von Kohlenstofftetrachlorid (CCL₄), geringere Entzündungszeichen der Leber auf.⁷² Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei der Fütterung mit Alkohol erzielt.⁷³ Im Gegensatz dazu führte eine LPS induzierte Schädigung der Leber sowie die chronische Gabe von CCL₄ in STAT3 Knock-out Mäusen zu einer verstärkten Leberentzündung.^{74, 75} Es wird davon ausgegangen, dass der pro-inflammatorische Effekt durch die Expression von Akut-Phase Proteinen hervorgerufen wird, wohingegen die anti-inflammatorische Wirkung auf einer Inhibition der Interferon vermittelten Entzündung beruht.

Eine bemerkenswerte Eigenschaft der Leber von Säugetieren ist ihre Fähigkeit zur Regeneration nach schweren Schäden oder dem Verlust eines Großteils der parenchymalen Zellen.^{76, 77} Normalerweise ruhende Hepatozyten werden durch diese Vorgänge stimuliert und treten in den Zellzyklus ein, um den Verlust der Zellmasse zu kompensieren.⁷⁷ Untersuchungen mittels STAT3 oder gp130 Knock-out Mäusen offenbarten, dass der STAT3-Signaltransduktionsweg auch zu diesem Prozess der Leber-Regeneration beiträgt.⁷⁸⁻⁸⁰ Hierbei zeigte vor allem der doppelte Knock-out von STAT3 in Hepatozyten und myeloiden Zellen eine dramatische Reduktion der Überlebensrate nach partieller Hepatektomie, verglichen zu den Kontroll-Mäusen.⁸¹

Bei der Schädigung von Leberparenchymzellen zum Beispiel durch chemische Agenzien führt die Aktivierung von STAT3 zu einem hepatoprotektiven Effekt der die Zellen vor dem Zelltod bewahrt. Eine Inhibition der STAT3-Aktivität resultiert dagegen bei Concanavalin A induzierten Leberschäden in einem verstärkten Zelltod der Parenchymzellen.⁸² Auch durch den CD95 (Fas, Apo-1) Agonisten Jo2 hervorgerufene Leberschäden konnten durch die Aktivität von STAT3 inhibiert

werden. Hervorgerufen wurde dieser Effekt durch die verstärkte Expression der anti-apoptotischen Proteine FLIP, Bcl-X_L und Bcl-2 sowie einer verringerten Expression von Caspase-8 und Caspase-3. Zusätzlich wurde auch der oxidative Stress durch erhöhte Expression des Redox Faktor-1 vermindert.⁸³

1.2.3 Aktivierung von STAT3 durch den IL-6R/gp130-Rezeptorkomplex

STAT3 kann gewebespezifisch von einer Vielzahl verschiedener Liganden aktiviert werden. In der Leber wird STAT3 vorrangig durch IL-6 und weitere Mitglieder der IL-6 Zytokinfamilie, zu denen der *leukemia inhibitory factor*, *ciliary neurotrophic factor*, *oncostatin M* und *cardiotrophin-1* zählen, aktiviert. Die Bindung von IL-6 an den entsprechenden membranständigen IL-6 Rezeptor (IL-6R) führt zu einer Trimerisierung von zwei gp130-Rezeptoreinheiten mit dem IL-6 gebundenen

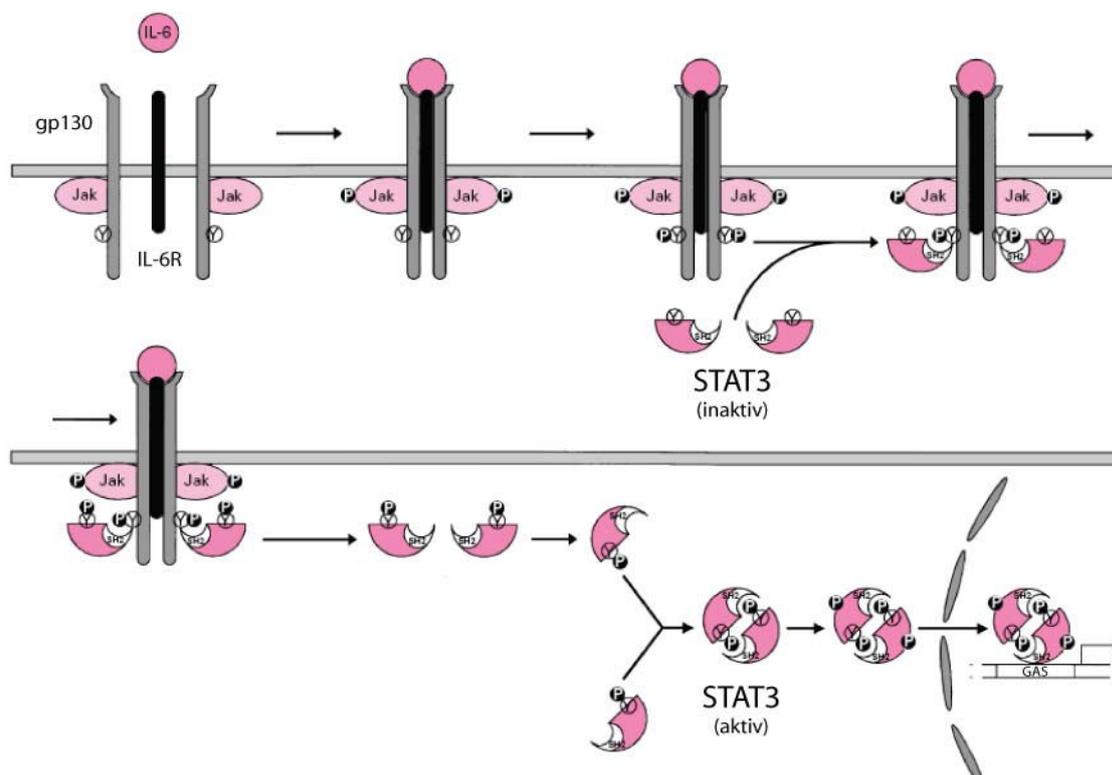


Abbildung 3. IL-6 vermittelte Aktivierung von STAT3 (modifiziert nach ⁸⁴). Die Bindung von IL-6 an den membranständigen IL-6R induziert dessen Trimerisierung mit zwei gp130-Rezeptoreinheiten. Gefolgt wird diese Formierung von der gegenseitigen Phosphorylierung und Aktivierung der gp130 assoziierten Jak, welche wiederum zytoplasmatische Tyrosinreste der gp130-Rezeptoreinheiten phosphorylieren. STAT3-Monomere binden über ihre SH2-Domäne an die phosphorylierten Tyrosinreste der gp130-Rezeptoreinheiten und werden anschließend selbst durch Jak phosphoryliert. Phosphoryliertes STAT3 dissoziiert vom Rezeptor, dimerisiert und transloziert in den Nucleus, wo es die Transkription seiner Zielgene induzieren kann.

Rezeptor. Dabei wird die Aufgabe der Signaltransduktion von den gp130 Rezeptoreinheiten übernommen. Infolge der Formierung des IL-6R/gp130 Rezeptorkomplexes, kommt es zu einer gegenseitigen Phosphorylierung und Aktivierung, der mit den gp130-Rezeptoreinheiten assoziierten Jak. Diese wiederum phosphorylieren zytoplasmatische Tyrosinreste der gp130 Rezeptoreinheiten, welche als Bindungsstellen für die STAT3-Monomere dienen. Erkannt werden diese phosphorylierten Tyrosinreste durch die SH2-Domänen der STAT3-Moleküle, die somit die Rekrutierung von STAT3 zu den gp130-Rezeptoreinheiten ermöglichen. Der Bindung von STAT3 an die gp130-Rezeptoreinheit folgt eine Phosphorylierung von STAT3 an dem Tyrosinrest 705 durch die Jaks. Phosphorylierte STAT3-Monomere dissoziieren anschließend von dem Rezeptorkomplex, dimerisieren aufgrund einer gegenseitigen Interaktion der phosphorylierten Tyrosinreste mit den SH2-Domänen, und werden letztlich in den Kern, in dem sie die Transkription ihrer Zielgene induzieren können, transloziert.

1.2.4 Regulation des IL-6 abhängigen STAT3-Signaltransduktionsweg

Die Regulation der Zytokin vermittelten Aktivität von STAT3 ist ein wichtiger Prozess um eine überschießende Signalweiterleitung, welche unter bestimmten Umständen sogar zur Entwicklung von Tumoren beitragen kann, zu verhindern. Es wurden bisher drei verschiedene Mechanismen entdeckt, die für die Regulation der STAT3 Aktivität verantwortlich sind. Dabei handelt es sich um drei verschiedene Klassen von regulatorischen Proteinen, die auf unterschiedliche Art und Weise die STAT3-Aktivität inhibieren. Dies ist zum einen das Protein *Suppressor of cytokine signalling 3* (SOCS3), die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP2 und zuletzt *Protein inhibitor of activated STAT* (PIAS3).

Da SOCS3 nicht nur ein Inhibitor des IL-6 abhängigen STAT3 Signaltransduktionsweges ist sondern auch ein direktes Zielgen von STAT3, handelt es sich hierbei um einen klassischen, negativen Rückkopplungsmechanismus. So zeigten *in-vivo* Studien, dass es in SOCS3 defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp (WT) zu einer deutlich verlängerten IL-6 induzierten Aktivität von STAT3 kommt.⁸⁵

Die Struktur von SOCS3 besteht aus einer N-terminalen `Kinase Inhibitory Region`, einer zentral gelegenen SH2-Domäne und einer sogenannten SOCS-Box, dessen genauere Funktion noch unbekannt ist.⁸⁶

SOCS3 ist in der Lage sowohl an ein Phospho-Tyrosin Motiv der gp130-Rezeptoreinheit als auch an das aktive Zentrum der Jak zu binden. Dies zieht eine Inhibition der Jak nach sich und führt dadurch zu einer verringerten Phosphorylierung der Rezeptoreinheiten, der STAT3-Monomere und der Jak.^{87, 88}

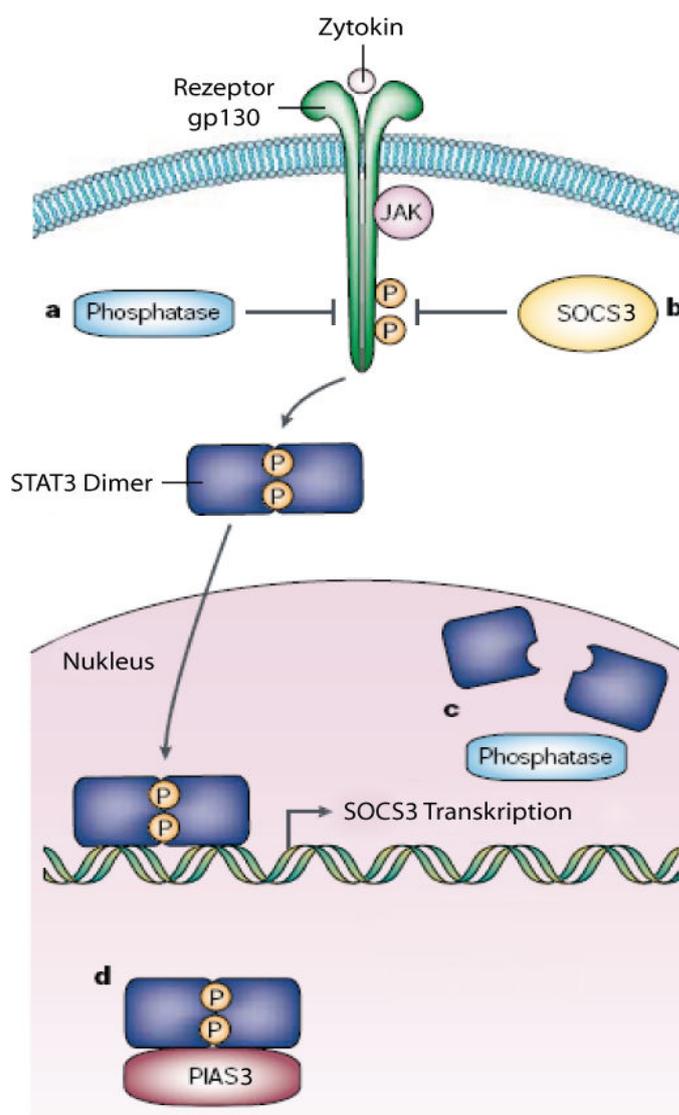


Abbildung 4. Mechanismen zur Regulation der STAT3-Aktivität (modifiziert nach ⁸⁹). Die Protein-Tyrosin Phosphatase SHP2 ist in der Lage neben der (A) gp130-Rezeptoreinheit auch (C) STAT3 zu dephosphorylieren. Die STAT3 induzierte Expression von SOCS3 führt zu einer Inhibition von Jak (B). (D) PIAS3 inhibiert die DNA-Bindung von STAT3.

Da die Phosphorylierung der Tyrosinreste von STAT3 entscheidend für die Signalweiterleitung sind, ist es nicht verwunderlich, dass auch eine Protein-Tyrosin-Phosphatase an der Regulation der STAT3-Aktivität beteiligt ist. Es handelt sich dabei um die SHP2. Versuche mit einer dominant-negativen SHP2 führten zu einer deutlich stärkeren Phosphorylierung der Rezeptoren, der Jak und der STAT Proteine.⁹⁰ Zudem belegen weitere Versuche eine Rekrutierung der SHP2 an phosphorylierte Tyrosinreste des zytoplasmatischen Teils der gp130 Rezeptoreinheit sowie die Interaktion von SHP2 mit STAT3.⁹¹ Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine mangelnde Aktivität der SHP2 zu einer verstärkten Induktion der Akut-Phase Antwort, aufgrund einer gesteigerten STAT3-Aktivität, führt.⁹²

Bei dem dritten Mechanismus für die Regulation der STAT3-Aktivität, verhindert die Inhibition der STAT3 DNA-Bindung die Expression der Zielgene. Verantwortlich hierfür ist das Protein *Protein inhibitor of activated STAT 3* (PIAS3). Obwohl eine Komplexbildung der beiden Proteine und eine Inhibition der STAT3 DNA-Bindung durch PIAS3 nachgewiesen werden konnte, ist der genaue Mechanismus noch nicht aufgeklärt.⁹³

1.3 Apoptose

Der Begriff der Apoptose wurde erstmals 1972 von Kerr und Kollegen verwendet.⁹⁴ Bei der Apoptose, welche auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird, handelt es sich um einen kontrollierten, physiologischen Prozess, der für die gezielte Eliminierung von überschüssigen, geschädigten, infizierten oder entarteten Zellen verantwortlich ist. Neben der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase der Gewebe ist sie außerdem für die embryonale Entwicklung des Organismus sowie für die Regulation des Immunsystems unabdingbar.⁹⁵

Bei den morphologischen Veränderungen, die charakteristisch für den Verlauf der Apoptose sind, handelt es sich in der frühen Phase, um das Schrumpfen und Lösen der Zelle aus dem Zellverband. Des Weiteren lässt sich eine Kondensation des Chromatins und des Zytoplasmas sowie die Fragmentation des Kerns beobachten. Aufgrund der Nukleasen vermittelten Spaltung der genomischen DNA zwischen den Nukleosomen entstehen zudem DNA-Fragmente die einem Vielfachen von 185 Basenpaaren entsprechen und in einem Agarosegel das typische Muster der *‘DNA-Leiter’* erkennen lassen. In der späten Phase der Apoptose erfolgt dann der Zerfall

der Zelle in so genannte apoptotische Körperchen. Dieser Vorgang wird auch als `Membrane Budding` bezeichnet.^{94, 96, 97}

Die apoptotischen Körperchen entsprechen kleinen Membranvesikel mit dicht gepackten Organellen, welche durch Phagozytose von Makrophagen aufgenommen und letztlich in Phagolysosomen abgebaut werden. Um eine effektive Erkennung und Aufnahme der apoptotischen Körperchen durch die Makrophagen zu gewährleisten, kommt es außerdem zu einer Translokation des Phospholipids Phosphatidylserin auf die Außenseite der apoptotischen Körperchen.^{99, 100}

Diese morphologischen Veränderungen unterscheiden sich deutlich von einer anderen Form des Zelltodes, der Nekrose. Anders als bei der Apoptose ist dies kein kontrollierter Prozess und durch ein starkes Anschwellen der Zelle, einer Karyolyse sowie einer Schädigung der Plasmamembran gekennzeichnet.⁹⁸ Mögliche Ursachen

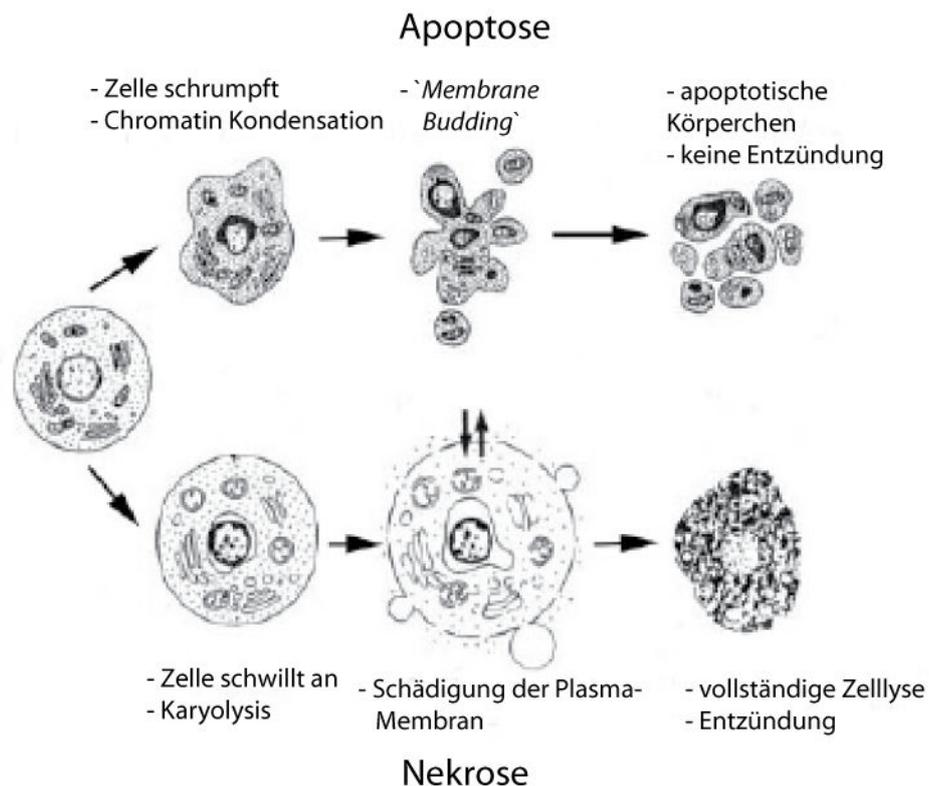


Abbildung 5. Morphologische Veränderungen während der Apoptose und Nekrose (modifiziert nach⁹⁸). Während der Apoptose können verschiedene morphologische Veränderung der Zelle beobachtet werden. So schrumpft die apoptotische Zelle und löst sich aus dem Zellverband, es kommt zur Kondensation des Chromatins sowie zur Fragmentierung des Zellkerns. Zuletzt erfolgt der Zerfall der Zelle in apoptotische Körperchen (`Membrane budding`), welche von Makrophagen aufgenommen und abgebaut werden. Im Gegensatz dazu ist die Nekrose durch ein Anschwellen der Zelle, welches zu einer Schädigung der Plasmamembran führt, gekennzeichnet. Durch den Verlust der Membranintegrität erfolgt ein Austritt von Zellinhalten, die zu einer entzündlichen Reaktion führen.

für die Induktion der Nekrose sind vor allem extrazelluläre Noxen wie Hitze oder Gifte. Durch die Schädigung der Plasmamembran während der Nekrose, kommt es zu einem Austritt von Zytoplasma in das interstitielle Gewebe. Aufgrund der im Zytoplasma enthaltenen, inflammatorischen Stoffe führt die Nekrose zu einer entzündlichen Reaktion im umgebenden Gewebe. Im Gegensatz dazu kommt es während der Apoptose nicht zu entzündlichen Prozessen, da die apoptotischen Körperchen ihren Inhalt nicht freisetzen und zudem schnell durch die Makrophagen aufgenommen und abgebaut werden.

Die Apoptose unterliegt einer strikten Kontrolle durch verschiedenste Mechanismen und eine Deregulation der Apoptose kann schwerwiegende Folgen nach sich ziehen. Vor allem an der Entstehung von Krebs sind Prozesse beteiligt, die zu einer Inhibition der Apoptose führen. Ebenso sind Autoimmunerkrankungen, bei denen autoreaktive T-Zellen oder überschüssige B-Zellen nicht mehr abgebaut werden, auf eine Inhibition der Apoptose zurückzuführen.^{101, 102} Eine überschießende Apoptose hingegen kann bei bestimmten degenerativen Erkrankungen sowie der Infektion mit dem Humanem Immundefizienz-Virus (HIV) beobachtet werden. Das virale Genprodukt Tat führt in HIV infizierten T-Zellen zu einer verstärkten Expression des CD95-Liganden, wodurch es zu einer verstärkten T-Zell-Rezeptor vermittelten Apoptose kommt.¹⁰³

Die für die Ausführung der Apoptose verantwortlichen Proteine sind die sogenannten Caspasen. Hierbei handelt es sich um eine hoch konservierte Familie von proteolytisch aktiven Proteinen, welche ubiquitär in Form von inaktiven Zymogenen exprimiert werden. Das Vorhandensein eines Cysteinrestes im aktiven Zentrum sowie die Spaltung von Peptidbindungen ihrer Substrate nach einem Asparaginrest, spiegelt sich auch in ihrer Bezeichnung als Cysteiny-l-abhängige Asparat spezifische Proteasen (C-ASP-asen) wieder.¹⁰⁴ Die Aktivierung der Caspasen erfolgt in einer kaskadenartigen Form, die zu einer Verstärkung des apoptotischen Signals führt. Bislang konnten 12 humane Caspasen identifiziert werden, welche in zwei Gruppen unterteilt werden. Die Caspasen 1, 4 und 5, sind für die Zytokinreifung wichtig und werden deshalb auch als inflammatorische Caspasen bezeichnet. Die zweite Gruppe, die essentiell für die Apoptose ist, lassen sich in Effektor-Caspasen (Caspase 3, 6 und 7) und Initiator-Caspasen (Caspase 2, 8, 9 und 10) einteilen.^{95, 105} Strukturell bestehen die Caspasen im Allgemeinen aus einer N-terminalen Prodomäne, die sich in ihrer Länge und Zusammensetzung unterscheiden kann,

sowie einer großen etwa 20 kDa-Untereinheit, gefolgt von einer kleinen, etwa 10 kDa-Untereinheit. Vor allem die Prodomänen der Initiator-Caspasen unterscheiden sich deutlich von denen der Effektor-Caspasen. Während die Prodomänen der Effektor-Caspasen nur einige Aminosäuren lang sind, verfügen die Prodomänen der Initiator-Caspasen-2 und -9, zusätzlich über eine Caspase-Rekrutierungs-Domäne (*Caspase recruiting domain*, CARD) sowie die Caspasen-8 und -10 über zwei Todeseffektor-Domänen (*Death Effector Domain*, DED). Bei diesen Domänen handelt es sich um Protein-Protein-Interaktions-Domänen, die eine Rekrutierung der Caspasen zu den entsprechenden Aktivierungskomplexen ermöglicht. Die Bindung an diesen Komplexen führt nach dem Prinzip der 'induzierten Proximität', aufgrund einer autoproteolytischen Prozessierung, zur Aktivierung der Initiator-Caspasen. Dies führt zur Initiierung der Caspase-Kaskade, bei der die Effektor-Caspasen durch die aktiven Initiator-Caspasen prozessiert und aktiviert werden.¹⁰⁶ Während der autokatalytischen oder Caspase vermittelten Aktivierung kommt es zur Freisetzung der einzelnen Caspase-Untereinheiten sowie der Abspaltung der Prodomäne. Gefolgt wird dieser Vorgang von der Bildung eines Heterotetramers, bestehend aus je zwei kleinen und großen Untereinheiten. Dieses Tetramer stellt die aktive Form der Caspase dar und verfügt über zwei katalytische Zentren. Obwohl alle Caspasen durch einen Cysteinrest im aktiven Zentrum zur Spaltung von Peptidbindungen nach einem Aspartatrest in der Lage sind, unterscheiden sie sich deutlich in Ihrer Spezifität, die durch die Aspartat umgebenden Aminosäuren bedingt ist. Entscheidend sind dabei besonders die drei Aminosäuren die dem Aspartat vorausgehen.¹⁰⁷

Zu den Substraten der Effektor-Caspasen zählen unter anderem Zytoskelett- und Strukturproteine, Zelladhäsionsmoleküle, Zellzyklusproteine und DNA-Reparatur-Proteine. Die Caspase vermittelte Spaltung dieser Proteine führt zu einem Zellzyklusarrest, dem Verlust der Zellkontakte, der Ausbildung der apoptotischen Körperchen und letztendlich zu der Aufnahme und dem Abbau der apoptotischen Zelle durch Makrophagen.^{108, 109}

1.3.1 Der extrinsische Apoptose-Signalweg

Abhängig von der Art des Stimulus erfolgt die Induktion der Apoptose über den extrinsischen- oder den intrinsischen Apoptose-Signalweg. Die Übermittlung des Apoptosesignals im extrinsischen Weg erfolgt unter der Beteiligung membranständiger Rezeptoren, sogenannter Todesrezeptoren. Diese gehören zur Familie der TNF-Rezeptor-Superfamilie, welche nicht nur an der Übermittlung des Apoptosesignals beteiligt sind, sondern auch über wichtige Funktionen für die Differenzierung und Regulation der Immunantwort verfügen.¹¹⁰⁻¹¹² Die Struktur dieser Rezeptoren ist gekennzeichnet durch verschiedene extrazelluläre Domänen, die der Ligandenbindung dienen, einer Transmembran-Domäne sowie einer ungefähr 80 Aminosäuren langen zytoplasmatischen Domäne, welche als Todes-Domäne (*Death Domain*, DD) bezeichnet wird. Diese Domäne ist essentiell für die Weiterleitung des Apoptosesignals in die Zelle.^{101, 111}

Bei den am besten charakterisierten Todesrezeptoren handelt es sich um den CD95/Fas/Apo-1 Rezeptor, den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) und die beiden *TNF related apoptosis inducing ligand* (TRAIL)-Rezeptoren.¹¹³⁻¹¹⁸ Im Falle von CD95 sowie der TRAIL-Rezeptoren, führt die Bindung der entsprechenden Liganden zu einer Homotrimerisierung der Rezeptoren. Der dabei entstehende, Rezeptorkomplex wird auch als Todessignalkomplex (*Death inducing signaling complex*, DISC) bezeichnet. Infolge der Bildung des DISC, kommt es aufgrund einer homophilen Interaktion der Todesdomänen des Rezeptors mit denen des Adapterproteins FADD (*Fas associating protein with death domain*) zu dessen Rekrutierung zum Rezeptorkomplex. Neben der Todes-Domäne verfügt FADD über eine Todeseffektor-Domäne (*Death Effector Domain*, DED) mit deren Hilfe FADD die Procaspase-8 zum Rezeptor rekrutieren kann. Auch hier erfolgt die Interaktion zwischen FADD und der Procaspase-8 über eine homophile Bindung der Todeseffektor-Domänen beider Proteine. Die Bindung der Procaspase-8 an den Rezeptorkomplex zieht deren autoproteolytische Spaltung und Aktivierung nach sich. Die aktivierte Caspase-8 dissoziiert anschließend vom Rezeptor und beginnt ihre Substrate, vor allem Effektor-Caspasen, zu spalten.

Im Rahmen der CD95/Fas induzierten Apoptose werden zwei verschiedene Zelltypen unterschieden.¹¹⁹ Beim Zelltyp I kommt es durch die Rezeptoraktivierung und der nachfolgenden Formierung des DISC, zu einer ausreichenden Menge prozessierter

Caspase-8 und somit zu einer effektiven Spaltung der Effektor-Caspasen. Der Zelltyp II ist durch eine nur geringe Ausbildung des DISCs charakterisiert. Dies führt nur zu einer inadäquaten Aktivierung der Caspase-8, wodurch eine direkte Induktion der Apoptose, durch die Spaltung der Effektor-Caspasen, nicht möglich ist. Nichts desto trotz, führt die Aktivierung von CD95 zur Apoptose. Ursache hierfür ist die Spaltung des Caspase-8 Substrats Bid (*Bcl-2 interacting domain death agonist*), einem Mitglied der *BH3-only*-Untergruppe der Bcl2-Proteinfamilie (s. unten). Die daraus resultierende truncierte Form von Bid (tBid), ist in der Lage, an die Mitochondrien zu translozieren und somit den intrinsischen Apoptoseweg zu aktivieren, um auf diesem Weg die Apoptose zu induzieren.¹²⁰

Die Aktivierung des TNFR1 durch seinen entsprechenden Liganden, ist im Gegensatz zur CD95 vermittelten Aktivierung noch weitaus komplexer. So werden zwei verschiedene Komplexe nach seiner Aktivierung gebildet.¹²¹ Der erste Komplex besteht aus dem Adapterprotein TRADD (*TNFR1 associated death domain protein*), TRAF2 (*TNF receptor associated factor 2*) und der Kinase RIPK1 (*Receptor interacting serine/threonine-protein kinase 1*) und führt durch die Rekrutierung und Prozessierung der IKK zur Aktivierung von NF- κ B und nachfolgend zu einem anti-apoptotischen Signal, z.B. der Expression von cFLIP, einem Caspase-8-Inhibitor. Daneben kann jedoch auch ein zweiter Komplex gebildet werden, der aus den Proteinen TRADD und FADD besteht und zur Aktivierung der Caspase-8 in der Lage ist. Eine starke Aktivierung von NF- κ B führt dementsprechend zum Überleben der Zelle, wohingegen eine schwache Aktivierung zum Tod der Zelle führt.^{122, 123}

1.3.2 Der intrinsische Apoptose-Signalweg

Die Aktivierung des intrinsischen oder auch mitochondrialen Apoptose-Signalweges erfolgt Rezeptor-unabhängig durch intrazelluläre Signale. Dazu zählen vor allem DNA-Schäden und oxidativer Stress, ausgelöst durch UV- oder Gamma-Strahlung und freie Sauerstoffradikale. Zentraler Prozess während der Initiierung der Apoptose stellt die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma dar.^{124,}

¹²⁵ In gesunden Zellen verhindert die äußere Mitochondrienmembran den Austritt von Cytochrom c, welches für die Elektronenübertragung vom III. auf den IV. Komplex der Atmungskette verantwortlich ist. Im Rahmen der intrinsischen Apoptose Initiierung kommt es jedoch, unter Beteiligung pro-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2

Proteinfamilie, zu einem Verlust der mitochondrialen Membranintegrität und somit zu einem Austritt von Cytochrom c ins Zytoplasma, wo es an das Adapterprotein Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*) bindet, wodurch es unter der Hydrolyse von dATP zu einer Konformationsänderung von Apaf-1, gefolgt von dessen Heptamerisierung kommt. Die während der Formierung freigelegte CARD von Apaf-1, ermöglicht nun eine homophile Interaktion mit der CARD der Initiator-Caspase-9. Der auf diese Weise entstandene, hochmolekulare Komplex bestehend aus Cytochrom c, Apaf-1, dADP und Caspase-9 wird als Apoptosom bezeichnet.¹²⁶⁻

128

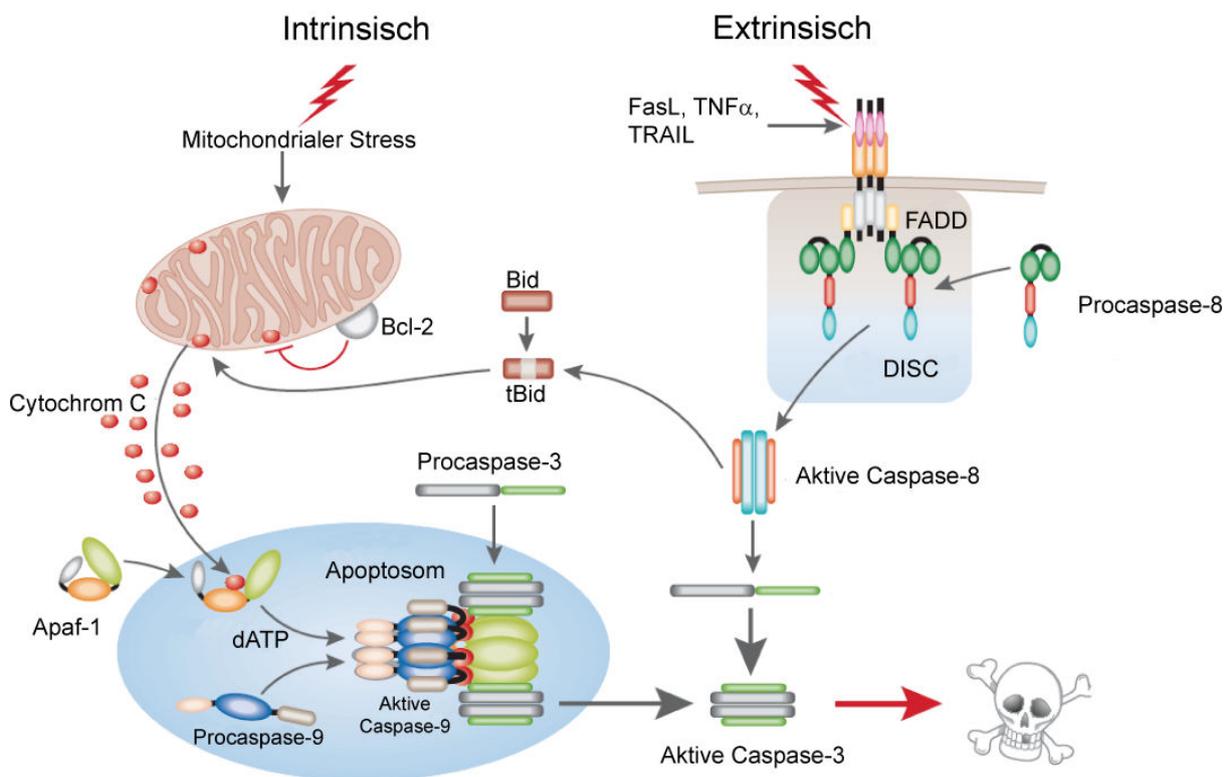


Abbildung 6. Intrinsischer und extrinsischer Apoptose-Signalweg (modifiziert nach ¹²⁹). Der intrinsische Apoptose-Signalweg wird durch intrazelluläre Signale induziert. Dabei kommt es zu einer Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom c, welches im Zytoplasma mit Apaf-1 assoziiert und das Apoptosom bildet. Die Apoptosom vermittelte Prozessierung der Initiator-Caspase-9 resultiert in der Induktion der Caspasen-Kaskade und der Ausführung der Apoptose. Die Bindung von Todesrezeptor-Liganden führt zur Induktion des extrinsischen Apoptose-Signalweges. Durch die nachfolgende Formierung des Todessignalkomplexes (DISC) kommt es zur Aktivierung der Initiator-Caspase-8 und der Induktion der Caspase-Kaskade, die letztendlich zum Zelltod führt. Alternativ kann der Extrinsische Apoptose-Signalweg durch die Spaltung des Caspase-8 Substrats Bid, ebenfalls zur Induktion des intrinsischen Apoptose-Signalweges führen.

Analog zum DISC-Komplex, der zur Spaltung der Initiator-Caspase-8 führt, resultiert die Formierung des Apoptosoms in der autoproteolytischen Spaltung und Aktivierung der Pro-Caspase-9, wodurch die Effektor-Caspasen-3 und -7 aktiviert werden und die Apoptose eingeleitet wird.

1.3.3 Die Bcl-2-Proteinfamilie

Die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien unterliegt einer strikten Kontrolle, um eine ungewollte Induktion der intrinsischen Apoptose zu verhindern. Von zentraler Bedeutung hierfür sind die Proteine der Bcl-2-Familie.¹³⁰ Die pro- oder anti-apoptotisch wirksamen Bcl-2-Proteine sind strukturell durch das Vorhandensein mindestens einer Bcl-2-Homologie-Domäne (BH) charakterisiert. Unterteilt werden die Proteine in zwei Hauptgruppen, den anti- und den pro-apoptotisch wirksamen Bcl-2-Proteinen. Die anti-apoptotischen Proteine verfügen über vier BH-Domänen (BH1-4), zu diesen zählen Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, A1 und Mcl-1. Die Gruppe der pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine werden zudem noch in zwei weitere Subgruppen unterteilt, den Effektoren und die `BH3-only`-Proteine. Bei den Effektoren handelt es sich um die Proteine Bak (*Bcl-2 antagonist killer*) und Bax (*Bcl-2 associated X protein*), welche neben den BH-Domänen 1-3, zusätzlich noch über eine Transmembran-Domäne verfügen. Die letzte Gruppe der Bcl-2-Proteine, bestehend aus den Proteinen Bid, Bim, Bad, Bik, Bmf, Noxa und Puma, verfügen einzig über die BH3-Domäne, aufgrund dessen sie auch als `BH3-only`-Proteine bezeichnet werden.^{131, 132} Speziell den Proteinen Bak und Bax kommt eine entscheidende Bedeutung in der mitochondrialen Apoptose Induktion zu, da Untersuchungen mit Bak/Bax doppeldefizienten Zellen zeigten, dass diese gegenüber einer Vielzahl von apoptotischen Stimuli resistent sind.^{133, 134} Während Bak mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert ist, liegt Bax vorwiegend im Zytoplasma vor. Durch ein aktivierendes Signal kommt es zu einer Rekrutierung von Bax zum membranständigen Bak, wo es aufgrund seiner C-terminalen Transmembran-Domäne zu einer Insertion von Bax in die äußeren Mitochondrienmembran kommt. Eine nachfolgende Konformationsänderung der beiden Proteine führt zu deren Oligomerisierung und der Bildung einer Membranpore, welche es dem Cytochrom c erlaubt aus dem periplasmatischen Raum der Mitochondrien ins Zytoplasma zu gelangen.^{132, 135, 136}

Die Aktivität der Effektor-Proteine Bak und Bax unterliegt einer strengen Regulation durch die anderen Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie. Infolge der Bindung von anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine an Bak und Bax wird die Formierung der mitochondrialen Membranpore verhindert.

Für die pro-apoptotische Wirkung der `BH3-only`-Proteine werden zwei verschiedene Mechanismen diskutiert. So führt die Bindung der `BH3-only`-Proteine an die anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine zu deren Inhibition und somit letztlich indirekt zur Induktion der Bak/Bax vermittelten Formierung der mitochondrialen Membranpore.

Daneben vermutet man jedoch auch, dass es durch die Bindung der `BH3-only`-Proteine an Bak und Bax, zu deren direkten Aktivierung kommen kann. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.¹³⁷⁻¹³⁹

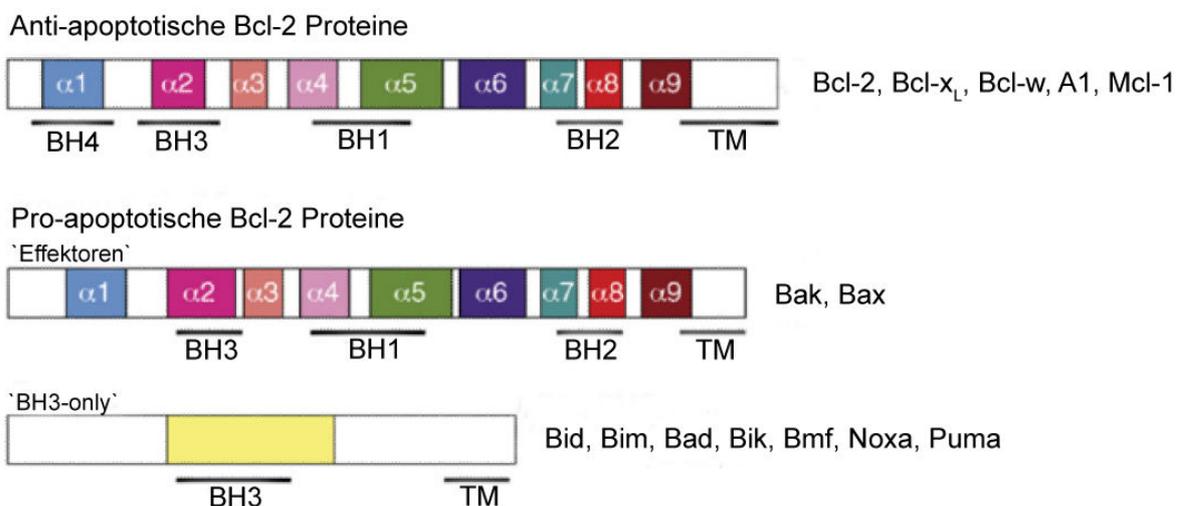


Abbildung 7. Die Bcl-2-Proteinfamilie (nach ¹⁴⁰). Die Bcl-2-Proteinfamilie wird strukturell und funktionell in drei Gruppen eingeteilt. Zu den anti-apoptotischen Proteinen, welche durch die BH-Domänen 1-4 gekennzeichnet sind, gehören Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, A1 und Mcl-1. Bak und Bax zählen zu den pro-apoptotischen Bcl-2-Proteinen und werden zudem als Effektoren bezeichnet. Sie verfügen über drei BH-Domänen (BH1-3). Die letzte pro-apoptotische Gruppe wird aufgrund der einzelnen BH3-Domäne als `BH3-only`-Proteine bezeichnet. Zu dieser zählen Bid, Bim, Bad, Bik, Bmf, Noxa und Puma. Des Weiteren sind die α-Helices der Proteine dargestellt und die Regionen mit den BH-Domänen durch einen Strich gekennzeichnet.

1.4 Zielsetzung

Das humane $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ wurde ursprünglich in unserer Arbeitsgruppe in einem differentiellen Screening von Apoptose-sensitiven und -resistenten Zellen identifiziert. Wie die initiale Charakterisierung ergab, zählt $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ zu den atypischen $\text{I}\kappa\text{B}$ -Proteinen, die, im Gegensatz zu den klassischen $\text{I}\kappa\text{B}$ -Proteinen, durch eine induzierbare Expression und Kernlokalisierung gekennzeichnet sind. Weitere Untersuchungen ergaben, dass $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ nicht nur die transkriptionelle Aktivität von NF- κB inhibieren kann, sondern, aufgrund seiner Transaktivierungsdomäne, auch dazu in der Lage ist, aktivierend auf die Genexpression zu wirken. So ist $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ sowohl in murinen als auch humanen Monozyten an der TLR-Liganden induzierten IL-6-Expression entscheidend beteiligt. Aber auch in anderen Zellsystemen konnte eine Beteiligung von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ an der Regulation der IL-6-Expression nachgewiesen werden.^{40, 141, 142} IL-6 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches ein Hauptaktivator des STAT3-Signaltransduktionsweges ist. Besonders in der Leber ist dieser für inflammatorische und regenerative Vorgänge sowie für die Hepatoprotektion von entscheidender Bedeutung und nimmt angesichts dessen eine zentrale Stellung in der Regulation hepatozellulärer Prozesse ein.

Aufgrund der Bedeutung von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ für die IL-6-Expression sowie einer sehr starken Ausprägung von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ in der Leber wurde vermutet, dass $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ durch eine Einflussnahme auf den IL-6 abhängigen STAT3-Signaltransduktionsweg hepatozelluläre Prozesse moduliert.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, einen möglichen Einfluss von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ auf die STAT3-Aktivität eingehend zu analysieren. Da in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass eine RNAi vermittelte Suppression von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ in HeLa D98 Zellen zu einer partiellen Apoptoseresistenz führte, während eine $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Überexpression Zelltod in HT1080 Zellen induzierte⁴⁰, sollte darüber hinaus in dieser Arbeit die Bedeutung von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ für die hepatozelluläre Apoptose untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), und Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA) bezogen.

2.1.2 Bakterienstämme

Die *Escherichia coli* (*E.coli*)-Stämme wurden in LB-Medium (1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl) bei 37°C über Nacht (ÜN) angezogen. Zur Selektion von plasmidhaltigen Zellen wurde dem Nährmedium nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Kanamycin hinzugefügt. Feste Nährmedien enthielten zusätzlich noch 2 % Agar.

Tabelle 1. Verwendete *E.coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
DH10ß	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ- rpsL nupG /pMON14272 / pMON7124	Life Technology (Darmstadt)
Top10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Life Technology

2.1.3 Eukaryontische Zelllinien

Für die eukaryontischen Zellen wurde DMEM/F12 Glutamax Medium von Life Technology verwendet. Das Medium wurde mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (PAA, Pasching, Österreich) und 100 Units/ml Penicillin (PAA) und 100 µg/ml Streptomycin (PAA) supplementiert. Im Falle der Tet-On Zelllinien wurde tetrazyklinfreies Fetales Kälberserum (PAA) verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in einem Inkubator.

Tabelle 2. Verwendete eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Eigenschaft	Bezugsquelle
HepG2	Humanes Hepatozelluläres Karzinom		ATCC
HepG2 Tet-On	Humanes Hepatozelluläres Karzinom	Enthalten das Tet-On Transaktivator Plasmid	Clontech (Paolo Alto, USA)
HepG2 Tet-On GFP	Humanes Hepatozelluläres Karzinom	Enthalten das Tet-On Transaktivator Plasmid sowie pTRE2Hyg-GFP	Selbst generiert
HepG2 Tet-On GFP-IκB-ζ	Humanes Hepatozelluläres Karzinom	Enthalten das Tet-On Transaktivator Plasmid sowie pTRE2Hyg-GFP-IκB-ζ	Selbst generiert

2.1.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Life Technology bezogen.

Tabelle 3. Verwendete Oligonukleotide, Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind rot hervorgehoben.

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendungszweck
5`Mcl-1- EcoRI	AAG AATTC AATGTTTGGCCTCAAAG AAACG	Amplifikation von Mcl-1
3`Mcl-1- BamHI	AAG GATCC AACTATCTTATTAGATAT GCCAAACC	Amplifikation von Mcl-1
5`STAT3- XhoI-atg	AA CTCGAG AAATGGCCCAATGGAAT CAGCTACAG	Amplifikation von STAT3
5`STAT3- HindIII-atg	AA AAGCTT AATGGCCCAATGGAATCA GCTACAG	Amplifikation von STAT3
3`-STAT3- Sall-stop	AAAG TCGACTT CTATCACATGGGGGA GGTAGCGCACTC	Amplifikation von STAT3

STAT3-fp550	GACATGCAAGATCTGAATGG	Sequenzierung von STAT3
STAT3-fp1400	CAACATGCTGACCAACAATC	Sequenzierung von STAT3
CMV-fp	GACATGCAAGATCTGAATGG	Sequenzierung der Expressionsvektoren
EBV-rp	GTGGTTTGTCCAAACTCATC	Sequenzierung der Expressionsvektoren

2.1.5 Plasmide

Tabelle 4. Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Name	Verwendungszweck	Bezugsquelle
GST-p38 α	Expression von GST markiertem p38	Prof. Wesselborg
pCMV-BD	Expression der GAL4 DNS-Bindedomäne	Stratagene (Heidelberg, Deutschland)
pCMV-BD-STAT3	Expression des GAL4-DNS-BD-STAT3 Fusionsprotein	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
peGFP-C1	Expression des grün fluoreszierende Protein (GFP)	Clontech
peGFP-I κ B- ζ	Expression von I κ B- ζ mit N-terminaler GFP-Markierung	Dr. Totzke
pGEX	Expression von GST	GE Healthcare (Little Chalfon, UK)
pGL3	Expression der modifizierten Firefly Luciferase	Promega (Madison, WI, USA)
pGL3-SOCS3	Expression des SOCS3-Promotor Luciferase Fusionsproteins	Dr. Albrecht
pmCherry-C1	Expression des rot fluoreszierenden mCherry Proteins	Clontech

pmCherry-Mcl-1	Expression von Mcl-1 mit N-terminaler mCherry-Markierung	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
pmCherry-STAT3	Expression von STAT3 mit N-terminaler mCherry-Markierung	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
pTRE2Hyg	Expression eines Gens von Interesse, welches unter der Kontrolle eines Doxyzyklin induzierbaren Promotors steht	Clontech
pTRE2Hyg-GFP	Doxyzyklin induzierbare Expression von GFP	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
pTRE2Hyg-GFP-I κ B- ζ	Doxyzyklin induzierbare Expression von GFP-I κ B- ζ	Im Rahmen dieser Arbeit generiert

2.1.6 Antikörper

Tabelle 5. Verwendete Antikörper

Antigen	Spezies	Verwendung	Bezugsquelle
Aktin	Maus	WB	Sigma-Aldrich
anti-Ziege	Esel	WB	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
anti-Maus	Ziege	WB	Bio-Rad
anti-Kaninchen	Ziege	WB	Bio-Rad
Bcl-2	Maus	WB	Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)
Bcl-X _L	Maus	WB	Trevigen (Gaithersburg, MD, USA)
Bim	Kaninchen	WB	Cell Signaling Technology (Danver, MA, USA)
Caspase3	Ziege	WB	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
DsRed	Maus	WB	Clontech
GAK	Kaninchen	WB	Abcam(Cambridge,UK)
GFP	Maus	WB, IP	Santa Cruz
GSK3 β	Maus	WB	BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ, USA)
GST	Ziege	WB	GE Healthcare

I κ B α	Kaninchen	WB	Santa Cruz
I κ B- ζ	Maus	WB	Hergestellt in unserem Labor
I κ B- ζ	Kaninchen	IP	Charles River Laboratories
Mcl-1	Kaninchen	WB	Santa Cruz
p38	Kaninchen	WB	Cell Signaling Technology
PARP	Maus	WB	BD Bioscience
RIPK2	Maus	WB	Cell Signaling Technology
STAT3	Kaninchen	WB, IP	Cell Signaling Technology
P-STAT3, Tyr705	Kaninchen	WB	Cell Signaling Technology

2.1.7 Enzyme und rekombinante Proteine

Tabelle 6. Verwendete Enzyme und rekombinante Proteine

Name	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	Life Technology
Phusion-Polymerase	Life Technology
Restriktionsendonukleasen	Fermentas (St.Leon-Rot)
T4-DNA Ligase	Promega
Trypsin EDTA Lösung	PAA
λ -Phosphatase	Merck
Interleukin (IL)-1 β	Biomol (Hamburg)
IL-6	Biomol (Hamburg)
Luciferin	Biaffin (Kassel)

2.1.8 Puffer

Tabelle 7. Häufig verwendete Puffer

Name	Zusammensetzung	
NP40-Lysepuffer	1%	Nonidet P-40 (NP40)

	150 mM	NaCL
	50 mM	Tris, pH 7,4
	1 mM	Dithiotreithol (DTT)
	1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
	10 µg/ml	Aprotinin
	10 µg/ml	Leupeptin
	10 µg/ml	Pepstatin
PBS	138 mM	NaCL
	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄ , pH7,4
	2,7 mM	KCL
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
Probenpuffer	62,5 mM	Tris, pH 7,4
	10% (V/V)	Glycerol
	3% (V/V)	β-Mercaptoethanol
	2% (W/V)	SDS
	0.25 mg/ml	Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer	25 mM	Tris, pH 8,3
	192 mM	Glycin
	0,1 (V/V)	Natriumdodecylsulfat (SDS)
TAE, 50x	2 M	Tris
	1 M	Essigsäure
	0,05 mM	EDTA, pH 8,5
TBS	100 mM	Tris, pH 7,5
	0,9% (W/V)	NaCL
TLB-Lysepuffer	1% (V/V)	Triton-x-100
	137 mM	NaCl

	50 mM	β -Glycerophosphat
	20 mM	Natriumpyrophosphat
	2 mM	EDTA, pH 8,5
	1 mM	Natriumvanadat
	10% (V/V)	Glycerol
	1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
	10 μ g/ml	Aprotinin
	10 μ g/ml	Leupeptin
	10 μ g/ml	Pepstatin
Transferpuffer	25 mM	Tris, pH 8,3
	192 mM	Glycin
Waschpuffer PBS/T	1x	PBS
	0,1%	Tween-20
Waschpuffer TBS/T	1x	TBS
	0,1%	Tween-20

2.1.9 Reagenzien

Tabelle 8. Häufig verwendete Reagenzien

Name	Bezugsquelle
Actinomycin D	Sigma-Aldrich
Akrylamid-Bisakrylamid	Bio-Rad
D4476	Merck
AC-DEVD-AMC	AAT Bioquest (Sunnyvale, CA, USA)
Dharmafect Duo	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Dharmafect4	Thermo Scientific
Doxyzyklin	Clontech
ECL	GE Healthcare

Hygromycin B	Life Technology
JetPei	Polyplus (Illkirch, Frankreich)
AC-LEHD-AMC	Enzo Life Science (Lörrach)
MG-132	Merck
Propidiumjodid (PI)	Sigma-Aldrich
Protein-G-Sepharose	Sigma-Aldrich
Q-VD-OPH	Merck
S3I-201	Merck
SB203580	Merck
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Tetramethylrhodamin (TMRE)	Merck
Turbofect in-vitro	Thermo Scientific
Turbofect siRNA	Thermo Scientific

2.1.10 Reaktionskits

Die Durchführung der Kits erfolgte, wenn nicht anders angegeben, laut Herstellerangaben.

Tabelle 9. Häufig verwendete Reaktionskits

Name	Verwendungszweck	Bezugsquelle
BCA Protein Assay Kit	Bestimmung der Protein- konzentration	Thermo Scientific
Galacto-Light™ β -Galactosidase Kit	Messung der β - Galaktosidase-Aktivität	Life Technology
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Umschreiben von mRNA in cDNA	Life Technology
Nuclear extraction Kit	Isolation von Zellkerne	Active Motif (Carlsbad, CA, USA)
Qiafilter Plasmid Maxi Kit	Aufreinigung von Plasmid DNA, großer Maßstab	Qiagen (Hilden, Germany)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Aufreinigung von Plasmid DNA, kleiner Maßstab	Qiagen

QIAquick Gel Extraction Kit	Aufreinigung von PCR Produkten	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Aufreinigung von PCR Produkten	Qiagen
QIAshredder	Homogenisierung von Zelllysaten	Qiagen
RNeasy Mini Kit	RNA Isolation	Qiagen
SOCS3-ELISA Kit	Proteinbestimmung von SOCS3	Uscn Life Science Inc. (Wuhan, China)
TransAM STAT3	Messung der DNA-Bindungsaktivität von STAT3	Active Motif

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation von *E.coli*-Stämmen

Die Transformation von chemokompetenten *E.coli*-Zellen erfolgte mittels Hitzeschock. Hierfür wurde ein Aliquot der Zellen auf Eis aufgetaut und 1 µg Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes hinzugefügt. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurde die Bakteriensuspension für 30 Sekunden (sec) in ein 42°C warmes Wasserbad gegeben. Anschließend nochmals 5 Minuten (min) auf Eis inkubiert, gefolgt von der Zugabe von 1 mL antibiotikafreiem LB-Medium und einer Inkubation bei 37°C und 300 rpm für 1 Stunde (h). Zur Selektion wurden 25 µl, 50 µl und 100 µl der Bakteriensuspension auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Herstellung einer Glycerinkultur

Für die Herstellung einer Glycerinstammkultur wurden 750 µl einer exponentiell wachsenden Bakteriensuspension mit 250 µl sterilem Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

2.2.3 Plasmidpräparation

Für die Isolation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurden 2 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie eines *E.coli*-Stammes inokuliert. Zur Selektion wurde das Medium mit 100 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Kanamycin supplementiert. Die Kultur wurde ÜN bei 37°C und 180 Umdrehungen pro Minute (rpm) inkubiert. Am folgendem Tag wurde 1 ml der ÜN-Kultur in ein Eppendorf Reaktionsgefäß (ERG) überführt und bei 4°C und 13.000 rpm für eine 1 min zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit aufgereinigt. Die aufgereinigte DNA wurde in 25 µl aqua bidest gelöst und bei -20°C gelagert.

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA im großen Maßstab wurden 200 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit 500 µl aus der oben beschriebene ÜN-Kultur oder mit Material aus einer Glycerinstammkultur angeimpft und ÜN bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Für die Plasmidpräparation wurde das Qiafilter Plasmid Maxi Kit verwendet. Abhängig von der Menge der isolierten DNA wurde sie in 100-250 µl aqua bidest gelöst und bei -20°C gelagert.

Mit Hilfe von Restriktionsverdau und der analytischen Auftrennung in einem Agarosegel wurde die Korrektheit der aufgereinigten Plasmid-DNA kontrolliert.

2.2.4 Polymerasen-Kettenreaktion

Die Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) diente der Amplifikation von vollständigen cDNAs der Gene MCL1 und STAT3. Als Template diente Material aus einer cDNA Synthesereaktion von unbehandelten HepG2 Zellen. Für die PCR wurde die thermostabile Phusion-Polymerase genutzt.

Folgender PCR-Ansatz wurde verwendet:

Volumen		Finale Konzentration
10 µl	5x HF-Puffer	1x
1 µl	10 mM dNTP's	200 µM
2,5 µl	10 µM je Oligonukleotid	0,5 µM
5 µl	cDNA	
0,5 µl	Phusion-Polymerase	1 Unit
28,5 µl	H ₂ O	
<hr/>		
Σ	50 µl	

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

	Temperatur	Zeit	
	98°C	3 min	
30x	98°C	1 min	
	63-68°C	30 sec	T _m abhängig von den Oligonukleotiden
	72°C	2 min	abhängig von der Produktlänge
	72°C	10 min	

2.2.5 Quantitative Real Time PCR

Die quantitative Real Time PCR (qRT-PCR), ermöglicht die Analyse des mRNA-Levels einzelner Gene. Hierfür wurde zuerst die isolierte und aufgereinigte Gesamt-RNA einer Probe mit Hilfe des 'High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit' in cDNA umgeschrieben. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Für die anschließende qRT-PCR wurden sogenannte TaqMan Gene Expression Assays der Firma Applied Biosystems verwendet. Es wurde der mRNA-Level folgender Gene analysiert: SOCS3, BCL2L11, MCL1 und GAPDH. Die Resultate der GAPDH Analysen wurden für die Normalisierung der Ergebnisse verwendet. Durchgeführt wurde die qRT-PCR mit der Hilfe eines 7300 real time PCR Systems und die Sequence Detection Software Version 1.4 (Applied Biosystems) wurde zur Auswertung der gewonnen Daten verwendet.

2.2.6 Restriktion und Dephosphorylierung von DNA

Für das Schneiden von Plasmid-DNA wurden die FastDigest® Restriktionsendonukleasen sowie die dazugehörigen Puffer der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Germany) verwendet. Die Restriktion erfolgte für 1 h bei 37°C. Um eine mögliche Religation der geschnittenen DNA zu verhindern, wurde 30 min vor Inkubationsende den Restriktionsansätzen 1 µl alkalische Phosphatase (1 Unit) hinzugefügt. Dies führt zum Verlust von Phosphatgruppen an den freien 5'- und 3'-Enden und unterdrückt so effizient eine Religation der verdauten Plasmide.

2.2.7 Ligation

Die T₄-DNA-Ligase wurde genutzt um linearisierte Plasmide mit DNA-Fragmenten zu ligieren. Dieses Enzym verknüpft unter ATP-Verbrauch doppelsträngige DNA-Moleküle durch Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 3'-OH und 5'-Phosphat Gruppen. Es wurde mit einem Volumen von 20 µl im Ligationsansatz gearbeitet. Plasmid-DNA und Insert wurden in einem molekularen Verhältnis von 1 zu 3 eingesetzt. Zusätzlich wurde dem Ligationsansatz 2 µl 10x-T₄-Reaktionspuffer und 1 µl T₄-DNA-Ligase hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 16°C ÜN.

2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Molekülen aufgrund ihrer Länge. Die DNA-Moleküle wurden in 1%igen Agarosegelen aufgetrennt. Für die Detektion der DNA wurde zu den Gelen 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt und als Gel- und Laufpuffer diente 1x TAE. Die DNA-Moleküle wurden vor dem Auftragen 1:10 mit `GelPilot DNA-Ladepuffer` (Qiagen) versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei analytischen Gelen bei 200 Volt und bei präparativen Gelen bei 120 Volt für 60-90 min. Als Größenstandard diente die `SmartLadder` (Eurogentec, Seraing, Belgien) oder die Gene Ruler 100bp Plus DNA Leiter von Fermentas.

2.2.9 Gelelution

Zur Isolierung elektrophoretisch aufgetrennter DNA wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet.

2.2.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch die Messung der Absorption bei 260 nm. Für die Messung wurde ein NanoDrop 1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific) genutzt. Zur Bestimmung der Reinheit wurde der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Es wurde nur DNA mit einem Quotient von ~1,8 und RNA mit einem Quotient von ~2,0 verwendet.

2.2.11 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung von DNA wurde der Service der Firma GATC Biotech AG (Konstanz, Schweiz) in Anspruch genommen. Hierfür wurde die DNA in die Ziel-Plasmide kloniert und an die GATC Biotech AG gesendet. Die ermittelten Sequenzdaten wurden anschließend mit Hilfe des Programms CLC DNA WorkBench von CLC Bio (Katrinebjerg, Dänemark) verifiziert.

2.2.12 RNA Isolation aus eukaryontischen Zellen

Der RNeasy Mini Kit von Qiagen wurde für die Isolation von gesamt RNA genutzt. Die gewonnene RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.1.13 Spezifische Unterdrückung der Expression von Genen

Für die spezifische Unterdrückung von Genen wurden siRNA Pools von Thermo Scientific sogenannte ON-TARGETplus SMARTpools verwendet. Diese Pools enthalten eine Mischung aus 4 spezifischen siRNAs für jeweils ein Gen. Die Zellen wurden standardmäßig mit 100 nM siRNA transfiziert und anschließend 48 bis 72h inkubiert, bevor sie anderweitig stimuliert wurden. Der Knock-down der betreffenden Gene wurde mittels Western-Blot Analysen kontrolliert. Die Transfektion erfolgte mit Dharmafect 4, beziehungsweise für den Fall, dass zusätzliche Plasmide kotransfiziert wurden, mit Dharmafect Duo. Die Durchführung erfolgte hierbei nach Angaben des Herstellers.

Es wurden ON-TARGETplus SMARTpools siRNAs für folgende Gene verwendet: STAT3 (STAT3), BCL2L11 (BIM), NF- κ BIZ (I κ B- ζ), MAPK11 (p38 β), MAPK14 (p38 α), RELA (p65), GSK3B (GSK3- β), RIPK2 (RIPK-2) und GAK (GAK).

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Gesamzell-Lysaten

Für die Herstellung von Gesamzell-Lysaten wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale abgeschabt und mit dem Nährmedium in ein 2 ml ERG überführt und für 5 min bei 4°C und 3000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte ein

Waschschrift mit 1 ml eiskaltem PBS um Reste des Nährmediums zu entfernen. Die Zellpellets wurden sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

Für die Zellyse wurden die Zellpellets in 75-100 μl NP40-Lysepuffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde danach bei 4°C und 13.000 rpm für 15 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues ERG überführt. Für die Analyse von phosphorylierten Proteinen wurde an Stelle des NP40-Lysepuffers der TLB-Lysepuffer mit Phosphatase-Inhibitoren verwendet.

2.3.2 Herstellung nukleärer Zellysate

Nukleäre Zellysate wurden mit Hilfe des Nuclear Extraction Kits von Active Motif hergestellt.

2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde der BCA Protein Assay Kit von Pierce verwendet. Die photometrische Auswertung erfolgte an einem Wallac Victor Multiplatten-Lesegeräte (PerkinElmer, Waltham, USA) bei einer Wellenlänge von 562 nm. Eine BSA-Standardreihe diente zur Bestimmung der Konzentration.

2.3.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese diente, unter denaturierenden Bedingungen, der Auftrennung von Proteinen an Hand ihrer Größe. Gleiche Proteinmengen der Zellysate wurden mit 5x Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 5 min denaturiert. Für die Auftrennung wurde abhängig von der Größe der zu trennenden Proteine 8%-, 12%- oder 15%ige SDS-Polyacrylamidgele (8-15% (v/v) Bis-Acrylamid Mix; 0,375 M Tris, pH 8,8; 0,1% (v/v) Natriumdodecylsulfat SDS; 0,1% (v/v) Ammoniumpersulfat, 0,04% (v/v) TEMED verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 150 Volt für 1-1,5 h, wobei die `PageRuler Prestained Protein Ladder` als Größenstandard diente.

2.3.5 Western-Blot Analyse

Die Western-Blot Analyse diente dem spezifischen Nachweis von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen mittels Immundetektion. Hierfür wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe einer Tank-Blot Apparatur der Firma Bio-Rad auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Transfer erfolgte laut Herstellerangaben für 2 h bei 100 Volt.

Anschließend erfolgte die Immundetektion der transferierten Proteine. Alle Schritte erfolgten dabei unter leichtem Schütteln. Zuerst wurden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur (RT) in Blockierungslösung (5% (w/v) Magermilch, 0,5% (v/v) Tween-20 in PBS oder TBS) inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran dreimal je 15 min mit PBS-T oder TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern erfolgte in 5% (w/v) BSA gelöst in PBS-T oder TBS-T, ÜN bei 4°C. Danach wurde die Membran, nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS-T oder TBS-T für je 15 min, mit einem Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiertem Sekundärantikörper, für 1 h bei RT inkubiert. Es folgte ein letztmaliger Waschschrift mit PBS-T oder TBS-T (dreimal je 15 min) bevor mit Hilfe des Chemilumineszenz-Reagenz ECL die Detektion erfolgte.

2.3.6 Enzym linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Analyse der STAT3-Phosphorylierung wurde der *PathScan Phospho-Stat3 Sandwich ELISA Kit* (Cell Signaling Technology) und zur Bestimmung der SOCS3-Proteinmenge der *ELISA Kit for Suppressor Of Cytokine Signaling 3* der Firma Uscn Life Science Inc. (Wuhan, China) verwendet. Es wurden jeweils 10 µg von nukleären Extrakten bzw. 10 µg von Gesamtzell-Lysaten eingesetzt.

2.3.7 Ko-Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Ko-Immunpräzipitation sollte eine mögliche Interaktion zwischen IκB-ζ und STAT3 nachgewiesen werden. Hierfür wurden HepG2 Zellen transient mit GFP-IκB-ζ beziehungsweise GFP als Kontrolle transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte eine Stimulation mit 20 ng/ml IL-6 für 30 min. Danach wurden die Zellen geerntet und mit Hilfe des NP40-Lysepuffers (ohne DTT) Gesamtzell-Lysate hergestellt. Diese Lysate wurden zuerst für eine 1 h mit Protein-G-Sepharose

preinkubiert. Nach Zentrifugation bei 8.000 rpm und 4°C für 1 min wurde der Überstand in ein frisches ERG überführt und frische Protein-G-Sepharose sowie 2 µg des entsprechenden Antikörpers hinzugefügt. Die anschließende Inkubation erfolgte rotierend bei 4°C ÜN. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und die Protein-G-Sepharose fünfmal mit NP-40 Lysepuffer (ohne DTT) gewaschen, im Anschluss mit 1x Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C denaturiert. Die Analyse der Ko-Immünpräzipitate erfolgte mittels SDS-PAGE und Western-Blot.

2.3.8 Bestimmung der DNA-Bindungsaktivität von STAT3

3×10^5 HepG2 Zellen pro Vertiefung einer 6-Lochplatte wurden transient mit GFP oder GFP-I κ B- ζ transfiziert. 24h nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten mit 20 ng/mL rekombinantem IL-6 stimuliert und anschließend geerntet. Mit Hilfe des *Nuclear Extraction Kit* wurden nukleäre Zelllysate hergestellt und in den *TransAM STAT3* Kit eingesetzt, der zur Bestimmung der STAT3 DNA-Bindungsaktivität verwendet wurde. Hierbei handelt es sich um eine ELISA-basierte Methode. In den Vertiefungen einer 96-Loch Platte wurden Oligonukleotide, deren Sequenz der *Interferon- γ activated sequence* (GAS), einer Erkennungssequenz von humanem STAT3 entspricht, gebunden. Phosphorylierte und dimerisierte STAT3-Moleküle sind in der Lage an diesen Oligonukleotiden zu binden. Die gebundenen STAT3-Moleküle werden anschließend mittels eines primären anti-STAT3 Antikörpers, gefolgt von einem sekundären HRP konjugierten Antikörpers, detektiert. Die Zunahme der optischen Dichte bei 450 nm (OD_{450nm}) korreliert mit der Menge an gebundenem STAT3. Die OD_{450nm} wurde an dem Wallac Victor Multiplatten-Lesegeräte gemessen.

2.3.9 Bestimmung der Caspase-Aktivität

Bei diesem enzymatischen Substrattest zur Bestimmung der Aktivität von Caspasen wurden die fluorogenen Substrate Ac-DEVD-AMC, für Caspase-3, und AC-LEHD-AMC, für Caspase-9, verwendet. Durch die spezifische Spaltung der Substrate, durch die jeweilige Caspase, wird 7-Amino-4-Methylcumarin (AMC) freigesetzt. Die

Menge an AMC kann fluorometrisch gemessen werden, wobei die Zunahme der Emission mit einer verstärkten Caspase-Aktivität korreliert.

Hierfür wurden Zellen in 50 mM Tris, pH 7.4, 1 % Nonidet P-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF und jeweils 10 µg/ml Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin lysiert. 50 µl Gesamtzell-Lysat (0,8 µg/µl) wurden in eine schwarze 96-Lochplatte überführt und mit 150 µl Substratpuffer (50 mM HEPES, pH 7.3, 100 mM NaCl, 10 % Sucrose, 0.1 % CHAPS, 10 mM DTT und 50 µM Ac-DEVD-AMC oder Ac-LEHD-AMC) aufgefüllt. Bei einer Anregungswellenlänge von 346 nm wurde mittels des Infinite M200 Spektrofluorometers (Tecan, Männedorf, Schweiz) die Emission bei 442 nm und 37°C über einen Zeitraum von 3 h alle 10 min gemessen.

2.3.10 Reporteranalysen zur Untersuchung der SOCS3-Promotoraktivität

Für die Untersuchung des Einflusses von I κ B- ζ auf die SOCS3-Promotoraktivität wurde ein SOCS3-Reporterplasmid, welches freundlicherweise von Frau Dr. Albrecht zur Verfügung gestellt wurde, genutzt. Dieses Plasmid enthält die SOCS3 Promotorsequenz, welche sich oberhalb eines Luciferase-Gens befindet. Somit ist die gemessene Luciferase-Aktivität direkt proportional zur Aktivität des untersuchten Promotors.

HepG2 Zellen wurden transient mit dem SOCS3-Reporterplasmid, einem β -Galaktosidase kodierenden Plasmid und GFP oder GFP-I κ B- ζ für 24 h transfiziert. Wurden zusätzlich siRNAs kotransfiziert, erfolgte die Inkubation für 72 h. Nach Transfektion wurden die Zellen stimuliert, anschließend geerntet, in 25 mM Glycylglycin, pH 7.8, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 1 mM DTT und 1 % (v/v) Triton-X-100 für 10 min lysiert und bei 13.000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. 10 µl des Überstandes wurden mit 140 µl Reaktionspuffer (15 mM Kalium P_i, pH 7.8, 25 mM Glycylglycin, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 1 mM DTT, 2 mM ATP) gemischt und in eine Mikrotiterplatte überführt. Die Lichtemission konnte nach Zugabe von 100 µl Luciferin (Biaffin, Kassel) mit einem Luminometer von Berthold Technologies (Bad Wildbad) gemessen werden. Die β -Galaktosidase Aktivität wurde zur Normalisierung der Luciferase Werte verwendet und mit Hilfe des `Galakto-Light Plus` Kit (Applied Biosystems) gemessen.

2.3.11 Reporteranalysen zur Bestimmung der STAT3-Transaktivierungsaktivität

Um den Einfluss von I κ B- ζ auf die Transaktivierungsaktivität von STAT3 zu analysieren wurde das STAT3 Protein N-terminal mit einer Gal4-DNA Bindedomäne fusioniert. Hierfür wurde die cDNA von STAT3 per PCR amplifiziert und in das Plasmid pCMV-BD kloniert. Mit Hilfe dieser DNA-Bindedomäne ist es dem STAT3-Fusionsprotein möglich an einer Gal4-Bindungsstelle eines Reporterplasmids (Gal4-TK-Luc) zu binden und transaktivierend auf das Luciferase-Gen des Reporterplasmids zu wirken. Werden Zellen mit diesen beiden Plasmiden sowie mit einem lacZ-Plasmid, das für die β -Galaktosidase kodiert, und GFP oder GFP-I κ B- ζ kotransfiziert, so kann an Hand der Luciferase-Aktivität die Transaktivierungsaktivität von STAT3 und der Einfluss von I κ B- ζ auf diese beurteilt werden. Die Messung der Luciferase- und β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte wie in 2.3.10 beschrieben.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Transfektion eukaryontischer Zellen

Die Transfektion der eukaryontischen Zellen erfolgte standardmäßig 24h nach dem Aussäen. Für die Transfektion der HepG2 Zellen wurde JetPei und für die HepG2 Tet-On Zellen TurboFect in-vitro verwendet. In beiden Fällen erfolgte die Durchführung nach Angaben der Hersteller.

2.4.2 Generierung einer stabilen I κ B- ζ Zelllinie

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten stabilen Zelllinien basieren auf der `HepG2 Tet-On Advanced Cell Line` von Clontech. In diesem Zellsystem wird ein reverser Tet-Repressor (rtTA) exprimiert, der in Anwesenheit von Doxyzyklin an einer Tetrazyklin-Erkennungssequenz (TES) bindet. Aufgrund der Fusion, einer VP16 transaktivierenden Domäne mit der DNA-Bindungsdomäne des Tet-Repressors, fungiert der rtTA als Transaktivator. Die TES ist dabei oberhalb eines Gens von Interesse gelegen und führt somit zu einer Doxyzyklin induzierbaren Expression des gewünschten Gens.

Die cDNA von GFP oder GFP-I κ B- ζ wurden in das Plasmid pTRE_{Hyg}, unterhalb einer TES, kloniert und für die Transfektion der HepG2 Tet-On Zelllinie genutzt. Die anschließende Selektion erfolgte mit 25 μ g/ml Hygromycin. Bei den so gewonnenen Zelllinien handelt es sich um polyklonale Zelllinien.

2.4.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Lokalisation von I κ B- ζ und STAT3 wurde in-vivo mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie durchgeführt. Hierfür wurden HepG2 Zellen auf 15 mm Deckgläschen ausgesät und transient mit GFP-I κ B- ζ und mCherry, GFP und mCherry-STAT3 oder GFP-I κ B- ζ und mCherry-STAT3 transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 20 ng/ml IL-6 für 30 min stimuliert oder blieben unbehandelt. Das Nährmedium wurde anschließend abgesaugt und die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen, welche für 10 min bei RT erfolgte, wurde 4 %iges Formaldehyd in PBS benutzt. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen mit *Fluorescence Mounting Medium* (Dako, Glostrup, Dänemark) eingedeckt. Die mikroskopische Untersuchung der fixierten Zellen erfolgte an einem Leica TCS SP2 Laser-Scanning Mikroskop der Firma Leica (Wetzlar).

2.4.4 Messung der Propidiumjodid-Aufnahme

Bei Propidiumjodid (PI) handelt es sich um einen fluoreszierenden Farbstoff, der in der Lage ist in die DNA zu interkalieren. Dabei ist zu beachten, dass PI nicht Membran permeabel ist und nur von toten oder sterbenden Zellen aufgenommen wird. Die Messung der PI-Aufnahme stellt somit eine einfache Methode zur Beurteilung der Viabilität einer Zellpopulation dar. Eine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose ist jedoch nicht möglich.

Für die Messung wurden $1,75 \times 10^5$ HepG2 Tet-On GFP oder HepG2 Tet-On GFP-I κ B- ζ Zellen in einer 12-Loch Platte ausgesät und 24 h später mit verschiedenen Substanzen stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, einmalig mit 1xPBS gewaschen und in 2 μ g/ml PI in PBS für 5 min auf Eis inkubiert. Um eine möglichst korrekte Messung von einzelnen Zellen zu ermöglichen, wurde die Zellsuspension vor der Messung mehrfach durch eine tausender Pipettenspitze gezogen. Die

Messung erfolgte an einem FACScalibur (BD Bioscience, Heidelberg), wobei das FSC/FL3-Profil für die Auswertung der Daten genutzt wurde.

2.4.5 Nicoletti-Assay

Mit Hilfe des Nicoletti-Assays wurde die Verteilung der Zellzyklusphasen von Zellpopulationen untersucht¹⁴³. Wie bei der Messung der PI-Aufnahme wird auch hier der fluoreszierende DNA-Farbstoff PI (50µg/ml) verwendet. Zusätzlich beinhaltet der verwendete Nicoletti-Puffer 0,1 % (v/v) Triton X-100 und 0,1 % (v/v) Natrium-Citrat, wodurch es zur Lyse der Zellen kommt, die Kerne jedoch intakt bleiben. Die gemessene Fluoreszenz ist somit direkt proportional zur vorhandenen DNA-Menge.

Für die Messung wurden $1,75 \times 10^5$ HepG2 Tet-On GFP oder HepG2 Tet-On GFP- $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ Zellen in einer 12-Loch Platte ausgesät und 24 h später mit verschiedenen Substanzen stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, einmalig mit 1xPBS gewaschen, in 500 µl Nicoletti-Puffer resuspendiert und für 2 h bei 4°C inkubiert.

Die Messung am Durchflusszytometer erfolgte wie in 2.4.4 beschrieben, jedoch wurde das Zellzahl/FL2-Profil zur Auswertung der Daten verwendet.

2.4.6 TMRE-Assay

Bei Tetramethylrhodamin (TMRE) handelt es sich um einen kationischen, membranpermeablen Farbstoff, der in Mitochondrien mit intaktem Membranpotential akkumuliert. Im Falle der Apoptose Induktion über den intrinsischen Signalweg kommt es zur Depolarisation der mitochondrialen Membran, was einen Austritt von TMRE aus den Mitochondrien ins Zytoplasma nach sich zieht und an Hand einer Verschiebung in der Fluoreszenzintensität erkennbar ist.

Nach Stimulation wurden die Zellen für 15 min in 250 nM TMRE inkubiert. Die Durchflusszytometrische Messung und Auswertung erfolgte, unter der Verwendung des Zellzahl/FL2-Profiles, wie in 2.4.4 beschrieben.

2.5.Auswertung

Die Ergebnisse basieren auf drei voneinander unabhängigen Experimenten die mindestens in Duplikaten gemessen wurden. Falls nicht anders ausgewiesen, sind in den Diagrammen die Mittelwerte der unabhängigen Experimente mit den dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 I κ B- ζ reguliert die STAT3-Aktivität

Bei I κ B- ζ handelt es sich um ein nukleäres Protein, welches in Form von nukleären Körperchen in Erscheinung tritt. Totzke *et al.*⁴⁰ beschrieb, dass I κ B- ζ in diesen nukleären Körperchen zusammen mit anderen Proteinen assoziiert ist. So konnte eine Kolokalisation von I κ B- ζ mit dem nukleären Korepressor `silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor` (SMRT) und der Histon-Deazetylase 5 (HDAC5) nachgewiesen werden.⁴⁰

Auch im Fall von STAT3 konnte, nach dessen IL-6 vermittelten Aktivierung, eine Akkumulation in nukleären Körperchen sowie eine Kolokalisation mit anderen Proteinen beobachtet werden, wobei es sich hierbei um das CREB-Bindeprotein und Histon H4 handelt.¹⁴⁴

Aufgrund dieser Beobachtungen, dass sowohl I κ B- ζ als auch STAT3 in nukleären Körperchen akkumulieren und darüber hinaus mit Proteinen kolokalisieren, die an der Modulation der Transkription beteiligt sind, stellte sich die Frage, ob I κ B- ζ und STAT3 in identischen nukleären Körperchen kolokalisieren.

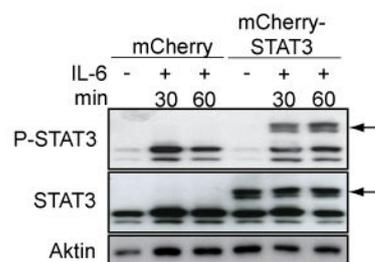
Zur Klärung dieser Frage wurden mit Hilfe von fluoreszierenden Fusionsproteinen Kolokalisationstudien durchgeführt. Hierfür wurde zu Beginn ein STAT3-Fusionsprotein, bei dem STAT3 N-terminal mit dem fluoreszierenden mCherry Protein fusioniert ist, hergestellt.

3.1.1 Das Fusionsprotein mCherry-STAT3 ist biologisch aktiv

Die biologische Aktivität des mCherry-STAT3 Fusionsproteins konnte an Hand von Western-Blot Analysen und einem Reporter gentest belegt werden. So zeigte die Western-Blot Analyse neben der endogenen STAT3-Expression eine signifikante Expression des STAT3-Fusionsproteins sowie dessen Phosphorylierung nach IL-6-Stimulation (Abb. 8A). Zuletzt wurde noch ein Reporter gentest durchgeführt. Bei diesem Versuch wurden HepG2 Zellen zusammen mit einem Luciferase-Reporter genkonstrukt oder dem entsprechenden Leervektor, einem β -Galaktosidase kodierenden Plasmid sowie dem pmCherry-STAT3-Konstrukt oder pmCherry-C1-Leervektor transfiziert. In diesem Luciferase-Reporterkonstrukt liegt die

Promotorsequenz von SOCS3, einem Zielgen von STAT3, oberhalb eines Luciferase-Gens. Die gemessene Luciferase-Aktivität ist somit abhängig von der STAT3-Aktivität. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigten bereits die unstimulierten mCherry-STAT3 exprimierenden Zellen eine erhöhte Luciferase-Aktivität (Abb. 8B). Durch die Stimulation mit IL-6 kam es auch in den Kontrollen zu einem signifikanten Anstieg der Luciferase-Aktivität, jedoch konnte in den mCherry-STAT3 exprimierenden eine vierfach höhere Luciferase-Aktivität gemessen werden.

A



B

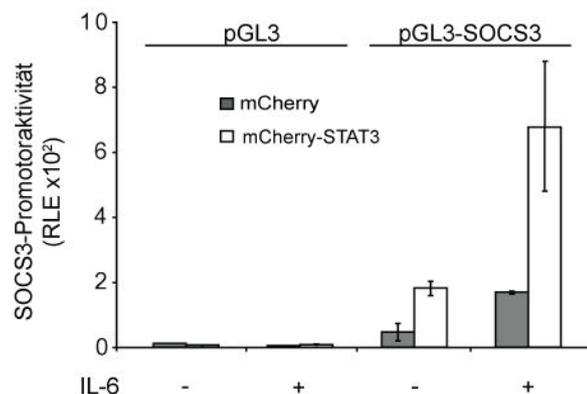


Abbildung 8. Das Fusionsprotein mCherry-STAT3 ist biologisch aktiv. Zur Überprüfung der biologischen Aktivität des STAT3-Fusionsproteins wurden HepG2 Zellen transient mit dem Expressionsplasmid pmCherry-STAT3 oder dem pmCherry-Leervektor transfiziert. **(A)** 24 h nach der Transfektion blieben die Zellen unbehandelt oder wurden wie angegeben mit 20 ng/ml IL-6 stimuliert, geerntet und lysiert. Gleiche Proteinmengen wurden zum Nachweis der P-STAT3-, STAT3- und Aktin-Expression in Western-Blot Analysen eingesetzt. Die Pfeile markieren die Expression des STAT3-Fusionsproteins. **(B)** HepG2 Zellen wurden zusätzlich mit dem Luciferase-Reporterkonstrukt pGL3-SOCS3 oder pGL3 sowie einem β -Galaktosidase kodierenden Plasmid kotransfiziert. Danach blieben die Zellen unbehandelt oder wurden für weitere 16 h mit 20 ng/ml IL-6 stimuliert. Die Aktivität der Luciferase wird in Relative Licht Einheiten (RLE) angegeben und die Normalisierung erfolgte mit Hilfe der β -Galaktosidase-Aktivität. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und es sind beispielhafte Ergebnisse dargestellt.

Zusammen belegen diese Ergebnisse eine biologische Aktivität des STAT3-Fusionsproteins, die der des endogenen STAT3-Proteins entspricht, und konnte somit für die Kolokalisationstudien verwendet werden.

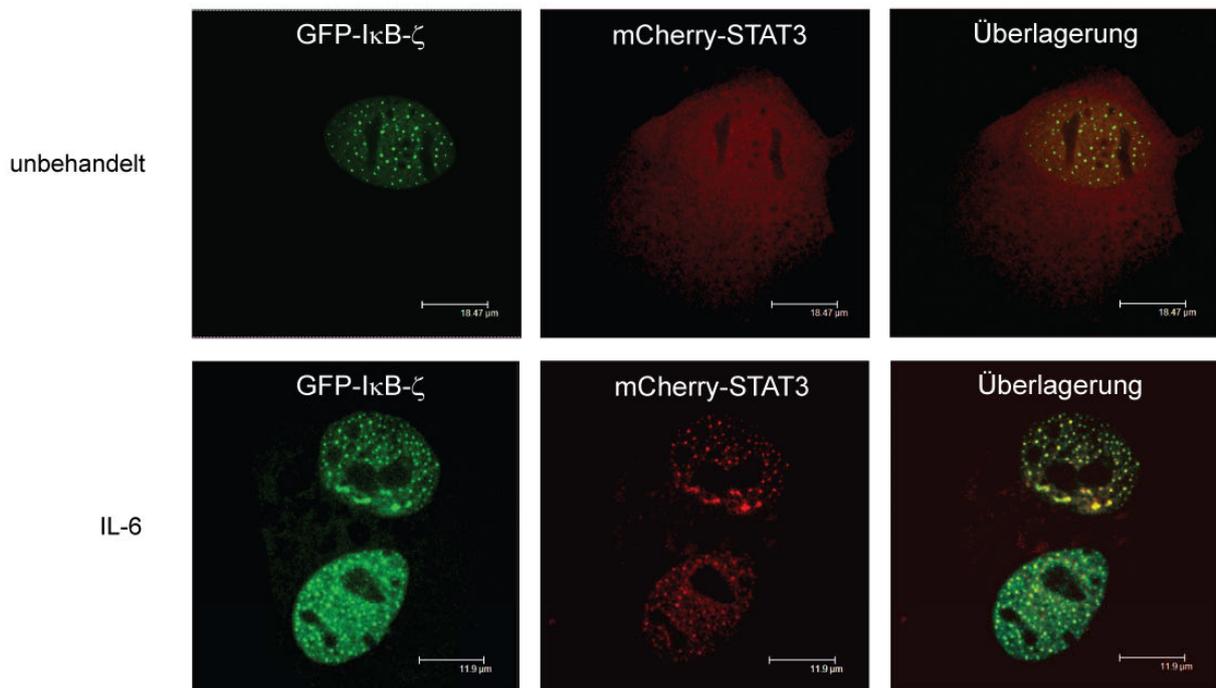
3.1.2 I κ B- ζ interagiert mit STAT3

Im nächsten Schritt sollte eine mögliche Kolokalisation von I κ B- ζ und STAT3 nachgewiesen werden. Für diese Kolokalisationstudien wurden HepG2 Zellen transient mit peGFP-I κ B- ζ und pmCherry-STAT3 sowie zur Kontrolle mit peGFP-I κ B- ζ und pmCherry-C1 oder pmCherry-STAT3 und peGFP-C1 transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit IL-6 stimuliert oder blieben unbehandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Hilfe eines Konfokalmikroskops untersucht. Wie erwartet zeigte sich ein deutliches Auftreten von I κ B- ζ in nukleären Körperchen, wobei die Stimulation mit IL-6 keinen Einfluss auf die Lokalisation von I κ B- ζ innerhalb der Zelle hatte (Abb. 9A). Auch auf die homogene Verteilung von GFP und mCherry hatte die IL-6-Stimulation keine Auswirkungen (Daten nicht gezeigt). Während das STAT3-Fusionsprotein in unbehandelten Zellen eine homogene Verteilung innerhalb der Zelle aufwies, führte die Stimulation mit IL-6 erwartungsgemäß zu einer Akkumulation von STAT3 innerhalb des Nukleus.

In den unbehandelten Zellen, die mit GFP-I κ B- ζ und mCherry-STAT3 kotransfiziert wurden, zeigte sich ebenso wie in den Kontrollen ein Auftreten von I κ B- ζ in den nukleären Körperchen sowie die homogene Verteilung von STAT3. Darüber hinaus führte die IL-6-Stimulation in diesen Zellen zu einer deutlichen Akkumulation von STAT3 in klar erkennbaren nukleären Körperchen. Die Überlagerung der Bilder zeigte eine klare Kolokalisation von I κ B- ζ und STAT3 in nukleären Körperchen (Abb. 9A).

Um zu überprüfen, ob I κ B- ζ und STAT3 nicht nur kolokalisieren, sondern auch miteinander interagieren, wurden zusätzlich Immunpräzipitationsstudien durchgeführt. Dazu wurden HepG2 Zellen mit GFP oder GFP-I κ B- ζ transfiziert und zur Aktivierung von STAT3 mit IL-6 stimuliert. Die Immunpräzipitationen erfolgten mittels eines anti-STAT3 Antikörpers und die darauf folgende Immundetektion in der Western-Blot Analyse mit Hilfe eines anti-GFP Antikörpers.

A



B

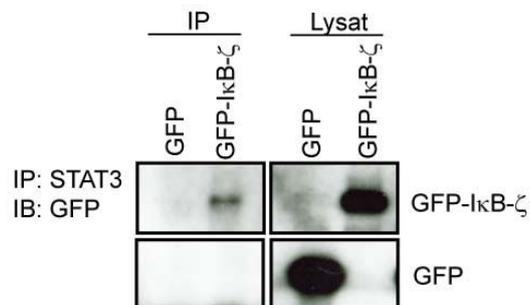


Abbildung 9. IκB-ζ und STAT3 kolokalisieren in nukleären Körperchen und bilden Proteinkomplexe. HepG2 Zellen wurden transient mit (A) GFP-IκB-ζ und pmCherry-STAT3 transfiziert. Nach einer Inkubation von 24 h wurden die Zellen für 30 min mit 20 ng/ml IL-6 stimuliert oder blieben unbehandelt. Die Fluoreszenzbilder wurden mit Hilfe eines Leica TCS SP2 Konfokalmikroskops aufgenommen. (B) HepG2 Zellen wurden mit GFP-IκB-ζ oder GFP transient transfiziert und 24 h später mit 20 ng/ml IL-6 für 30 min stimuliert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit Hilfe eines anti-STAT3 Antikörpers und die anschließende Immundetektion wurde mit einem anti-GFP Antikörper durchgeführt. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und es sind beispielhafte Ergebnisse dargestellt. IP: Immunpräzipitation; IB: Immunoblot

Es konnte ausschließlich im Präzipitat der GFP-I κ B- ζ transfizierten Zellen eine distinkte Bande, die der Größe von GFP-I κ B- ζ entspricht und im Lysat gut erkennbar war, detektiert werden. Im Vergleich dazu wurde in den GFP transfizierten Zellen nur in den Lysaten, jedoch nicht im Präzipitat, eine GFP spezifische Bande nachgewiesen (Abb. 9B). Somit konnte gezeigt werden, dass es in den nukleären Körperchen zu einer Interaktion von I κ B- ζ mit STAT3 kommt.

3.1.3 I κ B- ζ verstärkt die Aktivität von STAT3

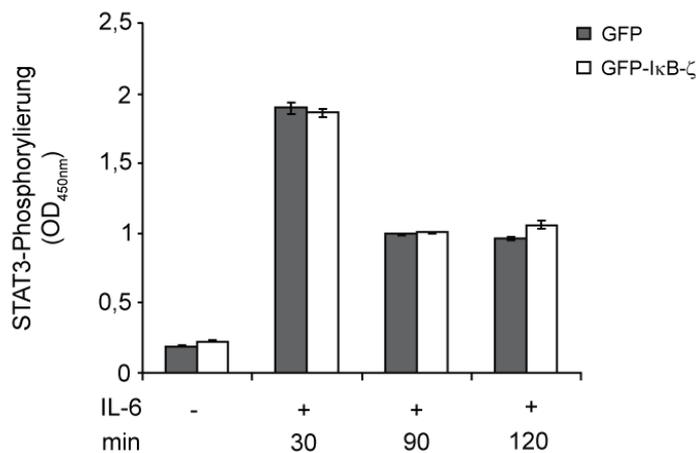
Aufgrund dessen, dass I κ B- ζ und STAT3 im Kern von HepG2 kolokalisieren und dort zudem Proteinkomplexe bilden, sollte in weiterführenden Experimenten ermittelt werden, ob diese Interaktion funktionelle Konsequenzen in Bezug auf die Aktivität von STAT3 nach sich zieht. Hierfür wurden in Anwesenheit von I κ B- ζ verschiedene Schritte des IL-6 abhängigen STAT3-Signaltransduktionsweges, die entscheidend für die STAT3-Aktivität sind, näher analysiert. Dabei handelt es sich um die STAT3-Phosphorylierung, welche eine Voraussetzung für die Dimerisierung und nachfolgenden Translokation von STAT3 in den Kern ist, die STAT3-DNA-Bindungsaktivität sowie die STAT3-Transaktivierungsaktivität.

Zuerst erfolgte die Analyse des Einflusses von I κ B- ζ auf die STAT3-Phosphorylierung. Hierfür wurden HepG2 Zellen mit GFP-I κ B- ζ oder GFP transfiziert, mit IL-6 stimuliert und anschließend nukleäre Extrakte hergestellt, die mit Hilfe eines Phospho-STAT3 Sandwich ELISAs analysiert wurden. Die Auswertung des ELISAs zeigte sowohl in den I κ B- ζ transfizierten Zellen als auch in den Kontrollen einen starken Anstieg der STAT3-Phosphorylierung nach 30 minütiger IL-6-Stimulation (Abb. 10A), der nach weiteren 60 min bereits zurückging, im Vergleich zu den unstimulierten Zellen jedoch noch immer auf einem hohen Niveau lag, welches auch bis zum Ende der Stimulation (120 min) unverändert blieb. Da hier zwischen den Kontrollen und den I κ B- ζ exprimierenden Zellen zu keinem Zeitpunkt der Stimulation ein Unterschied beobachtet wurde, kann ein Effekt von I κ B- ζ auf die STAT3-Phosphorylierung ausgeschlossen werden.

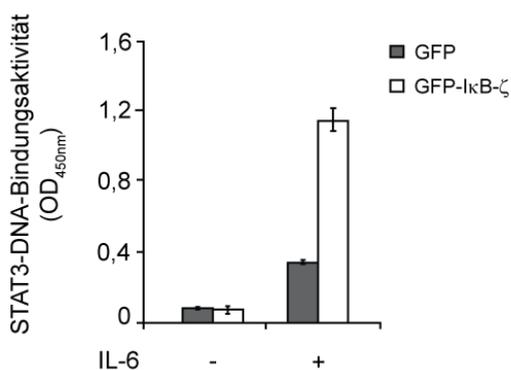
Im nächsten Schritt galt es, einen möglichen Einfluss der I κ B- ζ Expression auf die STAT3-DNA-Bindungsaktivität nachzuweisen. Erneut wurden hierfür HepG2 Zellen mit GFP-I κ B- ζ oder GFP transfiziert und mit IL-6 stimuliert. Die Zellen wurden nach erfolgter Stimulation geerntet und lysiert. Es wurden erneut nukleäre Extrakte

hergestellt, von denen gleiche Mengen in den `TransAM STAT3` Kit eingesetzt wurden. Durch die in diesem Kit verwendeten Oligonukleotide, welche der Erkennungssequenz von STAT3 entsprechen, ist es möglich die DNA-Bindungsaktivität von STAT3 zu bestimmen. Erwartungsgemäß führte die IL-6-Stimulation in den Kontrollzellen zu einer Induktion der DNA-Bindungsaktivität von

A



B



C

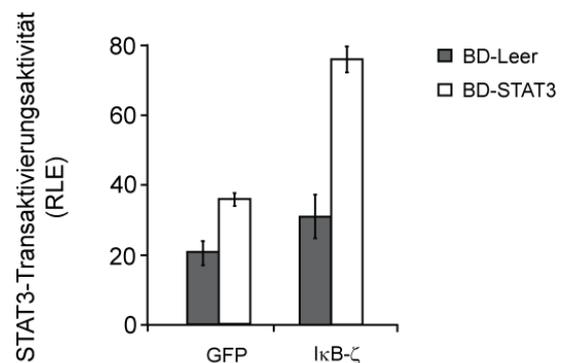


Abbildung 10. Einfluss von IκB-ζ auf die Phosphorylierung, DNA-Bindungs- und Transaktivierungsaktivität von STAT3. Um einen möglichen Einfluss von IκB-ζ auf STAT3 aufzudecken, wurde der Phosphorylierungsstatus, die DNA-Bindungs- sowie Transaktivierungsaktivität von STAT3 in Abhängigkeit von IκB-ζ untersucht. HepG2 Zellen wurden transient mit GFP oder GFP-IκB-ζ transfiziert. Für den (A) Phospho-STAT3 ELISA wurden die Zellen wie angegeben und für den (B) STAT3-DNA-Bindungsaktivitätstest 30 min mit IL-6 stimuliert. Anschließend wurden nukleäre Extrakte hergestellt und gleiche Proteinmengen eingesetzt. (C) Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Luciferase-Reporterplasmid, einem β-Galaktosidase kodierenden Plasmid sowie BD-STAT3 oder dem BD-Leervektor kotransfiziert und 24 h später mit IL-6 stimuliert. Die Transaktivierungsaktivität wurde in Relative Light Einheiten (RLE) gemessen und auf die Werte der β-Galaktosidase-Aktivität normalisiert. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und es sind beispielhafte Ergebnisse dargestellt.

STAT3, die interessanterweise in den I κ B- ζ transfizierten Zellen um das ~3-fache erhöht wurde (Abb. 10B). Im Gegensatz zur STAT3-Phosphorylierung ist I κ B- ζ somit in der Lage, einen Einfluss auf die Bindungsaktivität von STAT3 an die DNA auszuüben.

Zur Bestimmung der STAT3-Transaktivierungsaktivität wurden Luciferase-Reportergen-Analysen durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Transfektion von HepG2 Zellen mit dem Gal4-Reportergenkonstrukt und BD-STAT3, im Vergleich zum BD-Leervektor, zu einer erhöhten Luciferase Aktivität führte und belegen damit eine Transaktivität des BD-STAT3-Konstruktes (Abb. 10C). Die höchsten Luciferase-Aktivitäten konnten gemessen werden, wenn BD-STAT3 mit GFP-I κ B- ζ kotransfiziert wurde. In Bezug zur entsprechenden GFP-Kontrolle waren diese Werte um den Faktor 2 erhöht. Die Versuche wurden in Anwesenheit von IL-6 durchgeführt.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass I κ B- ζ neben einer gesteigerten DNA-Bindungsaktivität auch zu einer verstärkten Transaktivierungsaktivität von STAT3 führt, wohingegen die STAT3-Phosphorylierung nicht beeinflusst wird.

3.1.4 Die SOCS3-Promotoraktivität wird durch I κ B- ζ verstärkt.

Da nicht nur eine räumliche Interaktion zwischen I κ B- ζ und STAT3 nachgewiesen werden konnte, sondern auch ein Einfluss von I κ B- ζ sowohl auf die STAT3 DNA-Bindungs- als auch Transaktivierungsaktivität, sollten im nächsten Schritt die Auswirkungen der I κ B- ζ Überexpression auf das STAT3 Zielgen *suppressor of Cytokine Signaling 3* (SOCS3) untersucht werden.

Das Protein SOCS3 ist in der Lage, an die gp130 Untereinheit des aktiven IL-6 Rezeptorkomplexes zu binden und so die Aktivität der Jak zu inhibieren, wodurch eine Phosphorylierung von STAT3 verhindert wird. SOCS3 stellt somit einen negativen Regulator des IL-6 abhängigen STAT3-Signaltransduktionsweges dar, über den STAT3 seine eigene Aktivität (Rückkopplungsmechanismus) reguliert.

Als erstes wurde mit Hilfe des bereits im Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Luciferase-Reportergenkonstruktes der Einfluss von I κ B- ζ auf die SOCS3-Promotoraktivität untersucht.

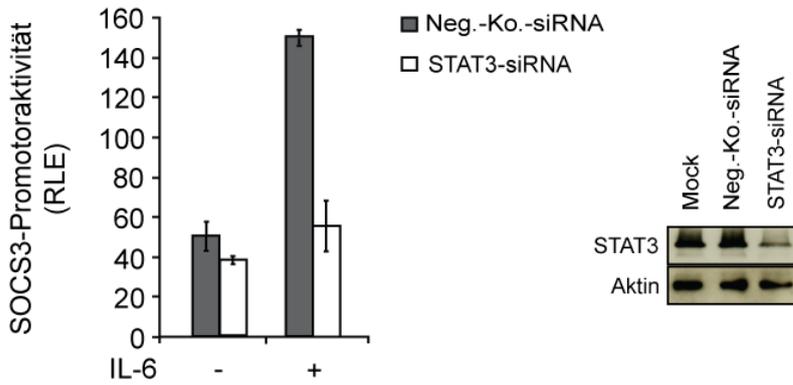
Durch Anwendung der RNA Interferenz (RNAi) wurde die STAT3-Abhängigkeit der SOCS3-Aktivierung bestätigt. Dazu wurden HepG2 Zellen zusammen mit dem

SOCS3-Reportergenkonstrukt, einem β -Galaktosidase kodierenden Plasmid sowie Negativ-Kontroll-siRNA oder STAT3-siRNA transfiziert.

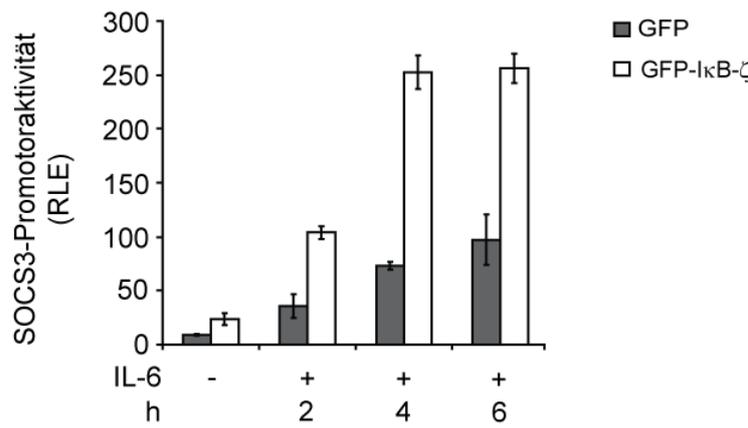
Die anschließende Bestimmung der Luciferase-Aktivität zeigte, wie erwartet, eine deutliche Induktion der SOCS3-Promotoraktivität als Folge der IL-6-Stimulation in den Kontrollen. Diese Induktion wurde jedoch beinahe vollständig durch den RNAi vermittelten Knock-down von STAT3 inhibiert und zeigt hiermit eine deutliche Abhängigkeit der SOCS3-Promotoraktivität von STAT3 (Abb. 11A).

Als nächstes wurde der Einfluss von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ auf die SOCS3-Promotoraktivität untersucht. HepG2 Zellen wurden hierfür erneut zusammen mit dem SOCS3-Reportergenkonstrukt, einem β -Galaktosidase kodierenden Plasmid sowie GFP oder GFP- $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ transfiziert und 24 h später mit IL-6 stimuliert. Bereits in unstimulierten Zellen konnte im Vergleich zu den Kontrollen durch die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Expression eine leicht erhöhte Luciferase-Aktivität gemessen werden (Abb. 11B). Nach IL-6-Stimulation konnte sowohl in den Kontrollen als auch in den $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ exprimierenden Zellen ein Anstieg der Luciferase-Aktivität in zeitabhängiger Weise gemessen werden, der in den $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ Zellen jedoch wesentlich stärker ausfiel. Über den gesamten Zeitraum der Stimulation lagen die Werte dabei 2 bis 3fach höher als in den Kontrollen (Abb. 11B). Dieser positive Effekt von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ auf die SOCS3-Promotoraktivität wurde in einem umgekehrten Ansatz mit Hilfe eines RNAi vermittelten Knock-downs von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ bestätigt. Hierfür wurden die HepG2 Zellen wieder mit dem SOCS3-Reportergenkonstrukt, dem β -Galaktosidase kodierenden Plasmid sowie einer Negativ-Kontroll-siRNA oder $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -siRNA transfiziert und mit IL-6 stimuliert. Tatsächlich wurde die SOCS3-Promotoraktivität bereits in unstimulierten Zellen durch den Knock-down von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ reduziert. Auch die IL-6-induzierte transkriptionelle Aktivität von SOCS3 wurde durch die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -siRNA stark inhibiert und führte zu einer 60% niedrigeren Aktivität (Abb. 11C). Zusammen mit den Ergebnissen der Überexpression von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$, belegen diese Resultate eindeutig eine Regulation der SOCS3-Promotoraktivität durch $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$. Der Knock-down von STAT3 und $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ wurde mittels Western-Blot Analysen nachgewiesen (Abb. 11 A und B, rechts).

A



B



C

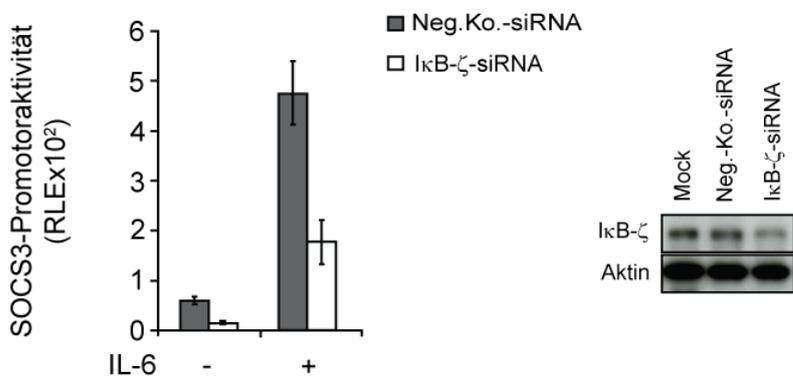


Abbildung 11. IκB-ζ führt zu einer verstärkten SOCS3-Promotoraktivität.

HepG2 Zellen wurden mit einem SOCS3-Reportergenkonstrukt, einem β-Galaktosidase kodierenden Plasmid sowie (A) einer Negativ-Kontroll- oder STAT3-siRNA kotransfiziert. Nach einer 48 stündigen Inkubation blieben die Zellen entweder unbehandelt oder wurden 6 h mit 20 ng/ml IL-6 stimuliert. Der erfolgreiche Knock-down von STAT3 wurde durch eine Western-Blot Analyse nachgewiesen. (B) Die Zellen wurden mit GFP-IκB-ζ oder GFP transfiziert und 24 h später entweder unbehandelt belassen oder wie angegeben mit 20 ng/ml IL-6 stimuliert. In (C) wurden die Zellen mit einer IκB-ζ- oder Negativ-Kontroll-siRNA 48 h kotransfiziert und anschließend entweder unbehandelt belassen oder mit 20 ng/ml IL-6 für 6 h stimuliert. Der Knock-down von IκB-ζ wurde in IL-1β stimulierten HepG2 Zellen nachgewiesen. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und es sind beispielhafte Ergebnisse dargestellt.

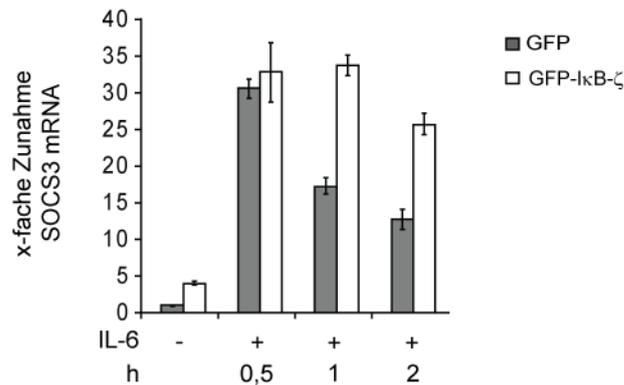
3.1.5 I κ B- ζ führt zu einer verstärkten SOCS3-Transkription

Der Nachweis einer gesteigerten Promotoraktivität des SOCS3 Gens durch I κ B- ζ , führte zu der Vermutung, dass I κ B- ζ auch die SOCS3-Transkription beeinflussen könnte. Aufschluss darüber sollten Untersuchungen des mRNA-Levels von SOCS3 mittels quantitativer RT-PCR geben. Dazu wurden HepG2 Zellen mit GFP-I κ B- ζ oder als Kontrolle mit GFP transfiziert und anschließend mit IL-6 stimuliert. IL-6 induzierte einen massiven Anstieg des SOCS3 mRNA Levels in den Kontrollen, der 30 min nach Stimulation im Vergleich zu den unstimulierten Zellen um das 30-fache erhöht war (Abb.12A). Im folgenden Verlauf der Stimulation wurde ein starker Rückgang des mRNA Levels in den Kontrollen detektiert, der zuletzt nur noch 12-fach erhöht war. Interessanterweise zeigten im Vergleich zu den Kontrollen die I κ B- ζ exprimierenden Zellen bereits in unbehandeltem Zustand einen 4-fach erhöhten SOCS3 mRNA-Level. Jedoch konnte nach der 30 minütigen IL-6-Stimulation kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen beobachtet werden, denn auch hier waren die Werte um das 30-fache erhöht. Erst zu einem späteren Zeitpunkt der Stimulation wurde ein Unterschied zu den Kontrollen offensichtlich. Während die Kontrollen durch einen starken zeitabhängigen Rückgang der SOCS3 mRNA-Expression gekennzeichnet waren, blieb der SOCS3 mRNA-Level der I κ B- ζ exprimierenden Zellen während der gesamten Stimulation auf einem hohen Niveau. So waren die Werte am Ende der Stimulation im Gegensatz zu den unstimulierten Zellen noch immer 25fach erhöht (Abb. 12A).

In der Arbeit von Yang *et al.*¹⁴⁵ konnte eine stabilisierende Wirkung von IL-1 β auf die SOCS3-mRNA in HepG2 Zellen gezeigt werden. Da IL-1 β die Expression von I κ B- ζ in HepG2 Zellen induzieren kann und die Tatsache, dass der SOCS3-mRNA-Level in I κ B- ζ exprimierenden Zellen nach der IL-6-Stimulation auf einem sehr hohen Niveau verblieb, stellte sich die Frage, ob die IL-1 β -induzierte SOCS3-mRNA-Stabilisierung, zumindest teilweise, über I κ B- ζ vermittelt werden könnte. Versuche mit Actinomycin D (ActD), einem Inhibitor der Transkription, konnten diesen Verdacht jedoch nicht bestätigen. GFP oder GFP-I κ B- ζ transfizierte HepG2 Zellen wurden nach Präinkubation mit IL-6 über einen Zeitraum von 6 h mit ActD behandelt. Die IL-6-induzierte Expression der SOCS3-mRNA konnte sowohl in I κ B- ζ exprimierenden als auch in den Kontrollzellen durch ActD vollständig inhibiert werden. Hierbei sank der SOCS3-mRNA-Level gleichermaßen ab und erreichte nach 6 h wieder

Ausgangswerte. Ein stabilisierender Effekt von I κ B- ζ auf die SOCS3-mRNA konnte deshalb ausgeschlossen werden.

A



B

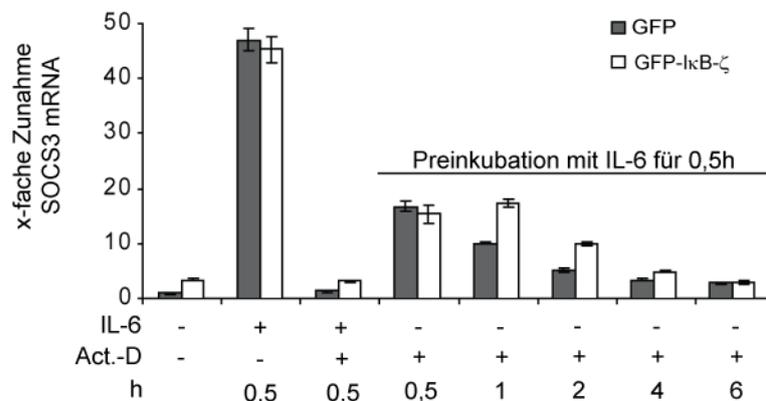
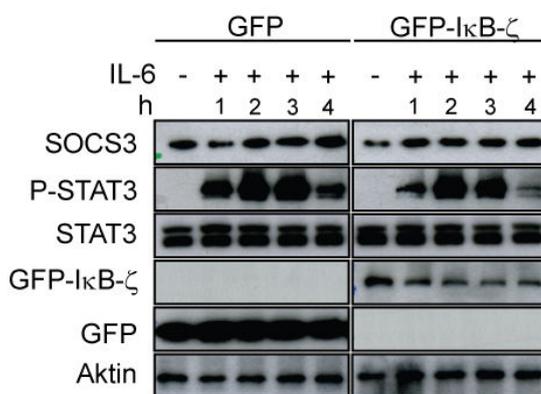


Abbildung 12. Die Überexpression von I κ B- ζ führt zu einem erhöhten SOCS3 mRNA-Level, der nicht durch eine mRNA-Stabilisierung vermittelt wird. HepG2 Zellen wurden transient mit GFP oder GFP-I κ B- ζ transfiziert. **(A)** 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten mit 20 ng/ml IL-6 stimuliert. Die Analyse der SOCS3 mRNA erfolgte mit Hilfe des 7300 real-time-PCR System von Applied Biosystems. **(B)** Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion für 0,5 h mit 20 ng/ml IL-6 in An- und Abwesenheit von 10 μ M Actinomycin D (ActD) stimuliert. Für die Analyse der mRNA Stabilität erfolgte eine Preinkubation mit 20 ng/ml IL-6 für 0,5 h, bevor die Zellen für die angegebenen Zeiten mit ActD inhibiert wurden. Die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt und es sind beispielhafte Ergebnisse dargestellt.

3.1.6 Der SOCS3 Protein-Level wird nicht durch I κ B- ζ beeinflusst

Nachdem eine gesteigerte Transkription des SOCS3-Gens durch I κ B- ζ beobachtet wurde, stellte sich die Frage, ob dies auch zu einer Zunahme der Expression des SOCS3-Proteins führt. Western-Blot Analysen von HepG2 Zellen, die entweder mit GFP-I κ B- ζ oder zur Kontrolle mit GFP transfiziert und anschließend mit IL-6 stimuliert wurden, offenbarten jedoch keinerlei Einfluss von I κ B- ζ auf die SOCS3 Proteinexpression (Abb. 13A). Überraschenderweise führte die IL-6-Stimulation aber auch in den Kontrollzellen zu keiner Veränderung der SOCS3-Expression, obwohl es in beiden Transfektanten durch die IL-6 induzierte Phosphorylierung von STAT3 zu dessen Aktivierung kam. Auch eine anschließende Untersuchung der Proben mit Hilfe eines sensitiveren ELISAs konnte keine Unterschiede der SOCS3-Expression durch Transfektion oder Stimulation detektieren, weshalb davon auszugehen ist, dass I κ B- ζ keinen Einfluss auf die SOCS3-Proteinexpression hat.

A



B

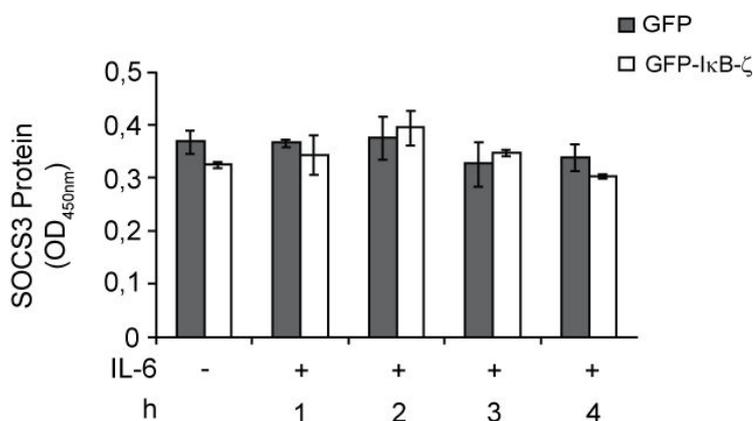


Abbildung 13. Die I κ B- ζ -Überexpression führt zu keiner erhöhten SOCS3-Proteinkonzentration.

HepG2 Zellen wurden mit GFP-I κ B- ζ oder GFP transfiziert und 24 h nach der Transfektion wie angegeben mit 20 ng/ml IL-6 stimuliert, geerntet, lysiert und gleiche Proteinmengen für (A) Western-Blot Analysen zum Nachweis der SOCS3, phospho-STAT3 (P-STAT3), STAT3, GFP-I κ B- ζ , GFP und Aktin Expression genutzt. (B) Für den Nachweis der SOCS3-Proteinexpression wurde zusätzlich ein ELISA verwendet. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und es sind beispielhafte Ergebnisse dargestellt. OD_{450nm}: Optische Dichte bei 450 nm

3.2 I κ B- ζ wirkt apoptotisch

3.2.1 Die transiente Expression von I κ B- ζ führt zu einem verstärkten Zelltod in HepG2 Zellen

Erste Hinweise auf eine Beteiligung von I κ B- ζ an der Apoptoseinduktion konnte bereits in Untersuchungen mit HT1080 und HeLa D98 Zellen gezeigt werden. So führte eine I κ B- ζ -Überexpression zu einer Induktion des Zelltodes, während die I κ B- ζ -siRNA eine partielle Apoptoseresistenz hervorrief.⁴⁰ Um der Frage nachzugehen, ob I κ B- ζ auch für die hepatozelluläre Apoptose von Bedeutung ist wurden HepG2 Zellen transient mit GFP-I κ B- ζ oder GFP als Kontrolle transfiziert. Nach einer Inkubation von 24 beziehungsweise 48 h wurden die Zellen mikroskopisch begutachtet sowie die Caspase-3-Aktivität gemessen.

Die Transfektionseffizienz lag bei diesen Versuchen zwischen 30 und 50%. Nach einer Transfektion für 24 h konnten mikroskopisch keine Unterschiede zwischen den GFP- und GFP-I κ B- ζ exprimierenden Zellen erkannt werden (Abb. 14A). Beide Transfektanten zeigten eine 40 bis 50%ige Konfluenz und es konnten keine morphologischen Veränderungen, welche auf einen Zelltod hinweisen würden, erkannt werden. Erst 48 h nach der Transfektion zeigten sich deutliche Unterschiede. Während die Kontrollzellen eine 70 - 80%ige Konfluenz und keine Zelltod assoziierten Anzeichen aufwiesen, konnte im Fall der I κ B- ζ transfizierten Zellen eine Abnahme der Zellzahl beobachtet werden. Außerdem wiesen die fluoreszierenden I κ B- ζ Zellen starke morphologische Veränderungen, wie Ausstülpungen des Zytoplasmas, starkes Abrunden sowie Schrumpfen der gesamten Zelle auf. Auch im Überstand wurden abgelöste, fluoreszierende Zellen sowie eine Vielzahl von Zellfragmenten beobachtet.

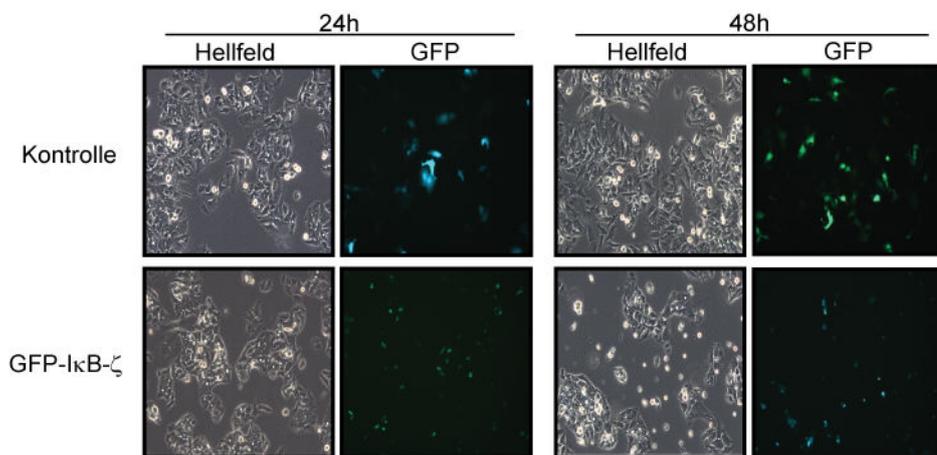
Um eine mögliche Beteiligung von Caspasen an diesen Vorgängen nachzuweisen, wurde die Aktivität der Caspase-3 gemessen. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen konnte in den I κ B- ζ exprimierenden Zellen bereits 24 h nach Transfektion eine leichte Induktion der Caspase-3-Aktivität nachgewiesen werden. Diese verstärkte sich 48 h nach Transfektion deutlich (3,5fach). Zu diesem Zeitpunkt wurde auch in den GFP transfizierten Zellen eine leichte Caspase-3-Aktivität nachgewiesen, die jedoch weit unter dem Wert der I κ B- ζ Zellen lag (Abb. 14B).

Diese Ergebnisse wurden durch Western-Blot Analysen bestätigt, in denen eine Pro-

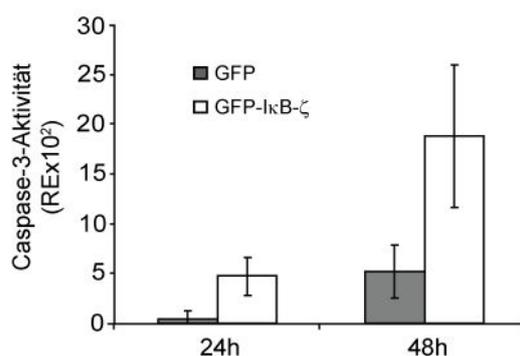
zessierung von Caspase-3 in ihre katalytisch aktiven Untereinheiten p12 und p17 48 h nach Transfektion mit $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$, jedoch nicht mit dem Kontrollvektor, erkennbar war (Abb. 14C).

Somit geben diese Daten Hinweise darauf, dass $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ zu einem Caspase-3-abhängigen Zelltod führt und somit in der Lage ist, die Apoptose zu induzieren.

A



B



C

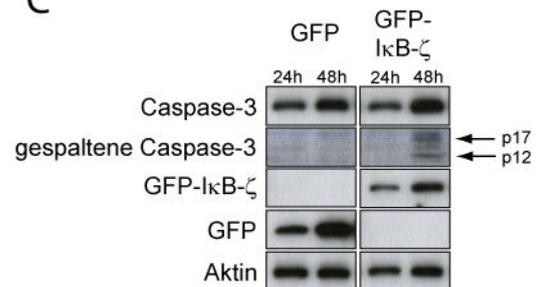


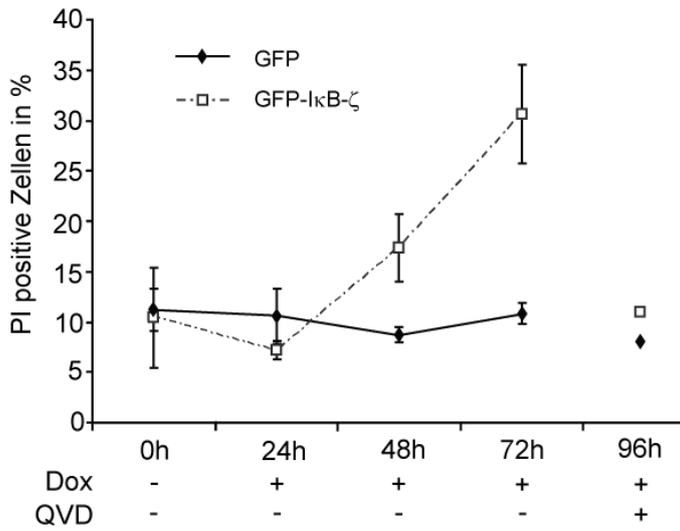
Abbildung 14. Die transiente Transfektion von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ führt zu einem verstärktem Zelltod. HepG2 Zellen wurden transient mit GFP- $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ oder GFP als Kontrolle transfiziert. (A) Hellfeld- und Fluoreszenzbilder wurden 24 h und 48 h nach der Transfektion mit Hilfe eines Actiovision Mikroskop (ZEISS) aufgenommen. Zusätzlich wurden die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, lysiert und jeweils gleiche Proteinmengen in die (B) Caspase-3-Aktivitätsmessung (mittels Ac-DEVD-AMC) und (C) Western-Blot Analysen eingesetzt. RE: relative Einheiten

3.2.2 I κ B- ζ induziert die Apoptose in stabilen, I κ B- ζ exprimierenden HepG2 Tet-On Zellen

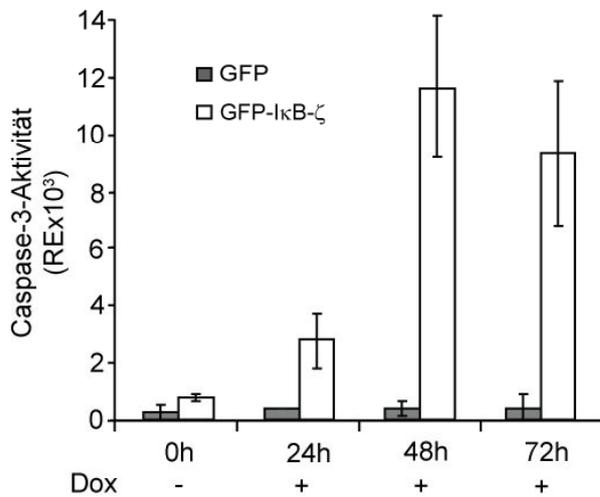
Wie in 3.2.1 beschrieben, führte die transiente Transfektion der HepG2 Zellen mit 30 - 50% positiven Zellen nur zu einer verhältnismäßig schwachen Transfektionseffizienz. Dieser Umstand könnte dazu führen, dass schwache Effekte, die durch I κ B- ζ entstehen, gar nicht detektiert werden, da sie vom Phänotyp der Wildtyp (WT) Zellen überlagert werden. Um diesem Problem entgegenzuwirken, wurden stabile I κ B- ζ Zelllinien, die auf der HepG2 Tet-On Advanced Zelllinie basieren, generiert. In diesen polyklonalen Zelllinien ist die Expression von GFP-I κ B- ζ oder GFP durch Doxyzyklin (Dox) Stimulation induzierbar. Eine stabile GFP Zelllinie wurde in den weiteren Experimenten als Kontrollzelllinie verwendet.

In den ersten durchgeführten Experimenten wurden diese Zellen mit 1 μ g/ml Dox über einen Zeitraum von 24 h bis 96 h stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Membrandysfunktion anhand der Aufnahme von Propidiumjodid (PI) sowie die Caspase-3-Aktivität gemessen und zuletzt Western-Blot Analysen durchgeführt. Die Messung der PI-Aufnahme ergab für die GFP Kontrollzellen keine signifikanten Veränderungen der PI positiven Zellen im Laufe der Stimulation (Abb. 15A). Jedoch wurden bereits ohne Stimulation zwischen 9 und 12% PI positive Zellen detektiert. Dieser hohe Hintergrund an PI positiven Zellen ist ein Resultat der praktischen Durchführung. Denn um eine möglichst korrekte Messung von einzelnen Zellen durchzuführen und ein Verstopfen des Durchflusszytometers zu verhindern, wurden die Zellen vor der Messung mehrmals durch eine 1000er Pipettenspitze gezogen, um die Zellen zu vereinzeln. Die dabei auftretenden Scherkräfte führten wahrscheinlich zu einer negativen Beeinflussung der Zellmembran, so dass PI in der Lage war, in die Zellen zu gelangen. Im Falle der I κ B- ζ Zelllinie wurde das gleiche Phänomen beobachtet und in unstimulierten Proben ~10% PI positive Zellen gemessen. Während 24 h nach Beginn der Stimulation noch keine Zunahme von PI positiven Zellen detektiert werden konnte, kam es weitere 24 h später zu einem Anstieg der PI positiven Zellen. Dieser Anstieg setzte sich bis zum Ende der Stimulation fort und erreichte nach 72 h ein Mittel von ca. 30% PI positiven Zellen. Da man an Hand der PI-Aufnahme nicht zwischen Nekrose und Apoptose unterscheiden kann, wurden zusätzlich Kostimulationen mit Dox und dem Caspasen Inhibitor Q-VD-OPH für 96 h durchgeführt. Dabei führte die Q-VD-OPH Kostimulation zu einer völligen

A



B



C

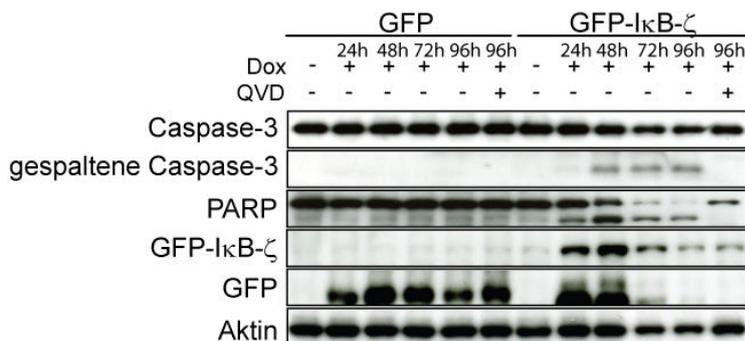


Abbildung 15. Die Doxozyklin induzierte Expression von IκB-ζ führt zur Induktion der Apoptose. Die HepG2 Tet-On Zelllinien GFP und GFP-IκB-ζ wurden wie angegeben mit 1 µg/ml Doxozyklin stimuliert. Für die Messung der PI-Aufnahme (A) sowie der Western-Blot Analysen (C) wurden zusätzlich 96 h Stimulationen mit Doxozyklin und dem Caspasen-Inhibitor Q-VD-OPH (1 µM) durchgeführt. (A) Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und anschließend mit 2 µg/ml PI inkubiert. Die PI-Aufnahme wurde mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung des FSC/FL3-Profiles ermittelt. Zusätzlich wurden Gesamtzell-Lysate der stimulierten Zellen generiert und gleiche Proteinmengen (B) zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität (mittels Ac-DEVD-AMC) und (C) zum Nachweis der Caspase-3- (Proform und Spaltprodukt), PARP-, GFP-, GFP-IκB-ζ- und Aktin-Expression mittels Western-Blot Analysen verwendet. Dox: Doxozyklin; QVD: Q-VD-OPH; RE: Relative Einheiten.

Inhibition der PI Zunahme, es wurden lediglich die durch die technische Durchführung verursachten Hintergrundwerte gemessen

Daher ist die I κ B- ζ induzierte Aufnahme von PI Caspasen abhängig und es handelt sich somit um einen apoptotischen Zelltod.

Parallel zur Messung der PI-Aufnahme wurde die Caspase-3-Aktivität bestimmt. Dabei konnte in den Kontrollzellen, über den gesamten Zeitraum der Stimulation, keine signifikante Caspase-3-Aktivität nachgewiesen werden. Die I κ B- ζ Zelllinie zeigte in den unstimulierten Proben ebenfalls keine signifikante Caspase-3-Aktivität, allerdings konnte bereits 24 h nach Beginn der Stimulation eine leichte Zunahme der Aktivität gemessen werden. Im weiteren Verlauf der Stimulation vervierfachte sich die gemessene Aktivität nochmals und verblieb bis zum Ende der Stimulation (72 h) auf diesem hohen Niveau (Abb. 15B).

Die Western-Blot Analyse, der in der Caspase-3-Aktivitätsmessung verwendeten Proben, ließ ganz klar die Dox induzierte Expression von GFP und GFP-I κ B- ζ erkennen (Abb. 15C). Zudem konnte, wie erwartet, nur im Falle der I κ B- ζ exprimierenden Zellen eine Spaltung der Caspase-3 detektiert werden.

So konnte in diesen Zellen, die 48 bis 96 h mit Dox stimuliert wurden, sowohl die Abnahme der Procaspase-3 als auch das Auftauchen der p17 Untereinheit gezeigt werden (Abb. 15C). Obwohl bereits 24 h nach Stimulation eine Caspase-3-Aktivität messbar war, es also zu einer Spaltung der Caspase-3 gekommen sein muss, konnte im Western-Blot keine Spaltung detektiert werden. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die Konzentration der Spaltprodukte zu diesem Zeitpunkt noch unterhalb der Detektionsgrenze lag. Ein weiterer Anhaltspunkt für eine Caspase-3-Aktivität 24 h nach der Stimulation ist die nachweisbare Spaltung der *Poly-(ADP-Ribose) Polymerase* (PARP), ein Hauptsubstrat der Caspase-3, welche im Laufe der Stimulation fast vollständig abgebaut wurde. Des Weiteren ist in den Western-Blot Analysen klar die inhibierende Wirkung von Q-VD-OPH zu erkennen, die eine Prozessierung der Caspase-3 vollständig inhibiert und somit eine Spaltung von PARP verhindert.

Entsprechend der zuvor gemachten Beobachtung, dass die transiente I κ B- ζ Expression in HepG2 Zellen die Apoptose induziert, lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass I κ B- ζ ebenfalls in der stabilen Zelllinie zu einem Caspase abhängigen Zelltod, der Apoptose, führt.

Da 48 h nach Beginn der Dox Stimulation die höchsten Caspase-3-Aktivitäten in den I κ B- ζ exprimierenden Zellen nachgewiesen werden konnten, wurde für die weiteren Experimente ein Stimulationszeitraum von 48 h gewählt.

3.2.3 IL-6 führt zu einer Verstärkung des apoptotischen Effekts von I κ B- ζ

Wie bereits in der Einleitung geschildert, besitzt der IL-6 abhängige Jak/STAT3 Signaltransduktionsweg vor allem in der Leber eine starke anti-apoptotische Wirkung. Dies und die Tatsache, dass in dieser Arbeit eine Interaktion zwischen I κ B- ζ und dem IL-6-induzierbaren Transkriptionsfaktor STAT3 in HepG2 Zellen nachgewiesen werden konnte, führte zu der Frage, ob IL-6 in der Lage ist, die pro-apoptotische Wirkung von I κ B- ζ zu inhibieren. Um dieser Frage nachzugehen, wurden entsprechende Stimulationen in den HepG2 Tet-On Zelllinien GFP und GFP-I κ B- ζ vorgenommen und wie zuvor die PI Aufnahme und Caspase-3-Aktivität gemessen sowie Western-Blot Analysen durchgeführt.

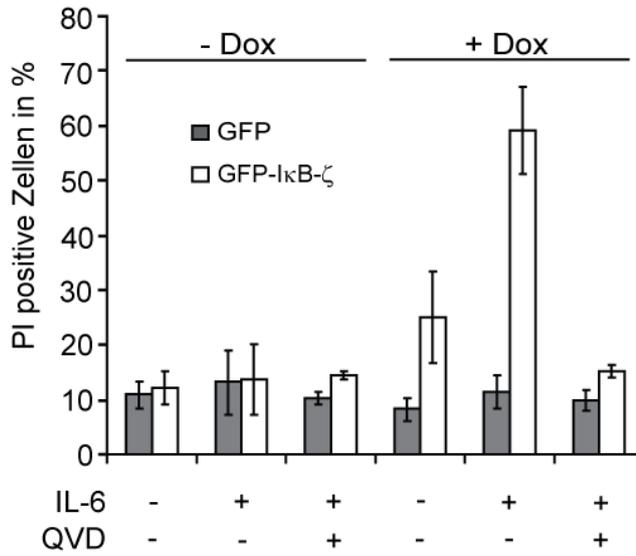
Interessanterweise führte die Kostimulation mit Dox und IL-6 anders als erwartet, nicht zu einer verminderten PI-Aufnahme, sondern zeigte vielmehr einen gegenteiligen Effekt. So führte die Kostimulation mit IL-6 zu einer verstärkten PI-Aufnahme und erreichte mit 60% positiven Zellen einen mehr als doppelt so hohen Wert wie die ausschließlich mit Dox stimulierten Zellen. Die gleichzeitige Stimulation mit Q-VD-OPH führte auch dieses Mal zu einer Inhibition der gesteigerten PI-Aufnahme über den Hintergrundwert hinaus. (Abb. 16A).

Ebenso die Messung der Caspase-3-Aktivität ließ einen verstärkenden Effekt der IL-6-Kostimulation erkennen. Wurden die I κ B- ζ Zellen mit Dox stimuliert, erreichten die gemessenen Caspase-3-Aktivitäten ähnliche Werte wie in 3.2.2, welche jedoch infolge der Kostimulation mit IL-6 um den Faktor 2 erhöht wurden (Abb. 16B).

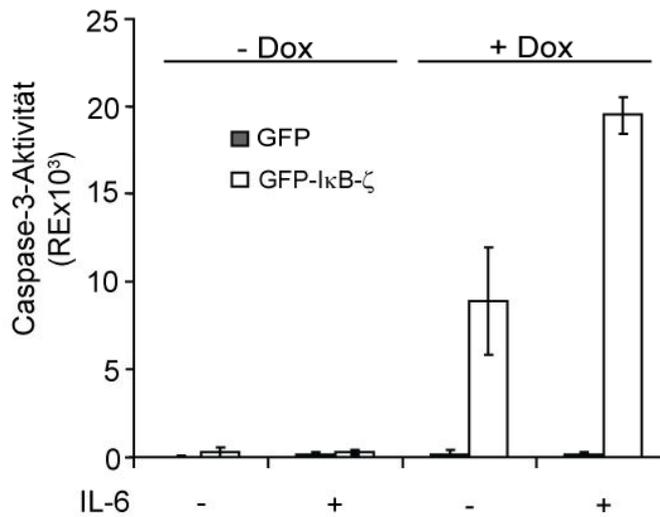
Wie zu erwarten war, konnten wieder, unabhängig von der Stimulation, keine signifikanten Caspase-3-Aktivitäten in den Kontrollzellen gemessen werden.

Auch in anschließenden Western-Blot Analysen konnte der verstärkende Effekt der IL-6-Kostimulation detektiert werden. Diese zeigten ausschließlich in I κ B- ζ exprimierenden Zellen eine Spaltung der Caspase-3 und von PARP, welche durch die IL-6-Kostimulation deutlich verstärkt wurden (Abb. 16C). Die gleichzeitige Stimulation mit Q-VD-OPH führte erneut zu einer vollständigen Blockierung der Caspase-3-Aktivierung und PARP-Spaltung.

A



B



C

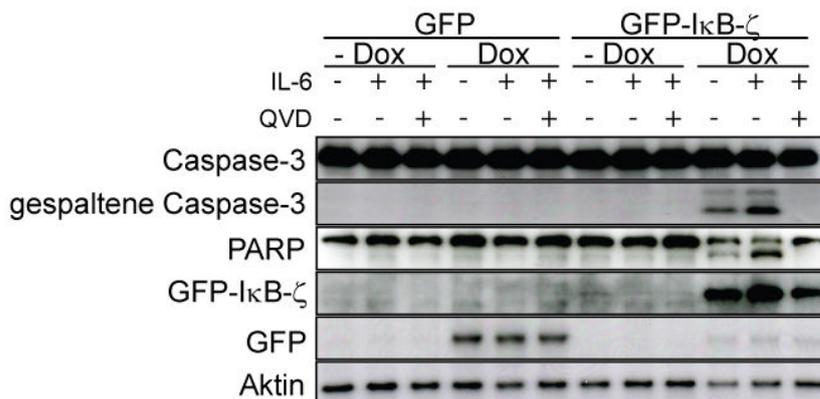


Abbildung 16: IL-6 verstärkt den apoptotischen Effekt von IκB-ζ. Die HepG2 Tet-On GFP und GFP-IκB-ζ Zellen wurden wie angegeben für 48 h mit Dox (1 µg/ml), IL-6 (20 ng/ml) und Q-VD-OPH (10 µM) stimuliert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. **(A)** Die Zellen wurden nach der Stimulation geerntet, mit 2 µg/ml PI inkubiert und anschließend die PI Aufnahme durchflusszytometrisch, unter Verwendung des FSC/FL3-Profiles, gemessen. Zusätzlich wurden Gesamtzell-Lysate der Zellen generiert und gleiche Proteinmengen **(B)** zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität (mittels Ac-DEVD-AMC) und **(C)** zum Nachweis der Caspase-3- (Proform und Spaltprodukt), PARP-, GFP-, GFP-IκB-ζ- und Aktin-Expression mittels Western-Blot Analysen verwendet. -/+ Dox: ohne/mit Doxyzyklin; PI: Propidiumjodid; QVD: Q-VD-OPH; RE: Relative Einheiten

Zusammengefasst zeigen die durchgeführten Versuche eindeutig, dass die Kostimulation mit IL-6 in einer Verstärkung des pro-apoptotischen Effekts von I κ B- ζ resultiert. Dahingegen führte die Stimulation mit IL-6 alleine weder zu einer Aktivierung der Caspase-3, noch wurde die Expression von GFP oder GFP-I κ B- ζ beeinflusst.

3.2.4 I κ B- ζ hat keinen Einfluss auf den Zellzyklus

Um zu klären, ob die durch I κ B- ζ induzierte Apoptose mit einer Arretierung des Zellzykluses verknüpft ist, wurde die Verteilung der Zellzyklusphasen nach Nicoletti et al.¹⁴³ bestimmt. Dabei wird der DNA Gehalt der Kerne mittels PI-Färbung gemessen und ermöglicht so eine Bestimmung der Zellzyklusphase. Der Gehalt an DNA von diploiden Zellen in der G₀/G₁-Phase beträgt 2n. Während der S-Phase verdoppelt sich der Chromosomensatz, die Zellen werden tetraploid und der DNA-Gehalt der sich in der G₂/M-Phase befindlichen Zellen ist somit 4n. Während der Apoptose kommt es zur Fragmentierung der DNA, wodurch der Gehalt an DNA in apoptotischen Zellkernen kleiner ist als 2n, man bezeichnet diese Phase als subG₁.

Für die Untersuchungen blieben die beiden Zelllinien HepG2 Tet-On GFP und GFP-I κ B- ζ unbehandelt oder wurden wie angegeben mit Dox und IL-6 stimuliert und anschließend mit PI inkubiert. Die durchflusszytometrischen Analysen der Zellen ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Zellzyklusphasen. Dies galt sowohl für die GFP als auch für die I κ B- ζ exprimierenden Zellen. Einzig eine leichte Zunahme von apoptotischen I κ B- ζ exprimierenden Zellen (subG₁-Phase) konnte nach einer 48 stündigen Dox Stimulation detektiert werden (Abb.17).

Wie im Abschnitt zuvor beschrieben, führte auch hier die IL-6-Kostimulation zu einer verstärkten Zunahme der subG₁-Population. Wohingegen die Stimulation mit IL-6 alleine zu keiner Zunahme führte.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte ein Einfluss von I κ B- ζ auf die Verteilung der Zellzyklusphasen ausgeschlossen werden.

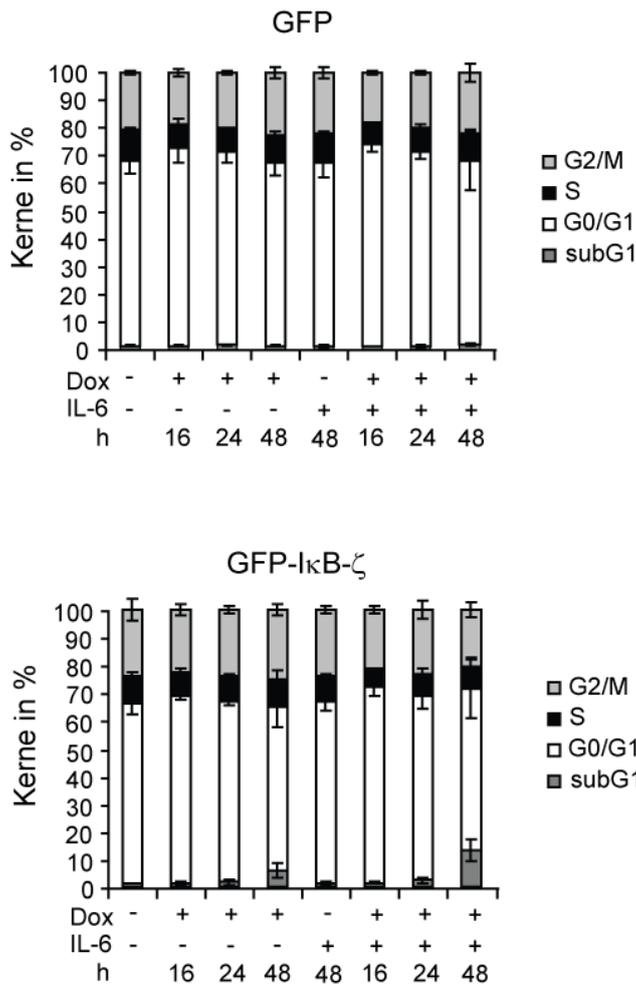


Abbildung 17. IκB-ζ hat keinen Einfluss auf den Zellzyklus. Zellen der HepG2 Tet-On Zelllinien GFP und GFP-IκB-ζ wurden wie angegeben mit 1 µg/ml Dox in An- und Abwesenheit von 20 ng/ml IL-6 stimuliert oder blieben unbehandelt. Die Bestimmung der Zellzyklusverteilung erfolgte durchflusszytometrisch nach Nicoletti *et al*¹⁴³.

3.2.5 IκB-ζ führt zu einem Verlust der mitochondrialen Membranintegrität und Induktion der Caspase-9-Aktivität

Die Aktivierung der Apoptose ist über zwei verschiedene Signalwege möglich. Zum einen über den extrinsischen, zum anderen über den intrinsischen Apoptoseweg. Um festzustellen, über welchen Weg die Apoptose Induktion durch IκB-ζ erfolgt, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen unter Verwendung von TMRE durchgeführt, bei dem es sich um ein kationisches Fluorophor handelt, welches sich in Mitochondrien von gesunden Zellen anreichert. Die Anreicherung ist dabei von einem intakten mitochondrialen Membranpotential abhängig. Wird der intrinsische Apoptoseweg induziert, kommt es im Laufe der Apoptose zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, was gleichzeitig mit einer Depolarisierung des Membranpotentials verknüpft ist. Diese Depolarisierung führt zu einer Diffusion des

TMRE ins Zytoplasma der Zelle und dadurch zu einer messbaren Verschiebung der Fluoreszenzintensität. Die Fluoreszenzmessung erfolgte durchflusszytometrisch unter Verwendung des Zellzahl/FL2-Profiles.

Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit Hilfe von Histogrammen. Diese ließen im Falle der GFP exprimierenden Zellen, unabhängig von Art und Dauer der Stimulation, nur einen einzelnen breiten Gipfel erkennen (Abb.18A). Da dieser Gipfel dem der unstimulierten Zellen entspricht, bedeutet dies, dass es in diesen Zellen während der Stimulation zu keiner Permeabilisierung der mitochondrialen Membran gekommen ist.

Die $\kappa\text{B-}\zeta$ exprimierenden Zellen ließen, in den unbehandelten und mit IL-6 stimulierten Proben, im Histogramm ebenfalls nur einen einzelnen, distinkten Gipfel erkennen. Die Fluoreszenzintensität dieses Gipfels ist dabei vergleichbar mit den Ergebnissen der GFP exprimierenden Zellen und wird im Weiteren als primärer Gipfel bezeichnet. Die Dox stimulierten $\kappa\text{B-}\zeta$ Zellen zeigten im Gegensatz dazu jedoch bereits nach 24 h eine leichte Verschiebung der Fluoreszenzintensität. Der in den Kontrollen sichtbare, breite primäre Gipfel ist in diesen Zellen deutlich schmaler und es zeichnet sich außerdem eine weitere Population von Zellen mit einer geringeren Fluoreszenzintensität ab. Bei dieser Population handelt es sich somit um Zellen, bei denen es zu einer Depolarisierung der mitochondrialen Membran gekommen sein muss.

Die Ausprägung dieser zusätzlichen Population mit geringerer Fluoreszenzintensität wird durch die Kostimulation mit Dox und IL-6 verstärkt und lässt deutlich die Entstehung eines sekundären Gipfels erkennen. Weitere 24 h später waren die Veränderungen in der Fluoreszenzintensität noch ausgeprägter. Die Dox stimulierten Zellen zeigten eine anhaltende Verringerung des Primärgipfels sowie die damit verbundene, deutliche Zunahme des sekundären Gipfels. In den IL-6 kostimulierten Proben war der sekundäre Gipfel zu diesem Zeitpunkt bereits wesentlich größer als der primäre Gipfel. Die unstimulierten Kontrollen sowie die ausschließlich mit IL-6 stimulierten Proben ließen dahingegen nur den primären Gipfel im Histogramm erkennen (Abb. 18A).

Die Depolarisierung der mitochondrialen Membran ist mit deren gleichzeitiger Permeabilisierung verknüpft und führt so zu einer Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma der Zellen. Dies führt wiederum zur Bildung des Apoptosoms, welches letztlich für die Aktivierung der Effektor Caspase-3 verantwortlich ist. Die Formierung

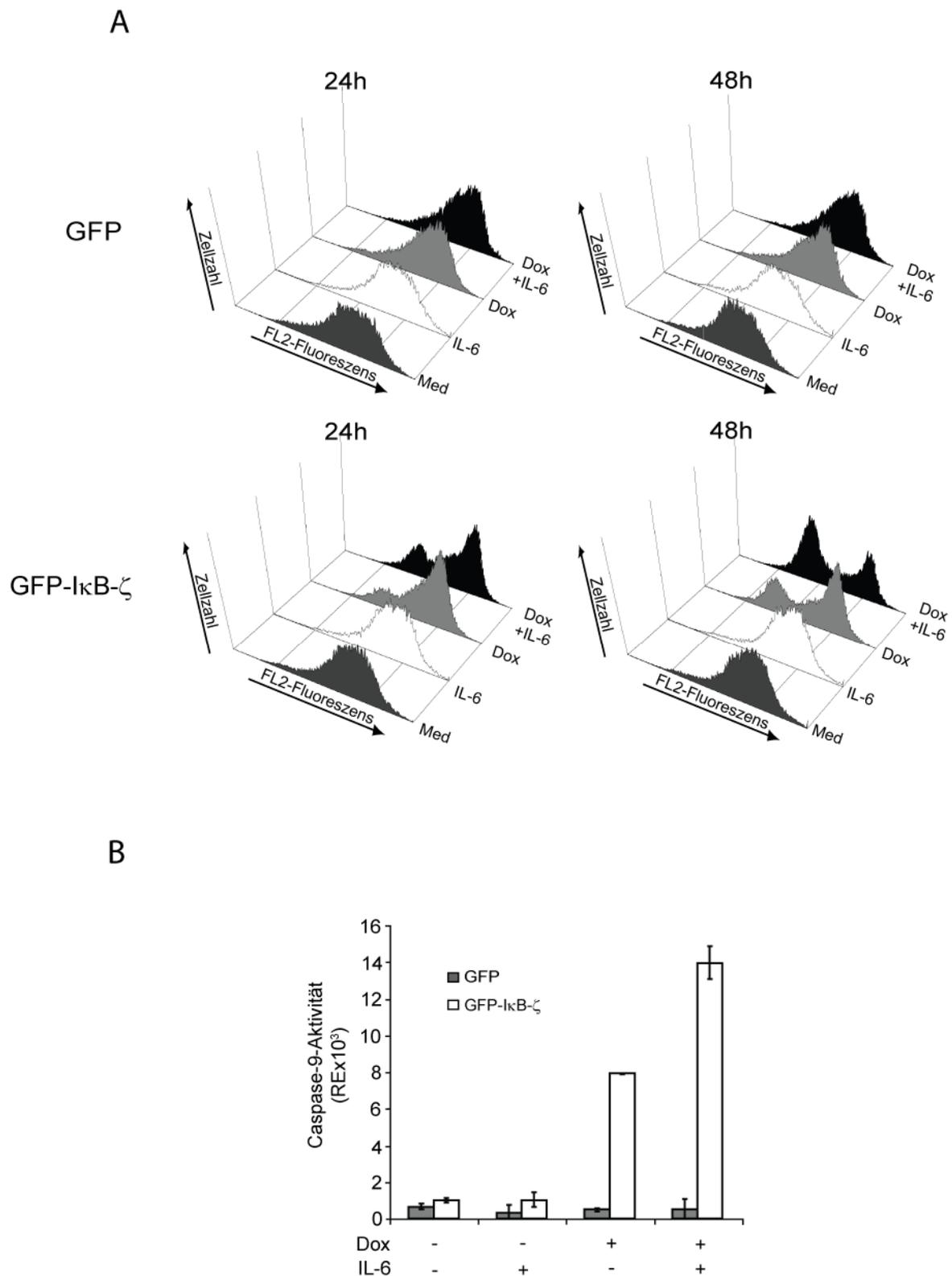


Abbildung 18. $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ führt zu einem Verlust der mitochondrialen Membranintegrität und einer Induktion der Caspase-9-Aktivität. HepG2 Tet-On GFP und GFP-I $\kappa\text{B-}\zeta$ Zellen blieben unbehandelt oder wurden über einen Zeitraum von 48 h wie angegeben mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Dox und 20 ng/ml IL-6 stimuliert (**A**) Nach der Stimulation wurden die Zellen für 15 min mit 250 nM TMRE inkubiert und anschließend, unter der Verwendung des Zellzahl/FL2 Profils, durchflusszytometrisch analysiert. (**B**) Die stimulierten Zellen wurden geerntet, lysiert und gleiche Proteinmenge zur Bestimmung der Caspase-9-Aktivität (mittels Ac-LEHD-AMC) verwendet. Die Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt und es sind beispielhafte Ergebnisse dargestellt. Dox: Doxzyklin; Med: Medium; RE: Relative Einheiten

des Apoptosoms, bestehend aus dem apoptotischen Protease Aktivierungsfaktor 1 (Apaf1), Cytochrom c und dATP, führt zu der Aktivierung der Initiator Caspase-9. Ein Nachweis der Caspase-9-Aktivität durch Doxyzyklin Stimulation würde somit die Vermutung unterstützen, dass I κ B- ζ die Apoptose über den intrinsischen Weg aktiviert. Um dies zu überprüfen, wurden beide HepG2 Tet-On Zelllinien wieder für 48 h mit Dox und IL-6 stimuliert oder blieben unbehandelt. Die Messung der Caspase-9-Aktivität ergab dabei ein ähnliches Ergebnis wie zuvor schon die Caspase-3-Aktivitätsmessungen. Die Dox Zugabe führte im Falle der I κ B- ζ Zellen zu einer verstärkten Aktivität der Caspase-9, welche durch IL-6 verstärkt wurde (Abb. 18B). Im Gegensatz dazu konnte in den Kontrollzellen, unabhängig von der Stimulation, keine Zunahme der Caspase-9-Aktivität detektiert werden.

Die beobachtete Permeabilisierung der mitochondrialen Membran sowie die erhöhte Caspase-9-Aktivität geben einen Hinweis darauf, dass I κ B- ζ über den intrinsischen Weg die Apoptose induziert. Darüber hinaus bestätigen die Ergebnisse noch einmal die Verstärkung des pro-apoptotischen Effektes von I κ B- ζ durch die IL-6-Kostimulation.

3.2.6 Die I κ B- ζ induzierte Apoptose wird über Bim und Mcl-1 vermittelt

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte der Mechanismus der I κ B- ζ induzierten Apoptose aufgeklärt werden. Um die Aussage zu bekräftigen, dass I κ B- ζ über den intrinsischen Weg die Apoptose induziert, wurde zuerst die Expression von Proteinen, die im Zusammenhang mit der Permeabilisierung der mitochondrialen Membran während der intrinsischen Apoptose stehen, untersucht. Dabei handelte es sich um Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie.

Für diese Untersuchungen wurden die Lysate der in 3.2.2 beschriebenen Proben verwendet. Die Analyse der Expressionsprofile folgender Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie: Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-X_L, Bim und Mcl-1 zeigte unterschiedliche Ergebnisse. In den beiden Tet-On Zelllinien GFP und GFP-I κ B- ζ konnte, unabhängig von der Stimulation, keine Expression von Bcl-2 sowie keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Proteinen Bcl-X_L (Daten nicht gezeigt), Bak und Bax beobachtet werden. Im Gegensatz dazu ließen sich jedoch für die Proteine Bim und Mcl-1 Unterschiede in deren Expressionsmuster erkennen. Während Bim zu den

`BH3-only'-Proteinen zählt und pro-apoptotisch wirkt, handelt es sich bei Mcl-1 um ein anti-apoptotisches Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie.

Wie aufgrund der vorherigen Ergebnisse zu erwarten war, traten diese veränderten Expressionsmuster nur in den I κ B- ζ exprimierenden Zellen auf. In diesen konnte eine Induktion der Bim-Expression vor allem der Isoformen BimL und BimS nachgewiesen werden (Abb. 19, Spur 10). Die Western-Blot Analysen zeigten ferner, dass durch die IL-6-Kostimulation die bereits durch Dox erhöhte Expression von Bim noch weiter verstärkt wurde. Neben den kleineren Isoformen BimL und BimS wurde hierbei auch die Isoform BimEL verstärkt exprimiert (Abb. 19 Spur 11). Diese Heraufregulierung der Bim-Expression stellt somit einen möglichen Mechanismus für die Wirkung der IL-6-Kostimulation auf die I κ B- ζ induzierte Apoptose dar.

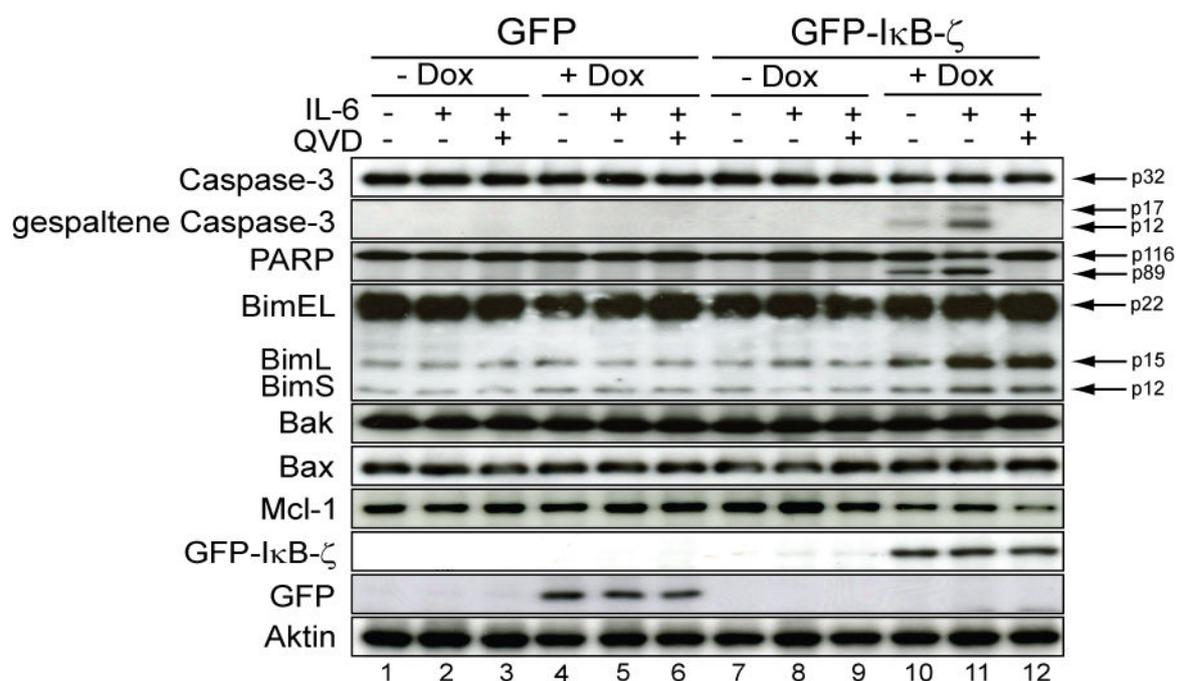


Abbildung 19. Die I κ B- ζ -Expression führt zu einer Heraufregulierung von Bim und simultanen Herunterregulierung von Mcl-1. Die HepG2 Tet-On GFP und GFP-I κ B- ζ Zellen blieben unbehandelt oder wurden wie angegeben für 48 h mit 1 μ g/ml Dox, 20 ng/ml IL-6 und 10 μ M Q-VD-OPH stimuliert. Die Zellen wurden anschließend geerntet, lysiert und gleiche Proteinmengen der Gesamtzell-Lysate in die Western-Blot Analyse eingesetzt. Die Expression von Aktin fungierte als Ladungskontrolle. -/+ Dox: ohne/mit Doxyzyklin, QVD:Q-VD-OPH

Wie bereits erwähnt, führte die Dox Stimulation auch zu einer veränderten Expression von Mcl-1 (Abb. 19, Spur 10-12), wobei diese allerdings, anders als bei Bim, zu einer Reduktion der Expression führte. Mcl-1 zählt zu den anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Proteinfamilie, dessen anti-apoptotische Wirkung auf der

Interaktion mit Bax/Bak beruht und diese dadurch an der Bildung der mitochondrialen Membranpore hindert. Ein weiterer wichtiger Unterschied zur Bim Expression ist, dass die IL-6-Kostimulation keinen Einfluss auf die Expression von Mcl-1 hatte (Abb. 19, Spur 11).

Die zusätzliche Stimulation mit Q-VD-OPH ließ weder auf die Expression von Bim noch auf die von Mcl-1 einen Einfluss erkennen. Zusammengefasst lassen diese Veränderungen der Expressionsmuster vermuten, dass die verstärkte Expression des pro-apoptotischen Proteins Bim, gemeinsam mit der verminderten Expression des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1, zu einer synergistischen Induktion der Apoptose führte.

Diese Annahme konnte durch Bim-Suppressions- sowie Mcl-1-Überexpressionsversuche bestätigt werden. So führte die Verwendung der Bim-siRNA, im Vergleich zu der Kontrolle, sowohl in den Dox als auch in den mit Dox und IL-6 kostimulierten Zellen zu einer mehr als 60% niedrigeren Caspase-3-Aktivität (Abb. 20). Es gilt bei diesen Ergebnissen jedoch zu beachten, dass mit Hilfe der Bim-siRNA nur ein mäßiger Knock-down der Bim Expression erzielt werden konnte, welche außerdem in den stimulierten Zellen auch wieder verstärkt vorlag (Daten nicht gezeigt). Leider führten Veränderungen der Versuchsbedingungen nicht zu einer verbesserten Inhibition der Bim Expression.

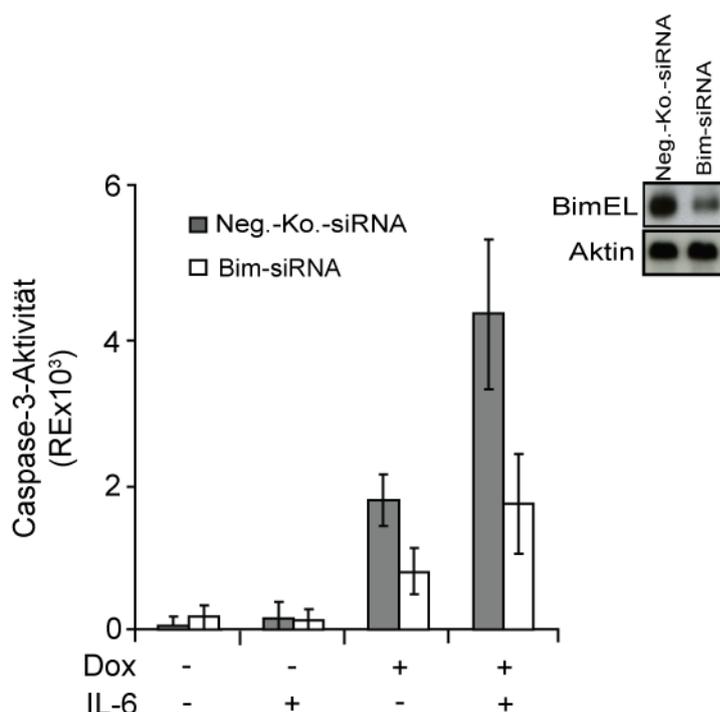
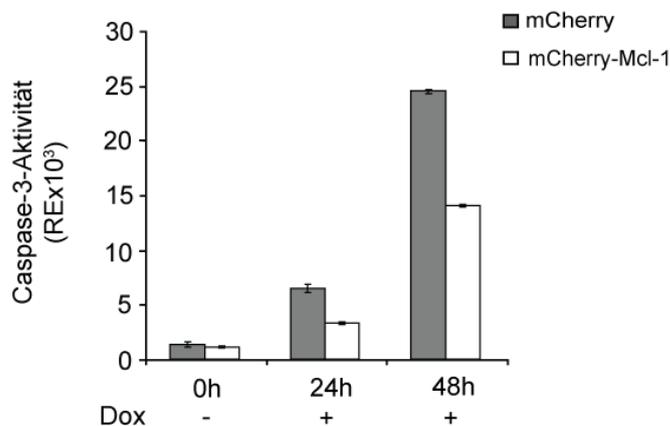


Abbildung 20. Der RNAi vermittelte Knock-down von Bim führt zu einer Inhibition der I κ B- ζ induzierten Apoptose. HepG2 Tet-On GFP-I κ B- ζ Zellen wurden mit 100nM Negativ-Kontroll-siRNA oder Bim-siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion blieben die Zellen unbehandelt oder wurden wie angegeben für weitere 30 h mit 1 μ g/ml Dox und 20ng/ml IL-6 alleine oder in Kombination stimuliert. Anschließend wurde die Caspase-3-Aktivität mittels Ac-DEVD-AMC gemessen sowie der Knock-down von Bim in unstimulierten Zellen mittels Western-Blot Analyse nachgewiesen. Dox: Doxzyklin; Neg.-Ko.-siRNA: Negativ-Kontroll-siRNA; RE: Relative Einheiten

Für die Mcl-1 Überexpressionsversuche wurde die HepG2 Tet-On GFP-I κ B- ζ Zelllinie mit den Plasmiden pmCherry-Mcl-1 oder pmCherry-C1 transfiziert und anschließend mit Dox inkubiert. Da in der vorangegangenen Western-Blot Analyse kein Einfluss der IL-6-Kostimulation auf die Mcl-1 Expression nachgewiesen werden konnte, wurde in diesen Versuchen von einer IL-6-Kostimulation abgesehen.

Die Messung der Caspase-3-Aktivität dieser Zellen ergab, eine um ~ 40 - 50% geringere Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 21A). Zur weiteren Klärung der Bedeutung von Mcl-1, für die I κ B- ζ induzierte Apoptose, wurden Versuche mit dem Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid (CHX) durchgeführt. Mit Hilfe dieser

A



B

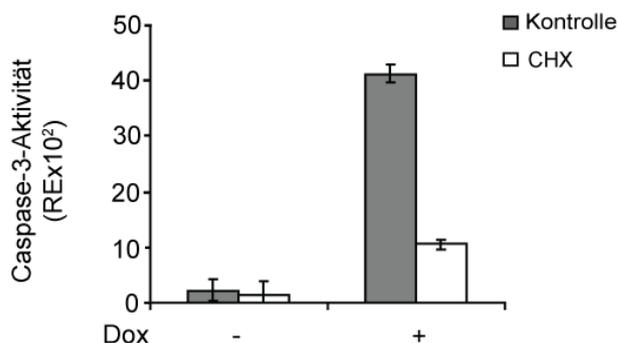


Abbildung 21. Neben der verringerten Mcl-1-Expression ist vor allem die de-novo Synthese von Proteinen entscheidend für die I κ B- ζ induzierte Apoptose. (A) HepG2 Tet-On GFP-I κ B- ζ Zellen wurden mit mCherry-Mcl-1 oder als Kontrolle mit mCherry-C1 transfiziert. 24 h nach der Transfektion schloss sich eine Stimulation für 24 bzw. 48 h mit 1 μ g/ml Dox sowie die Messung der Caspase-3-Aktivität mittels Ac-DEVD-AMC an. **(B)** HepG2 Tet-On GFP-I κ B- ζ Zellen wurden für 24 h mit 1 μ g/ml Dox stimuliert. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation eines Teils der Zellen mit 25 μ M CHX, während der andere Teil nur mit Nährmedium ohne Zusätze inkubiert wurde. Auch hier erfolgte die Messung der Caspase-3-Aktivität mittels Ac-DEVD-AMC. Die Versuche wurden 3-fach durchgeführt und es sind beispielhafte Ergebnisse dargestellt. CHX: Cycloheximid; Dox: Doxyzyklin; RE: Relative Einheiten.

Versuche sollte ermittelt werden, ob eine verminderte Mcl-1-Expression ausreichend für die Induktion der Apoptose ist oder ob eine de-novo Synthese von Proteinen, in diesem Falle von Bim, erfolgen muss. Für diese Versuche wurden HepG2 Tet-On GFP-I κ B- ζ Zellen zur Induktion der Apoptose für 24 h mit Dox stimuliert. Nach der Entfernung des Dox aus dem Nährmedium, wurde ein Teil der Zellen für weitere 24 h mit 25 μ M CHX behandelt, während der Rest der Zellen nur mit Nährmedium ohne Zusätze inkubiert wurde. Die nachfolgende Bestimmung der Caspase-3-Aktivität zeigte, dass die weitere CHX Behandlung im Vergleich zu den Kontrollzellen zu einer starken Verminderung der Caspase-3-Aktivität führte. So führte die zusätzliche Behandlung mit CHX zu einer 80%igen Reduktion der Caspase-3-Aktivität.

Zusammen bestätigen diese Ergebnisse, dass die I κ B- ζ induzierte Apoptose durch Bim und Mcl-1 vermittelt wird und dass vor allem die de-novo Synthese von Proteinen entscheidend für die Apoptoseinduktion ist.

3.2.7 STAT3 ist an der I κ B- ζ vermittelten Apoptose beteiligt

Da IL-6 in Abhängigkeit von I κ B- ζ unerwarteterweise pro-apoptotisch wirkte, und der STAT3-Signaltransduktionsweg durch IL-6 induziert wird, sollte im nächsten Schritt geklärt werden, ob dieser positive Effekt der IL-6-Kostimulation durch STAT3 vermittelt wird oder ob andere Faktoren dafür verantwortlich sind.

Hierfür wurde zuerst der STAT3-Phosphorylierungsstatus von HepG2 Tet-On GFP-I κ B- ζ Zellen mit Hilfe von Western-Blot Analysen untersucht. Diese ließen bereits in unstimulierten Zellen eine geringe basale Phosphorylierung von STAT3 erkennen, welche infolge der IL-6-Stimulation massiv verstärkt wurde (Abb. 22A). Zwar führte die Kostimulation mit Dox und IL-6 ebenfalls zu einer starken Phosphorylierung von STAT3, allerdings wurde diese durch Dox leicht verringert. Da dieser Effekt jedoch nicht eindeutig reproduziert werden konnte, erfolgten diesbezüglich keine weiteren Untersuchungen.

Im weiteren Verlauf wurde mit dem spezifischen STAT3-Inhibitor S3I-201 gearbeitet. Dieser blockiert die SH2-Domäne von STAT3, wodurch dessen Bindung an die gp130-Untereinheit des aktiven IL-6 Rezeptorkomplexes sowie dessen nachfolgende Aktivierung verhindert wird.¹⁴⁶

Die Verwendung von S3I-201 führte zu einer starken Inhibition der Caspase-3-Aktivität und spricht somit für eine Beteiligung von STAT3 an der I κ B- ζ vermittelten Apoptose (Abb. 22B). Bemerkenswerterweise konnte dieser Effekt nicht nur in den

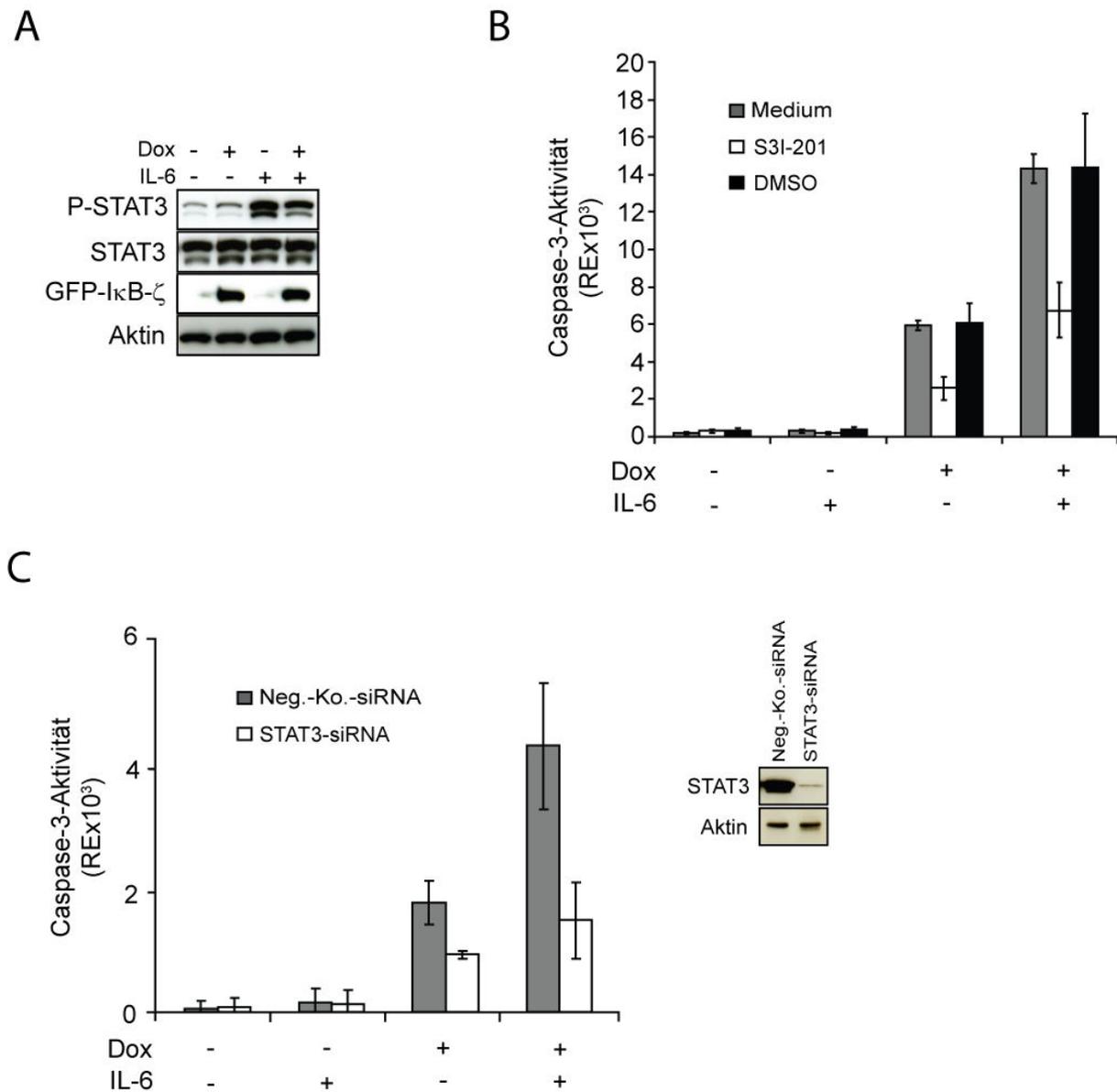


Abbildung 22. STAT3 ist in Ab- und Anwesenheit von IL-6 an der I κ B- ζ vermittelten Apoptose beteiligt. HepG2 Tet-On GFP-I κ B- ζ Zellen wurden unbehandelt belassen oder wie angegeben für 48 h mit 1 μ g/ml Dox und 20 ng/ml IL-6 alleine oder in Kombination stimuliert. **(A)** Western-Blot Analysen zum Nachweis der P-STAT3-, STAT3-, GFP-I κ B- ζ - und Aktin-Expression. In **(B)** wurden die Zellen wie angegeben zusätzlich mit 25 μ M S3I-201 oder als Kontrolle mit dem Lösungsmittel DMSO stimuliert. Im Anschluss erfolgte die Messung der Caspase-3-Aktivität mittels Ac-DEVD-AMC. **(C)** HepG2 Tet-On GFP-I κ B- ζ Zellen wurden mit 100 nM Negativ-Kontroll- oder STAT3-siRNA transfiziert und für 48 h inkubiert, bevor sie wie angegeben für weitere 30 h mit 1 μ g/ml Dox und 20 ng/ml IL-6 alleine oder in Kombination stimuliert wurden. Anschließend erfolgte die Messung der Caspase-3-Aktivität mittels Ac-DEVD-AMC sowie der Nachweis des STAT3-Knock-downs mittels Western-Blot Analyse. DMSO: Dimethylsulfoxid; Dox: Doxzyklyn; Neg.-Ko.-siRNA: Negativ-Kontroll-siRNA; RE: Relative Einheiten.

mit Dox und IL-6 kostimulierten Zellen beobachtet werden, sondern auch in den ausschließlich mit Dox stimulierten Zellen. In beiden Fällen waren die gemessenen Werte im Vergleich zu den Kontrollen um bis ~50% verringert. Dass die Apoptose auch in den ausschließlich mit Dox stimulierten Zellen durch S3I-201 inhibiert wurde bedeutet, dass STAT3 nicht nur abhängig, sondern auch unabhängig von IL-6 zu der I κ B- ζ vermittelten Apoptose beiträgt.

Zur weiteren Bestätigung der Abhängigkeit der I κ B- ζ induzierten Apoptose von STAT3, wurden nachfolgend Experimente mit STAT3-siRNA durchgeführt. Entsprechend den vorangegangenen Versuchen mit dem Inhibitor, führte der RNAi vermittelte Knock-down von STAT3 ebenfalls zu einer starken Inhibition der I κ B- ζ vermittelten Apoptose. Während, im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen, bei den Dox stimulierten Zellen eine Verringerung der Caspase-3-Aktivität um 50% gemessen werden konnte, zeigten die mit IL-6 kostimulierten Zellen im Mittel sogar eine um 65% geringere Caspase-3-Aktivität (Abb. 22C).

In einigen Versuchen konnte der verstärkende Effekt der IL-6-Kostimulation durch den STAT3 Knock-down außerdem beinahe komplett inhibiert werden. Die, im Vergleich zu den vorherigen Versuchen, insgesamt niedrigere Caspase-3-Aktivität ist wahrscheinlich auf eine verkürzte Stimulationszeit mit Dox zurückzuführen. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die Aussagekraft der Ergebnisse.

Zusammen lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass der verstärkende Effekt von IL-6 auf die I κ B- ζ induzierte Apoptose auf eine Aktivierung von STAT3 zurückzuführen ist. Darüber hinaus scheint STAT3 aber auch unabhängig von IL-6 zu der I κ B- ζ vermittelten Apoptose beizutragen.

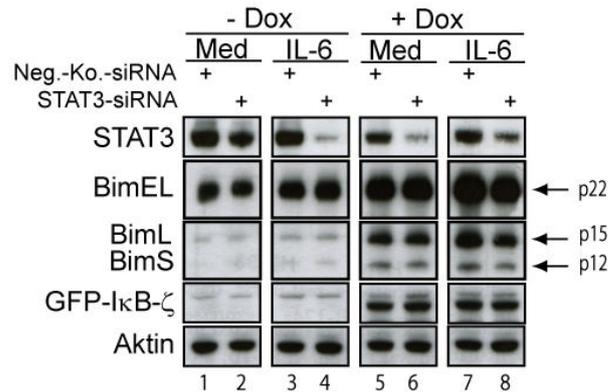
3.2.8 Die Bim-Expression ist abhängig von STAT3

Zur Aufklärung des Mechanismus wie STAT3 an der I κ B- ζ induzierten Apoptose beteiligt ist, wurden die Gesamtzell-Lysate der STAT3 Knock-down Zellen sowie der entsprechenden Kontrollzellen mittels Western-Blot analysiert (Abb. 23A). Diese ließen neben dem Knock-down von STAT3 auch die durch I κ B- ζ verstärkte Expression von Bim, welche durch die IL-6-Kostimulation nochmals verstärkt wurde, erkennen. Des Weiteren konnte, passend zu der zuvor gemessenen verminderten Caspase-3-Aktivität, eine Inhibition der Bim-Expression in den mit Dox und IL-6 kostimulierten Zellen beobachtet werden (Abb. 23A, Spur 8). Obwohl der STAT3

Knock-down ebenso in den ausschließlich mit Dox stimulierten Zellen zu einer Inhibition der Caspase-3-Aktivität führte, konnte in diesen keine Inhibition der Bim Expression nachgewiesen werden (Abb. 23A, Spur 6).

Die Reduzierung der Bim-Expression in den mit Dox und IL-6 kostimulierten STAT3

A



B

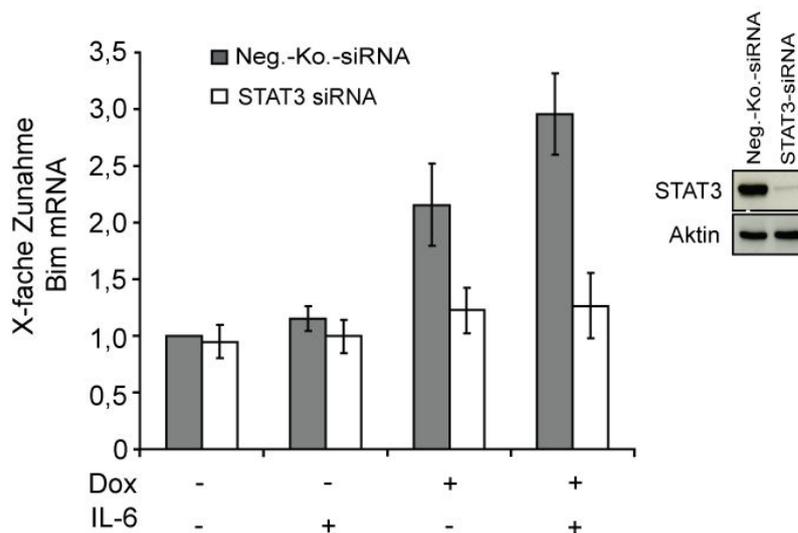


Abbildung 23. Die Bim-Expression ist abhängig von STAT3 und IκB-ζ. HepG2 Tet-On GFP-IκB-ζ Zellen wurden entweder mit 100 nM Negativ-Kontroll- oder STAT3-siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen oder wie angegeben für weitere 30 h mit 1 µg/ml Dox und 20 ng/ml IL-6 alleine oder in Kombination stimuliert. **(A)** Für den Nachweis der STAT3-, Bim-, GFP-IκB-ζ- und Aktin-Expression wurden gleiche Proteinmenge der Gesamtzell-Lysate mittels Western-Blot analysiert. **(B)** Die Bestimmung des Bim mRNA Levels erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Der Knock-down von STAT3 wurde mittels Western-Blot Analyse nachgewiesen. -/+ Dox: ohne/mit Doxyzyklin; Med: nur Nährmedium Neg.-Ko.-siRNA: Negativ-Kontroll-siRNA; RE: relative Einheit.

Knock-down Zellen führte zu der Frage, auf welche Weise STAT3 die Expression von Bim beeinflusst. Die Expression von Proteinen kann auf verschiedenen Ebenen, wie zum Beispiel der Transkription, der Translation oder der Degradation, beeinflusst werden. Da es sich bei STAT3 um einen Transkriptionsfaktor handelt, lag der Verdacht nahe, dass die durch den STAT3 Knock-down verminderte Bim-Expression auf eine Inhibition der Transkription zurückzuführen ist. Um dem nachzugehen, wurden quantitative RT-PCR Analysen durchgeführt.

Während die Stimulation mit IL-6, bei fehlender $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ Expression, keinen Einfluss auf die Bim-Transkription hatte, konnte infolge der Dox Stimulation eine 2,2-fache und im Fall der Kostimulation mit Dox und IL-6 sogar eine 3-fache Zunahme im Vergleich zu den unstimulierten Zellen detektiert werden (Abb. 23B). Diese Ergebnisse entsprechen somit den zuvor beobachteten Veränderungen der Bim-Proteinexpression. Die durch Dox in An- und Abwesenheit von IL-6 induzierte Bim mRNA-Expression wurde durch den STAT3 Knock-down stark reduziert. Dies erklärt zumindest in den mit IL-6 stimulierten, $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ exprimierenden Zellen die verminderte Proteinexpression von Bim durch die STAT3-siRNA.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die verstärkte Bim Expression durch STAT3 auf transkriptioneller Ebene in $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ abhängiger Weise reguliert wird.

3.2.9 Der Proteinkinase-Inhibitor SB203580 inhibiert die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ induzierte Apoptose

In den vorangegangenen Abschnitten konnte der Nachweis einer bedeutenden Rolle von STAT3 für die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ induzierte Apoptose erbracht werden. Von Bedeutung ist hier vor allem die STAT3 abhängige Bim Transkription, die in IL-6 kostimulierten $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ exprimierenden Zellen zu einer verstärkten Expression von Bim führte. Auf Grund der Tatsache, dass es in den Dox stimulierten STAT3 Knock-down Zellen zu einer Inhibition der Caspase-3-Aktivität kam, gleichzeitig jedoch keine Verminderung der Bim Expression detektiert werden konnte, führte zu der Annahme, dass STAT3 möglicherweise noch anderweitig Einfluss auf die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ induzierte Apoptose nimmt.

Da Bim in diesem Prozess eine zentrale Rolle einnimmt, wurde vermutet, dass STAT3 möglicherweise posttranslationale Modifikationen von Bim vermitteln könnte, was die pro-apoptische Wirkung von Bim verstärkt. Denkbar wäre z. B. die Veränderung des Phosphorylierungsmusters von Bim. Denn Untersuchungen

zeigten, dass eine Phosphorylierung von BimEL durch die p38 MAP-Kinase in PC12 Zellen zu einer verstärkten Arsen induzierten Apoptose führte.¹⁴⁷

Darüber hinaus wurde auch schon über ein Zusammenspiel der p38 MAP-Kinase und STAT3 berichtet. So konnte neben einer Beteiligung der p38 MAP-Kinase an der Regulation der STAT3-Transaktivität¹⁴⁸, auch eine Inhibierung des IL-6 abhängigen STAT3-Signaltransduktionsweges durch die p38 MAP-Kinase beobachtet werden.¹⁴⁹

Des Weiteren konnte zudem gezeigt werden, dass eine Glukocorticoid induzierte Aktivierung der p38 MAP-Kinase in lymphoblastischen Leukämiezellen zu einer verstärkten Bim Expression führte.¹⁵⁰

Zusammen führten diese Beobachtungen zu der Frage, ob die p38 MAP-Kinase durch eine mögliche Interaktion mit STAT3 zu der $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ induzierten Apoptose beiträgt.

Aufgrund dessen wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit der Einfluss der p38 MAP-Kinase auf die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ induzierte Apoptose sowie Veränderungen des Phosphorylierungsstatus von Bim untersucht. Hierfür wurden zuerst Versuche mit dem p38-Inhibitor SB203580 durchgeführt. Dessen Verwendung führte zu einer, mit dem STAT3-Inhibitor S3I-201 vergleichbaren, Inhibition der $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ vermittelten Apoptose Induktion. Die Inhibition konnte hierbei sowohl in Dox stimulierten als auch in den mit Dox und IL-6 kostimulierten Zellen beobachtet werden (Abb. 24A). Wurden die Inhibitoren S3I-201 und SB203580 gemeinsam verwendet, konnte sogar eine nahezu vollständige Inhibition der $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ induzierten Apoptose erzielt werden.

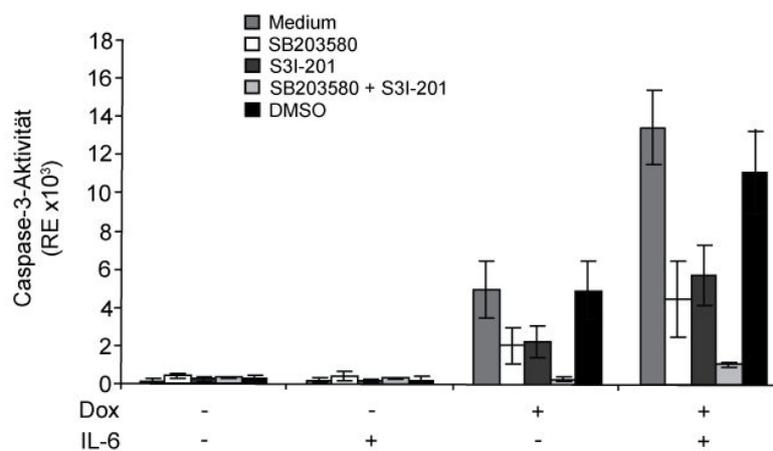
Eine anschließende Western-Blot Analyse der Proben zeigte, dass die Inhibition der $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ vermittelten Apoptose auf eine stark verminderte Expression von Bim zurückzuführen ist. So ist eindeutig die verstärkte Expression von Bim durch $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ erkennbar, welche allerdings durch die einzelnen Inhibitoren abgeschwächt und durch die Kombination beider Inhibitoren sogar noch weiter reduziert wurde, so dass sie wieder denen der unstimulierten Zellen entsprach (Abb. 24B, Spur 5). In den mit Dox und IL-6 kostimulierten Zellen konnte die Kombination der beiden Inhibitoren die Induktion der Bim-Expression zwar nicht vollständig unterbinden, im Vergleich zu den Kontrollen wurde sie jedoch sehr stark inhibiert (Abb. 24B, Spur 9).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die Verwendung des p38-Inhibitors SB203580 durch eine verminderte Bim Expression zu einer geringeren, und in Kombination mit dem STAT3-Inhibitor S3I-201, aufgrund einer fehlenden Bim-

Expression, zu einer beinahe vollständigen Inhibition der $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ induzierten Apoptose führt.

Wie oben erwähnt, sollte auch der Phosphorylierungsstatus von Bim genauer untersucht werden. Da phosphorylierte Proteine im Vergleich zu ihrem unphosphorylierten Pendant aufgrund der zusätzlichen Phosphat Gruppe ein

A



B

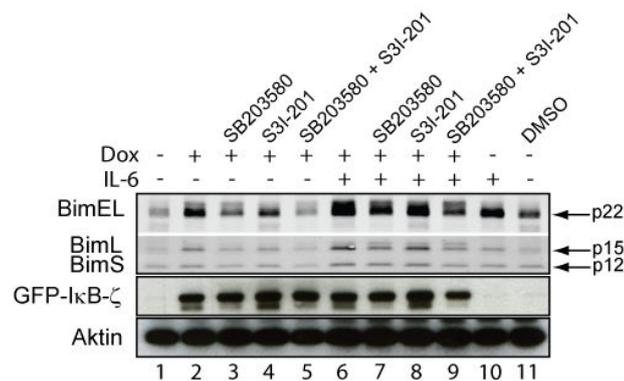


Abbildung 24. Die simultane Verwendung von S3I-201 und SB203580 führt aufgrund einer abgeschwächten Bim-Expression zu einer nahezu vollständigen Inhibition der $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ induzierten Apoptose. HepG2 Tet-On GFP- $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ Zellen wurden unbehandelt belassen oder wie angegeben für 48 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Dox, 20 ng/ml IL-6, 10 μM SB203580 und 25 μM S3I-201 alleine oder in Kombination stimuliert. Im Anschluss wurde die (A) Caspase-3-Aktivität gemessen (mittels Ac-DEVD-AMC) sowie (B) Western-Blot Analysen zum Nachweis der Bim-, GFP- $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ - und Aktin-Expression durchgeführt. Als Kontrollen wurden unstimulierte und ausschließlich mit IL-6 stimulierte Zellen sowie mit DMSO behandelte Zellen mitgeführt. Dox: Doxyzyklin; RE: relative Einheit.

höheres Molekulargewicht aufweisen, kommt es zu einem langsameren Laufverhalten des phosphorylierten Proteins in der SDS-Page und erlaubt dadurch eine Beurteilung des Phosphorylierungsstatus von Proteinen.¹⁵¹ Im Fall der Dox stimulierten und den mit Dox und IL-6 kostimulierten Zellen konnte jedoch kein verlangsamtes Laufverhalten im Vergleich zu den unstimulierten Zellen detektiert werden. Auch die Behandlung der Proben mit λ -Phosphatase führte zu keiner signifikanten Veränderung des Laufverhaltens von Bim (Daten nicht gezeigt). Eine veränderte Phosphorylierung von Bim während der $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ induzierten Apoptose kann somit aller Wahrscheinlichkeit nach ausgeschlossen werden.

3.2.10 p38 hat keinen Einfluss auf die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ induzierte Apoptose

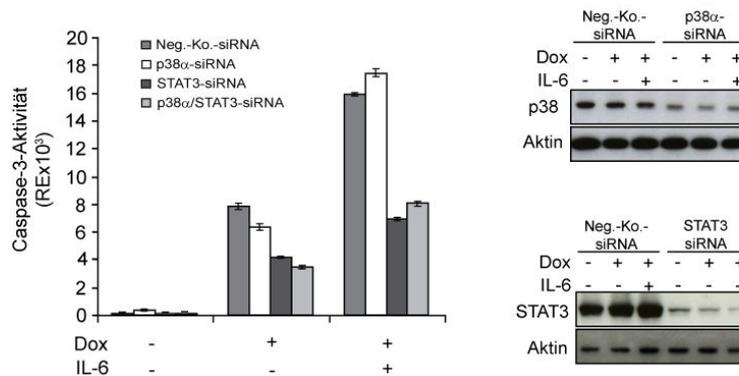
In den nachfolgenden Experimenten sollte mit Hilfe der RNAi gezeigt werden, dass der beobachtete negative Effekt von SB203580 auf die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ induzierte Apoptose tatsächlich auf eine Inhibition der p38 MAP-Kinase zurückzuführen ist. Gleichzeitig sollte durch einen doppelten Knock-down von STAT3 und der p38 MAP-Kinase der synergistische Effekt von SB203580 und S3I-201, der zu einer nahezu vollständigen Inhibition der Apoptose führte, genauer untersucht werden.

Die p38 MAP-Kinase Familie besteht aus folgenden Mitgliedern: p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ . Während p38 α und p38 β ubiquitär exprimiert werden, findet man p38 γ predominant in Muskelzellen und p38 δ in Dünndarm, Hoden und Pankreas.¹⁵²⁻¹⁵⁴ Infolgedessen wurde nur der Einfluss von p38 α und p38 β auf die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ induzierte Apoptose untersucht.

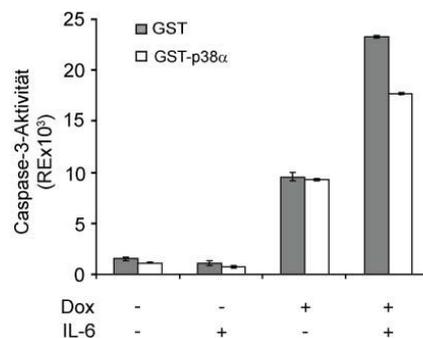
In den ersten dafür durchgeführten Versuchen wurde neben der p38 α -siRNA eine STAT3-siRNA verwendet. Während der Knock-down von STAT3 wie zuvor zu einer Inhibition der Caspase-3-Aktivität führte, hatte der Knock-down von p38 α keinen Einfluss (Abb. 25A). Der Doppel-Knockdown von p38 α und STAT3 führte ebenfalls zu einer Inhibition der Caspase-3-Aktivität, wobei das Ausmaß der Inhibition mit dem des einzelnen STAT3 Knock-downs vergleichbar war.

Parallel zu diesen RNAi-Experimenten wurden auch Überexpressionsversuche mit einem GST-p38 α Konstrukt durchgeführt. Jedoch konnte in diesen Versuchen im Vergleich zu der GST-Kontrolle kein verstärkender Einfluss der p38 α Überexpression auf die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ induzierte Apoptose beobachtet werden (Abb. 25B).

A



B



C

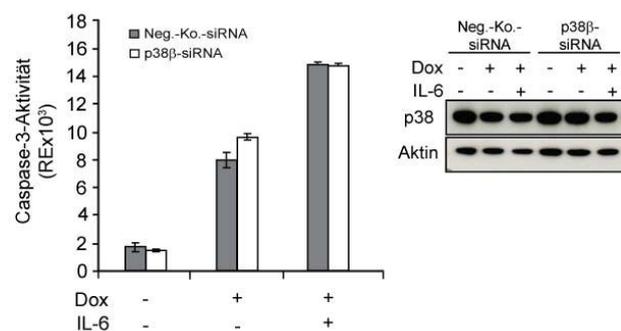


Abbildung 25. p38 hat keinen Einfluss auf den apoptotischen Effekt von I κ B- ζ . (A) HepG2 Tet-On GFP-I κ B- ζ Zellen wurden entweder mit je 100 nM Negativ-Kontroll-, p38 α -, STAT3-siRNA oder mit je 50 nM p38 α - und STAT3-siRNA transfiziert. Nach 48 h Inkubation blieben die Zellen unbehandelt oder wurden wie angegeben für weitere 30 h mit 1 μ g/ml Dox und 20 ng/ml IL-6 stimuliert. Im Anschluss wurde die Caspase-3-Aktivität mittels Ac-DEVD-AMC bestimmt sowie der Nachweis des Knock-downs von STAT3 und p38 α mittels Western-Blot Analysen durchgeführt. (B) HepG2 Tet-On GFP-I κ B- ζ Zellen wurden mit GST-p38 α oder dem pGex-Leervektor transfiziert. 24 h nach der Transfektion blieben die Zellen unbehandelt oder wurden für 48 h wie angegeben mit 1 μ g/ml Dox und 20 ng/ml IL-6 alleine oder in Kombination stimuliert. Anschließend wurde die Caspase-3-Aktivität bestimmt (mittels Ac-DEVD-AMC). (C) HepG2 Tet-On GFP-I κ B- ζ Zellen wurden entweder mit je 100 nM Negativ-Kontroll- oder p38 β -siRNA transfiziert. Nach einer 48 h Inkubation blieben die Zellen unbehandelt oder wurden wie angegeben für weitere 30 h mit 1 μ g/ml Dox und 20 ng/ml IL-6 alleine oder in Kombination stimuliert. Es schloss sich die Messung der Caspase-3-Aktivität mittels Ac-DEVD-AMC an. Die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt und es sind beispielhafte Ergebnisse dargestellt. Dox: Doxyzyklin, Neg.-Ko.-siRNA: Negativ-Kontroll-siRNA; RE: Relative Einheiten.

Im nächsten Schritt galt es nun, den Einfluss von p38 β auf die I κ B- ζ induzierte Apoptose zu untersuchen. Unabhängig von der Stimulation führte die Verwendung der p38 β -siRNA jedoch ebenso wie die α -Isoform zu keiner verringerten Caspase-3-Aktivität (Abb. 25C). Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass es durch die

p38 β -siRNA zu keiner detektierbaren Verringerung der p38 Expression in der Western-Blot Analyse gekommen ist. Da der verwendete Antikörper mit den beiden Isoformen p38 α und p38 β kreuzreagiert, konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die p38 β -siRNA ohne Funktion war oder p38 β gar nicht von den verwendeten Zellen exprimiert wird.

Somit konnte nicht bestätigt werden, dass die p38 MAP-Kinasen die I κ B- ζ induzierte Apoptose beeinflussen.

3.2.11 Die Kinasen CK1 δ , GAK, GSK3 β und RIPK2 haben keinen Einfluss auf die I κ B- ζ induzierte Apoptose

SB203580 galt lange als ein spezifischer Inhibitor der p38 MAP-Kinasen. Allerdings konnten Untersuchungen zeigen, dass neben den p38 MAP-Kinasen noch weitere Kinasen durch SB203580 inhibiert werden.¹⁵⁵ Dazu zählen die Casein Kinase 1 δ (CK1 δ), die Cyclin-G-assozierte Kinase (GAK), die Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) und die Rezeptor interagierende Serin/Threonin Protein Kinase 2 (RIPK2).¹⁵⁵ Um den Einfluss dieser Kinasen auf die I κ B- ζ induzierte Apoptose zu testen, wurden die HepG2 Tet-On GFP-I κ B- ζ Zellen mit siRNAs gegen GAK, GSK3 β und RIPK2 bzw. mit dem spezifischen CK1 δ -Inhibitor D4476 behandelt.

Die Verwendung der RIPK2- und GAK-siRNA führten dabei im Vergleich zu den Kontrollen zu einer stärkeren Induktion der Caspase-3-Aktivität, wobei der Effekt der RIPK2-siRNA stärker und sowohl in den Dox stimulierten als auch in den kostimulierten Zellen zu beobachten war. Dagegen konnte im Fall der GAK-siRNA der verstärkende Effekt nur in den Dox stimulierten Zellen beobachtet werden (Abb. 26A und B). Im Gegensatz dazu hatte der Knock-down der GSK3 β keinen Einfluss auf die I κ B- ζ vermittelte Apoptose Induktion (Abb. 26C). Auch die Verwendung des spezifischen CK1 δ -Inhibitors D4476 hatte keine Auswirkung auf die Caspase-3-Aktivität (Abb. 26D).

Da die Inhibition aller getesteten Kinasen zu keiner verminderten Caspase-3-Aktivität führte, konnte der genaue Mechanismus, über den der Inhibitor SB203580 die I κ B- ζ vermittelte Apoptose hemmt, im Rahmen dieser Dissertation nicht geklärt werden.

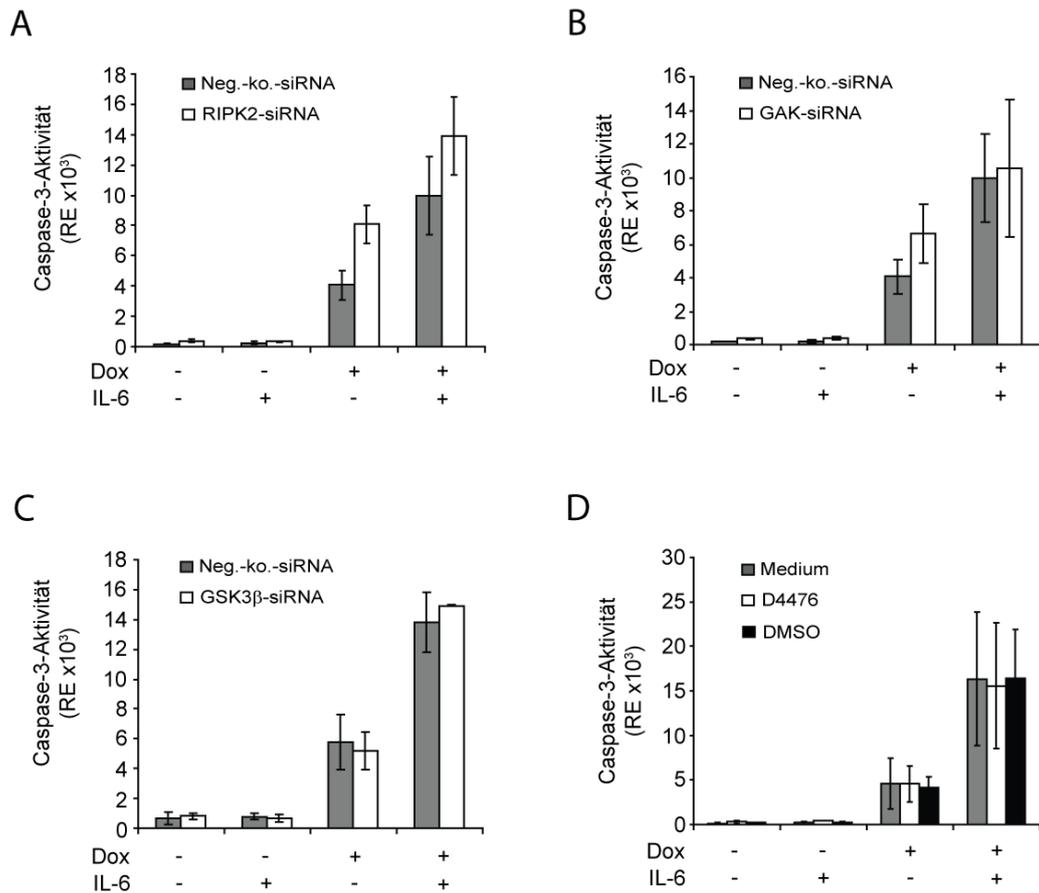


Abbildung 26. Die Kinasen RIPK2, GAK, GSK3 β und CK1 δ haben keinen Einfluss auf die I κ B- ζ induzierte Apoptose. HepG2 Tet-On GFP-I κ B- ζ Zellen wurden entweder mit 100 nM Negativ-Kontroll-, **(A)** RIPK2-, **(B)** GAK- oder **(C)** GSK3 β -siRNA transfiziert und 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entweder unbehandelt gelassen oder für 30 h mit 1 μ g/ml Dox und 20 ng/ml IL-6 alleine oder in Kombination stimuliert, gefolgt von der Bestimmung der Caspase-3-Aktivität. **(D)** HepG2 Tet-On GFP-I κ B- ζ Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen oder für 48 h mit 1 μ g/ml Dox und 20 ng/ml IL-6 alleine oder in Kombination und, wenn angegeben, mit 25 μ M D4476 stimuliert. Als Kontrolle wurden die Zellen auch mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Anschließend wurde die Caspase-3-Aktivität mittels Ac-DEVD-AMC gemessen. Dox: Doxzyklin; Neg.-Ko.-siRNA: Negativ-Kontroll-siRNA; RE: Relative Einheiten.

4 Diskussion

I κ B-Proteine sind essentielle Regulatoren des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der eine zentrale Rolle in der Regulation zahlreicher biologischer Prozesse wie der Entzündungsantwort, Immunität, Wachstumskontrolle und Apoptose spielt. Während die klassischen I κ B-Proteine im Zytoplasma lokalisiert sind, handelt es sich bei I κ B- ζ um ein atypisches I κ B-Protein, welches ausschließlich im Kern lokalisiert ist, wo es in nukleären Körperchen mit dem transkriptionellen Korepressor SMRT und der Histon-Deazetylase 5 (HDAC5) assoziiert. Ein weiterer Unterschied zu den zytoplasmatischen I κ B-Proteinen ist, dass I κ B- ζ nicht konstitutiv exprimiert wird, sondern Entzündungsmediatoren zu einer Induktion führen. Im Gegensatz zu den typischen I κ B-Proteinen ist I κ B- ζ außerdem in der Lage, nicht nur inhibierend, sondern aufgrund seiner Transaktivierungs-Domäne auch aktivierend auf die Genexpression zu wirken. In vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass I κ B- ζ zum einen in einem hohen Maß in der Leber exprimiert wird und zum anderen zu einer verstärkten Expression von IL-6 in verschiedenen Zelltypen führt. Auch andere Autoren berichten von einer I κ B- ζ vermittelten IL-6-Expression in verschiedenen Zelllinien (3T3-, Raw 264.7-, THP1-Zellen) und primären humanen Monozyten.^{29, 31, 40, 141, 142}

IL-6 ist ein Hauptaktivator des STAT3-Signaltransduktionsweges, der besonders in der Leber für Prozesse der Inflammation, Regeneration und Hepatoprotektion von entscheidender Bedeutung ist. Die Aktivierung von STAT3 wird durch die Bindung von IL-6 an den membranständigen IL-6-Rezeptor (IL-6R) initiiert und führt zu einer Oligomerisierung des IL-6R mit zwei gp130-Untereinheiten. Aufgrund der räumlichen Nähe erfolgt anschließend eine gegenseitige Phosphorylierung der gp130 assoziierten Janus Kinasen (Jak), welche wiederum zytoplasmatische Tyrosinreste der gp130-Untereinheit phosphorylieren. Mit Hilfe einer Src-homologie-2 (SH2)-Domäne können STAT3-Moleküle an den phosphorylierten Tyrosinresten des Rezeptorkomplexes binden und werden daraufhin durch die aktiven Jaks phosphoryliert. Phosphorylierte STAT3-Moleküle dissoziieren vom Rezeptorkomplex, dimerisieren und wandern in den Kern, wo sie die Transkription Ihrer Zielgene induzieren können.⁸⁴

Interessanterweise konnte nach IL-6-Stimulation auch für STAT3 eine Akkumulation in nukleären Körperchen sowie eine Assoziation mit den Proteinen CREB bindendes Protein und azetyliertem Histon 4 beobachtet werden. Damit ist sowohl I κ B- ζ als auch STAT3 in nukleären Körperchen mit Proteinen, die an der Regulation der Transkription beteiligt sind, assoziiert.

4.1 I κ B- ζ interagiert mit STAT3

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde vermutet, dass I κ B- ζ durch eine mögliche Einflussnahme auf den IL-6 abhängigen STAT3-Signaltransduktionsweg für hepatozelluläre Prozesse von Bedeutung sein könnte. Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb der Einfluss von I κ B- ζ auf die Aktivität von STAT3 untersucht werden.

Übereinstimmend mit der Beobachtung, dass IL-6 in der Leber vorrangig durch die dort residenten Makrophagen, auch Kupffer Zellen genannt, sekretiert wird^{156, 157}, konnte bei den in dieser Arbeit verwendeten HepG2 Zellen keine I κ B- ζ vermittelte Expression von IL-6 detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dessen ist eine indirekte Aktivierung von STAT3 durch eine I κ B- ζ vermittelte Sekretion von IL-6 ausgeschlossen.

Als erstes wurden Experimente für den Nachweis einer möglichen Kolo-kalisation von I κ B- ζ und STAT3 in nukleären Körperchen durchgeführt. Dabei konnte, mit Hilfe von fluoreszierenden I κ B- ζ - und STAT3-Fusionsproteinen, nach IL-6-Stimulation eine eindeutige Kolo-kalisation von I κ B- ζ und STAT3 in nukleären Körperchen gezeigt werden. Um die Kolo-kalisation von I κ B- ζ und STAT3 zu bestätigen, wurden zudem anschließend Ko-immunpräzipitationen durchgeführt. Die Präzipitation von endogenem STAT3 aus GFP-I κ B- ζ transfizierten HepG2 Zellen lieferte dabei den Nachweis für eine Protein-Komplexbildung durch I κ B- ζ und STAT3. Es konnte folglich eindeutig nachgewiesen werden, dass I κ B- ζ und STAT3 in Anwesenheit von IL-6 nicht nur kolo-kalisiert vorliegen, sondern auch in der Lage sind, gemeinsam Proteinkomplexe zu formen. Infolgedessen war eine Einflussnahme von I κ B- ζ auf die Aktivität von STAT3 sehr wahrscheinlich und wurde in weiterführenden Experimenten eingehend untersucht.

Für die Aktivität von STAT3 als Transkriptionsfaktor, ist vor allem dessen Fähigkeit zur Bindung an die DNA und die Initiierung der Transkription seiner Zielgene von größter Wichtigkeit. Da die Phosphorylierung von STAT3 Voraussetzung für dessen

Aktivität ist, wurde anschließend der Einfluss von I κ B- ζ auf die Phosphorylierung untersucht. Die Ergebnisse ließen jedoch keinen Einfluss von I κ B- ζ auf die Phosphorylierung erkennen, was höchstwahrscheinlich auf die räumliche Trennung der STAT3-Phosphorylierung, die im Zytoplasma stattfindet, und die nukleäre Lokalisation von I κ B- ζ zurückzuführen ist.

Im Gegensatz dazu konnte jedoch in Untersuchungen bezüglich der DNA-Bindungs- und Transaktivierungsaktivität von STAT3 ein Einfluss von I κ B- ζ nachgewiesen werden. So führte die Überexpression von I κ B- ζ zu einer starken Zunahme der IL-6 induzierten STAT3-DNA-Bindungs- sowie Transaktivierungsaktivität. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse ist, dass die Interaktion von STAT3 mit I κ B- ζ zu einer Veränderung der STAT3-Dimer Konformation führt, welche die DNA-Bindung des STAT3/I κ B- ζ -Komplexes begünstigt. Da bekannt ist, dass I κ B- ζ unter anderem auch mit Chromatin modulierenden Proteinen wie HDAC5 kolokalisiert vorkommt, wäre es zudem denkbar, dass der STAT3/I κ B- ζ -Komplex durch die Regulation von Histon-Deazetylasen zu einer Modulation der Chromatinstruktur führt. Infolgedessen wird die Bildung des Prä-Initiierungskomplexes am Promotor gefördert und würde somit die Steigerung der STAT3-Transaktivierungsaktivität durch I κ B- ζ erklären.

4.1.1 Einfluss von I κ B- ζ auf das STAT3-Zielgen SOCS3

Der Nachweis einer Einflussnahme von I κ B- ζ auf die Aktivität von STAT3 ließ erwarten, dass I κ B- ζ folglich in der Lage ist, die Expression von STAT3-Zielgenen zu beeinflussen. Aufgrund der gesteigerten IL-6 induzierten DNA-Bindungs- und Transaktivierungsaktivität von STAT3 durch I κ B- ζ wurde natürlicherweise mit einem verstärkenden Effekt von I κ B- ζ auf die Expression von STAT3-Zielgenen gerechnet. Ein STAT3-Zielgen, dessen Expression hierfür untersucht wurde, ist *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3). Dabei handelt es sich um ein direktes Zielgen von STAT3, welches durch die Inhibition der STAT3-Phosphorylierung zu einer Verminderung der STAT3-Aktivität führt. Die Expression von SOCS3 durch STAT3 stellt somit einen klassischen Rückkopplungsmechanismus dar, der eine überschießende Aktivität von STAT3 verhindern soll.^{158, 159}

Als erstes wurden Untersuchungen zur Feststellung der SOCS3-Promotoraktivität durchgeführt und dabei konnte festgestellt werden, dass I κ B- ζ tatsächlich einen positiven Effekt auf die IL-6 induzierte SOCS3-Promotoraktivität ausübt, da die I κ B- ζ -

Überexpression zu einer Verstärkung der durch IL-6 vermittelten SOCS3-Promotoraktivität führte, während eine I κ B- ζ -siRNA diese reduzierte. Aber auch in Abwesenheit von IL-6 konnte bereits ein verstärkender Effekt von I κ B- ζ beobachtet werden, dieser war jedoch im Vergleich zur IL-6-Stimulation wesentlich schwächer ausgeprägt.

Mittels qRT-PCR-Analysen konnte nachfolgend gezeigt werden, dass die I κ B- ζ vermittelte Erhöhung der SOCS3-Promotoraktivität letztlich auch in einer gesteigerten Transkription des SOCS3-Gens resultierte. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen belegen somit eindeutig, dass die I κ B- ζ vermittelte Steigerung der STAT3 DNA-Bindungs- und Transaktivierungsaktivität zu einer gesteigerten mRNA-Expression von STAT3-Zielgenen, zumindest des SOCS3-Gens, führen kann. Allerdings konnte in den qRT-PCR-Analysen ebenfalls in unbehandelten Zellen eine verstärkte SOCS3 mRNA-Expression in Abhängigkeit von I κ B- ζ detektiert werden. Dass I κ B- ζ in Abwesenheit von IL-6 sowohl zu einer verstärkten Promotoraktivität als auch Transkription von SOCS3 führte, lässt den Rückschluss zu, dass I κ B- ζ zusätzlich auch unabhängig von STAT3 die SOCS3-Expression beeinflussen kann. Denkbar wäre, dass I κ B- ζ durch die Interaktion mit weiteren Faktoren zu einer Erhöhung der basalen Transkription von SOCS3 führt. So konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Sp3 an GC-reiche Elemente des murinen SOCS3-Promotors bindet und dessen Überexpression zu einer Erhöhung der basalen und IL-6 induzierten SOCS3-Transkription führt. Interessanterweise zeigte sich außerdem, dass die transkriptionelle Aktivität von Sp3 abhängig von der Azetylierung bestimmter Lysinreste ist und diese durch HDACs beeinflusst wird. Da im humanen SOCS3-Promotor ebenso diese GC-reichen Elemente vorhanden sind, wäre es möglich, dass I κ B- ζ durch eine direkte Interaktion oder durch die Modulation der Azetylierung von Sp3 zu einer verstärkten basalen SOCS3-Transkription führt.^{160, 161}

Erstaunlicherweise konnte trotz der enorm gesteigerten Transkription des SOCS3-Gens in späteren Versuchen weder in I κ B- ζ exprimierenden, noch in den Kontrollzellen eine verstärkte Expression des SOCS3-Proteins nachgewiesen werden. Zwar wurde in den unstimulierten Zellen eine basale Expression des SOCS3-Proteins detektiert, diese veränderte sich jedoch nicht nach IL-6-Stimulation. Eine genaue Erklärung für dieses Phänomen konnte nicht gefunden werden, es muss sich jedoch um einen posttranskriptionalen Mechanismus handeln. So wurde in einer neueren Studie nachgewiesen, dass die Expression von SOCS3 unter

anderem durch die microRNA-203 reguliert werden kann.¹⁶² Bei microRNAs handelt es sich um eine Klasse von nicht kodierenden RNA Molekülen, welche posttranskriptional die Expression von Genen inhibieren können. Dies geschieht entweder durch die Inhibition der Translation und/oder durch die Degradation der Ziel-mRNA.¹⁶³ Eine Inhibition der SOCS3-Translation durch die microRNA-203 könnte somit eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben der Regulation von SOCS3 auf Proteinebene sein, obwohl eine massive Zunahme der SOCS3-Transkripte beobachtet wurde. Dies würde aber wahrscheinlich nicht nur in Abhängigkeit von I κ B- ζ auftreten.

4.2 Einfluss von I κ B- ζ auf die hepatozelluläre Apoptose

Bei der Apoptose handelt es sich um einen streng regulierten, physiologischen Prozess. Aufgrund des sicheren Abbaus von unerwünschten oder geschädigten Zellen durch die Apoptose ist sie von essentieller Bedeutung für die Embryonalentwicklung, die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase sowie für die Steuerung der Immunantwort.¹⁶⁴

Bereits frühere Untersuchungen ergaben erste Hinweise auf eine Beteiligung von I κ B- ζ an der Apoptoseinduktion. So resultierte ein RNAi vermittelter Knock-down von I κ B- ζ in HeLa D98 Zellen in einer geringeren Sensitivität gegenüber TNF- und anti-CD95 induzierter Apoptose, wohingegen die Überexpression von I κ B- ζ in HT1080 Zellen zu einer Induktion des Zelltodes führte⁴⁰.

4.2.1 I κ B- ζ induziert die Apoptose

In der vorliegenden Arbeit konnte dieser pro-apoptotische Effekt von I κ B- ζ auch im hepatischen Zellsystem nachgewiesen werden. Hierbei führte die transiente Überexpression von I κ B- ζ in HepG2-Zellen zu einem verstärkten Zelltod, der mit einer gesteigerten Caspase-3-Aktivität einherging. Die Aktivierung der Caspase-3, die für eine spätere Phase der Apoptose charakteristisch ist, wurde hier als Apoptoseparameter herangezogen. Es konnte dadurch festgestellt werden, dass es sich um ein Zellsterben durch Apoptose handelt. Wegen immer wieder auftretenden Schwierigkeiten mit der Transfektionseffizienz wurden im weiteren Verlauf der Arbeit polyklonale HepG2-Zelllinien generiert, die GFP-I κ B- ζ oder GFP stabil exprimieren.

Da $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ per se Apoptose induziert, wurden Zelllinien verwendet, in denen die Expression von GFP- $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ bzw. GFP durch Doxyzyklin (Dox) Stimulation induzierbar ist. Wie bei der transienten Expression, so führte auch die Dox induzierte $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Expression zu einer Induktion des Zelltodes. Messungen der Propidiumjodid (PI)-Aufnahme zeigten hierbei 48 h nach Stimulationsbeginn eine starke Zunahme PI positiver Zellen, die sich bis zum Ende der Stimulation fortsetzte. Eine zusätzliche Behandlung mit dem Caspase-Inhibitor Q-VD-OPH (QVD) konnte effektiv die Zunahme von PI positiven Zellen verhindern, was für eine Abhängigkeit des $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ induzierten Zelltodes von Caspasen spricht und somit bestätigt, dass es sich hier um ein Zellsterben durch Apoptose handelt. Die bei diesen Messungen auftretenden hohen Werte von PI positiven Zellen in unstimulierten Proben ist der Durchführung der Methode geschuldet. Um eine distinkte Messung von einzelnen Zellen zu gewährleisten und darüber hinaus ein Verstopfen des Durchflusszytometers zu verhindern, wurden die Zellen vor der Messung mehrfach durch eine 1000er Pipettenspitze gespült. Die dabei auftretenden Scherkräfte führten höchstwahrscheinlich zu einer Schädigung der Plasmamembran, die es dem PI ermöglichte, ins Zellinnere zu gelangen. Da in beiden Zelllinien ein ähnlicher Hintergrund gemessen wurde, konnte dieses Phänomen jedoch außer Acht gelassen werden.

Die anschließende Bestimmung der Caspase-3-Aktivität ließ eindeutig deren Beteiligung am $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ induzierten Zelltod erkennen. Anders als bei der Bestimmung der PI-Aufnahme, konnte jedoch bereits 24 h nach Dox Stimulation eine erhöhte Aktivität detektiert werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass erst die Aktivierung der Effektor-Caspasen zu einem Verlust der Zellmembranintegrität führt und erst anschließend PI in die Zelle gelangen kann. Weitere 24 h später vervierfachte sich die Aktivität und blieb bis zum Ende der Stimulation auf diesem hohem Niveau. In Western-Blot Analysen war die Prozessierung der Caspase-3 ebenfalls nur in den $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ exprimierenden, jedoch nicht in den Kontrollzellen, erkennbar. Konsequenterweise wurde das Caspase-3 Substrat PARP ebenfalls nur in Abhängigkeit von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ gespalten. Wie erwartet, konnte die Spaltung von Caspase-3 und PARP durch die Hemmung von Caspasen mittels QVD blockiert werden. Zusammengefasst belegen diese Ergebnisse eindeutig, dass die Expression von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ in HepG2 Zellen zu einem Caspase abhängigen Zelltod, der Apoptose, führte.

4.2.2 Der verstärkende Effekt von IL-6

In der Leber ist STAT3 vor allem für die Regeneration, Proliferation und Regulation der Akut-Phase Antwort entscheidend. In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass STAT3 z. B. Mäuse vor CD95 induzierten Leberschäden schützt und somit auch über eine anti-apoptotische Wirkung verfügt⁸³. Infolge der nachgewiesenen Interaktion zwischen I κ B- ζ und STAT3 sowie der bekannten anti-apoptotischen Wirkung von STAT3, sollte in einem weiteren Schritt ein möglicher Einfluss von STAT3 auf die I κ B- ζ induzierte Apoptose untersucht werden. Erwartet wurde dabei, dass die Aktivierung von STAT3 durch eine IL-6-Kostimulation mit I κ B- ζ in einer Inhibierung der I κ B- ζ induzierten Apoptose resultiert. Auch für diese Versuche konnte dabei eine indirekte Aktivierung von STAT3 durch I κ B- ζ ausgeschlossen werden, da in den generierten Zelllinien ebenfalls keine Expression von IL-6 detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Überraschenderweise führte die IL-6-Kostimulation nicht zu einer Reduktion der Apoptose sondern vielmehr zu einer dramatischen Verstärkung des pro-apoptotischen Effektes von I κ B- ζ . Sowohl der Prozentsatz an PI positiven Zellen als auch die Caspase-3-Aktivität wurden durch die IL-6-Kostimulation verdoppelt. Die verstärkende Wirkung von IL-6 ließ sich außerdem in Western-Blot Analysen an Hand einer gesteigerten Spaltung der Caspase-3 und PARP erkennen. Der Effekt der IL-6-Kostimulation lässt somit die Vermutung zu, dass es auch während der I κ B- ζ induzierten Apoptose zu einem Zusammenspiel von I κ B- ζ und STAT3 kommt. Zur Aufklärung des genauen Wirkmechanismus bedurfte es jedoch noch weiterführender Experimente, auf die in einem späteren Abschnitt genauer eingegangen wird.

Ob I κ B- ζ während der Apoptoseinduktion zusätzlich zu einer Arretierung des Zellzykluses führte, wurde mit der Hilfe von durchflusszytometrischen Untersuchungen analysiert. Die Bestimmung der Zellzyklus-Verteilung ließ allerdings keine Veränderung durch die I κ B- ζ -Expression erkennen. Einzig die subG1-Population apoptotischer Zellkerne stieg durch I κ B- ζ an und wurde durch die IL-6-Kostimulation verstärkt. Die Ergebnisse decken sich somit mit denen aus den PI-Versuchen und den Caspase-3-Aktivitäts Messungen.

4.2.3 Verlust der mitochondrialen Membranintegrität sowie eine gesteigerte Caspase-9-Aktivität durch I κ B- ζ

Die Induktion der Apoptose kann über zwei verschiedene Wege erfolgen, dem extrinsischen und dem intrinsischen. Während der extrinsische Apoptoseweg durch äußere Faktoren wie zum Beispiel TNF, TRAIL oder CD95-Ligand aktiviert werden kann und zudem Rezeptor gebunden ist, kommt es im Fall des intrinsischen Apoptosewegs durch intrazellulären Stress wie z. B. DNA-Schäden zu einer Aktivierung der Apoptose. Dabei spielen vor allem die Mitochondrien eine entscheidende Rolle. Denn während der intrinsischen Apoptose kommt es zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, gefolgt von der Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma. Dort ist es zusammen mit dem Protein Apaf-1 und der Procaspase-9 an der Formierung des Apoptosoms beteiligt. Innerhalb dieses Apoptosoms liegt die Initiator-Caspase-9 in einem aktiven Zustand vor und kann die Effektor-Caspasen-3 und -7 aktivieren.

Zur Ermittlung, ob I κ B- ζ die Apoptose über den intrinsischen Weg induziert, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen unter der Verwendung von TMRE durchgeführt, die durch die Messung der Caspase-9-Aktivität ergänzt wurden. Die Analysen zeigten deutlich, dass es durch die Dox-Stimulation nur in den I κ B- ζ , jedoch nicht in den Kontrollzellen sowohl zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, als auch zu einer Aktivierung der Caspase-9 kam. In beiden Fällen konnte außerdem erneut der verstärkende Effekt der IL-6-Kostimulation beobachtet werden. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis auf eine Induktion der Apoptose durch die Aktivierung des intrinsischen Weges. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass I κ B- ζ zu einem veränderten Ausprägungsmuster verschiedener Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie führte (s. unten). Eine Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges durch die Spaltung des Caspase-8-Substrates Bid kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

4.2.4 Bedeutung der Bcl-2-Proteine Bim und Mcl-1 für die I κ B- ζ induzierte Apoptose

Eine strikte Steuerung der Apoptose ist unabdingbar für die zelluläre Homöostase eines Organismus. Kommt es zu einer Störung der apoptotischen Regulation, kann

dies schwerwiegende Folgen nach sich ziehen. So kann eine unzureichende oder blockierte Apoptose unter anderem zur Entwicklung von Krebs oder Autoimmunerkrankungen führen.

Ein wichtiger Kontrollpunkt in dem durch $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ wahrscheinlich aktivierten intrinsischen Apoptoseweg stellen die Mitochondrien dar. Wie bereits erwähnt, kommt es während der Apoptose zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, die zur Freisetzung von Cytochrom c und letztlich zur Aktivierung der proteolytischen Effektor-Caspasen führt. Dieser Prozess der Membran-Permeabilisierung unterliegt einer strengen Regulation durch die Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie. An Hand von strukturellen Unterschieden sowie verschiedenen Funktionen in der Apoptose-Regulation wird die Bcl-2-Proteinfamilie in drei Gruppen unterteilt. Zum einen sind dies die anti-apoptotischen Mitglieder, zu denen Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, A1 und Mcl-1 gehören, zum anderen die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak, die trotz ihrer pro-apoptotischen Wirkung eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Bcl-2 aufweisen, und zuletzt die pro-apoptotischen `BH-3 only`-Proteine Bik, Bad, Bid, Bim, Bmf, Noxa und Puma.¹³⁰

Mcl-1 (*myeloid cell leukemia sequence 1*) zählt zu den anti-apoptotisch wirksamen Bcl-2-Proteinen und konnte erstmals in PMA stimulierten myeloiden Leukämiezellen nachgewiesen werden.¹⁶⁵ Die anti-apoptotische Wirkung von Mcl-1 beruht auf einen inhibitorischen Effekt, der die Bildung der mitochondrialen Membranpore durch Bax und Bak verhindert.^{166, 167} Mcl-1 verfügt im Gegensatz zu den anderen Bcl-2-Proteinen über eine relative kurze Halbwertszeit, die vor allem durch die proteasomale Degradation reguliert wird.^{168, 169} In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Induktion der Apoptose mit einer abgeschwächten Expression von Mcl-1 verknüpft war. So wurde belegt, dass die Inhibition der Mcl-1 Expression durch Blockierung der Synthese und einem verstärkten proteasomalen Abbau essentiell für die Induktion des intrinsischen Apoptoseweges war. In einer weiteren Arbeit konnte der proteasomale Abbau von Mcl-1 für die Induktion der Apoptose in Cisplatin stimulierten renalen Tubuluszellen verantwortlich gemacht werden.¹⁷⁰

In den hier vorliegenden Experimenten konnte ebenfalls eine verringerte Expression von Mcl-1 als Folge der $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Expression beobachtet werden. Dass die geringere Ausprägung von Mcl-1 tatsächlich für die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ induzierte Apoptose von Bedeutung ist, wurde mit Hilfe der Überexpression von Mcl-1 in $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ exprimierenden Zellen,

welche zu einer Reduzierung der Caspase-3-Aktivität um bis zu 50% führte, bestätigt. Dass es trotz der massiven Überexpression von Mcl-1 nicht zu einer vollständigen Inhibition der Apoptose kam, ist ein deutlicher Hinweis für das Vorhandensein weiterer Faktoren, die entscheidend für die I κ B- ζ induzierte Apoptose sind. Versuche mit dem Translations-Inhibitor Cycloheximid (CHX) untermauern diese Vermutung, da die Verwendung von CHX zu einer 80%igen Verringerung der I κ B- ζ induzierten Caspase-3-Aktivität führte und somit zu einer starken Inhibition der Apoptose. Daher ist es wahrscheinlich, dass die verringerte Expression des anti-apoptotischen Mcl-1 nur zu einem kleinen Teil zur I κ B- ζ induzierten Apoptose beiträgt und dass vor allem die Neusynthese pro-apoptotischer Proteine von entscheidender Bedeutung für die Apoptoseinduktion ist. Für einen geringen Einfluss von Mcl-1 auf diesen Prozess spricht außerdem die Beobachtung, dass IL-6 keinen Einfluss auf die Mcl-1-Expression hatte, obwohl es den pro-apoptotischen Effekt von I κ B- ζ dramatisch erhöhte.

Ob ein verstärkter proteasomaler Abbau von Mcl-1 für dessen verringerte Expression verantwortlich ist, sollte durch die Verwendung des Proteasom-Inhibitors MG-132 geklärt werden. Die Inkubation der Zellen mit MG-132 führte jedoch in kürzester Zeit zu einem massiven Zelltod und ließ deshalb bezüglich eines verstärkten proteasomalen Abbaus keine Rückschlüsse zu. Da jedoch Expressionsstudien mittels qRT-PCR keine signifikanten Veränderungen der Mcl-1-Transkription durch I κ B- ζ erkennen ließen (Daten nicht gezeigt), spricht dies eher für eine verstärkte proteasomale Degradation von Mcl-1 in Abhängigkeit von I κ B- ζ .

Neben der reduzierten Ausprägung von Mcl-1 konnte in den Versuchen gleichzeitig eine verstärkte Expression von Bim festgestellt werden. Bim zählt zu den 'BH3-only'-Proteinen und wirkt pro-apoptotisch. Für den Mechanismus, durch den Bim zur Induktion der Apoptose führt, werden zwei Modelle beschrieben. Im ersten, dem direkten Modell führt die Bindung von Bim an Bax und Bak zu deren Aktivierung und der anschließenden Formierung der mitochondrialen Membranpore durch Bax und Bak. Das zweite Modell beschreibt eine indirekte Aktivierung von Bax und Bak durch Bim. Hierbei bindet Bim an anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie, wodurch diese Bax und Bak nicht mehr inhibieren können, was letztlich zu der Bildung der mitochondrialen Membranpore führt.¹³⁷⁻¹³⁹ Interessant ist, dass Bim in der Lage ist, alle anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine zu binden. Dass dieser Umstand Bim zu einem starken Induktor der Apoptose macht, konnte an Hand von

Zytotoxizitätstests mit Fibroblasten gezeigt werden. In diesen Tests führte die Expression von Bim, im Vergleich zu den anderen `BH-3-only`-Proteinen, zur höchsten Zellsterblichkeit.¹⁷¹ Weitere zahlreiche Berichte belegen die pro-apoptotische Wirkung von Bim. So führt zum Beispiel die Inkubation von HepG2 und HuH7 Zellen, beides Hepatoblastoma Zelllinien, mit gesättigten Fettsäuren auf Grund einer verstärkten Expression von Bim zur Apoptose.^{172, 173} Durch differentielles Splicing entstehen drei Bim-Isoformen, BimEL, BimL und BimS. Alle drei verfügen über eine starke pro-apoptotische Wirkung und werden ubiquitär ausgeprägt.¹⁷⁴

In der vorliegenden Arbeit konnte in den $\kappa\text{B-}\zeta$ exprimierenden Zellen eine verstärkte Expression dieser drei Bim Isoformen detektiert werden, wobei der Effekt vor allem bei BimL und BimS am stärksten ausgeprägt war. Dass die $\kappa\text{B-}\zeta$ induzierte Apoptose auf eine verstärkte Bim-Expression zurückzuführen ist, konnte durch Bim-Suppressionsversuche, die zu einer starken Inhibition der Apoptose führten, bestätigt werden. Während die IL-6-Stimulation keinen Einfluss auf die Mcl-1-Expression nahm, führte sie zu einer verstärkten Expression aller drei Bim-Isoformen in den $\kappa\text{B-}\zeta$ exprimierenden Zellen und könnte somit einen Wirkmechanismus darstellen, über den IL-6 zu einer Zunahme der $\kappa\text{B-}\zeta$ induzierten Apoptose führt. Diese Annahme konnte durch den Knock-down von Bim bestätigt werden. So konnte durch die Verwendung der Bim-siRNA der verstärkende Effekt von IL-6 auf die $\kappa\text{B-}\zeta$ vermittelte Caspase-3-Aktivität sehr stark inhibiert werden, was darauf hindeutet, dass der verstärkende Effekt von IL-6 auf die $\kappa\text{B-}\zeta$ induzierte Apoptose tatsächlich auf eine gesteigerte Expression von Bim zurückzuführen ist.

Zusätzlich durchgeführte Analysen mittels qRT-PCR unterstützen diese These, da in den $\kappa\text{B-}\zeta$ exprimierenden Zellen ebenfalls eine gesteigerte Bim-Transkription detektiert werden konnte, die durch IL-6 nochmals verstärkt wurde.

Zusammengefasst lassen diese Resultate die Schlussfolgerung zu, dass es durch $\kappa\text{B-}\zeta$ zu einer simultanen Herunterregulierung des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 und Hochregulierung des pro-apoptotischen Proteins Bim kommt, die letztendlich zu einer synergistischen Induktion der Apoptose führen. Dabei wäre denkbar, dass der anti-apoptotische Effekt von Mcl-1 einerseits durch die verringerte Expression und andererseits besonders durch die erhöhte Konzentration an Bim-Molekülen, welche die übrigen Mcl-1-Moleküle binden und inhibieren können, stark verringert werden könnte. Obwohl es bisher keine weiteren Hinweise darauf gibt, könnte Bim darüber

hinaus weitere anti-apoptotische Bcl-2-Proteine binden, um so deren anti-apoptotische Wirkung zu inhibieren und die Apoptose zu induzieren.

4.2.5 Die Rolle von STAT3 in der I κ B- ζ induzierten Apoptose

Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, zeigte IL-6 per se keinen apoptotischen Effekt, wohingegen eine Kostimulation mit Dox und IL-6 zu einer Verstärkung der I κ B- ζ induzierten Apoptose führte, was auf eine gesteigerte Expression von Bim zurückgeführt werden kann. Da der IL-6 abhängige STAT3-Signaltransduktionsweg jedoch für seine anti-apoptotische Wirkung bekannt ist, stellte sich die Frage, ob dieser positive Effekt von IL-6 tatsächlich auf eine Aktivierung von STAT3 zurückzuführen ist oder ob andere Faktoren für den beobachteten Effekt von IL-6 verantwortlich sind.

In den folgenden Experimenten sollte daher unter Verwendung des spezifischen STAT3-Inhibitors S3I-201 und der STAT3-siRNA der Einfluss von STAT3 auf die I κ B- ζ induzierte Apoptose genauer untersucht werden. In beiden Fällen führte die Anwendung sowohl in den Dox stimulierten als auch in den mit Dox und IL-6 kostimulierten Zellen zu einer starken Inhibition der I κ B- ζ induzierten Caspase-3-Aktivität. Des Weiteren führte die STAT3-siRNA zu einer beinahe vollständigen Inhibition des verstärkenden Effektes von IL-6, was auf eine fehlende Zunahme der Bim-Expression zurückgeführt werden kann. Denn Western-Blot Analysen offenbarten hier, dass das Niveau der Bim-Expression in den mit Dox und IL-6 kostimulierten STAT3 Knock-down Zellen mit dem der ausschließlich mit Dox stimulierten STAT3 Knock-down Zellen vergleichbar war.

Dass der STAT3-Inhibitor und die STAT3-siRNA ebenfalls in den ausschließlich mit Dox stimulierten Zellen zu einer Inhibition der I κ B- ζ vermittelten Apoptose führten, lässt vermuten, dass I κ B- ζ auch unabhängig von IL-6 mit STAT3 interagiert.

Dies könnte zum einen auf eine basale Phosphorylierung von STAT3 zurückzuführen sein, die anhand von Western-Blot Analysen in unstimulierten Zellen detektiert werden konnte, und zum anderen könnte I κ B- ζ aber auch mit unphosphoryliertem STAT3 (U-STAT3) interagieren. Wie berichtet wurde, ist U-STAT3 dazu in der Lage, ohne eine vorhergehende IL-6 vermittelte Phosphorylierung in den Kern zu wandern, da das Auftreten einer phosphorylierungs-defizienten STAT3-Mutante im Kern in verschiedenen, unstimulierten Zellen beobachtet wurde.¹⁷⁵ An Hand von

Genexpressions-Studien konnte zudem eine transkriptionelle Aktivität von USTAT3 nachgewiesen werden. Dabei führte die Transfektion einer phosphorylierungsdefizienten STAT3-Mutante zu einer Veränderung der Ausprägungsmuster von 1191 Genen. Die Expression von weiteren 869 Genen wurde außerdem sowohl von Wildtyp-STAT3 als auch von der STAT3-Mutante reguliert.¹⁷⁶

Somit wäre es denkbar, dass I κ B- ζ entweder mit dem basal phosphorylierten STAT3 oder dem USTAT3 oder sogar mit Beiden, nach Translokation in den Kern, interagiert. Gestützt wird diese These zusätzlich durch weiterführende Untersuchungen mittels qRT-PCR. Bei diesen Analysen konnte gezeigt werden, dass STAT3 in Ab- und Anwesenheit von IL-6 essentiell für die Bim-Transkription ist. Denn der Knock-down von STAT3 führte nicht nur in den mit Dox und IL-6 kostimulierten Zellen zu einer fast vollständigen Inhibition der Bim-Transkription, sondern auch in den ausschließlich mit Dox stimulierten Zellen. Eine exakte Schlussfolgerung, ob I κ B- ζ mit dem basal phosphorylierten STAT3 oder dem USTAT3 interagiert, kann jedoch mit den vorliegenden Ergebnissen nicht getroffen werden. Hierfür bedarf es noch weiterer Experimente, z. B. mit Phosphorylierungs-defizienten STAT3-Mutanten.

Dass es sowohl in den ausschließlich mit IL-6 stimulierten Zellen als auch in den I κ B- ζ exprimierenden STAT3 Knock-down Zellen zu keiner Induktion der Bim-Transkription kam, bedeutet zudem, dass I κ B- ζ und STAT3 alleine nicht zu einer verstärkten Bim-Transkription führen können. Eine Interaktion der beiden Proteine ist infolgedessen Voraussetzung für die Initiierung der Bim-Transkription und spricht für eine Funktion von I κ B- ζ als Koaktivator von STAT3.

Erstaunlicherweise führte der Knock-down von STAT3 in Abwesenheit von IL-6 zu einer Inhibition der Bim-Transkription in I κ B- ζ exprimierenden Zellen, die Proteinexpression von Bim wurde jedoch nicht vom STAT3 Knock-down negativ beeinflusst. Dennoch kam es trotz der unveränderten Expression von Bim in den Dox stimulierten STAT3 Knock-down Zellen zu einer starken Inhibition der Apoptose. Diese Beobachtungen führen zu folgenden Schlussfolgerungen: 1. Die I κ B- ζ Expression führt unabhängig von der Transkription zu einer gesteigerten Proteinexpression von Bim. Mögliche Mechanismen wären zum Beispiel eine gesteigerte Translation, erhöhte Stabilität der Bim-mRNA oder des Proteins. Die hier vorliegenden Ergebnisse lassen jedoch keine Rückschlüsse auf den möglichen

Mechanismus zu, so dass noch weiterführende Experimente zu dessen Klärung notwendig sind.

2. STAT3 scheint neben der verstärkten Transkription von Bim noch über andere Mechanismen zur I κ B- ζ induzierten Apoptose beizutragen. Wegen der zentralen Rolle von Bim ist hierbei die Modulation der Bim-Aktivität durch STAT3 ein vorstellbarer Mechanismus. Der Verdacht einer gesteigerten Phosphorylierung von Bim durch STAT3, welche zu einer verstärkten apoptotischen Wirkung von Bim führen kann, konnte jedoch nicht bestätigt werden.^{177, 178} Experimente diesbezüglich ließen keine Veränderung der Bim-Phosphorylierung, weder durch I κ B- ζ noch STAT3, erkennen (Daten nicht gezeigt). Die Ursache für die Bim unabhängige Inhibition der Apoptose durch den STAT3 Knock-down bleibt somit weiterhin ungeklärt und ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Am Bemerkenswertesten ist jedoch die Tatsache, dass STAT3, welches bislang als anti-apoptotisch galt und im Zusammenhang mit der Tumorgenese als Onkogen betrachtet wird, durch die Interaktion mit I κ B- ζ eine entgegengesetzte Wirkung entfaltet und aufgrund der induzierten Bim-Transkription pro-apoptotisch wirkt. Dies bedeutet, dass I κ B- ζ durch die Interaktion mit STAT3 nicht nur dessen Aktivität regulieren kann, sondern auch in der Lage ist, die grundlegende Wirkung von STAT3 zu modulieren, was von klinischer Relevanz sein könnte.

4.2.6 Die Verwendung von SB203580 führt zu einer Inhibition der Apoptose

Parallel zu den Versuchen bezüglich der Bim-Phosphorylierung wurden Experimente mit dem p38 MAP-Kinasen-Inhibitor SB203580 durchgeführt. Der Anlass hierfür war, dass die p38 MAP-Kinasen zum einen in der Lage sind, Bim zu phosphorylieren und darüber hinaus die Aktivität von STAT3 zu modulieren.^{147-149, 179}

Weil es durch den STAT3 Knock-down zu einer Inhibition der I κ B- ζ induzierten Apoptose kam, gleichzeitig die Bim-Expression aber unverändert blieb, wurde vermutet, dass im Rahmen der I κ B- ζ vermittelten Apoptose ein Crosstalk des STAT3-Signalwegs mit dem p38 MAP-Kinase-Signalwegs stattfindet, der letztlich zu einer p38 MAP-Kinase vermittelten Bim-Phosphorylierung und damit zu einer gesteigerten

pro-apoptotischen Wirkung führt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Versuche mit dem p38-Kinase-Inhibitor SB203580 durchgeführt. Obwohl Resultate der Phosphorylierung von Bim betreffend keine Veränderung durch I κ B- ζ oder der IL-6-Kostimulation zeigten, führte die Verwendung von SB203580 zu einer fast vollständigen Inhibition der Apoptose. Anschließende Western-Blot Analysen offenbarten, dass eine stark reduzierte Expression von Bim für den inhibitorischen Effekt von SB203580 verantwortlich ist. Im nächsten Schritt sollte mittels p38-siRNA der Effekt von SB203580 nachempfunden werden, um so die Beteiligung der p38 MAP-Kinase an der I κ B- ζ induzierten Apoptose zu bestätigen. Der Gebrauch der p38 α - und p38 β -siRNAs hatten aber ebenso wie die Überexpression von p38 α keinerlei Auswirkungen auf die Apoptose und schließt somit eine Beteiligung der p38 MAP-Kinasen an der I κ B- ζ induzierten Apoptose aus. Nachdem eindeutig gezeigt werden konnte, dass die p38 MAP-Kinase nicht von Bedeutung war, stellte sich die Frage, wie die Behandlung mit SB203580 zu dem beobachteten Effekt führte.

Weitere Literaturrecherchen dazu ergaben, dass der p38-Inhibitor SB203580 neben p38 α und p38 β noch eine Vielzahl weiterer Kinasen inhibiert.¹⁵⁵ Zu diesen Kinasen zählen die GSK3 β , CK1 δ , RIPK2 und die GAK, welche ähnlich stark wie die p38 MAP-Kinasen durch SB203580 inhibiert werden. Versuche mit Inhibitoren und siRNAs für die entsprechenden Kinasen zeigten jedoch ebenfalls keine negativen Auswirkungen, die mit der Behandlung durch SB203580 zu vergleichen wären. Allerdings konnte der Knock-down von RIPK2 und GAK aufgrund des Fehlens eines funktionierenden Antikörpers nicht nachgewiesen werden.

Weitere Untersuchungen zum Mechanismus, welcher der SB203580 vermittelten Reduktion der Bim-Expression zugrunde liegen, konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

I κ B- ζ gehört zu den ungewöhnlichen Mitgliedern der I κ B-Proteinfamilie, die sich sowohl strukturell als auch funktionell von den klassischen I κ B-Proteinen unterscheiden. I κ B- ζ ist im Zellkern lokalisiert, wo es als induzierbares Protein exprimiert wird und kann nicht nur inhibierend auf die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B wirken, sondern, aufgrund seiner Transaktivierungsdomäne, die Genexpression auch aktivieren. Da I κ B- ζ sehr stark in der Leber exprimiert wird und darüber hinaus die Expression von IL-6, einem Aktivator des STAT3-Signaltransduktionsweges, der eine herausragende Rolle im hepatischen Zellsystem spielt, in verschiedenen Zelltypen induziert, war es Ziel dieser Arbeit, die Bedeutung von I κ B- ζ für hepatozelluläre Prozesse zu charakterisieren. Hauptaugenmerk galt dabei der Interaktion von I κ B- ζ mit STAT3 und deren funktionelle Konsequenzen für die Aktivität von STAT3 sowie für die hepatozelluläre Apoptose.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum hepatozellulären Zelltod offenbarten, dass I κ B- ζ durch die Veränderung der Expression regulatorischer Proteine Apoptose in HepG2 Zellen induzieren kann. Bei diesen regulatorischen Proteinen handelt es sich um das pro-apoptotische Protein Bim und das anti-apoptotische Protein Mcl-1, beides Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie. Die Ergebnisse lassen hierbei den Schluss zu, dass die Verstärkung der Bim-Expression, bei gleichzeitig verringerter Mcl-1-Expression, zu einer synergistischen Induktion der Apoptose führte.

Obwohl der IL-6 abhängige STAT3-Signaltransduktionsweg bisher als anti-apoptotisch in Erscheinung getreten ist, konnte überraschenderweise im Zusammenhang mit dem I κ B- ζ induzierten Zelltod eine pro-apoptotische Wirkung beobachtet werden. So führte die IL-6-Stimulation zu einer Verstärkung des pro-apoptotischen Effektes von I κ B- ζ . Nähere Untersuchungen hierzu zeigten, dass dieser verstärkende Effekt von IL-6 auf einer STAT3 abhängigen zusätzlichen Steigerung der Bim-Expression zurückzuführen ist. Anschließende Expressionsanalysen ließen erkennen, dass bereits die Überexpression von I κ B- ζ in Anwesenheit von STAT3 zu einer Induktion der Bim-Transkription führte, welche durch die Zugabe von IL-6 verstärkt wurde. Jedoch sowohl die Überexpression von I κ B- ζ in STAT3 Knock-down Zellen als auch die IL-6 vermittelte Aktivierung von

STAT3 bei fehlender I κ B- ζ Expression führte nicht zu einer Induktion der Bim-Transkription, was für eine Funktion von I κ B- ζ als Koaktivator von STAT3 spricht.

Erstaunlicherweise führte der Knock-down von STAT3 in I κ B- ζ exprimierenden Zellen zu einer Inhibition der Bim-Transkription und einer verringerten Apoptoseinduktion, obwohl die Bim-Proteinmenge vom STAT3 Knock-down unbeeinflusst blieb. Dies lässt vermuten, dass zum einen I κ B- ζ transkriptionsunabhängig die Protein-Menge von Bim erhöhte, z. B. durch eine Stabilisierung der Bim-mRNA, und zum anderen dass STAT3 über eine weitere, Bim unabhängige Funktion, oder über die Modulation der Bim-Aktivität zur I κ B- ζ vermittelten Apoptose beiträgt. Die dafür verantwortlichen Mechanismen konnten allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden.

Die Annahme, dass I κ B- ζ als Koaktivator für STAT3 fungiert, wird des Weiteren durch Untersuchungen unterstützt, welche eindeutig eine Kolo-kalisation und Interaktion von I κ B- ζ mit STAT3 zeigten. Infolgedessen kommt es zu einer Erhöhung der IL-6 induzierten DNA-Bindungs- sowie Transaktivierungsaktivität von STAT3 durch I κ B- ζ . Diese I κ B- ζ vermittelte Steigerung der STAT3-Aktivität führte letztendlich auch zur positiven Regulation des STAT3-Zielgens SOCS3. Überraschenderweise führte die erhöhte Transkription des SOCS3-Gens jedoch nicht zu einer gesteigerten Expression des Proteins, was für eine posttranskriptionelle Regulation spricht. Zusammenfassend konnten wichtige Einblicke in I κ B- ζ abhängige Regulationsprozesse, insbesondere durch die Interaktion mit STAT3, in HepG2 Zellen gewonnen werden. I κ B- ζ reguliert nicht nur die STAT3-Aktivität positiv, sondern übt auch pro-apoptotische Effekte aus. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung, dass I κ B- ζ die grundlegende anti-apoptotische Funktion von STAT3 zu einem Apoptose fördernden Effekt moduliert, von besonderer Bedeutung.

Da der IL-6 abhängige STAT3-Signaltransduktionsweg auch eine zentrale Rolle in der Inflammation und Regeneration der Leber einnimmt, ist zu vermuten, dass I κ B- ζ über die Regulation der STAT3-Aktivität auch auf diese Prozesse Einfluss nimmt.

5 Summary

I κ B- ζ belongs to the unusual members of the I κ B protein family, which differ from the classical I κ B proteins in structural and functional aspects. It is localized within the nucleus, where it is expressed as an inducible protein. I κ B- ζ is not only able to inhibit the transcriptional activation of NF- κ B but, due to its transactivation domain, also to activate gene expression. I κ B- ζ is strongly expressed in liver tissue and induces the expression of IL-6 in several cell types. Since IL-6 is an activator of the STAT3 signal transduction pathway, that is of tremendous importance in the hepatic cell system the aim of this doctoral thesis was to characterize the relevance of I κ B- ζ for hepatocellular processes.

The main focus was to investigate the interaction of I κ B- ζ with STAT3 and the resulting functional consequences for the STAT3 activity and hepatocellular apoptosis. In the context of this thesis analyses of hepatocellular cell death revealed that I κ B- ζ can induce apoptosis in HepG2 cells by modulating the expression pattern of the pro-apoptotic protein Bim and the anti-apoptotic protein Mcl-1, both members of Bcl-2 protein family. The obtained results allow us to conclude that the enhanced expression of Bim and the simultaneous decrease of Mcl-1 expression lead to a synergistical induction of apoptosis.

Although the IL-6 dependent STAT3 signal transduction pathway acts in an anti-apoptotic manner, it surprisingly displayed a pro-apoptotic effect in the context of I κ B- ζ -induced apoptosis. Thus, the stimulation with IL-6 enhanced the pro-apoptotic effect of I κ B- ζ through a STAT3-dependent increase of Bim protein expression.

Subsequent expression analyses indicated that in the presence of STAT3 the overexpression of I κ B- ζ leads to an induction of Bim mRNA transcription, which was further elevated by IL-6. However, overexpression of I κ B- ζ in STAT3 knock-down cells as well as the IL-6 mediated STAT3 activation in absence of I κ B- ζ did not result in an induction of Bim transcription indicating that I κ B- ζ functions as a coactivator of STAT3.

Interestingly, the knock-down of STAT3 in I κ B- ζ expressing cells inhibited Bim mRNA transcription and led to a reduced induction of apoptosis, although the Bim protein expression was not influenced by the STAT3 knock-down.

This suggests that on the one hand I κ B- ζ increased the protein expression of Bim independently from its transcription, maybe due to a stabilization of the Bim mRNA,

and on the other hand that STAT3 contributed to the I κ B- ζ mediated apoptosis through the modulation of Bim activation or via an additional function which is independent of Bim. Unfortunately, the underlying mechanisms could not be fully clarified in the time frame of this doctoral thesis.

The assumption that I κ B- ζ functions as a coactivator of STAT3 was further supported by investigations which clearly showed a colocalization and interaction of I κ B- ζ with STAT3. As a result the IL-6-induced DNA binding and transactivation activity of STAT3 was enhanced by I κ B- ζ which finally led to a positive regulation of the STAT3 target gene SOCS3. Surprisingly, the increased transcription of SOCS3 did not result in an enhanced protein expression suggesting that a posttranscriptional regulation is involved.

In summary, important insights in I κ B- ζ dependent regulation processes, in particular through the interaction with STAT3, were achieved in hepatic HepG2 cells. I κ B- ζ not only positively regulates the activity of STAT3, but also exhibits a pro-apoptotic effect. In this context, the I κ B- ζ mediated modulation of the basic anti-apoptotic effect of STAT3 toward a pro-apoptotic function is of crucial importance. Due to the pivotal role of the IL-6 dependent STAT3 signal transduction pathway in inflammatory and regenerative processes of the liver it can be assumed that I κ B- ζ also influences this processes through the regulation of the STAT3 activity.

6 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1. Schematische Darstellung der NF- κ B- und I κ B-Proteine
- Abbildung 2. Die klassische und alternative Aktivierung des NF- κ B-Signalweges
- Abbildung 3. IL-6 vermittelte Aktivierung von STAT3
- Abbildung 4. Mechanismen zur Regulation der STAT3-Aktivität
- Abbildung 5. Morphologische Veränderungen während der Apoptose und Nekrose
- Abbildung 6. Intrinsischer und extrinsischer Apoptose-Signalweg
- Abbildung 7. Die Bcl-2-Proteinfamilie
- Abbildung 8. Das Fusionsprotein mCherry-STAT3 ist biologisch aktiv
- Abbildung 9. I κ B- ζ und STAT3 kolokalisieren in nukleären Körperchen und bilden Proteinkomplexe
- Abbildung 10. Einfluss von I κ B- ζ auf die Phosphorylierung, DNA-Bindungs- und Transaktivierungsaktivität von STAT3
- Abbildung 11. I κ B- ζ führt zu einer verstärkten SOCS3-Promotoraktivität
- Abbildung 12. Die Überexpression von I κ B- ζ führt zu einem erhöhten SOCS3 mRNA-Level, der nicht durch eine mRNA-Stabilisierung vermittelt wird
- Abbildung 13. Die I κ B- ζ -Überexpression führt zu keiner erhöhten SOCS3 Proteinkonzentration
- Abbildung 14. Die transiente Transfektion von I κ B- ζ führt zu einem verstärktem Zelltod
- Abbildung 15. Die Doxyzyklin induzierte Expression von I κ B- ζ führt zur Induktion der Apoptose
- Abbildung 16: IL-6 verstärkt den apoptotischen Effekt von I κ B- ζ
- Abbildung 17. I κ B- ζ hat keinen Einfluss auf den Zellzyklus
- Abbildung 18. I κ B- ζ führt zu einem Verlust der mitochondrialen Membranintegrität und einer Induktion der Caspase-9-Aktivität
- Abbildung 19. Die I κ B- ζ -Expression führt zu einer Heraufregulierung von Bim und simultanen Herunterregulierung von Mcl-1
- Abbildung 20. Der RNAi vermittelte Knock-down von Bim führt zu einer Inhibierung der I κ B- ζ induzierten Apoptose

Abbildung 21. Neben der verringerten Mcl-1-Expression ist vor allem die de-novo Synthese von Proteinen entscheidend für die I κ B- ζ induzierte Apoptose

Abbildung 22. STAT3 ist in Ab- und Anwesenheit von IL-6 an der I κ B- ζ vermittelten Apoptose beteiligt

Abbildung 23. Die Bim-Expression ist abhängig von STAT3 und I κ B- ζ

Abbildung 24. Die simultane Verwendung von S3I-201 und SB203580 führt aufgrund einer abgeschwächten Bim-Expression zu einer nahezu vollständigen Inhibition der I κ B- ζ induzierten Apoptose

Abbildung 25. p38 hat keinen Einfluss auf den apoptotischen Effekt von I κ B- ζ

Abbildung 26. Die Kinasen RIPK2, GAK, GSK3 β und CK1 δ haben keinen Einfluss auf die I κ B- ζ induzierte Apoptose

7 Abkürzungsverzeichnis

ActD	Actinomycin D
AMC	7-Amino-4-Methylcumarin
ANK	Ankyrin-Wiederholung
Apaf1	Protease Aktivierungsfaktor 1
APS	Ammoniumpersulfat
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BH	<i>Bcl-2 homology</i>
Bim	<i>Bcl-2-like protein 11</i>
CARD	<i>caspase recruiting domain</i>
CCL4	Kohlenstofftetrachlorid
CHX	Cycloheximid
DD	<i>death domain</i> , Todes-Domäne
DED	<i>death effector domain</i> , Todeseffektor-Domäne
DISC	<i>death inducing signaling complex</i> , Todessignalkomplex
Dox	Doxyzyklin
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERG	Eppendorf Reaktionsgefäß
FADD	<i>Fas associating protein with death domain</i>
h	Stunde
hBD-2	<i>human beta-defensin 2</i>
HDAC5	Histon-Deazetylase 5
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IFN	Interferon
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
INAP	<i>interleukin-1 inducible nuclear ankyrin-repeat protein</i>
I κ B	Inhibitor von NF- κ B
Jak	Janus Kinase
KIR	Kinase Inhibitory Region
LZ	Leucin Zipper

MAD	Matrix-Assoziierte Deazetylase
MAIL	<i>molecule possessing ankyrin repeats induced by lipopolysaccharide</i>
Mcl-1	<i>myeloid cell leukemia sequence-1</i>
min	Minute
NBD	NEMO-binde Domäne
NEMO	<i>NF-κB essential modifier</i>
NES	<i>nuclear export signal</i>
NF- κ B	Nuklearfaktor- κ B
NGAL	<i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
NIK	NF- κ B induzierende Kinase
NK	Natürliche Killerzelle
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
OD	Optische Dichte
PARP	Poly-(ADP-ribose) Polymerase
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
PI	Propidiumjodid
PIAS	<i>protein inhibitor of activated STAT</i>
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
qRT-PCR	quantitative Real Time PCR
QVD	Q-VD-OPH
RHD	<i>Rel-homology domain</i>
RIP1	<i>receptor interacting serine/threonine-protein kinase 1</i>
RNAi	RNA Interferenz
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
rtTA	reverser Tet-Repressor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
sec	Sekunden
SH2	Src-homologie 2
SMRT	<i>silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine Signaling</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAD	Transaktivierungs-Domäne
TEMED	Tetramethyldiamin

TES	Tetrazyklin-Erkennungssequenz
TLR	Toll-Like Rezeptor
TMRE	Tetramethylrhodamin
TNF α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TRADD	<i>TNF-R1 associated death domain protein</i>
TRAF2	<i>TNF receptor associated factor 2</i>
TRAIL	<i>TNF related apoptosis inducing ligand</i>
ÜN	Über Nacht
USTAT3	unphosphoryliertes STAT3
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
WT	Wildtyp

8 Literaturverzeichnis

1. Pahl, H.L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866 (1999).
2. Sen, R. & Baltimore, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921-928 (1986).
3. Gerondakis, S., Grumont, R., Gugasyan, R., Wong, L., Isomura, I., Ho, W. & Banerjee, A. Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene* 25, 6781-6799 (2006).
4. Perkins, N.D. & Gilmore, T.D. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ* 13, 759-772 (2006).
5. Gilmore, T.D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25, 6680-6684 (2006).
6. Huxford, T., Malek, S. & Ghosh, G. Structure and mechanism in NF-kappa B/I kappa B signaling. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 64, 533-540 (1999).
7. Hayden, M.S. & Ghosh, S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18, 2195-2224 (2004).
8. Gilmore, T.D. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* 18, 6842-6844 (1999).
9. Hoffmann, A., Natoli, G. & Ghosh, G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* 25, 6706-6716 (2006).
10. Chen, Y.Q., Sengchanthalangsy, L.L., Hackett, A. & Ghosh, G. NF-kappaB p65 (RelA) homodimer uses distinct mechanisms to recognize DNA targets. *Structure* 8, 419-428 (2000).
11. Chen, F.E. & Ghosh, G. Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene* 18, 6845-6852 (1999).
12. Ghosh, S. & Hayden, M.S. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* 8, 837-848 (2008).
13. Ghosh, S. & Karin, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl, S81-96 (2002).
14. Thompson, J.E., Phillips, R.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Ghosh, S. I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell* 80, 573-582 (1995).
15. Malek, S., Chen, Y., Huxford, T. & Ghosh, G. IkappaBbeta, but not IkappaBalpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappaB dimers by masking both NF-kappaB nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem* 276, 45225-45235 (2001).
16. Whiteside, S.T., Epinat, J.C., Rice, N.R. & Israel, A. I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *Embo J* 16, 1413-1426 (1997).
17. Heilker, R., Freuler, F., Vanek, M., Pulfer, R., Kobel, T., Peter, J., Zerwes, H.G., Hofstetter, H. & Eder, J. The kinetics of association and phosphorylation of IkappaB isoforms by IkappaB kinase 2 correlate with their cellular regulation in human endothelial cells. *Biochemistry* 38, 6231-6238 (1999).
18. Goudeau, B., Huetz, F., Samson, S., Di Santo, J.P., Cumano, A., Beg, A., Israel, A. & Memet, S. IkappaBalpha/IkappaBepsilon deficiency reveals that a critical NF-kappaB dosage is required for lymphocyte survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15800-15805 (2003).
19. Samson, S.I., Memet, S., Vosshenrich, C.A., Colucci, F., Richard, O., Ndiaye, D., Israel, A. & Di Santo, J.P. Combined deficiency in IkappaBalpha and IkappaBepsilon reveals a critical window of NF-kappaB activity in natural killer cell differentiation. *Blood* 103, 4573-4580 (2004).
20. Harhaj, E.W., Maggirwar, S.B. & Sun, S.C. Inhibition of p105 processing by NF-kappaB proteins in transiently transfected cells. *Oncogene* 12, 2385-2392 (1996).

21. Cohen, S., Orian, A. & Ciechanover, A. Processing of p105 is inhibited by docking of p50 active subunits to the ankyrin repeat domain, and inhibition is alleviated by signaling via the carboxyl-terminal phosphorylation/ ubiquitin-ligase binding domain. *J Biol Chem* 276, 26769-26776 (2001).
22. Basak, S., Kim, H., Kearns, J.D., Tergaonkar, V., O'Dea, E., Werner, S.L., Benedict, C.A., Ware, C.F., Ghosh, G., Verma, I.M. & Hoffmann, A. A fourth IkappaB protein within the NF-kappaB signaling module. *Cell* 128, 369-381 (2007).
23. Ohno, H., Takimoto, G. & McKeithan, T.W. The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell* 60, 991-997 (1990).
24. Carmody, R.J., Ruan, Q., Palmer, S., Hilliard, B. & Chen, Y.H. Negative regulation of toll-like receptor signaling by NF-kappaB p50 ubiquitination blockade. *Science* 317, 675-678 (2007).
25. 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., Reinherz, E.L. & Clayton, L.K. Peptide-induced negative selection of thymocytes activates transcription of an NF-kappa B inhibitor. *Mol Cell* 9, 637-648 (2002).
26. Hirotsu, T., Lee, P.Y., Kuwata, H., Yamamoto, M., Matsumoto, M., Kawase, I., Akira, S. & Takeda, K. The nuclear IkappaB protein IkappaBNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J Immunol* 174, 3650-3657 (2005).
27. Kuwata, H., Matsumoto, M., Atarashi, K., Morishita, H., Hirotsu, T., Koga, R. & Takeda, K. IkappaBNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation. *Immunity* 24, 41-51 (2006).
28. Touma, M., Antonini, V., Kumar, M., Osborn, S.L., Bobenchik, A.M., Keskin, D.B., Connolly, J.E., Grusby, M.J., Reinherz, E.L. & Clayton, L.K. Functional role for I kappa BNS in T cell cytokine regulation as revealed by targeted gene disruption. *J Immunol* 179, 1681-1692 (2007).
29. Kitamura, H., Kanehira, K., Okita, K., Morimatsu, M. & Saito, M. MAIL, a novel nuclear I kappa B protein that potentiates LPS-induced IL-6 production. *FEBS Lett* 485, 53-56 (2000).
30. Haruta, H., Kato, A. & Todokoro, K. Isolation of a novel interleukin-1-inducible nuclear protein bearing ankyrin-repeat motifs. *J Biol Chem* 276, 12485-12488 (2001).
31. Motoyama, M., Yamazaki, S., Eto-Kimura, A., Takeshige, K. & Muta, T. Positive and negative regulation of nuclear factor-kappaB-mediated transcription by IkappaB-zeta, an inducible nuclear protein. *J Biol Chem* 280, 7444-7451 (2005).
32. Whiteside, S.T. & Israel, A. I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol* 8, 75-82 (1997).
33. Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Takeuchi, O., Takeshige, K., Saitoh, T., Yamaoka, S., Yamamoto, N., Yamamoto, S., Muta, T., Takeda, K. & Akira, S. Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature* 430, 218-222 (2004).
34. Yamazaki, S., Muta, T. & Takeshige, K. A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei. *J Biol Chem* 276, 27657-27662 (2001).
35. Shiina, T., Konno, A., Oonuma, T., Kitamura, H., Imaoka, K., Takeda, N., Todokoro, K. & Morimatsu, M. Targeted disruption of MAIL, a nuclear IkappaB protein, leads to severe atopic dermatitis-like disease. *J Biol Chem* 279, 55493-55498 (2004).
36. Ueta, M., Hamuro, J., Yamamoto, M., Kaseda, K., Akira, S. & Kinoshita, S. Spontaneous ocular surface inflammation and goblet cell disappearance in I kappa B zeta gene-disrupted mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 579-588 (2005).
37. Matsuo, S., Yamazaki, S., Takeshige, K. & Muta, T. Crucial roles of binding sites for NF-kappaB and C/EBPs in IkappaB-zeta-mediated transcriptional activation. *Biochem J* 405, 605-615 (2007).

38. Miyake, T., Satoh, T., Kato, H., Matsushita, K., Kumagai, Y., Vandenbon, A., Tani, T., Muta, T., Akira, S. & Takeuchi, O. IkappaBzeta is essential for natural killer cell activation in response to IL-12 and IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 17680-17685.
39. Vidal, S.M. & Lanier, L.L. NK cell recognition of mouse cytomegalovirus-infected cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 298, 183-206 (2006).
40. Totzke, G., Essmann, F., Pohlmann, S., Lindenblatt, C., Janicke, R.U. & Schulze-Osthoff, K. A novel member of the IkappaB family, human IkappaB-zeta, inhibits transactivation of p65 and its DNA binding. *J Biol Chem* 281, 12645-12654 (2006).
41. Kayama, H., Ramirez-Carrozzi, V.R., Yamamoto, M., Mizutani, T., Kuwata, H., Iba, H., Matsumoto, M., Honda, K., Smale, S.T. & Takeda, K. Class-specific regulation of pro-inflammatory genes by MyD88 pathways and IkappaBzeta. *J Biol Chem* 283, 12468-12477 (2008).
42. Hacker, H. & Karin, M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* 2006, re13 (2006).
43. McKenzie, F.R., Connelly, M.A., Balzarano, D., Muller, J.R., Gelezianas, R. & Marcu, K.B. Functional isoforms of IkappaB kinase alpha (IKKalpha) lacking leucine zipper and helix-loop-helix domains reveal that IKKalpha and IKKbeta have different activation requirements. *Mol Cell Biol* 20, 2635-2649 (2000).
44. Xiao, G., Fong, A. & Sun, S.C. Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 279, 30099-30105 (2004).
45. Bonizzi, G. & Karin, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25, 280-288 (2004).
46. Vucic, D., Dixit, V.M. & Wertz, I.E. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 439-452.
47. Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M. & Stark, G.R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-1421 (1994).
48. Zhang, T., Kee, W.H., Seow, K.T., Fung, W. & Cao, X. The coiled-coil domain of Stat3 is essential for its SH2 domain-mediated receptor binding and subsequent activation induced by epidermal growth factor and interleukin-6. *Mol Cell Biol* 20, 7132-7139 (2000).
49. Ma, J., Zhang, T., Novotny-Diermayr, V., Tan, A.L. & Cao, X. A novel sequence in the coiled-coil domain of Stat3 essential for its nuclear translocation. *J Biol Chem* 278, 29252-29260 (2003).
50. Becker, S., Groner, B. & Muller, C.W. Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature* 394, 145-151 (1998).
51. Chen, X., Vinkemeier, U., Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Darnell, J.E., Jr. & Kuriyan, J. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 93, 827-839 (1998).
52. Vinkemeier, U., Moarefi, I., Darnell, J.E., Jr. & Kuriyan, J. Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science* 279, 1048-1052 (1998).
53. Durbin, J.E., Hackenmiller, R., Simon, M.C. & Levy, D.E. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 84, 443-450 (1996).
54. Park, C., Li, S., Cha, E. & Schindler, C. Immune response in Stat2 knockout mice. *Immunity* 13, 795-804 (2000).
55. Kaplan, M.H., Sun, Y.L., Hoey, T. & Grusby, M.J. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 382, 174-177 (1996).
56. Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M.Y., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Tripp, R.A., Chu, C., Quelle, F.W., Nosaka, T., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Grosveld, G., Paul, W.E. & Ihle, J.N. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 380, 630-633 (1996).

57. Nakajima, H., Liu, X.W., Wynshaw-Boris, A., Rosenthal, L.A., Imada, K., Finbloom, D.S., Hennighausen, L. & Leonard, W.J. An indirect effect of Stat5a in IL-2-induced proliferation: a critical role for Stat5a in IL-2-mediated IL-2 receptor alpha chain induction. *Immunity* 7, 691-701 (1997).
58. Imada, K., Bloom, E.T., Nakajima, H., Horvath-Arcidiacono, J.A., Udy, G.B., Davey, H.W. & Leonard, W.J. Stat5b is essential for natural killer cell-mediated proliferation and cytolytic activity. *J Exp Med* 188, 2067-2074 (1998).
59. Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T. & Akira, S. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3801-3804 (1997).
60. Wegenka, U.M., Buschmann, J., Luttkien, C., Heinrich, P.C. & Horn, F. Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol Cell Biol* 13, 276-288 (1993).
61. Raz, R., Lee, C.K., Cannizzaro, L.A., d'Eustachio, P. & Levy, D.E. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2846-2851 (1999).
62. Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I. & Smith, A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* 12, 2048-2060 (1998).
63. Lee, C.K., Raz, R., Gimeno, R., Gertner, R., Wistinghausen, B., Takeshita, K., DePinho, R.A. & Levy, D.E. STAT3 is a negative regulator of granulopoiesis but is not required for G-CSF-dependent differentiation. *Immunity* 17, 63-72 (2002).
64. Sano, S., Itami, S., Takeda, K., Tarutani, M., Yamaguchi, Y., Miura, H., Yoshikawa, K., Akira, S. & Takeda, J. Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *Embo J* 18, 4657-4668 (1999).
65. Bromberg, J.F., Horvath, C.M., Besser, D., Lathem, W.W. & Darnell, J.E., Jr. Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol* 18, 2553-2558 (1998).
66. Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C. & Darnell, J.E., Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell* 98, 295-303 (1999).
67. Garcia, R. & Jove, R. Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *J Biomed Sci* 5, 79-85 (1998).
68. Zushi, S., Shinomura, Y., Kiyohara, T., Miyazaki, Y., Kondo, S., Sugimachi, M., Higashimoto, Y., Kanayama, S. & Matsuzawa, Y. STAT3 mediates the survival signal in oncogenic ras-transfected intestinal epithelial cells. *Int J Cancer* 78, 326-330 (1998).
69. Liu, H., Ma, Y., Cole, S.M., Zander, C., Chen, K.H., Karras, J. & Pope, R.M. Serine phosphorylation of STAT3 is essential for Mcl-1 expression and macrophage survival. *Blood* 102, 344-352 (2003).
70. Karni, R., Jove, R. & Levitzki, A. Inhibition of pp60c-Src reduces Bcl-XL expression and reverses the transformed phenotype of cells overexpressing EGF and HER-2 receptors. *Oncogene* 18, 4654-4662 (1999).
71. Masuda, M., Suzui, M., Yasumatu, R., Nakashima, T., Kuratomi, Y., Azuma, K., Tomita, K., Komiyama, S. & Weinstein, I.B. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 62, 3351-3355 (2002).
72. Horiguchi, N., Lafdil, F., Miller, A.M., Park, O., Wang, H., Rajesh, M., Mukhopadhyay, P., Fu, X.Y., Pacher, P. & Gao, B. Dissociation between liver inflammation and hepatocellular damage induced by carbon tetrachloride in myeloid cell-specific signal transducer and activator of transcription 3 gene knockout mice. *Hepatology* 51, 1724-1734.
73. Horiguchi, N., Wang, L., Mukhopadhyay, P., Park, O., Jeong, W.I., Lafdil, F., Osei-Hyiaman, D., Moh, A., Fu, X.Y., Pacher, P., Kunos, G. & Gao, B. Cell type-dependent

- pro- and anti-inflammatory role of signal transducer and activator of transcription 3 in alcoholic liver injury. *Gastroenterology* 134, 1148-1158 (2008).
74. Wang, H., Lafdil, F., Wang, L., Park, O., Yin, S., Niu, J., Miller, A.M., Sun, Z. & Gao, B. Hepatoprotective versus oncogenic functions of STAT3 in liver tumorigenesis. *Am J Pathol* 179, 714-724.
 75. Sakamori, R., Takehara, T., Ohnishi, C., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Takeda, K., Akira, S. & Hayashi, N. Signal transducer and activator of transcription 3 signaling within hepatocytes attenuates systemic inflammatory response and lethality in septic mice. *Hepatology* 46, 1564-1573 (2007).
 76. Taub, R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 836-847 (2004).
 77. Fausto, N., Campbell, J.S. & Riehle, K.J. Liver regeneration. *Hepatology* 43, S45-53 (2006).
 78. Dierssen, U., Beraza, N., Lutz, H.H., Liedtke, C., Ernst, M., Wasmuth, H.E. & Trautwein, C. Molecular dissection of gp130-dependent pathways in hepatocytes during liver regeneration. *J Biol Chem* 283, 9886-9895 (2008).
 79. Moh, A., Iwamoto, Y., Chai, G.X., Zhang, S.S., Kano, A., Yang, D.D., Zhang, W., Wang, J., Jacoby, J.J., Gao, B., Flavell, R.A. & Fu, X.Y. Role of STAT3 in liver regeneration: survival, DNA synthesis, inflammatory reaction and liver mass recovery. *Lab Invest* 87, 1018-1028 (2007).
 80. Li, W., Liang, X., Kellendonk, C., Poli, V. & Taub, R. STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration. *J Biol Chem* 277, 28411-28417 (2002).
 81. Wang, H., Park, O., Lafdil, F., Shen, K., Horiguchi, N., Yin, S., Fu, X.Y., Kunos, G. & Gao, B. Interplay of hepatic and myeloid signal transducer and activator of transcription 3 in facilitating liver regeneration via tempering innate immunity. *Hepatology* 51, 1354-1362.
 82. Klein, C., Wustefeld, T., Assmus, U., Roskams, T., Rose-John, S., Muller, M., Manns, M.P., Ernst, M. & Trautwein, C. The IL-6-gp130-STAT3 pathway in hepatocytes triggers liver protection in T cell-mediated liver injury. *J Clin Invest* 115, 860-869 (2005).
 83. Haga, S., Terui, K., Zhang, H.Q., Enosawa, S., Ogawa, W., Inoue, H., Okuyama, T., Takeda, K., Akira, S., Ogino, T., Irani, K. & Ozaki, M. Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. *J Clin Invest* 112, 989-998 (2003).
 84. Heinrich, P.C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. & Graeve, L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334 (Pt 2), 297-314 (1998).
 85. Croker, B.A., Krebs, D.L., Zhang, J.G., Wormald, S., Willson, T.A., Stanley, E.G., Robb, L., Greenhalgh, C.J., Forster, I., Clausen, B.E., Nicola, N.A., Metcalf, D., Hilton, D.J., Roberts, A.W. & Alexander, W.S. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol* 4, 540-545 (2003).
 86. Bergamin, E., Wu, J. & Hubbard, S.R. Structural basis for phosphotyrosine recognition by suppressor of cytokine signaling-3. *Structure* 14, 1285-1292 (2006).
 87. Sasaki, A., Yasukawa, H., Suzuki, A., Kamizono, S., Syoda, T., Kinjyo, I., Sasaki, M., Johnston, J.A. & Yoshimura, A. Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells* 4, 339-351 (1999).
 88. Endo, T.A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N., Taniguchi, T., Fujita, T., Kanakura, Y., Komiyama, S. & Yoshimura, A. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387, 921-924 (1997).
 89. Levy, D.E. & Darnell, J.E., Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 651-662 (2002).
 90. Lehmann, U., Schmitz, J., Weissenbach, M., Sobota, R.M., Hortner, M., Friederichs, K., Behrmann, I., Tsiaris, W., Sasaki, A., Schneider-Mergener, J., Yoshimura, A.,

- Neel, B.G., Heinrich, P.C. & Schaper, F. SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *J Biol Chem* 278, 661-671 (2003).
91. Gunaje, J.J. & Bhat, G.J. Involvement of tyrosine phosphatase PTP1D in the inhibition of interleukin-6-induced Stat3 signaling by alpha-thrombin. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 252-257 (2001).
 92. Schaper, F., Gendo, C., Eck, M., Schmitz, J., Grimm, C., Anhof, D., Kerr, I.M. & Heinrich, P.C. Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression. *Biochem J* 335 (Pt 3), 557-565 (1998).
 93. Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P. & Shuai, K. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278, 1803-1805 (1997).
 94. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257 (1972).
 95. Adams, J.M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 17, 2481-2495 (2003).
 96. Strasser, A., O'Connor, L. & Dixit, V.M. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69, 217-245 (2000).
 97. Nagata, S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 256, 12-18 (2000).
 98. Van Cruchten, S. & Van Den Broeck, W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 31, 214-223 (2002).
 99. Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A. & Henson, P.M. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405, 85-90 (2000).
 100. Savill, J. & Fadok, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-788 (2000).
 101. Nagata, S. Human autoimmune lymphoproliferative syndrome, a defect in the apoptosis-inducing Fas receptor: a lesson from the mouse model. *J Hum Genet* 43, 2-8 (1998).
 102. Worth, A., Thrasher, A.J. & Gaspar, H.B. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype. *Br J Haematol* 133, 124-140 (2006).
 103. Westendorp, M.O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., Debatin, K.M. & Krammer, P.H. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 375, 497-500 (1995).
 104. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. & Wang, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 269-290 (1999).
 105. Denault, J.B. & Salvesen, G.S. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev* 102, 4489-4500 (2002).
 106. Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10964-10967 (1999).
 107. Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T. & Nicholson, D.W. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17907-17911 (1997).
 108. Stroh, C. & Schulze-Osthoff, K. Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ* 5, 997-1000 (1998).
 109. Earnshaw, W.C., Martins, L.M. & Kaufmann, S.H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383-424 (1999).
 110. Locksley, R.M., Killeen, N. & Lenardo, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501 (2001).
 111. Ashkenazi, A. & Dixit, V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308 (1998).

112. Krammer, P.H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795 (2000).
113. Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. & Peter, M.E. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579-5588 (1995).
114. Peter, M.E. & Krammer, P.H. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10, 26-35 (2003).
115. Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. & Dixit, V.M. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827 (1996).
116. Kitson, J., Raven, T., Jiang, Y.P., Goeddel, D.V., Giles, K.M., Pun, K.T., Grinham, C.J., Brown, R. & Farrow, S.N. A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature* 384, 372-375 (1996).
117. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365 (1997).
118. LeBlanc, H.N. & Ashkenazi, A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 10, 66-75 (2003).
119. Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. & Peter, M.E. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17, 1675-1687 (1998).
120. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490 (1998).
121. Micheau, O. & Tschopp, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181-190 (2003).
122. Baud, V. & Karin, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 11, 372-377 (2001).
123. Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10, 45-65 (2003).
124. Adrain, C. & Martin, S.J. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 26, 390-397 (2001).
125. Wang, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15, 2922-2933 (2001).
126. Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X. & Akey, C.W. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9, 423-432 (2002).
127. Riedl, S.J. & Salvesen, G.S. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 405-413 (2007).
128. Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274, 11549-11556 (1999).
129. MacFarlane, M. & Williams, A.C. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep* 5, 674-678 (2004).
130. Adams, J.M. & Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324-1337 (2007).
131. Youle, R.J. & Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59 (2008).
132. Leber, B., Lin, J. & Andrews, D.W. Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis* 12, 897-911 (2007).
133. Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V.M., Adelman, D.M., Simon, M.C., Ma, A., Golden, J.A., Evan, G., Korsmeyer, S.J., MacGregor, G.R. & Thompson, C.B. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak

- and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 6, 1389-1399 (2000).
134. Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B. & Korsmeyer, S.J. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-730 (2001).
 135. Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J. & Schlesinger, P.H. Proapoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7, 1166-1173 (2000).
 136. Brenner, D. & Mak, T.W. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* 21, 871-877 (2009).
 137. Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R. & Newmeyer, D.D. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 17, 525-535 (2005).
 138. Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S. & Korsmeyer, S.J. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2, 183-192 (2002).
 139. Willis, S.N. & Adams, J.M. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 17, 617-625 (2005).
 140. Chipuk, J.E. & Green, D.R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* 18, 157-164 (2008).
 141. Dagvadorj, J., Naiki, Y., Tumurkhuu, G., Noman, A.S., Iftekar, E.K.I., Koide, N., Komatsu, T., Yoshida, T. & Yokochi, T. Interleukin (IL)-10 attenuates lipopolysaccharide-induced IL-6 production via inhibition of I κ B-zeta activity by Bcl-3. *Innate Immun* 15, 217-224 (2009).
 142. Seshadri, S., Kannan, Y., Mitra, S., Parker-Barnes, J. & Wewers, M.D. MAIL regulates human monocyte IL-6 production. *J Immunol* 183, 5358-5368 (2009).
 143. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F. & Riccardi, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139, 271-279 (1991).
 144. Herrmann, A., Sommer, U., Pranada, A.L., Giese, B., Kuster, A., Haan, S., Becker, W., Heinrich, P.C. & Muller-Newen, G. STAT3 is enriched in nuclear bodies. *J Cell Sci* 117, 339-349 (2004).
 145. Yang, X.P., Albrecht, U., Zakowski, V., Sobota, R.M., Haussinger, D., Heinrich, P.C., Ludwig, S., Bode, J.G. & Schaper, F. Dual function of interleukin-1 β for the regulation of interleukin-6-induced suppressor of cytokine signaling 3 expression. *J Biol Chem* 279, 45279-45289 (2004).
 146. Siddiquee, K., Zhang, S., Guida, W.C., Blaskovich, M.A., Greedy, B., Lawrence, H.R., Yip, M.L., Jove, R., McLaughlin, M.M., Lawrence, N.J., Sebti, S.M. & Turkson, J. Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7391-7396 (2007).
 147. Cai, B., Chang, S.H., Becker, E.B., Bonni, A. & Xia, Z. p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of BimEL at Ser-65. *J Biol Chem* 281, 25215-25222 (2006).
 148. Zauberman, A., Zipori, D., Krupsky, M. & Ben-Levy, R. Stress activated protein kinase p38 is involved in IL-6 induced transcriptional activation of STAT3. *Oncogene* 18, 3886-3893 (1999).
 149. Ahmed, S.T., Mayer, A., Ji, J.D. & Ivashkiv, L.B. Inhibition of IL-6 signaling by a p38-dependent pathway occurs in the absence of new protein synthesis. *J Leukoc Biol* 72, 154-162 (2002).
 150. Lu, J., Quearry, B. & Harada, H. p38-MAP kinase activation followed by BIM induction is essential for glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoblastic leukemia cells. *FEBS Lett* 580, 3539-3544 (2006).

151. Raggiaschi, R., Lorenzetto, C., Diodato, E., Caricasole, A., Gotta, S. & Terstappen, G.C. Detection of phosphorylation patterns in rat cortical neurons by combining phosphatase treatment and DIGE technology. *Proteomics* 6, 748-756 (2006).
152. Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J.A., Lin, S. & Han, J. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* 271, 17920-17926 (1996).
153. Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R.J. & Han, J. The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 228, 334-340 (1996).
154. Kumar, S., McDonnell, P.C., Gum, R.J., Hand, A.T., Lee, J.C. & Young, P.R. Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun* 235, 533-538 (1997).
155. Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S., Alessi, D.R. & Cohen, P. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 408, 297-315 (2007).
156. Stonans, I., Stonane, E., Russwurm, S., Deigner, H.P., Bohm, K.J., Wiederhold, M., Jager, L. & Reinhart, K. HepG2 human hepatoma cells express multiple cytokine genes. *Cytokine* 11, 151-156 (1999).
157. Gregory, S.H., Wing, E.J., Danowski, K.L., van Rooijen, N., Dyer, K.F. & Tweardy, D.J. IL-6 produced by Kupffer cells induces STAT protein activation in hepatocytes early during the course of systemic listerial infections. *J Immunol* 160, 6056-6061 (1998).
158. Starr, R. & Hilton, D.J. SOCS: suppressors of cytokine signalling. *Int J Biochem Cell Biol* 30, 1081-1085 (1998).
159. Suzuki, A., Hanada, T., Mitsuyama, K., Yoshida, T., Kamizono, S., Hoshino, T., Kubo, M., Yamashita, A., Okabe, M., Takeda, K., Akira, S., Matsumoto, S., Toyonaga, A., Sata, M. & Yoshimura, A. CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J Exp Med* 193, 471-481 (2001).
160. Ehrling, C., Haussinger, D. & Bode, J.G. Sp3 is involved in the regulation of SOCS3 gene expression. *Biochem J* 387, 737-745 (2005).
161. Wilson, A.J., Byun, D.S., Popova, N., Murray, L.B., L'Italien, K., Sowa, Y., Arango, D., Velcich, A., Augenlicht, L.H. & Mariadason, J.M. Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem* 281, 13548-13558 (2006).
162. Ru, P., Steele, R., Hsueh, E.C. & Ray, R.B. Anti-miR-203 Upregulates SOCS3 Expression in Breast Cancer Cells and Enhances Cisplatin Chemosensitivity. *Genes Cancer* 2, 720-727.
163. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. & Sonenberg, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9, 102-114 (2008).
164. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516 (2007).
165. Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P. & Craig, R.W. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3516-3520 (1993).
166. Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M. & Huang, D.C. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 19, 1294-1305 (2005).
167. Germain, M., Milburn, J. & Duronio, V. MCL-1 inhibits BAX in the absence of MCL-1/BAX Interaction. *J Biol Chem* 283, 6384-6392 (2008).
168. Adams, K.W. & Cooper, G.M. Rapid turnover of mcl-1 couples translation to cell survival and apoptosis. *J Biol Chem* 282, 6192-6200 (2007).
169. Nijhawan, D., Fang, M., Traer, E., Zhong, Q., Gao, W., Du, F. & Wang, X. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 17, 1475-1486 (2003).

170. Yang, C., Kaushal, V., Shah, S.V. & Kaushal, G.P. Mcl-1 is downregulated in cisplatin-induced apoptosis, and proteasome inhibitors restore Mcl-1 and promote survival in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 292, F1710-1717 (2007).
171. 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. & Huang, D.C. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17, 393-403 (2005).
172. Barreyro, F.J., Kobayashi, S., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Malhi, H. & Gores, G.J. Transcriptional regulation of Bim by FoxO3A mediates hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem* 282, 27141-27154 (2007).
173. Malhi, H., Bronk, S.F., Werneburg, N.W. & Gores, G.J. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem* 281, 12093-12101 (2006).
174. O'Reilly, L.A., Cullen, L., Visvader, J., Lindeman, G.J., Print, C., Bath, M.L., Huang, D.C. & Strasser, A. The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells. *Am J Pathol* 157, 449-461 (2000).
175. Liu, L., McBride, K.M. & Reich, N.C. STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin-alpha3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8150-8155 (2005).
176. Yang, J., Chatterjee-Kishore, M., Staugaitis, S.M., Nguyen, H., Schlessinger, K., Levy, D.E. & Stark, G.R. Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Res* 65, 939-947 (2005).
177. Lei, K. & Davis, R.J. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2432-2437 (2003).
178. Putcha, G.V., Le, S., Frank, S., Besirli, C.G., Clark, K., Chu, B., Alix, S., Youle, R.J., LaMarche, A., Maroney, A.C. & Johnson, E.M., Jr. JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron* 38, 899-914 (2003).
179. Bode, J.G., Ludwig, S., Freitas, C.A., Schaper, F., Ruhl, M., Melmed, S., Heinrich, P.C. & Haussinger, D. The MKK6/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is capable of inducing SOCS3 gene expression and inhibits IL-6-induced transcription. *Biol Chem* 382, 1447-1453 (2001).

9 Anhang

Lebenslauf

Stephan Kober	geboren am 11. März 1981 in Wuppertal
Sep 1987- Jun 1991	Grundschule Berg-Mark-Str., Wuppertal
Aug 1991- Jun 2000	Gymnasium Am Kothen, Wuppertal Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Okt 2000- Sep 2003	Ausbildung zum Medizinisch-Technischen Laboratoriums-Assistenten, MTA-Schule Bochum Langendreer
Okt 2003- Aug 2006	FH Gelsenkirchen, Studiengang: Molekulare Biologie Abschluss: Bachelor of Science Titel der Bachelor-Thesis: Ergänzende Untersuchungen zur Etablierung neuer Produktionsstämme in Expressionssystem <i>Hansenula polymorpha</i>
Okt 2006- Aug 2008	FH Gelsenkirchen, Studiengang: Molekulare Biologie Abschluss: Master of Science Titel der Master-Thesis: Optimierung des Expressionssystems <i>Hansenula polymorpha</i>
Dez 2008- Sep 2012	Doktorarbeit am Institut für Molekulare Medizin bei Prof. Wesselborg, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Thema: Bedeutung von I κ B- ζ für die Regulation hepatozellulärer Prozesse

Publikationen

Kober, S., Wesselborg, S., Totzke, G., I κ B- ζ induced apoptosis is increased upon IL-6 mediated activation of STAT3, in Vorbereitung, 2012

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Wesselborg für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit meine Dissertation an seinem Institut anzufertigen.

Bei Herrn Prof. Dr. Martin bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats als stellvertretendes Mitglied der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Gudrun Totzke, die durch Ihre intensive Betreuung sowie Ihre stete Hilfsbereitschaft maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Bei Andrea, Bianca und Moritz bedanke ich mich für deren Unterstützung, all den praktischen Tipps und den vielen humorvollen Gesprächen, die mir die endlosen Stunden im Labor erleichtert haben.

Dr. Dennis Sohn möchte ich für all seine wertvollen wissenschaftlichen als auch privaten Ratschläge sowie für die, manchmal etwas anderen, Mittagspausen danken. Ebenso bedanke ich mich bei meinen Kolleginnen Denise und Sabine, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Bei meiner Familie und meinen Freunde bedanke ich mich für Ihre uneingeschränkte Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meiner Freundin Saskia, die mich durch alle Höhen und Tiefen während der Doktorarbeit begleitet hat und mit Ihren aufbauenden Worten immer eine große Stütze für mich gewesen ist.

Erklärung

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

Düsseldorf, 10. Jul 2012

Stephan Kober