

**Molekulare Analyse der Signaltransduktion
apoptotischer und inflammatorischer
Prozesse**

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Diplom-Biologe

Stephan Pohlmann

aus

Dortmund

Düsseldorf, Mai 2007

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

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

Tag der mündlichen Prüfung:
18.06.2007

Referenten:

Herr Prof. Dr. K. Schulze-Osthoff
Institut für Molekulare Medizin
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Herr Prof. Dr. H. Mehlhorn
Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis:

1	EINLEITUNG	1
1.1	Apoptose	1
1.1.1	Historische Einordnung	1
1.1.2	Die Morphologie und Rolle der Apoptose	1
1.1.3	Caspasen	3
1.1.4	Der extrinsische Apoptose-Signalweg	4
1.1.5	Der intrinsische Apoptose-Signalweg	5
1.1.6	Die Bcl-2 Familie	6
1.1.7	Regulation der mitochondrial vermittelten Apoptose durch die Bcl-2-Familie	7
1.2	Der Tumorsuppressor p53	8
1.2.1	Struktur und Funktion von p53	8
1.2.2	Die Aktivierung von p53	9
1.2.3	Die Rolle von p53 in der Apoptose- und Zellzykluskontrolle	9
1.3	Der Transkriptionsfaktor Nuklearfaktor-kappa B (NF-κB)	11
1.3.1	Die NF-κB/Rel-Proteine	12
1.3.2	Die IκB-Proteine	13
1.3.3	Mechanismus der NF-κB-Aktivierung	18
1.3.4	Der IκB-Kinase (IKK)-Komplex	18
1.3.5	Die klassische Aktivierungskaskade	18
1.3.6	Der alternative NF-κB-Aktivierungsweg	19
1.3.7	Die Funktion und Regulation von NF-κB	20
1.4	Struktur und Funktion der Tyrosinkinase p56 Lck	22
2	ZIELSETZUNG	24
3	MATERIAL UND METHODEN	26
3.1	Material	26
3.1.1	Chemikalien	26
3.1.2	Bakterienstämme	26
3.1.3	Eukaryontische Zelllinien	26
3.1.4	Plasmide	27
3.1.5	Oligonukleotide	29
3.1.6	Antikörper	29
3.1.7	Sekundäre Antikörper	30
3.2	Methoden	30
3.2.1	Kultur und Anzucht von <i>E. coli</i>	30
3.2.2	Transformation von <i>E. coli</i>	31
3.2.3	Plasmid-Präparation	31
3.2.4	Glycerin Stammkultur	31
3.2.5	Gelelektrophorese	31
3.2.6	RNA-Isolierung	31
3.2.7	RNase Protection Assay	32
3.2.8	RT-PCR	32
3.2.9	Real-time RT-PCR	33
3.2.10	Nachweis von Zytokinen mittels Luminex	34
3.2.11	Fluoreszenzmikroskopische Analysen	34
3.2.12	Mitochondrienisolierung	35

3.2.13	Durchflusszytometrie	35
3.2.14	Seneszenz assoziierte β -Galaktosidasefärbung	36
3.2.15	Western-Blot-Analyse	36
3.2.16	Transfektionen	37
3.2.17	Herstellung von retroviralen Überständen	37
3.2.18	Die Transduktion von Zielzellen	37
3.2.19	Kryokonservierung und Auftauen eukaryontischer Zellen	38
3.2.20	Behandlung mit γ -Strahlen und Chemotherapeutika	38
3.2.21	Messung der Caspase-Aktivität	38
3.2.22	Micro-Array Analyse	39
3.2.23	Auswertung	39
4	ERGEBNISSE	40
4.1	Die strahlungsinduzierte Translokation von p53 an die Mitochondrien löst keine Apoptose aus	40
4.1.1	Ionisierende Gammastrahlen induzieren auch in Apoptose-resistenten Zellen eine funktionelle p53-Antwort	40
4.1.2	Bestimmung der zellulären Lokalisation des bestrahlungsinduzierten p53-Proteins	42
4.1.3	Die stressinduzierte p53-Translokation an die Mitochondrien korreliert nicht mit einer Apoptose-Induktion.	45
4.2	IκBζ als Schlüsselprotein bei der Induktion von Zytokinen	53
4.2.1	I κ B ζ aggregiert in subnukleären Körperchen	53
4.2.2	I κ B ζ induziert die Expression spezifischer Zytokine in HT1080-Zellen	54
4.2.3	Einfluss der funktionellen Domänen von I κ B ζ auf die Zytokininduktion	60
4.2.4	Die I κ B ζ -vermittelte Induktion von Zytokinen in Abhängigkeit von p50 und p65	63
4.2.5	Induktion der Zytokinsynthese in Endothelzellen	68
4.2.6	Effekte von I κ B ζ auf die Apoptose	70
4.3	Die Rolle von Lck in Chemotherapeutika-induzierten Apoptose	74
4.3.1	Die Apoptose-Resistenz von T-Zellen ist unabhängig von der Lck-Expression	74
4.3.2	Die Rolle von Lck in der Apoptose-Induktion durch Rosmarinsäure, Ceramid und TNF- α	76
4.3.3	Bestimmung der Caspase-Aktivität in Lck-defizienten und profizienten Jurkat-Zellen	78
4.3.4	Expression von Bcl-2 Familienproteinen in Lck-profizienten und defizienten Jurkat-Zellen	80
5	DISKUSSION	82
5.1	Die Rolle von p53 in der mitochondrialen Apoptose	82
5.1.1	Die mitochondriale Translokation von p53 nach Bestrahlung	82
5.1.2	Der Einfluss der Bcl-2 Familien-Proteine auf mitochondriale Translokation von p53	84
5.1.3	Post-translationale Modifikationen von p53	85
5.2	IκBζ als Regulator von inflammatorischen und apoptotischen Prozessen	86
5.2.1	I κ B ζ aktiviert die Expression zahlreicher Zytokine	86
5.2.2	Die Rolle der Transaktivierungsdomäne von I κ B ζ und anderer NF- κ B-Proteine	87
5.3	Die Rolle der Tyrosinkinase Lck in der Apoptose	90
5.3.1	Die Bedeutung von Lck im mitochondrialen Apoptoseweg	90
5.3.2	Die Rolle von Lck in der extrinsisch vermittelten Apoptose	91
5.3.3	Die Regulation der Bak-Expression in Lck-defizienten Zellen	92
6	ZUSAMMENFASSUNG	94
6.1	Mitochondriale Translokation von p53 in Abwesenheit von Apoptose	94
6.2	IκBζ als Mediator der NF-κB-abhängigen Zytokin-Induktion	94
6.3	Die Tyrosinkinase Lck und ihre Rolle in der Apoptose	95

7	SUMMARY	97
7.1	Mitochondrial localization of p53 in the absence of apoptosis	97
7.2	I κ B ζ and its function as a key regulator in inflammation and apoptosis	97
7.3	The role of the tyrosine kinase Lck in apoptosis	98
8	LITERATURVERZEICHNIS	100
9	ABKÜRZUNGEN	112
10	ANHANG	
	Abbildung 1: Morphologie des Zelltodes	2
	Abbildung 2: Der extrinsische und intrinsische Signalweg der Apoptose	6
	Abbildung 3: Modelle zur p53-induzierten Apoptose	11
	Abbildung 4: Schematische Darstellung der Mitglieder der NF- κ B- und I κ B-Familie	13
	Abbildung 5: Der klassische und alternative NF- κ B-Signalweg	20
	Abbildung 6: Gammastrahlen induzieren ein funktionelles p53-Protein in MCF-7-Zellen	42
	Abbildung 7: Bestrahlungsinduziertes p53-Protein wird überwiegend im Zellkern exprimiert	43
	Abbildung 8: Bestrahlungsinduziertes p53 transloziert zu den Mitochondrien	44
	Abbildung 9: Stressinduzierte mitochondriale p53-Translokation in seneszenten und apoptotischen Zellen	46
	Abbildung 10: Fehlende Korrelation zwischen stressinduzierter p53-Translokation und der Apoptose-Induktion	47
	Abbildung 11: Bax und Puma werden in Abhängigkeit von p53 auch in bestrahlungsresistenten Zellen induziert	48
	Abbildung 12: Bax wird nur durch Etoposid, nicht aber durch Bestrahlung oligomerisiert und aktiviert	50
	Abbildung 13: Mitochondrien-gerichtete p53-Expression führt nicht zur Apoptose-Induktion	51
	Abbildung 14: I κ B ζ ist im Zellkern lokalisiert	53
	Abbildung 15: I κ B ζ induziert die mRNA-Expression verschiedener Zytokine	55
	Abbildung 16: I κ B ζ induziert die mRNA-Expression von IL-1 β und IL-6	56
	Abbildung 17: I κ B ζ induziert die Synthese von GM-CSF, IL-6, IL-1 β und IL-8	59
	Abbildung 18: I κ B ζ induziert die mRNA-Expression verschiedener Zytokine	60
	Abbildung 19: Sowohl der N- als auch C-Terminus von I κ B ζ sind für die Zytokin-Induktion erforderlich	62
	Abbildung 20: Expressionsstatus von p50 und p65 in den verschiedenen MEF-Linien und Nachweis der Expression von I κ B ζ und I κ B α nach Transduktion der Zelllinien	63
	Abbildung 21: Die I κ B ζ -induzierte Synthese verschiedener Zytokine wird NF- κ B-abhängig vermittelt	66
	Abbildung 22: Die NF- κ B-Untereinheiten p65 und p50 haben keinen Einfluss auf die distinkte Verteilung von I κ B ζ in subnukleären Strukturen	68
	Abbildung 23: I κ B ζ induziert die mRNA-Expression von IL-8 und IL-6 in Endothelzellen	69
	Abbildung 24: Die Überexpression von I κ B ζ induziert Apoptose in HT1080-Zellen	71
	Abbildung 25: I κ B ζ induziert die Aktivierung von Caspasen	72
	Abbildung 26: I κ B ζ induziert Apoptose in MCF-7/Casp-3-Zellen	73
	Abbildung 27: Einfluss der Chemotherapeutika-Behandlung verschiedener Jurkat-T-Zellen	75
	Abbildung 28: Apoptose-Induktion durch Ceramid- und Rosmarinsäure in Lck-defizienten und profizienten Jurkat-Zellen	77
	Abbildung 29: Caspasen-Aktivierung in den verschiedenen Jurkat-Zellklonen	79
	Abbildung 30: Expression von Lck und Bcl-2-Proteinen in den einzelnen Jurkat-Zellklonen	80

1 EINLEITUNG

1.1 Apoptose

1.1.1 Historische Einordnung

Der Gedanke, dass Zellen eines natürlichen Todes sterben, wurde bereits im Jahre 1842 durch Carl Vogt entwickelt, der diesbezügliche Untersuchungen an Krötenzellen durchführte (Vogt, 1842). Obwohl schon 1889 auch das Absterben menschlicher Zellen durch W. Felix protokolliert wurde (Felix, 1889), dauerte es noch weitere 70 Jahre bevor R. Bellairs im Jahre 1961 erstmalig sterbende Zellen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie visualisieren konnte (Bellairs, 1961). Mit Beginn der siebziger Jahre wurde die erste Dekade fundamentaler Erkenntnisse dieses Forschungsfeldes eingeleitet, in der typische Charakteristika apoptotischer Zellen beschrieben wurden. So prägte J. Kerr im Jahr 1972 den Begriff Apoptose (programmierter Zelltod) als eine von der Nekrose abweichende Form des Zelltodes, die sich durch spezifische Veränderungen der Zellmorphologie auszeichnet (Kerr *et al.*, 1972). In diesem Zeitraum wurde während des Zelltodes auch eine endonukleosomale Degradierung der genomischen DNA beobachtet, die seitdem als typisches Merkmal apoptotischer Zellen angesehen wird (Wyllie, 1980). Der entscheidende Durchbruch in der Apoptoseforschung gelang aber erst Mitte der neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts mit der Identifizierung einer Familie von Cysteinproteasen (Caspasen), die durch die proteolytische Spaltung zahlreicher Substrate die charakteristischen morphologischen und biochemischen Veränderungen einer apoptotischen Zelle hervorrufen (Yuan *et al.*, 1993).

1.1.2 Die Morphologie und Rolle der Apoptose

Im Bereich der Metazoa unterscheidet man hauptsächlich zwei Formen des Zelltodes: Nekrose und Apoptose. Nekrose wird beispielsweise durch mechanische Verletzungen hervorgerufen, die durch ein Versagen der Ionenhomöostase in den Zellmembranen zum Anschwellen und schließlich zum Platzen der Zelle führen. Der dadurch freigesetzte Zellinhalt vermittelt die Rekrutierung von Phagozyten, die durch die Produktion zahlreicher Zytokine erhebliche Entzündungsreaktionen hervorrufen (Wyllie, 1997). Durch die Apoptose dagegen, die ein aktives endogenes Selbstmordprogramm darstellt, werden keine inflammatorischen Prozesse induziert, da die dabei entstehenden Zellfragmente membranumschlossen bleiben und durch phagozytierende Zellen vollständig abgebaut

werden. Dadurch können unerwünschte und defekte Zellen eliminiert werden, weshalb die Apoptose nicht nur in der Embryonalentwicklung, sondern auch im ausdifferenzierten Organismus von entscheidender Bedeutung ist (Wyllie *et al.*, 1980). Diesbezüglich haben zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre gezeigt, dass eine deregulierte Apoptose eng mit dem Auftreten verschiedener Erkrankungen assoziiert ist. So sind z.B. AIDS und degenerative Erkrankungen (M. Alzheimer, M. Parkinson) durch eine erhöhte Apoptoserate gekennzeichnet, während insbesondere in der Tumorentstehung eine verminderte Apoptose von Bedeutung ist.

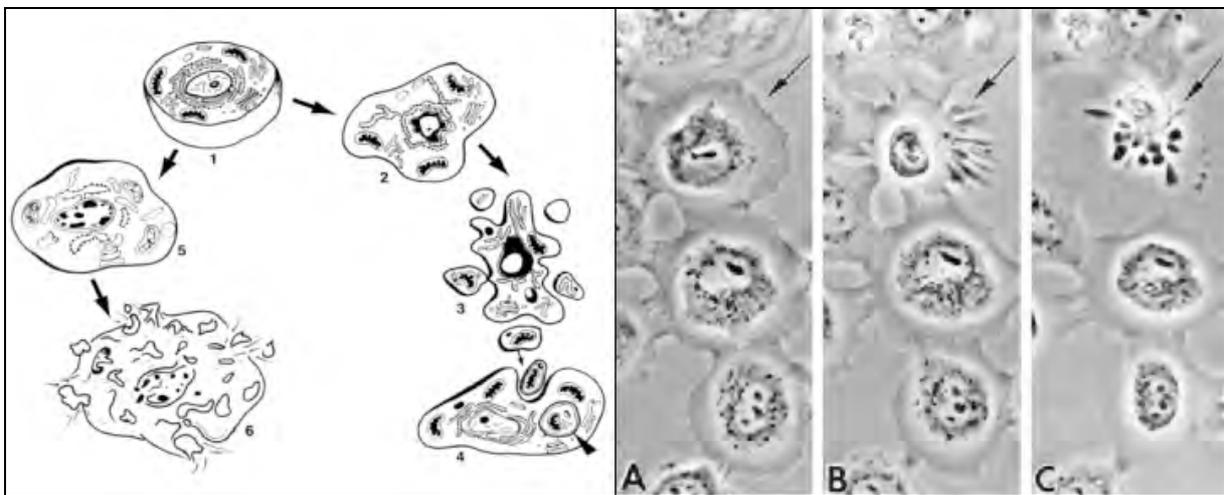


Abbildung 1: Morphologie des Zelltodes (verändert nach Kerr *et al.*)

Schematischer Vergleich von Apoptose und Nekrose (linke Hälfte). Die apoptotisch werdende Zelle (1) zeigt anfangs die charakteristische Chromatinkondensierung sowie ein Schrumpfen des Zellkörpers (2). Anschließend beginnen die Fragmentierung des Chromatins und der Zerfall der Zelle in sogenannte apoptotische Körperchen (3). Diese werden schließlich von Makrophagen und anderen phagozytierenden Zellen eingeschlossen und abgebaut (4). Eine nekrotische Zelle dagegen schwillt zunächst an (5), was zu einem Platzen der Zelle und zur Freisetzung der intrazellulären Bestandteile führt (6). *Kinetik der Apoptose (rechte Hälfte).* Die durch einen Pfeil markierte Zelle (A) zeigt den typischen Zeitverlauf der Apoptose mit der Zellschrumpfung und Membranausstülpungen (B) sowie dem Ablösen aus dem Zellverband (C).

Apoptose wird durch diverse Stimuli wie z.B. γ -Strahlen, Chemotherapeutika oder die Stimulation von Todesrezeptoren hervorgerufen und über gut definierte biochemische Signalwege vermittelt. Im Mikroskop wird sie sichtbar mit dem Schrumpfen der Zelle und dem Ablösen aus dem Zellverband eingeleitet. Es werden charakteristische Ausstülpungen an der Zellmembran gebildet (Zeiosis) und es kommt zur Kondensierung des Chromatins, während andere Organellen, wie beispielsweise die Mitochondrien, intakt bleiben. In einem anschließenden Stadium wird das Chromatin fragmentiert und die Zelle zerfällt in sogenannte apoptotische Körperchen, die die Zellorganellen und Teile des Zellkerns enthalten. Die

Kondensierung und Fragmentierung des Chromatins führt zur Entstehung von DNA-Multimeren, die einem Vielfachen von 185 bp entsprechen und in einem Agarosegel als „DNA-Leiter“ visualisiert werden können (Arends *et al.*, 1990). Dagegen wird die Bildung der Vesikel, das sogenannte „membrane blebbing“, bereits als morphologisches Merkmal sichtbar (Kerr *et al.*, 1972).

1.1.3 Caspasen

Während die morphologischen Veränderungen der Zelle erst im finalen Stadium des apoptotischen Prozesses beobachtet werden können, sind die molekularen Merkmale ihrer Initiierung und Ausführung bereits zu einem frühen Zeitpunkt auf biochemischer Ebene durch die Aktivierung von Caspasen nachweisbar. Die Caspasen, die sich durch einen Cysteinrest im katalytischen Zentrum auszeichnen und Peptidbindungen nach Aspartatresten spalten (Cysteiny-abhängige Aspartat-spezifische Proteasen), stellen die Schlüsselenzyme der Apoptose dar. Sie werden kaskadenartig in großen Mengen aktiviert und vollstrecken durch die gezielte Spaltung einer Vielzahl von Substraten das apoptotische Programm (Fischer *et al.*, 2003; Alnemri *et al.*, 1996). Caspasen werden als inaktive Procaspasen synthetisiert (Zymogene), die aus einer N-terminalen Prodomäne sowie einer großen (etwa 20 kDa) und einer kleinen (etwa 10 kDa) Untereinheit bestehen. Die proteolytische Aktivierung der Caspasen bedarf mindestens zwei aufeinanderfolgender Spaltungen an Aspartatresten, um die große und kleine Untereinheit voneinander und von der Prodomäne zu trennen (Yamin *et al.*, 1996). Dies führt zur Bildung des aktiven Caspasen-Heterotetramers, welches sich aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten zusammensetzt. Bisher konnten 11 aktive humane Caspasen identifiziert werden. Darüber hinaus wurde noch eine weitere Caspase beschrieben, Caspase-12, die aber in den meisten Menschen aufgrund von zwei Mutationen als verkürztes und nicht funktionelles Protein exprimiert wird. Basierend auf der strukturellen und funktionellen Organisation der Caspasen kann man diese in zwei Gruppen unterteilen: Caspasen mit kurzen Prodomänen (etwa 30 Aminosäuren), die eine Rolle als Effektorcaspasen einnehmen, und Enzyme mit langen Prodomänen (mehr als 100 Aminosäuren), die als Initiatorcaspasen fungieren. Die Prodomänen der Initiatorcaspasen enthalten je nach Funktion entweder die Todeseffektordomäne (*death effector domain*, DED) oder die Caspasen-Rekrutierungsdomäne (*caspase recruitment domain*, CARD). Dabei wird die DED für hydrophobe Bindungen mit aktivierenden Adaptermolekülen (z.B. FADD, siehe 1.1.4) benötigt, wohingegen die CARD

eine elektrostatische Anziehung einzelner Caspasen untereinander sowie mit Adapterproteinen (z.B. Apaf-1, siehe 1.1.5) vermittelt. Während Effektorcaspasen ausschließlich von Initiatorcaspasen prozessiert und damit aktiviert werden, sind Initiatorcaspasen auch ohne vorherige Prozessierung bereits teilweise aktiv. Mit der Aktivierung von Initiatorcaspasen wird die Caspase-Kaskade in Gang gesetzt, die durch eine positive Rückkopplungsschleife (Initiatorcaspasen können auch durch Effektorcaspasen prozessiert werden) eine Verstärkung des initialen Signals erfährt und schließlich zum Tod der Zelle führt. Dabei wird die Aktivierung der Initiatorcaspasen über zwei Signalwege vermittelt, die als extrinsischer und intrinsischer Signalweg bezeichnet werden.

1.1.4 Der extrinsische Apoptose-Signalweg

In Abhängigkeit vom Todesstimulus werden unterschiedliche Signalwege der Apoptose eingeschlagen. So besitzen viele Zellen sogenannte Todesrezeptoren, die zur Familie der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptoren (Schulze-Osthoff *et al.*, 1998) gehören und von spezifischen extrazellulären Liganden aktiviert werden. Charakteristisch für diese Rezeptor-Familie sind mehrere extrazelluläre Cystein-reiche Domänen sowie die äußerst homologe intrazelluläre Todesdomäne (*death domain, DD*), welche für die Transduktion des cytotoxischen Signals verantwortlich ist (Ashkenazi und Dixit, 1998). Neben dem TNF-Rezeptor-1 und den beiden *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL)-Rezeptoren, ist der CD95-Rezeptor (*cluster of differentiation 95*) / Apo1 / Fas) der prominenteste Vertreter dieser Familie (Yonehara *et al.*, 1989; Trauth *et al.*, 1989). Ähnlich wie die diese Rezeptoren weisen auch ihre Liganden (CD95L, TNF- α und TRAIL) ein hohes Maß an Homologie auf.

Die Stimulation durch diese Liganden, die sowohl in löslicher als auch in membrangebundener Form vorliegen, führt zur Trimerisierung der Todesrezeptoren und damit zur Bildung des Todessignal-Komplexes (*death inducing signaling complex, DISC*) (Kischkel *et al.*, 1995). Die Oligomerisierung erleichtert bzw. bewirkt die Assoziation mit dem Adaptermolekül FADD (*Fas-associated protein with death domain* / MORT1), welches über seine Todesdomäne eine homophile Bindung mit der intrazellulären Todesdomäne der Rezeptoren eingeht (Itoh und Nagata, 1993). Gleichermaßen kann FADD über eine weitere Interaktionsdomäne, die Todeseffektordomäne (*death effector domain, DED*), mit den DEDs der Procaspasen-8 und -10 interagieren. Diese Bindung induziert eine Konformationsänderung der Initiatorcaspasen und damit deren anschließende autoproteolytische Prozessierung und Aktivierung (Muzio *et al.*, 1998; Kischkel *et al.*, 2001).

In Abhängigkeit vom Zelltyp führt dies entweder direkt (Typ I-Zellen) oder indirekt unter Beteiligung des intrinsischen Signalweges (Typ II-Zellen) zur Aktivierung von Effektorcaspasen wie z.B. Caspase-3 (Scaffidi *et al.*, 1998). Während Initiatorcaspasen in Typ I-Zellen schnell und in großen Mengen am DISC prozessiert werden, die die Caspase-3 direkt aktivieren können, kommt es dagegen aus bisher unbekanntem Gründen in Typ II-Zellen nur zu einer schwachen DISC-Bildung. Hierdurch werden nur unzureichende Mengen an aktiven Initiatorcaspasen generiert, die keine direkte Caspase-3-Aktivierung vermitteln können, weswegen eine Verstärkung über einen anderen Signalweg benötigt wird. Hierbei spielt das Caspase-8/10-Substrat Bid (*Bcl-2 interacting domain death agonist*), ein Mitglied der *BH3-only* Untergruppe der Bcl-2-Familie (Abschnitt 1.1.6), eine entscheidende Rolle. Durch dessen Spaltung transloziert das hierdurch generierte C-terminale tBid-Fragment (*truncated Bid*) zu den Mitochondrien und aktiviert dort den intrinsischen Signalweg der Apoptose (Li *et al.*, 1998) (Abschnitt 1.1.5).

Im Gegensatz zu CD95 erscheint der Signalweg des TNF-Rezeptor-1 weitaus komplexer, da von TNF- α nicht nur Apoptose-, sondern auch Überlebens-Signale übermittelt werden, die hauptsächlich auf eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zurückzuführen sind (Wajant *et al.*, 2003). So wird nach Bindung des Liganden TNF- α zunächst ein zellmembranständiger Rezeptorkomplex ausgebildet, der aus dem Adaptermolekül TRADD (TNF-R1-associated death domain protein), der Kinase RIP1 (*receptor interacting protein 1*) sowie TRAF2 (*TNF-receptor associated factor 2*) besteht und NF- κ B aktiviert. Apoptotische Signalwege werden aber nur im Falle einer schwachen oder erfolglosen NF- κ B-Aktivierung induziert, wodurch es zur Dissoziation dieses Komplexes in das Zytoplasma kommt und zur anschließenden Rekrutierung von FADD und den Initiatorcaspasen-8 /-10 (Micheau und Tschopp, 2003).

1.1.5 Der intrinsische Apoptose-Signalweg

Im zweiten Apoptose-Signalweg agieren die Mitochondrien als zentrale Schaltstelle, die nach Aktivierung durch unterschiedliche Stimuli wie z.B. DNA-Schäden Cytochrom c freisetzen und dadurch den mitochondrialen oder intrinsischen Todesweg initiieren (Luo *et al.*, 1998). Das freigesetzte Cytochrom c bindet im Zytoplasma das Regulatorprotein Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) und legt hierdurch dessen CARD-Interaktionsdomäne frei (Zou *et al.*, 1997). Durch die Exposition dieser Domäne kann nun die Interaktion über eine CARD-CARD Bindung mit der Caspase-9 erfolgen, was die Bildung eines hochmolekularen

heptameren Komplexes, dem sogenannten Apoptosom, bewirkt (Cain *et al.*, 1999). Die dadurch bedingte Oligomerisierung der Caspase-9 führt analog zur Caspase-8/-10 im DISC zu dessen autokatalytischer Prozessierung und nachfolgender Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7, die dann über die gezielte Spaltung ihrer Substrate für den ordnungsgemäßen Ablauf des apoptotischen Programms sorgen (Abb. 2).

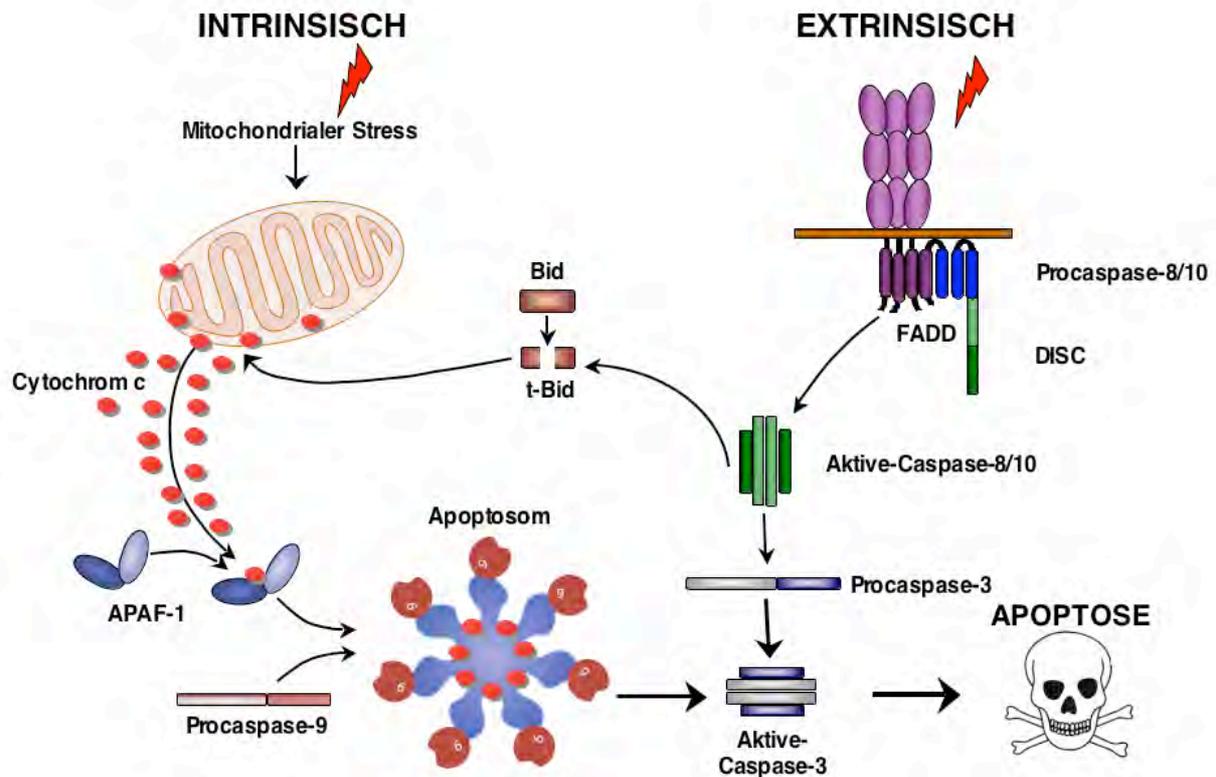


Abbildung 2: Der extrinsische und intrinsische Signalweg der Apoptose

Nach der Induktion des extrinsischen Apoptosesignalweges durch einen Todesrezeptorliganden kommt es zur DISC-Bildung, d.h. zur Rezeptor-Trimerisierung und anschließender Rekrutierung des Adaptermoleküls FADD und der Procaspase-8/-10. Die hierdurch prozessierte Caspase-8/-10 aktiviert dann die Effektorcaspase-3, wodurch Apoptose ausgelöst wird. Alternativ kann der intrinsische Todesweg entweder durch Weiterleitung des Rezeptorsignals über trunkiertes Bid (tBid) oder durch mitochondrialen Stress ausgelöst werden. In diesem Fall wird die Oligomerisierung der proapoptischen Proteine Bax und Bak ausgelöst (siehe 1.1.6), die wiederum Poren in der äußeren Mitochondrienmembran induzieren, so dass Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt wird. Durch Komplexbildung von Apaf-1, Cytochrom c und Procaspase 9 entsteht ein heptamerer Proteinkomplex, das Apoptosom, welches zur autokatalytischen Aktivierung dieser Initiatorcaspase führt und über die anschließende Prozessierung von Caspase-3 Apoptose induziert.

1.1.6 Die Bcl-2 Familie

Um eine unerwünschte Aktivierung des intrinsischen Todesweges zu vermeiden, ist es von entscheidender Bedeutung, dass der kritische Prozess in diesem Signalweg, die Freisetzung von Cytochrom c, äußerst streng kontrolliert wird. Dies wird durch eine evolutionär konservierte Gruppe von Regulatorproteinen gewährleistet, den Mitgliedern der Bcl-2-

Proteinfamilie. Der Namensgeber dieser Familie, das anti-apoptotisch wirkende Bcl-2-Protoonkogen, wurde 1985 in B-Zell-Lymphomen (*B-cell lymphoma*, *Bcl*) identifiziert, bei denen das Bcl-2-Gen häufig durch eine chromosomale Translokation in den Locus der schweren Immunglobulinkette versetzt ist (Tsujiimoto *et al.*, 1985). Dies führt zu einer stark erhöhten Bcl-2-Expression und zum Schutz der Zellen vor der Apoptose-Induktion (Hockenbery *et al.*, 1990). Die Einordnung in diese Proteinfamilie, deren Mitglieder sowohl anti- als auch pro-apoptotische Aufgaben übernehmen, wird durch das Vorhandensein von mindestens einer der vier konservierten α -helikalen BH (*Bcl-2 homology*)-Domänen bestimmt (Gross *et al.*, 1999; Adams und Cory, 1998). Die einzelnen Mitglieder dieser Familie können strukturell und funktionell in drei Gruppen eingeteilt werden. Die Proteine der ersten Gruppe weisen drei bis vier konservierte BH-Domänen (BH1-BH4) sowie eine Transmembrandomäne auf. Mitglieder dieser Gruppe wirken ausschließlich anti-apoptotisch und werden beispielsweise durch Bcl-2 repräsentiert. Die Mitglieder der zweiten Gruppe grenzen sich strukturell durch das Fehlen der BH4-Domäne ab und wirken ausschließlich pro-apoptotisch. Die prominentesten Vertreter sind Bax (*Bcl-2 associated x protein*) und Bak (*Bcl-2 antagonist killer*). Die Proteine der dritten Gruppe wie z.B. Puma (*p53-upregulated modifier of apoptosis*) und Noxa besitzen nur die BH3-Domäne (*BH3-only proteins*). Sie wirken ebenfalls pro-apoptotisch, indem entweder anti-apoptotische Bcl-2-Proteine inhibieren oder die pro-apoptotischen Proteine Bak und Bax aktivieren.

1.1.7 Regulation der mitochondrial vermittelten Apoptose durch die Bcl-2-Familie

Im Verlauf der Apoptose kommt es zur Porenbildung in den Mitochondrien (*permeability transition pore*, *PTP*). Diese Poren durchspannen sowohl die innere als auch die äußere Mitochondrienmembran (Newmeyer und Ferguson-Miller, 2003). Obwohl dies zu einem Verlust des mitochondrialen pH-Gradienten und damit zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) führt, ist noch umstritten, inwiefern dieser Prozess essentiell für die Initiierung des apoptotischen Signals ist. Unumstritten ist aber die Tatsache, dass aktivierte Bax- und Bak-Proteine eine Porenbildung in der äußeren mitochondrialen Membran induzieren, über die Cytochrom c aus dem intermembranären Raum in das Zytosol gelangen kann (Desagher *et al.*, 1999; Griffiths *et al.*, 1999). Die Freisetzung von Cytochrom c und die damit verbundene Apoptose-Induktion ist in Abwesenheit beider Proteine stark beeinträchtigt (Lindsten *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2001). Nach heutigem Verständnis liegen Bax und Bak im Zytoplasma bzw. in Assoziation mit den Mitochondrien als inaktive Monomere vor. Die

Aktivierung von Bax und Bak, die durch vielfältige Mechanismen wie z.B. durch die Bindung an die *BH3-only* Proteine tBid und Puma reguliert wird (Strasser, 2005), ruft eine Konformationsänderung hervor, wodurch der zuvor verborgene N-Terminus freigelegt wird, der die Proteine in einer inaktiven, geschlossenen Form gehalten hat. Dies bewirkt deren Oligomerisierung und Insertion in die äußere mitochondriale Membran (Korsmeyer *et al.*, 2000).

Die Antagonisten der Cytochrom c-Freisetzung sind die anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl-1, die als integrale mitochondriale Membranproteine Bax und Bak binden und so eine Porenbildung verhindern. Außerdem können sie auch mit aktivierten *BH3-only* Proteinen wie z.B. Puma und Noxa assoziieren und so einer Signalweiterleitung an Bax und Bak entgegenwirken (Cheng *et al.*, 2001). Letztendlich wird die mitochondriale Apoptose-Induktion durch das stöchiometrische Verhältnis der verschiedenen pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Mitglieder kontrolliert, welches von Überlebens- und Apoptose-Signalwegen abhängig ist (Tsujimoto, 2003). So konnte gezeigt werden, dass der Tumorsuppressor p53 z.B. die Transkription von Bax, Puma und Noxa induziert, während er die Expression von Bcl-2 und Bcl-x_L reprimiert (Yu und Zhang, 2005). Letztere sind aber auch gleichzeitig Zielgene des Überlebens- und Transkriptionsfaktors NF-κB (Chen *et al.*, 2000; Viatour *et al.*, 2003).

1.2 Der Tumorsuppressor p53

1.2.1 Struktur und Funktion von p53

Ein zentraler Regulator der zellulären Schadensantwort ist der Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor p53, der über zahlreiche DNA-schädigende Stimuli aktiviert wird. p53 kontrolliert über die Induktion seiner vielen Zielgene verschiedene kritische Prozesse wie den Zellzyklus, die DNA-Reparatur und die Apoptose (Levine *et al.*, 2006). Basierend auf diesen Funktionen, die der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität dienen und demzufolge einer Tumorentstehung entgegenwirken, lässt sich auch erklären, dass p53 in nahezu 50% aller humanen Tumore entweder eine inaktivierende Mutation aufweist oder vollständig deletiert ist. p53 stellt damit das am häufigsten mutierte Gen in Tumoren dar. (Greenblatt *et al.*, 1994; Hollstein *et al.*, 1991). Die vielfältigen Funktionen von p53 werden durch eine enorme Vielfalt von posttranslationalen Modifikationen des Transkriptionsfaktors kontrolliert (siehe 1.2.2). In funktioneller Hinsicht kann das p53-Protein in drei verschiedene Domänen

eingeteilt werden: die N-terminale Transaktivierungsdomäne (Fields und Jang, 1990), die zentrale DNA-Bindungsdomäne (Cho *et al.*, 1994) sowie die für die Tetramerisierung benötigte C-terminale Region, die für die Aktivierung von p53 essentiell ist (Ayed *et al.*, 2001).

1.2.2 Die Aktivierung von p53

Die Aktivierung von p53 durch DNA-Schäden erfolgt über eine zum Teil gut verstandene Phosphorylierungskaskade, die nicht nur den proteasomalen Abbau des relativ kurzlebigen p53-Proteins verhindert und dadurch zu dessen Stabilisierung führt, sondern auch eine erhöhte Sequenz-spezifische Promoterbindung zur Folge hat (Lavin und Gueven, 2006; Xu, 2003). Ausgangspunkt hierbei sind die sogenannten PI3-Kinasen der *Ataxia telangiectasia*-Familie, ATM und ATR, die durch DNA-Schäden autophosphoryliert und damit aktiviert werden (Appella und Anderson, 2001). Aktivierte ATM- und ATR-Kinasen phosphorylieren dann entweder direkt oder indirekt über die *Checkpoint*-Kinasen Chk1 und Chk2 das p53-Protein, wodurch dessen Dissoziation von der E3-Ligase HDM2 (*human double minute 2*) ausgelöst wird. Dadurch kann p53 nicht mehr von HDM2 mit Ubiquitin zur proteasomalen Degradation markiert werden. Darüber hinaus wird durch diese Dissoziation auch der HDM2-vermittelte Export von p53 aus dem Zellkern verhindert, ein Prozess, der ebenfalls zur Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors beiträgt.

Abgesehen von DNA-Schäden wird p53 auch durch eine Vielzahl stressinduzierender Stimuli aktiviert, weshalb es verständlich ist, dass auch andere Kinasen wie z.B. Casein-Kinasen, Cyclin-abhängige Kinasen (*Cyclin-dependent kinase*, *CDK*) oder die Jun N-terminale Kinase (JNK) diesen Transkriptionsfaktor phosphorylieren. Neben zahlreichen Phosphorylierungen wird die Aktivität von p53 auch durch andere post-translationale Modifikationen reguliert. Hierzu zählen Acetylierung, Sumoylierung, Methylierung sowie Neddylierung, deren Einflüsse aber allesamt noch weitgehend unverstanden sind (Bode und Dong, 2004; Lavin und Gueven, 2006).

1.2.3 Die Rolle von p53 in der Apoptose- und Zellzykluskontrolle

Sowohl Zellzyklusarrest als auch Apoptose werden überwiegend durch transkriptionelle Aktivitäten von p53 vermittelt. Während die p53-induzierte Apoptose über die Kontrolle einer Vielzahl von Genen vermittelt wird (siehe unten), ist der p53-induzierte Zellzyklusarrest weitgehend auf die Expression eines einzelnen Proteins, dem Cyclin-abhängigen Kinase

(CDK)-Inhibitor p21, zurückzuführen (Roninson, 2002). Über die Hemmung der Cyclin-D/CDK4- und Cyclin-E/CDK2-Komplexe, die durch die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (Rb) zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F führen, verhindert p21 die Expression zahlreicher Zellzyklus-relevanter Proteine und somit den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklusses. Darüber hinaus kann p21 durch die Hemmung verschiedener CDKs auch in anderen Zellzyklusphasen eingreifen.

Im Gegensatz hierzu moduliert p53 apoptotische Prozesse durch die Induktion von zahlreichen pro-apoptotischen Proteinen, von denen, wie bereits beschrieben, besonders die Bcl-2-Familienmitglieder Bax, Bak, Bid, Noxa und Puma hervorzuheben sind, da sie in der Initiierung der mitochondrialen Caspasekaskade von zentraler Bedeutung sind (Chipuk und Green, 2006). Darüber hinaus reprimiert p53 auch die Expression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 und Bcl-x_L und sensitiviert somit Zellen für eine Apoptose-Induktion (Yu und Zhang, 2005). Interessanterweise zeigten aber verschiedene Mausmodelle, in denen einzelne p53-Zielgene deletiert wurden, nicht den apoptotischen Phänotyp einer p53-*Knock-out*-Maus, was darauf hinweist, dass in der p53-induzierten Apoptose ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Faktoren notwendig ist und/oder p53 auch unabhängig von seiner Funktion als Transkriptionsfaktor in der Apoptose-Induktion agieren kann. Tatsächlich konnte die Freisetzung von Cytochrom c nur durch einen Bax/Bak-Doppel-*Knock-out* inhibiert werden, nicht aber nach Deletion der einzelnen Bcl-2-Proteine (Ruiz-Vela *et al.*, 2005).

Auch eine transkriptionsunabhängige Apoptose-Induktion durch p53 konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden. So wurde nicht nur gezeigt, dass Apoptose selbst durch ein transkriptionell inaktives p53-Protein induziert wird, sondern auch in Gegenwart von Cycloheximid, einem irreversiblen Inhibitor der Translation. Die zugrunde liegenden Mechanismen blieben aber lange unbekannt. Diesbezüglich wurden erst kürzlich verschiedene Modelle postuliert, die auf einer Translokation von p53 sowie auf dessen Interaktion mit den anti-apoptotischen Bcl-2- und Bcl-x_L-Proteinen beruhen. Während aber in einem Modell diese Interaktion im Zytoplasma stattfinden soll und insbesondere in Verbindung mit einer p53-vermittelten transkriptionellen Aktivierung von Puma zum Tragen kommt (Abb. 3) (Chipuk und Green, 2006), basiert ein anderes Modell ausschließlich auf der stressinduzierten Translokation von p53 an die Mitochondrien und der dort stattfindenden Interaktion mit Bcl-2 oder Bcl-x_L (Mihara *et al.*, 2003). Obwohl die Apoptose-Induktion durch p53 zumindest im zweiten Modell gänzlich unabhängig von seiner transkriptionellen Aktivität zu sein scheint, ist aber auch dieser Mechanismus nicht unumstritten.

Daneben spielt auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine bedeutende Rolle in p53-vermittelten Signalwegen, obwohl dieser hauptsächlich Überlebenssignale induziert. So trägt NF- κ B zur Regulation der p53-Expression bei und vermittelt dadurch dessen Stabilisierung und Aktivierung. Außerdem zeigten NF- κ B und p53 kooperative Effekte in der Induktion von p53-Zielgenen wie z.B. Puma (Schumm *et al.*, 2006). Anhand dieser komplexen Zusammenhänge wird die Bedeutung eines kritischen Gleichgewichtes zwischen NF- κ B- und p53-vermittelten Signalwegen offensichtlich, da dadurch essentielle Entscheidungsprozesse reguliert werden.

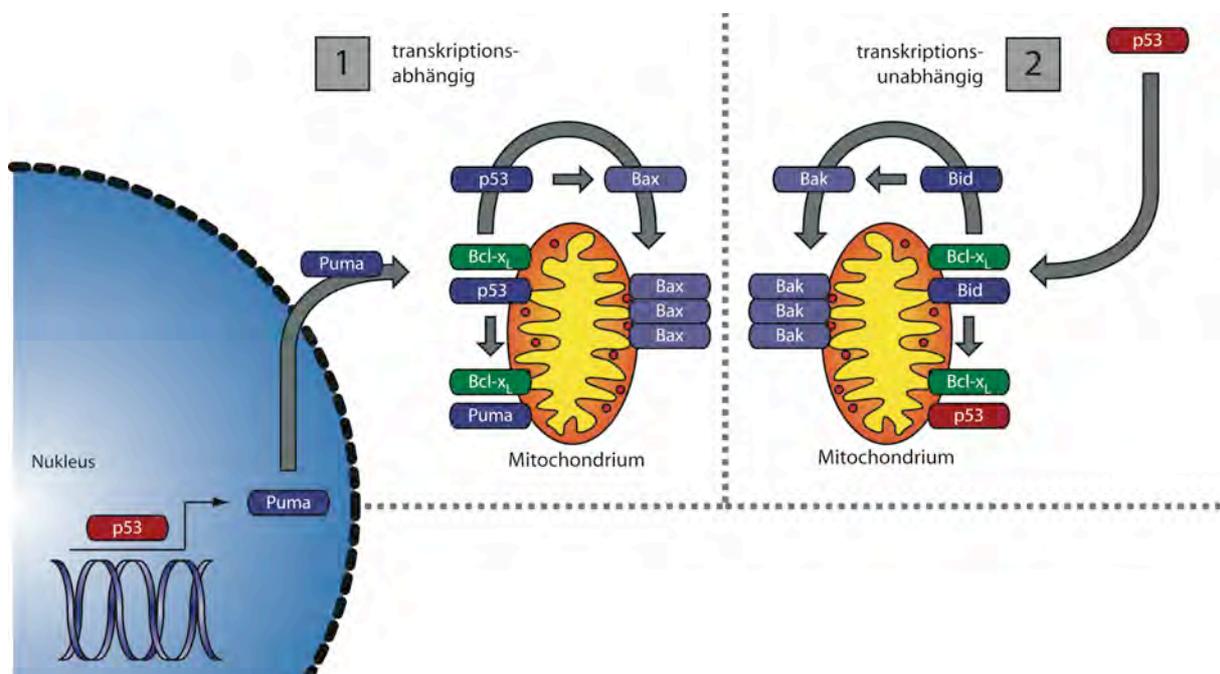


Abbildung 3: Modelle zur p53-induzierten Apoptose

(1) Dargestellt ist die p53-vermittelte Induktion von Apoptose im Zytoplasma, die in Verbindung mit der transkriptionellen Aktivierung von Puma auftritt. Durch Interaktion von Puma mit dem anti-apoptotischen Protein Bcl-x_L wird p53 aus einem Komplex mit Bcl-x_L befreit und kann Bax aktivieren. (2) Gezeigt ist eine transkriptionsunabhängige Funktion von p53 an den Mitochondrien. P53 setzt Bid aus einem Komplex mit Bcl-x_L frei, worauf p53 durch Bcl-x_L gebunden wird und Bid die Oligomerisation von Bak induziert.

1.3 Der Transkriptionsfaktor Nuklearfaktor-kappa B (NF- κ B)

NF- κ B wurde 1986 in reifen B-Lymphozyten als nukleärer Faktor entdeckt, der an eine spezifische DNA-Sequenz in der Verstärker-Region der Gene für die leichte Kette κ der Immunglobuline bindet und eine hohe konstitutive Aktivität aufweist (Sen und Baltimore, 1986). Mittlerweile ist bekannt, dass NF- κ B ein im Organismus ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor ist, der während der Evolution hoch konserviert wurde und durch eine große Anzahl extra- und intrazellulärer Stimuli aktivierbar ist. NF- κ B spielt

nicht nur eine Schlüsselrolle in der Immunantwort, sondern auch in der Regulation einer Vielzahl anderer biologischer Prozesse wie Apoptose, Zelladhäsion, Wachstumskontrolle und Differenzierung.

1.3.1 Die NF- κ B/Rel-Proteine

NF- κ B ist ein dimerer Transkriptionsfaktor, dessen Untereinheiten zur Familie der Rel-Proteine gehören. In Säugetieren besteht die NF- κ B-Familie aus fünf Mitgliedern: RelA (p65), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF- κ B-1) und p100/p52 (NF- κ B2). Diese Proteine zeichnen sich durch eine konservierte, aus 300 Aminosäuren bestehende, Rel-Homologie-Domäne (RHD) aus, welche für die DNA-Bindung, Dimerisierung, Kerntranslokation und Interaktion mit inhibitorischen I κ B-Proteinen verantwortlich ist (Chen und Ghosh, 1999). RelA, RelB und c-Rel werden als reife Proteine synthetisiert und sind aufgrund ihrer C-terminal lokalisierten Transaktivierungsdomäne in der Lage, die Transkription von Genen direkt zu aktivieren. Im Gegensatz dazu werden p50 und p52 als Vorläufermoleküle p105 bzw. p100 synthetisiert, die durch eine C-terminale Ankyrin-Wiederholungsdomäne charakterisiert sind. Diese wird durch einen Ubiquitin-abhängigen Degradationsprozess abgespalten und die Proteine so in ihre mature Form überführt (Hoffmann *et al.*, 2006). Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass p50 und p52 keine Transaktivierungsdomäne besitzen und somit zwar an die DNA binden, jedoch als Homodimere nicht zur Aktivierung von Zielgenen führen, es sei denn, sie interagieren mit transaktivierenden Proteinen wie Rel-A (Chen und Ghosh, 1999). Ansonsten ist p50/p50- und p52/p52-Homodimeren eher eine Rolle als negative Regulatoren der Transkription zuzuschreiben.

Mit Ausnahme von RelB, welches nur Heterodimere bildet, können die anderen Mitglieder der NF- κ B-Familie sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden, die an einen DNA-Abschnitt in der Promotorregion ihrer Zielgene mit der Konsensussequenz GGGRNYYCC (R, Purin; Y, Pyrimidin; N, beliebige Base), dem sogenannten κ B-Motiv, binden. Durch diese kombinatorische Diversität besitzt die Zelle die Möglichkeit zu einer äußerst variantenreichen NF- κ B-Antwort, da individuelle Dimere unterschiedliche Präferenzen für verschiedene κ B-Bindungsstellen haben, die sie mit unterschiedlicher Affinität und Spezifität binden können. Desweiteren werden verschiedene Dimerkomplexe sowohl stimulus- als auch zeitabhängig variabel aktiviert (Hoffmann *et al.*, 2003). Anhand von Röntgenstrukturanalysen konnte die Bindung von NF- κ B-Dimeren an die DNA visualisiert werden. NF- κ B umschließt mit beiden Untereinheiten schmetterlingsähnlich die DNA, in der eine Linker-Region als

Verbindung zwischen der DNA-bindenden- und der Dimerisierungsdomäne in den jeweiligen Untereinheiten liegt (Hoffmann *et al.*, 2006).

1.3.2 Die I κ B-Proteine

Die Aktivität von NF- κ B wird durch Assoziation mit inhibitorischen I κ B-Proteinen reguliert. Charakteristikum dieser Proteinfamilie ist das Vorhandensein von sechs oder sieben Ankyrin-Wiederholungen, die mit der RHD der NF- κ B-Proteine interagieren. Die Familie der I κ B-Moleküle in Säugetieren umfasst I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3, I κ B_{NS}, I κ B ζ sowie die Vorläufermoleküle p105 und p100.

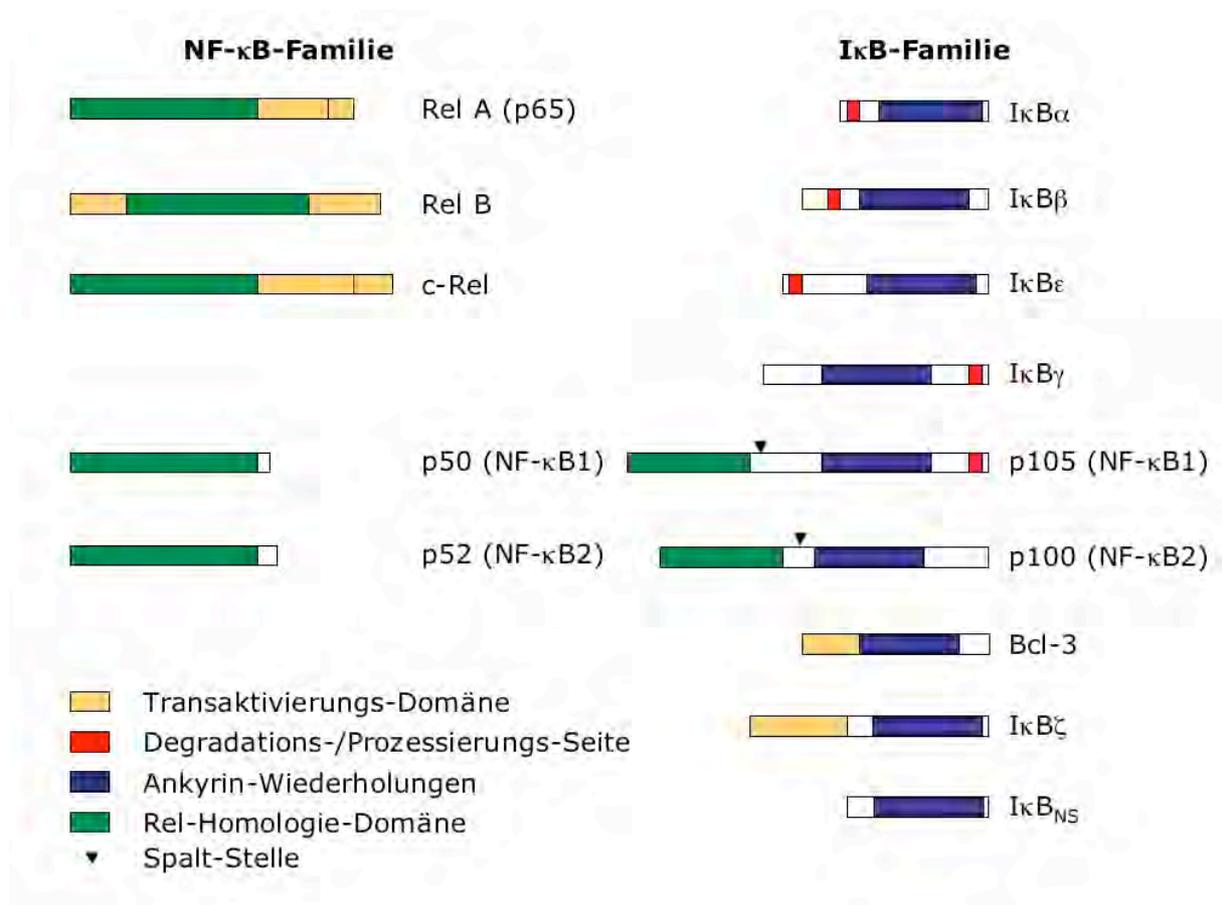


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Mitglieder der NF- κ B- und I κ B-Familie (verändert nach Muta, T.)

Die Mitglieder der NF- κ B-Familie besitzen eine charakteristische Rel-Homologie-Domäne, die für die DNA-Bindung, Dimerisierung, Kerntranslokation und Interaktion mit den I κ B-Proteinen verantwortlich ist. RelA, RelB und c-Rel weisen zusätzlich eine Transaktivierungsdomäne auf. p50 und p52 sind die prozessierten Formen ihrer Vorläuferproteine p105 und p100. Die I κ B-Proteine weisen typische Ankyrin-Wiederholungs-Domänen auf. I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ enthalten spezifische Sequenzen (Degradations-Seite), die phosphoryliert und polyubiquitiniert werden. I κ B γ entspricht der C-terminalen Domäne von p105. Bcl-3 und I κ B ζ weisen eine Transaktivierungsdomäne auf und sind ebenso wie I κ B_{NS} im Zellkern lokalisiert. Für die Prozessierung von p105

zu p50 und p100 zu p52 besitzen die Vorläufermoleküle eine Spalt-Stelle, die das Signal für die proteasomale Degradation enthält.

Innerhalb der I κ B-Familie wurde I κ B α als erster spezifischer NF- κ B-Inhibitor identifiziert (Baeuerle und Baltimore, 1988), der hauptsächlich die Aktivität des klassischen NF- κ B-Dimers p50/p65 regelt. Es handelt sich hierbei um ein 38 kD großes Protein, das primär durch den hohen Anteil an Aspartaten und Glutamaten auffällt. Strukturell werden die Ankyrin-Wiederholungen von einer regulatorischen Domäne auf der N-terminalen und einer PEST-Region auf der C-terminalen Seite flankiert. Die PEST-Domäne, benannt nach den häufig auftretenden Aminosäuren Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T), ist hauptsächlich im Proteinumsatz involviert. In den Ankyrin-Wiederholungen befinden sich zum einen die Kernimportsequenzen (*nuclear localization signal*, NLS) und zum anderen die Kernexportsequenz (*nuclear export sequence*, NES). Durch diese Sequenzen kann I κ B α konstitutiv zwischen Zytoplasma und Kern pendeln. Nach Inkubation mit NF- κ B-stimulierenden Agentien wird I κ B α innerhalb weniger Minuten abgebaut. Da das I κ B α -kodierende Gen ein κ B-Motiv in seinem Promotor enthält, bewirkt die NF- κ B-Aktivierung bereits nach 30 Minuten eine *de novo*-Synthese des I κ B α -Proteins, welches dann in den Zellkern translozieren und NF- κ B von der DNA dissoziieren kann. Im Anschluss wird der I κ B α /NF- κ B-Komplex ins Zytoplasma zurücktransportiert (Henkel *et al.*, 1993). Somit wird die NF- κ B-Aktivität sehr rasch über einen negativen Rückkopplungsmechanismus reguliert (Sun *et al.*, 1993). Zytoplasmatische I κ B α /NF- κ B-Komplexe können im Gegensatz zu beispielsweise anderen I κ B β /NF- κ B Komplexen in den Kern wandern, weil durch I κ B α nur eine NLS des NF- κ B-Dimers p65/p50 maskiert wird. I κ B β wurde 1995 kloniert. Es weist die gleichen strukturellen Merkmale wie I κ B α auf (Sun *et al.*, 1993) und bindet wie dieses I κ B-Protein mit einer ähnlich hohen Affinität an dieselben NF- κ B-Untereinheiten. Im Unterschied zu I κ B α unterliegt die Expression von I κ B β keinem negativen Rückkopplungsmechanismus, wodurch es zu einer länger anhaltenden NF- κ B-Aktivierung kommt. Ein weiterer Unterschied zu I κ B α liegt darin, dass I κ B β nach einem Stimulus verzögert abgebaut wird, was darauf zurückzuführen ist, dass I κ B β über seine C-terminale PEST-Domäne mit einer Subklasse von Ras-Proteinen assoziiert ist (Fenwick *et al.*, 2000). I κ B ϵ weist abgesehen von der fehlenden PEST-Domäne große strukturelle Ähnlichkeiten zu I κ B α und I κ B β auf (Whiteside *et al.*, 1997), bindet jedoch im Unterschied zu diesen I κ B-Proteinen präferentiell p65- und c-Rel-Homodimere. Analog zu I κ B β verläuft die Degradationskinetik langsamer als bei I κ B α . Eine weitere Besonderheit ist die erhöhte Expression in Makrophagen.

Bei I κ B γ handelt es sich um ein alternatives Genprodukt des NF- κ B1-Gens, das durch einen internen Promotor von einem alternativen Start aus gebildet wird (Inoue *et al.*, 1992). I κ B γ inhibiert p50- und p52-Homodimere spezifisch in murinen B-Zellen (Baldwin, 1996). Durch das Vorhandensein von Ankyrin-Wiederholungen in ihrem C-Terminus werden die Vorläuferproteine p105 und p100 ebenfalls in die Klasse der I κ B-Proteine eingeordnet. p100 spielt eine Rolle bei der Regulation von RelB, wohingegen p105 anscheinend einer permanenten Prozessierung unterliegt (Xiao *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zu den bisher aufgeführten zytoplasmatischen I κ B-Proteinen sind Bcl-3, I κ B_{NS} und I κ B ζ im Zellkern lokalisiert. Bcl-3 wurde erstmals als in Lymphknoten vorkommend beschrieben, wo es als Onkogen in B-Zellen agiert (Ohno *et al.*, 1990). Strukturell weist es große Homologien zu I κ B α auf, besitzt allerdings in seinem N- und C-Terminus sehr prolinreiche Sequenzen, welche der Transkriptionsaktivierung der durch p50- oder p52-Homodimere vermittelten Genexpression dienen (Baeuerle und Baltimore, 1996). Hierbei kann Bcl-3 zum einen mit den p50- und p52-Homodimeren interagieren, wodurch diese von den κ B-Bindungsstellen der DNA entfernt werden und somit die Bindung von NF- κ B-Dimeren mit Transaktivierungsdomäne ermöglicht wird (Franzoso *et al.*, 1993). Zum anderen kann Bcl-3 mit den p50- und p52-Homodimeren einen transkriptionell aktiven Komplex bilden, wodurch es zu einer direkten Aktivierung der Genexpression kommt (Bours *et al.*, 1993).

I κ B_{NS} wurde bei der negativen Selektion von murinen Thymozyten identifiziert. Es interagiert mit der NF- κ B-Untereinheit p50 (Fiorini *et al.*, 2002). I κ B_{NS} scheint eine große Rolle bei der Regulation der zellulären Zytokinantwort zu spielen, da es beispielsweise die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Interleukin (IL)-6 Produktion inhibiert (Kuwata *et al.*, 2006; Hirotsu *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu spielt das I κ B-Protein I κ B ζ eine Rolle als positiver Regulator inflammatorischer Prozesse (siehe unten) und fungiert daher vermutlich als Gegenspieler von I κ B_{NS}.

I κ B ζ wurde zunächst im Rahmen zweier voneinander unabhängiger Forschungsarbeiten in der Maus identifiziert und entsprechend der induzierenden Stimuli als *molecule possessing ankyrin-repeats induced by LPS* (MAIL) oder *IL-1-inducible nuclear ankyrin-repeat protein* (INAP) bezeichnet (Kitamura *et al.*, 2000; Haruta *et al.*, 2001). Kurz darauf wurde dieses neue I κ B-Protein in einer weiteren Arbeit mittels subtraktiver Hybridisierung identifiziert und erstmals auf Grund von funktionellen und strukturellen Charakteristika namentlich als „I κ B ζ “ in die Gruppe der I κ B-Proteine eingeordnet (Yamazaki *et al.*, 2001). Die C-terminalen

Ankyrin-Wiederholungen weisen eine hohe Homologie zu Bcl-3 und zu I κ B_{NS} auf, wohingegen die N-terminale Region von I κ B ζ keinerlei Homologien zu anderen bekannten Proteinen zeigt. Im Gegensatz zu den klassischen I κ B-Proteinen zeichnet sich I κ B ζ ebenso wie Bcl-3 durch diverse atypische Merkmale wie das Vorhandensein einer Transaktivierungsdomäne und die nukleäre Lokalisation aus. Entsprechend dieser subzellulären Lokalisation konnte bisher keinerlei Effekt von I κ B ζ auf den nukleären Import von NF- κ B gezeigt werden. Die NLS wurde in der N-terminalen Region des Proteins identifiziert (Yamazaki *et al.*, 2001). I κ B ζ wird vorwiegend in Milz, Lunge und den Lymphknoten der Maus exprimiert (Kitamura *et al.*, 2000).

Das murine I κ B ζ -Gen ist 30kb groß und beinhaltet 14 Exons, die für I κ B ζ (L) kodieren. Durch Ausschluss von Exon 3 entsteht die verkürzte, alternative Spleißvariante I κ B ζ (S). Eine weitere Spleißvariante, I κ B ζ (D), mit einer größeren Deletion im zentralen Teil des Gens, wird durch Spleißen in Exon 7 erzeugt (Motoyama *et al.*, 2005). Nach IL-1 β - oder LPS-Stimulation wird hauptsächlich das 85 kD I κ B ζ (L)-Protein induziert, wobei zusätzlich eine zweite größere Form auftritt. Dies weist auf eine posttranslationale Modifikation des Proteins hin, bei der es sich jedoch nicht um eine Phosphorylierung handelt (Kitamura *et al.*, 2003; Yamazaki *et al.*, 2005).

Interessanterweise wird die murine I κ B ζ -mRNA spezifisch über den IL-1-/TLR (*Toll-like receptor*)-Signalweg, jedoch nicht über den TNF-Signalweg induziert, was auf einer Stabilisierung des I κ B ζ -Transkripts beruht. Diese posttranskriptionelle Regulation wird durch ein integriertes cis-Element im N-terminalen Bereich des I κ B ζ -Leserahmens kontrolliert. Während die alleinige Stimulation mit TNF- α keinen Einfluss auf die Expression von I κ B ζ ausübt, führt dieses Zytokin in Kombination mit IL-17 zu einer Induktion der I κ B ζ -mRNA, wobei IL-17 für die Stabilisierung der mRNA erforderlich ist. Somit werden für die I κ B ζ -Induktion zwei Signale benötigt, die Aktivierung von NF- κ B und eine Stimulus-spezifische Stabilisierung der I κ B ζ -mRNA (Yamazaki, 2005).

Durch Studien an I κ B ζ -*knock-out*-Mäusen konnten Erkenntnisse zur physiologischen Rolle von I κ B ζ gewonnen werden. I κ B ζ -defiziente Mäuse zeigten in den ersten vier bis acht Wochen nach der Geburt keine äußerlichen Veränderungen. Danach bildete sich allerdings eine chronische Entzündung des okulären Bereiches aus. Das Krankheitsbild entsprach einer allergischen, überempfindlichen Hautentzündung, die von einem erhöhten IgE-Spiegel und einer erhöhten Expression von Thymus- und Aktivierungs-regulierten Chemokinen in den

Läsionen begleitet wurde (Shiina *et al.*, 2004). I κ B ζ scheint an der Regulation inflammatorischer Prozesse beteiligt zu sein, da die durch Liganden des IL-1/TLR-Signalweges induzierte IL-6-Synthese in I κ B $\zeta^{-/-}$ -Zellen dramatisch reduziert ist. Im Gegensatz dazu wurde eine Beeinträchtigung der TNF- α -medierten IL-6-Induktion in den I κ B ζ -defizienten Zellen nicht beobachtet. Nach Stimulation mit LPS wird I κ B ζ an die κ B-Bindungsstelle des IL-6-Promotors rekrutiert. Da I κ B ζ spezifisch mit p50, jedoch nicht mit RelA, RelB, c-Rel und p52 interagiert, wird die IL-6-Aktivierung wahrscheinlich durch diese Assoziation ausgelöst. Neben der Induktion von IL-6 ist I κ B ζ ebenso essentiell für die Expression zahlreicher weiterer LPS-induzierbarer Gene wie Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) oder IL-12 p40 (IL12b) (Yamamoto *et al.*, 2004). Für die transkriptionelle Aktivität sind die Aminosäuren 329-402 in der N-terminalen Region von I κ B ζ verantwortlich, wie anhand von GAL4-Fusionsproteinen mit verschiedenen I κ B ζ -Fragmenten in einem Reportergentest ermittelt wurde. Interessanterweise führte das komplette I κ B ζ nicht zur Transkriptionsaktivierung, sondern erst nach Koexpression mit einem GAL4-p50 Protein (Motoyama *et al.*, 2005).

In einem differentiellen Screening mit Apoptose-resistenten und -sensitiven Zellen wurde in unserem Institut erstmalig das humane I κ B ζ identifiziert und strukturell charakterisiert. Es ist in der Lage, mit den NF- κ B-Untereinheiten p65 und p50 zu interagieren und kann die Transkription von NF- κ B inhibieren. Im Gegensatz zu anderen I κ B-Proteinen wird I κ B ζ nach Stimulation der Zelle nicht abgebaut, sondern erfährt eine starke Induktion seines Transkripts im Gegensatz zum murinen I κ B ζ durch TNF- α und in Übereinstimmung mit dem murinen I κ B ζ durch LPS oder IL- β . Die Expression seines Transkriptes konnte in verschiedenen Geweben der Lunge und der Leber sowie in Leukozyten entdeckt werden und scheint dort eine Rolle in der Regulation apoptotischer Prozesse zu spielen (Totzke *et al.*, 2006). Kürzlich wurde der Einfluss von humanem I κ B ζ auf das NF- κ B-Zielgen NGAL (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*), einem siderophoren Bindeprotein, welches bakterio-statische Effekte vermittelt, beschrieben (Cowland *et al.*, 2006). Die Expression von NGAL wird spezifisch durch IL-1 β , jedoch nicht durch TNF- α induziert, obwohl beide Zytokine eine Bindung von NF- κ B an den Promotor des Gens induzieren. I κ B ζ wird bekanntlich ebenfalls spezifisch durch IL-1 β induziert. Es konnte gezeigt werden, dass dieses I κ B ζ -Protein als Koaktivator für die IL-1 β spezifische NGAL-Induktion über den NF- κ B-Signalweg erforderlich ist.

1.3.3 Mechanismus der NF- κ B-Aktivierung

In unstimulierten Zellen wird NF- κ B durch Assoziation mit den I κ B-Proteinen, hauptsächlich I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ , im Zytoplasma in seiner inaktiven Form gehalten. Die Bindung der I κ B-Proteine an die RHD von NF- κ B maskiert dessen NLS, wodurch eine Translokation vom Zytoplasma in den Kern verhindert wird. NF- κ B kann durch eine Vielzahl extra- und intrazellulärer Stimuli aktiviert werden. Dazu gehören Pathogene (Bakterien und Viren sowie deren Produkte), oxidativer (z.B. Wasserstoffperoxid, Ozon) und physikalischer Stress (UV-Strahlung, ionisierende Strahlung, Scherkräfte) sowie chemische (z.B. Phorbol ester, Forskolin) und zelluläre Agentien (Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone). Die NF- κ B-aktivierenden Stimuli führen zur Phosphorylierung, Polyubiquitinierung und proteasomalem Abbau der I κ B-Proteine, wodurch die NF- κ B-Dimere freigesetzt werden und in den Kern translozieren. Es existieren zwei Signalwege, über die NF- κ B aktiviert werden kann: der klassische und der alternative NF- κ B-Signalweg, die beide durch den I κ B-Kinase (IKK)-Komplex vermittelt werden.

1.3.4 Der I κ B-Kinase (IKK)-Komplex

Der 900 kD große IKK-Komplex wurde erstmals 1996 in unstimulierten HeLa-Zellen bei der Phosphorylierung von I κ B α beschrieben (Chen *et al.*, 1996). Der gesamte Komplex besteht aus drei Untereinheiten: IKK α , IKK β und IKK γ (NEMO). IKK α und IKK β weisen eine hohe Sequenzhomologie in über der Hälfte ihrer Aminosäuren auf und bilden funktionell die katalytische Untereinheit des Komplexes. Dementsprechend besitzen IKK α und IKK β eine N-terminale Kinasedomäne und einen Leucinreißverschluss sowie eine C-terminale Helix-Schleife-Helix-Domäne. Ergänzt werden die beiden durch IKK γ , welches regulatorische Aufgaben ohne Kinase-Aktivität übernimmt. Strukturell besteht IKK γ aus drei großen helikalen Domänen, einem Leucinreißverschluss und einer C-terminalen Zink-Finger-Domäne (Scheidereit, 2006).

1.3.5 Die klassische Aktivierungskaskade

Der klassische Weg der NF- κ B-Aktivierung wird hauptsächlich durch proinflammatorische Stimuli oder genotoxischen Stress ausgelöst. Es kommt zur Aktivierung des IKK-Komplexes, indem die Serinreste 176 und 180 von IKK α und 177 und 181 von IKK β in deren Kinasedomäne einer spezifischen Phosphorylierung unterzogen werden. Dabei ist die Phosphorylierung in der IKK β -Untereinheit für die Aktivierung obligatorisch. Anschließend phosphoryliert IKK β zwei Serinreste in der N-terminalen Region von I κ B. Im humanen I κ B α

handelt es sich dabei um Ser32 und Ser36, bei I κ B β um Ser19 und Ser23. Die I κ B-Proteine werden daraufhin durch den SCF/beta-TrCP Ubiquitin-Ligasekomplex polyubiquitiniert und anschließend durch das 26S Proteasom abgebaut. Die Polyubiquitinierung von I κ B α erfolgt an den zwei benachbarten Lysinresten Lys21 und Lys22. Als Folge dessen wird die NLS von NF- κ B demaskiert und der Transkriptionsfaktor transloziert in den Zellkern, wo er die Transkription seiner Zielgene reguliert. Dazu gehört auch I κ B α , welches nach Neusynthese in den Kern wandert, NF- κ B von der DNA ablöst und zurück ins Zytoplasma transportiert. Durch diese negative Rückkopplung reguliert NF- κ B seine eigene Aktivität (Hoffmann *et al.*, 2006).

1.3.6 Der alternative NF- κ B-Aktivierungsweg

Dagegen wird der alternative Weg durch diverse Mitglieder der TNF-Familie, so u.a. dem *B cell activating factor of the TNF family* (BAFF) und dem CD40-Liganden (CD40L) aktiviert. Im Mittelpunkt des alternativen NF- κ B Aktivierungsmechanismus steht die NF- κ B-induzierende Kinase (*NF- κ B inducing kinase*, *NIK*). In einer von IKK β und IKK γ unabhängigen Reaktion werden IKK α -Homodimere durch NIK phosphoryliert, die ihrerseits p100 phosphorylieren, welches im Zytoplasma in einem Komplex mit RelB assoziiert ist (Senftleben *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung leitet die Polyubiquitinierung und die partielle proteasomale Degradation ein, so dass p100 zu p52 umgewandelt wird. Nach dieser Prozessierung transloziert der p52/RelB-Komplex in den Kern und bindet an die entsprechenden Promotorsequenzen (Derudder *et al.*, 2003).

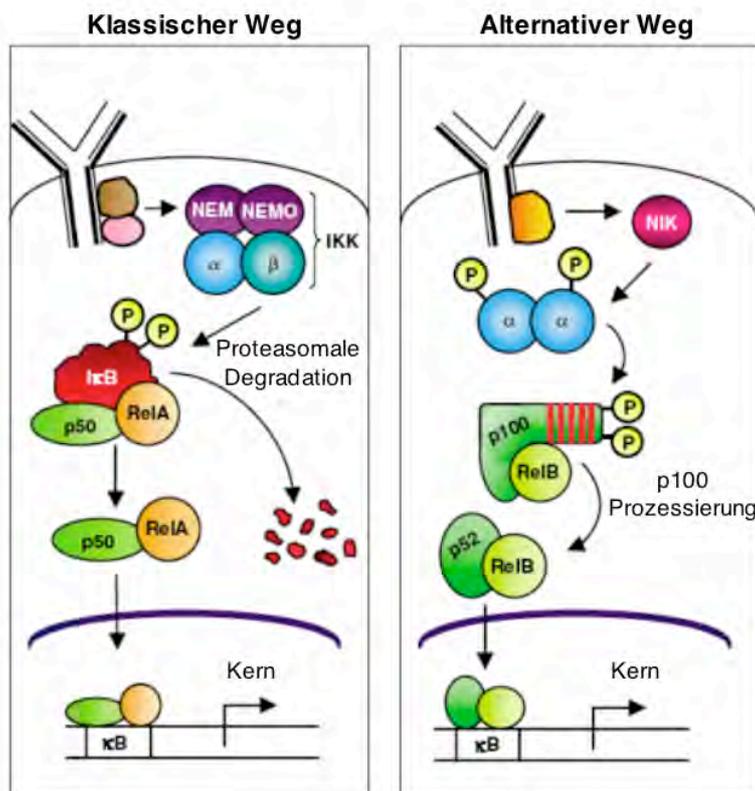


Abbildung 5: Der klassische und alternative NF-κB-Signalweg (nach Gilmore *et al.*, 2006)

Zwei Signalwege führen zur Aktivierung von NF-κB. Der klassische Weg wird durch proinflammatorische Stimuli sowie durch genotoxischen Stress ausgelöst (links). Dies führt zu einer IKKβ-abhängigen Phosphorylierung und nachfolgenden Polyubiquitinierung der IκB-Proteine, die in einer proteasomalen Degradation endet. Dadurch wird das NF-κB-Dimer freigesetzt und transloziert in den Kern, wo es die Transkription von Zielgenen aktiviert. Der alternative Weg wird durch verschiedene Mitglieder der TNF-Familie ausgelöst (rechts). NIK vermittelt eine Aktivierung von IKKα, das als Homodimer die proteasomale Degradation von p100 zu p52 einleitet. Dies führt zu einer Translokation eines p52/RelB-Dimers in den Kern.

1.3.7 Die Funktion und Regulation von NF-κB

NF-κB reguliert viele Gene, die für inflammatorische Prozesse relevant sind. So kommt den proinflammatorisch regulierten Genen eine besondere Rolle bei der Immunantwort zu. Ein wesentlicher Faktor bei der Immunantwort ist die Signalübertragung durch Botenstoffe wie Zytokine oder Chemokine, welche durch NF-κB induziert werden. Allerdings kann NF-κB auch einem selbstamplifizierenden Zyklus unterliegen, indem er Zytokine wie TNF-α und IL-1 hochreguliert, welche selbst NF-κB induzieren können. Im Anschluss an die Initiation einer Entzündungsreaktion werden weitere proinflammatorische Zytokine wie IL-6 und vor allem endotheliale Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1, ICAM-1 oder E-Selectin, die ebenfalls der Kontrolle durch NF-κB unterliegen und die endotheliale Transmigration von Entzündungszellen regulieren, induziert.

Des Weiteren spielt NF- κ B bei der Regulation der Apoptose eine wesentliche Rolle. Obwohl der Transkriptionsfaktor sowohl pro- als auch antiapoptotische Prozesse reguliert, kommt es in den meisten Zellen zur Hemmung der Apoptose. Ein erster Hinweis auf eine antiapoptotische Wirkung wurde anhand von Rel-A-defizienten Mäusen erbracht, die bereits im Embryonalstadium durch massive Apoptose der Leberzellen starben. Interessanterweise konnte durch das zusätzliche Ausschalten des TNF- α -Gens die Apoptose verhindert werden, was zeigt, dass RelA vor TNF- α -induziertem Zelltod schützt. Kürzlich wurde nachgewiesen, dass NF- κ B über die Induktion der proapoptotischen alternativen Spleißvariante des Bcl-Gens, Bcl_x_s, zur Apoptose von Neuronen führt (Dutta *et al.*, 2006). Eine weitere Regulation von NF- κ B durch Phosphorylierung oder Interaktion mit Kofaktoren betrifft unmittelbar die transkriptionelle Aktivität in der Promotorregion der jeweiligen Zielgene. In Abhängigkeit von verschiedenen Regulationsmechanismen wird die spezifische und selektive Antwort von allen NF- κ B abhängigen Genen vermittelt. Die Spezifität der Transkriptionsaktivierung basiert unter anderem auf den Unterschieden in der κ B-Bindungsstelle der Zielgene. Letztere ermöglichen bzw. erleichtern eine selektive Assoziation von bestimmten NF- κ B-Dimeren, die ihrerseits spezifisch in gewissen Signalwegen reguliert werden. Des Weiteren kann eine differentielle NF- κ B-Aktivierung durch die I κ B-Proteine moduliert werden, die stimulus- und zelltypabhängig degradiert werden. Da die verschiedenen Mitglieder der I κ B-Proteine nur mit bestimmten NF- κ B-Komplexen interagieren, werden durch ihren spezifischen Abbau nur bestimmte NF- κ B Dimere aktiviert. Interessanterweise unterliegen die einzelnen I κ B-Proteine bestimmten Degradationskinetiken und sorgen somit für Unterschiede in der Dauer der NF- κ B Antwort. Letztendlich spielt auch der Zelltyp indem NF- κ B aktiviert wird eine große Rolle, da nicht alle Zellen die entsprechenden Rezeptoren oder Signalmoleküle besitzen, um auf die Vielfalt aller NF- κ B stimulierenden Liganden zu antworten (Karin, 1999). So wirkt sich beispielsweise eine Hyperphosphorylierung der p50-Untereinheit stabilisierend aus, während eine Hypophosphorylierung destabilisierend auf die p50-DNA-Interaktion wirkt (Li *et al.*, 1994; Kushner und Ricciardi, 1999). Im Zusammenspiel mit der Phosphorylierung von NF- κ B-Proteinen sind auch Interaktionen mit weiteren transkriptionellen Koaktivatoren relevant. So ist beispielsweise bekannt, dass p65 nur im phosphorylierten Zustand mit dem Koaktivator CBP/p300 interagieren kann (Viatour *et al.*, 2005).

Neben der direkten transkriptionsaktivierenden Funktion wurde auch beschrieben, dass NF- κ B-Proteinen mit anderen Transkriptionsfaktoren wie z.B. p53 interagieren oder hierdurch auf indirektem Wege die Genexpression beeinflussen kann (Wu und Lozano, 1994). Im

Anbetracht der vielfältigen Bedeutung von NF- κ B in verschiedenen Signalprozessen ist es nicht erstaunlich, dass eine Fehlfunktion der NF- κ B-Regulation mit diversen Krankheiten wie Asthma, Atherosklerose, chronische Entzündungen oder einer Ischämie-bedingten Leberschädigung assoziiert ist (Courtois und Gilmore, 2006; Makarov, 2000; Zwacka *et al.*, 1998). Im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen wurde auch eine Beteiligung der Tyrosinkinase Lck an NF- κ B beschrieben werden.

1.4 Struktur und Funktion der Tyrosinkinase p56 Lck

Die Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten ist ein zentraler Mechanismus bei der Modulation verschiedener Signalketten. Die Balance zwischen phosphorylierten und unphosphorylierten Proteinen wird maßgeblich durch das Zusammenspiel von Tyrosinkinasen mit ihren Zielproteinen reguliert. Die Gruppe der Tyrosinkinasen lässt sich in zwei Untergruppen teilen: die Rezeptor-Tyrosinkinasen und die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen. Rezeptor-Tyrosinkinasen besitzen eine extrazelluläre Liganden-Bindungsstelle, eine hydrophobe Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische Region. Die Mitglieder der Src-Familie sind typische Vertreter der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen und können strukturell in fünf funktionelle Domänen unterteilt werden. Darunter weisen sie N-terminal eine Src-Homologie-Domäne, eine SH3- und SH2-Domäne und eine katalytische sowie eine regulatorische Domäne am C-Terminus auf. Die Tyrosinkinase Lck, ein Mitglied dieser Familie, hat ein Molekulargewicht von 56 kDa, und wird hauptsächlich in T-Zellen exprimiert, wo sie eine wichtige Funktion bei Aktivierungsprozessen durch den T-Zellrezeptor (TZR) besitzt. Lck wird hauptsächlich durch Phosphorylierung der Aminosäuren Tyr394 und Tyr505 in ihrem katalytischen Zentrum reguliert. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung von Tyr505 zu einer inaktiven Konformation führt (Chow *et al.*, 1993; Ostergaard *et al.*, 1989), während die Phosphorylierung von Tyr394 die katalytische Aktivität steigert (Hardwick und Sefton, 1997). Für die Aktivierung von Lck ist ebenso eine N-terminale Myristoylierung erforderlich, die die Kinase in der Membran verankert. In ersten Untersuchungen wurde Lck mit der Aktivierung von T-Zellen in Verbindung gebracht, wo eine gesteigerte rezeptorvermittelte Tyrosinphosphorylierung durch die konstitutive Expression von Lck ausgelöst wurde (Abraham *et al.*, 1991). Untersuchungen an einer mutierten T-Zelllinie (JCaM1.6), die eine katalytisch inaktive Form von Lck exprimiert, bestätigten diese zentrale Bedeutung von Lck. In diesen Zellen ist die intrazelluläre Signaltransduktion nach TZR/CD3-Stimulierung gestört und kann durch Transfektion von Wildtyp-Lck wiederhergestellt werden

(Straus und Weiss, 1992). Nach heutiger Kenntnis bewirkt Lck die Phosphorylierung des TZR-Komplexes innerhalb von intrazellulären Sequenzmotifen, die als ITAMs (Immunorezeptor-Tyrosin-Aktivierungsmotive) bezeichnet werden. Dieses ermöglicht die Rekrutierung der Tyrosinkinase ZAP-70 und weiterer Mediatoren, die schließlich zur Aktivierung der Phospholipase C führen. Letztendlich kommt es nach Bildung von Diacylglycerin und Inositoltriphosphat zu der Aktivierung zahlreicher Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren (NF-AT, NF- κ B AP-1), die an der Bildung T-Zell-Mitogens IL-2 beteiligt sind (Di Somma *et al.*, 1996). Allerdings wurde auch eine proapoptische Rolle von Lck beschrieben, die an der Apoptose-Induktion durch ionisierende Strahlung, Ceramid oder Chemotherapeutika beteiligt sein soll (Heyninck und Beyaert, 2006). Wie Lck in apoptotischen Signalketten eingreift, ist jedoch weitgehend unklar.

2 ZIELSETZUNG

Wie einleitend beschrieben, besitzen die Tyrosinkinase Lck, der Tumorsuppressor p53 und der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine zentrale Stellung in zahlreichen biologischen Prozessen. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene durch diese drei Proteine vermittelte Regulationsmechanismen näher untersucht.

Der Tumorsuppressor p53

Der Tumorsuppressor p53 wird nach DNA-Schädigung über komplexe Regulationsmechanismen aktiviert und kann in den geschädigten Zellen in Abhängigkeit unterschiedlicher posttranslationaler Modifikationen entweder einen Zellzyklusarrest, Seneszenz oder Apoptose induzieren. Diese zellulären Effekte werden überwiegend durch die transkriptionelle Aktivität von p53 und die Expression zahlreicher p53-Targetgene vermittelt. Jüngere Untersuchungen deuten jedoch daraufhin, dass an der Apoptose-Induktion durch p53 auch eine transkriptionsunabhängige Aktivität von p53 beteiligt ist, die durch eine Translokation von p53 an die Mitochondrien und eine dortige Interaktion mit Bcl-2-Proteinen vermittelt werden soll. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine mögliche Funktion von p53 an den Mitochondrien näher untersucht. Hierbei wurde auch der Fragestellung nachgegangen, ob eine gestörte Interaktion von p53 mit mitochondrialen Apoptose-Regulatoren an der Strahlenresistenz von Tumorzellen beteiligt ist.

Das I κ B Protein I κ B ζ

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde das neue humane I κ B-Protein I κ B ζ in der Arbeitsgruppe durch ein differntielles *Screening* von Apoptose-sensitiven und resistenten Zellen entdeckt. In einer ersten Studie konnte in Reportergerntests gezeigt werden, dass die Überexpression von I κ B ζ in der Tat die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B inhibiert. Weitere Untersuchungen erwiesen jedoch, dass I κ B ζ - ähnlich wie für das I κ B-Homolog Bcl-3 bekannt - eine eigene Transaktivierungsdomäne besitzt und dadurch möglicherweise genaktivierende Funktionen ausübt. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Befund näher charakterisiert und eine mögliche Funktion von I κ B ζ für die Aktivierung proinflammatorischer Targetgene untersucht. Aufgrund einer bekannten Rolle von NF- κ B als Überlebensfaktor, wurde weiterhin die Effekte von I κ B ζ auf die Apoptose analysiert.

Die Tyrosinkinase Lck

Die Tyrosinkinase Lck ist in T-Zellen ein zentraler Regulator der Zellaktivierung. Vorausgegangene Studien hatten auf eine proapoptotische Funktion von Lck bei der Chemotherapeutika-induzierten Apoptose hingewiesen, die jedoch bislang ausschließlich durch Experimente in dem durch chemische Mutagenese generierten Lck-defizienten Jurkat T-Zellklon JCaM1.6 bestätigt wurden. Die Rolle von Lck bei der Apoptose-Induktion sollte daher in weiteren Zellsystemen analysiert werden. Insbesondere sollte die Regulation von Bcl-2 Proteinen durch die Tyrosinkinase näher charakterisiert werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen Sigma (München), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

3.1.2 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> -Stamm	Genotyp	Verwendung	Bezugsquelle
Top 10 F'	$F'\{lacI^q, Tn10(Tet^R)\}$ <i>mcrA</i> <i>_(mrr-hsdRMS-</i> <i>mcrBC)</i> <i>_80lacZ_M15</i> <i>_lacX74 recA1 araD139</i> <i>_(ara-leu)7697 galU</i> <i>galK rpsL (Str^R) endA1</i> <i>nupG</i>	Rezipientenstamm für die Vermehrung von Plasmidvektoren und deren Derivaten	Invitrogen (Karlsruhe)
BL21 (DE3) Gold	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm⁺ Tet^r gal_</i> (DE3) <i>endA Hte</i>	Rezipientenstamm für die Vermehrung von Plasmiden und deren Derivaten	Stratagene (Heidelberg)

3.1.3 Eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Charakteristika	Medium
MCF-7	Brustkarzinom	Caspase-3-defizient	RPMI 1640
MCF-7/Casp-3	Brustkarzinom	Caspase-3-Gen retransfiziert	RPMI 1640
MCF-7/GFP-Bax	Brustkarzinom	Stabil transfiziert mit Plasmid für ein GFP- Bax Fusionsprotein	RPMI 1640
MCF-7/p53siRNA	Brustkarzinom	Stabil transfiziert mit p53 siRNA	RPMI 1640
SKW 6.4	B-Zell- Lymphoblastom		ISCOVE
RKO	Kolonkarzinom		DMEM
HCT 116	Brustkarzinom		McCoy's 5A
HCT116/p53 ^{-/-}	Brustkarzinom	p53-defizient	McCoy's 5A
Jurkat J16	T-Zell-Lymphom		RPMI 1640
JCaM 1.6	T-Zell-Lymphom	Jurkat-Derivat, Lck- defizient	RPMI 1640
JCaM ATCC	T-Zell-Lymphom	Jurkat-Derivat, Lck- defizient	RPMI 1640

JCaM Abraham	T-Zell-Lymphom	Jurkat-Derivat, Lck-defizient	RPMI 1640
HT1080	Fibrosarkom		RPMI 1640
HEK 293	embryonale Nierenzellen		DMEM
Phoenix	embryonale Nierenzellen	HEK 293-Derivat, exprimiert virale Gag-pol-Gene.	DMEM
MEF	murine, embryonale Fibroblasten		DMEM
MEF p50 ^{-/-}	murine, embryonale Fibroblasten	p50-defizient	DMEM
MEF p65 ^{-/-}	murine, embryonale Fibroblasten	p65-defizient	DMEM
HeLa D98	Zervixkarzinom		RPMI 1640
HUVEC	humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen		RPMI 1640

Allen Medien wurde 10% FKS und 50 µg/ml Pen/Strep zugesetzt.

3.1.4 Plasmide

Bezeichnung	Verwendungszweck	Charakteristika	Bezugsquelle
pCDNA 4.1/Myc/His	Vektor zur Expression in eukaryontischen Zellen	C-terminale <i>Myc/His</i> -Markierung	Invitrogen
pCDNA 4.1/Myc/His IκBζ	Vektor zur Expression in eukaryontischen Zellen	<i>IκBζ</i> mit C-terminaler <i>Myc/His</i> Markierung	Gudrun Totzke
pGAG-Pol	Retroviraler Expressionsvektor	Kodiert für die viralen gruppenspezifischen Antigene und die Enzyme Reverse Transkriptase, Protease und Integrase	Stephan Ludwig
pVSV-G	Retroviraler Expressionsvektor	Kodiert für das Glykoprotein des vesikulären Stomatitisvirus	Stephan Ludwig

p53-WT	Vektor zur Expression in eukaryontischen Zellen	<i>p53</i> -Wildtyp	Ute Moll
p53-CTM	Vektor zur Expression in eukaryontischen Zellen	<i>p53</i> mit der Transmembrandomäne von <i>Bcl-2</i>	Ute Moll
peGFP-C1	Vektor zur Expression in eukaryontischen Zellen	N-terminale GFP-Markierung	Clontech
peGFP-I κ B ζ	Vektor zur Expression in eukaryontischen Zellen	<i>IκBζ</i> mit N-terminaler GFP-Markierung	Gudrun Totzke
p-eGFP-I κ B ζ N-Terminus	Vektor zur Expression in eukaryontischen Zellen	NH ₂ -terminale Region von <i>IκBζ</i> (Aminosäuren 1-317)	Gudrun Totzke
p-eGFP-I κ B ζ C-Terminus	Vektor zur Expression in eukaryontischen Zellen	COOH-terminale Region von <i>IκBζ</i> (Aminosäuren 318-617)	Gudrun Totzke
peGFP-I κ B α	Vektor zur Expression in eukaryontischen Zellen	<i>IκBα</i> mit N-terminaler GFP-Markierung	Johannes Schmid
pCFG5-IEGZ	Retroviraler Vektor zur Expression in eukaryontischen Zellen	C-terminale GFP-Markierung, R-, U5-, 3'LTR-Elemente unter der Kontrolle eines CMV-Promotors.	Stephan Ludwig, Institut für Molekulare Virologie, Universität Münster
pCFG5-IEGZ-I κ B ζ	Retroviraler Vektor zur Expression in eukaryontischen Zellen	Bicistronischer Vektor für das <i>IκBζ</i> -Gen und C-terminale GFP-Markierung, R-, U5-, 3'LTR-Elemente unter der Kontrolle eines CMV-Promotors.	Gudrun Totzke
pCFG5-IEGZ-I κ B α	Retroviraler Vektor zur Expression in eukaryontischen Zellen	Bicistronischer Vektor für ein nicht degradierbares <i>IκBα</i> -Protein mit C-terminaler GFP-Markierung, R-, U5-, 3'LTR-Elemente unter der Kontrolle eines CMV-Promotors.	Stephan Ludwig

3.1.5 Oligonukleotide

Name	Verwendungszweck	Sequenz 5'-3'
IκBζ 5'	RT-PCR	GCTAATCCCATGCAGACTTC
IκBζ 3'	RT-PCR	GAACGTGTCACCATCTGCAT
IκBα 5'	RT-PCR	AAAGGATCCGCCACCATTTCAGGCGGCCGAG
IκBα 3'	RT-PCR	TTTAAGCTTTAACGTCAGACGCTGGCCTCC
GAPDH 5'	RT-PCR	GCCAAAAGGGTCATCATCTC
GAPDH 3'	RT-PCR	GTAGAGGCAGGGATGTTC
IL-1β 5'	RT-PCR	AAGTACCTGAGCTCGCCAGT
IL-1β 3'	RT-PCR	GCAGGACAGGTACAGATTCT
TNF-α 5'	RT-PCR	CAGGCAGTCAGATCATCTTC
TNF-α 3'	RT-PCR	GATAGATGGGCTCATAACCAG
GM-CSF 5'	RT-PCR	ATGTGGCTGCAGAGCCTGCT
GM-CSF 3'	RT-PCR	GCAGAAAGTCCTTCAGGTTC
MCP-1 5'	RT-PCR	CATAGCAGCCACCTTCATTC
MCP-1 3'	RT-PCR	GTGGTCCATGGAATCCTGAA
IL-8 5'	RT-PCR	CTGATTTCTGCAGCTCTGTG
IL8-3'	RT-PCR	GAATTCTCAGCCCTCTTC
IL-6 5'	RT-PCR	GATTCCAAAGATGTAGCCGC
IL-6 3'	RT-PCR	GCTTGTTCCTCACTACTCTC
IL-6 5'	Real-Time RT-PCR	ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC
IL-6 3'	Real-Time RT-PCR	GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG
IL-8 5'	Real-Time RT-PCR	CTTGTTCCACTGTGCCTTGGTT
IL-8 3'	Real-Time RT-PCR	GCTTCCACATGTCCTCACAACAT

3.1.6 Antikörper

Antigen	Spezies	Verwendung	Bezugsquelle
Chk1	Maus	WB	Transduction Laboratories (Heidelberg)
p53(Ab6)	Maus	WB, IF	Calbiochem (Bad Soden)
p21	Maus	WB	BD Bioscience (Heidelberg)
PARP	Maus	WB	BD Bioscience (Heidelberg)
Bak	Maus	WB	Oncogene Research Products (San Diego, USA)
Bcl-2	Maus	WB	Novocastra Laboratories (Newcastle, UK)
Bcl-x _L	Maus	WB	Trevigen (Gaithersburg, USA)
Bax	Maus	WB	Trevigen (Gaithersburg, USA)
Bax-NT	Kaninchen	WB, IF	Upstate (Virginia, USA)
Puma	Kaninchen	WB	Santa Cruz (Heidelberg)
PCNA	Maus	WB	Santa Cruz (Heidelberg)
Caspase-3	Ziege	WB	R&D Systems (Wiesbaden)

Aktin	Maus	WB	Sigma (München)
HMG1	Maus	WB, IF	Santa Cruz (Heidelberg)
Lck	Maus	WB	Santa Cruz (Heidelberg)
Caspase-9	Kaninchen	WB	Cell Signaling (Californien)
Bak	Maus	WB	Pharmingen (Hamburg)
I κ B α	Kaninchen	WB	Santa Cruz (Heidelberg)
FLAG	Kaninchen	WB	Sigma (München)
I κ B ζ	Maus	WB	Gudrun Totzke

*WB: Western-Blot

*IF: Immunfluoreszenz

3.1.7 Sekundäre Antikörper

Die sekundären Antikörper, anti-Maus IgG und anti-Kaninchen IgG gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase, wurden von Promega (Mannheim) bezogen. Anti-Ziege IgG gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase sowie fluoreszenzmarkierten Antikörper anti-Maus IgG und anti-Kaninchen IgG gekoppelt mit Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 oder AlexaFluor 350 wurden von Molecular Probes (Karlsruhe) bezogen.

3.2 Methoden

Alle nicht näher aufgeführten Methoden wurden nach Sambrook *et al.*, 2001, durchgeführt.

3.2.1 Kultur und Anzucht von *E. coli*

Bakterien vom Stamm Top 10 F' oder BL21 Gold wurden bei 37°C auf LB-Agarplatten kultiviert. Die Anzucht erfolgte in LB-Flüssigmedium bei 250 Upm und 37°C über Nacht. Die Selektion der Transformanten wurde durch die Gabe von 100 μ g/ml Ampicillin oder 50 μ g/ml Kanamycin gewährleistet.

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

+18 g/l Agar bei LB-Festmedium

3.2.2 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA wurde durch Elektroporation (Biorad, München) durchgeführt.

3.2.3 Plasmid-Präparation

Eine Mini-Präparation der Plasmide erfolgte mittels alkalischer Lyse. Die Isolierung größerer Mengen von Plasmid-DNA erfolgte mit Säulen anhand des Hersteller-Protokolls (Qiagen, Hilden).

3.2.4 Glycerin Stammkultur

Zur Lagerung der Plasmid-tragenden Bakterien wurden 800 μ l einer in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Kultur mit 200 μ l sterilem Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

3.2.5 Gelelektrophorese

Die analytische und präparative Trennung von DNA-Fragmenten wurde mit horizontaler Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde 1% Agarose in 100 ml 1 x TAE durch Aufkochen gelöst und anschließend mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromidlösung versetzt. Die gelöste Agarose wurde als Horizontalgel mit ca. 5 mm Höhe gegossen und anschließend mit TAE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit 1/6 Probenpuffer (0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25 (w/v) Xylencyanol, 30% (v/v) Glycerin) versetzt und bei 80 V getrennt. Als Größenstandard diente die 1kb DNA Ladder (Promega, Mannheim).

1 x TAE : 40 mM Tris
 20 mM Essigsäure
 2 mM EDTA pH = 8,5

3.2.6 RNA-Isolierung

Es wurden jeweils 5×10^6 Zellen in 60 mm-Kulturschalen (Greiner, Solingen) ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 in einem wasserdampfgesättigten Inkubator (HeraCell,

Heraeus) kultiviert. Die Stimulation der Zellen erfolgte über die angegebenen Zeiträume mit 10 ng/ml TNF- α und 10 μ g/ml Cycloheximid. Zur Ernte der Zellen wurde jeweils 1 ml TRI-Reagenz auf die mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber (Sarsted, Nümbrecht) gelöst und in einem 2 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) mit 200 μ l Chloroform versetzt. Das Gemisch wurde agitiert und nach 5 min zur Phasentrennung zentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4°C) (Eppendorf, Hamburg). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß mit dem gleichen Volumen an Isopropanol präzipitiert. Dazu wurde das Gemisch für 15 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde bei RT getrocknet und in 50 μ l H₂O aufgenommen.

3.2.7 RNase Protection Assay

Der Versuch erfolgte nach Angaben des Herstellers (BD, Pharmingen, San Diego, USA). Die präparierte RNA konnte mit Hilfe eines *Multi-Probe Template-Sets* analysiert werden. Dazu wurde das jeweilige Template-Set mit RNasin, T7-Polymerase, DTT, UTP (20 mCi/ml, Amersham), GACU Nukleotid Pool und Transkriptionspuffer vermischt und inkubiert. Es wurden radioaktiv markierte „anti-sense“-Konstrukte, komplementär zu den Template-Set-Vorlagen, inkubiert. Nach Fällung der markierten Sonden wurden diese mit der zu untersuchenden RNA inkubiert, damit die komplementären Stränge hybridisierten. Die Proben wurden anschließend mit RNase verdaut, so dass lediglich die Doppelstränge in definierter Länge übrig blieben. Die durch die Hybridisierung geschützten Transkripte konnten anschließend auf ein denaturierendes Harnstoffgel aufgetragen und aufgetrennt werden. Das getrocknete Gel (1 h, 70°C, Vakuum) wurde mit einem Röntgenfilm exponiert. Die Expression der untersuchten Gene konnte in Relation zu den internen Standards L32 und GAPDH analysiert werden.

3.2.8 RT-PCR

1 μ g RNA wurden mit 200 U/ μ l MMLV-Reverse-Transkriptase (Invitrogen), RT Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 10 mM DTT, 0,5 mM dNTP-Mix, 50 U RNase-Inhibitor und 100 pmol zufälliger Hexamer-Starteroligonukleotide in einem Gesamtvolumen von 40 μ l für 5 min bei 25°C, 5 min bei 30°C, 90 min bei 37°C und 5 min

bei 95°C inkubiert (Mastercycler Personal, Eppendorf). 4 μ l des Ansatzes wurden in der PCR eingesetzt, die sich wie folgt zusammensetzte:

Volumen (μ l)	
4	DNA-Template
5	<i>Taq</i> -Puffer (10x)
4	dNTPs (jedes 10 mM)
1	5'Primer (20 pmol)
1	3'Primer (20 pmol)
1	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase
ad 50	dest. H ₂ O

Die oben aufgeführten Ansätze durchliefen die folgenden Zyklen:

Zyklus	Zeit	Temperatur
1. Initiale Denaturierung	2 min	95°C
2. Denaturierung	1 min	95°C
3. Annealing	1 min	Oligonukleotid-abhängig (s.u.)
4. Elongation	2 min pro kb	74°C
5. Primerextension	10 min	74°C

Schritt 2-4: 25-35 Zyklen

Mit Hilfe der PCR wurden, unter Verwendung der im Punkt Material aufgeführten Oligonukleotide, die entsprechenden DNA-Teile der zu untersuchenden Zytokine vervielfältigt. Die amplifizierten Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt.

3.2.9 Real-time RT-PCR

Die Umschreibung von 1 μ g RNA in cDNA wurde mit der Revert AID Transcriptase (Fermentas) mit Hilfe von Oligo dT Primern (16mer) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Realtime-PCR erfolgte im MX3005P von Stratagene in 40 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 60°C (Standard-Protokoll Stratagene).

μl	
0,5	cDNA-Template
6	Brilliant SYBR-Green Mix (2x) (Stratagene)
0,3	5'Primer (10 μM)
0,3	3'Primer (10 μM)
4,9	dest. H ₂ O

Die Auswertung wurde nach der $2^{\Delta\Delta\text{CT}}$ -Methode durchgeführt (Livak und Schmittgen, 2001)

3.2.10 Nachweis von Zytokinen mittels Luminex

Die Detektion von Zytokinen und Chemokinen im Zellkulturüberstand erfolgte mit Hilfe der Luminex-Technologie nach Angaben des Herstellers (Biosource, California, USA). Hierzu wurden jeweils Zytokin-spezifische Multiplex-Ansätze für Maus oder Mensch eingesetzt. Die Luminex-Analyse basiert auf der Bindung des zu untersuchenden Zytokins oder Chemokins an den spezifischen Antikörper eines zweifach gefärbten Polystyrol-Kügelchens. Nach einem Waschschrift wurden die Kügelchen mit dem gebundenen Zytokin mit einem zweiten Biotin-markierten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist in der Lage, mit Streptavidin-PE zu reagieren, welches anschließend zu dem bereits gebildeten Komplex hinzugefügt wurde. Durch einen weiteren Waschschrift wurde das überschüssige Streptavidin-PE entfernt. Durch die Fluoreszenz des Streptavidin-PE und die Farbkodierung des ersten Antikörpers konnte mittels zweier Laser über die Intensität des emittierten Lichts eine Interaktion des Kügelchens mit seinem spezifischen Zytokin gezeigt werden. Die Quantifizierung erfolgte durch die Messung einer Standardreihe.

3.2.11 Fluoreszenzmikroskopische Analysen

Die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. 1×10^5 Zellen wurden auf sterile Deckgläschen in 12-Lochplatten zur Transfektion oder Stimulation ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit 2% Formaldehyd in kaltem PBS fixiert. Zur Absättigung freier Bindungsstellen und Permeabilisierung der Zellen erfolgte eine zweistündige Inkubation mit 4% BSA und 0,05% Saponin in PBS. Der erste Antikörper (0,2 $\mu\text{g/ml}$) wurde über Nacht bei 4°C zur Blockierlösung gegeben. Anschließend erfolgten drei Waschschriffe mit PBS und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (100 $\mu\text{g/ml}$) bei RT. Nach einer Stunde wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen werden. Die Zellen wurden entweder mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) als Kernfärbung, mit Mitotracker Rot als Mitochondrienfärbung oder nicht weiter gefärbt. Zum Schluss wurden die

Deckgläschen auf Objektträgern mit Vectashield (Alexis) fixiert. Die Bilder wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Axiovert-135 (Zeiss) und der Software Open Lab (Improvision, Tübingen) dokumentiert.

3.2.12 Mitochondrienisolierung

Die Isolierung der Mitochondrien erfolgte durch einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten. Dazu wurden die zu untersuchenden Zellen abgeschabt, gewaschen und sedimentiert. Im Anschluss wurden die Zellen in Puffer MB (400 mM Saccharose, 50 mM Tris/HCl pH 7,6, 1 mM EGTA, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 10 mM Kaliumphosphat pH 7,6 und 0,2% BSA) resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit 40 Schlägen in einem Dounce-Homogenisator aufgebrochen. Durch Zentrifugation bei 4000 rpm und 4°C konnten die unaufgebrochenen Zellen und Kerne entfernt werden. Die Mitochondrienpelletierung erfolgte anschließend durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Puffer MSM (300 mM Mannitol, 10 mM Kaliumphosphat pH 7,2, 0,1% BSA) aufgenommen. Um die Reinheit der Mitochondrienfraktion M1 zu erhöhen, wurde diese auf einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten (1,2-1,6 M Saccharose in 10 mM Tris-HCl pH 7,5 und 0,1% BSA) aufgetragen. Nach einer Stunde Zentrifugation bei 70000 x g wurde die Interphase abgenommen, in MSM-Puffer 1:4 verdünnt und bei 45000 x g für 15 min zentrifugiert, um die M2-Fraktion zu erhalten.

3.2.13 Durchflusszytometrie

Zur Zell-Zyklus-Analyse und Detektion von Apoptose wurden die Zellen nach Nicoletti *et al.* (1991) mit Trypsin abgelöst, in PBS gewaschen und in 0,1% Triton X-100, 0,1% Natriumcitrat und 50 µg/ml Propidiumjodid aufgenommen. Lediglich die toten Zellen nehmen das Propidiumjodid durch ihre defekte Membran auf, wo es mit der DNA der Zelle interkaliert. Die toten Zellen weisen dadurch eine höhere Fluoreszenz auf. In der anschließenden Messung im FACScalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) konnten die Apoptoserate der Zellpopulation und der Zellzyklus bestimmt werden. Für jede Messung wurde ein Minimum von 10000 Zellen eingesetzt.

3.2.14 Seneszenz assoziierte β -Galaktosidasefärbung

Dieser Versuch basiert auf der Aktivierung des Enzyms β -Galaktosidase bei der Induktion von Seneszenz, welche durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden kann. Nach den jeweiligen Stimulationen wurden die Zellen in PBS gewaschen, in 0,2% Glutaraldehyd und 2% Formaldehyd für 5 min fixiert, erneut gewaschen und in Abwesenheit von CO_2 in der Färbelösung (150 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN}_6)$, 5mM $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN}_6)$, 40 mM Citronensäure und 12 mM Natriumphosphat pH 6,0 1 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid) inkubiert.

3.2.15 Western-Blot-Analyse

Gleiche Proteinmengen von mitochondrialen, zytosolischen oder Gesamtzell-Extrakten wurden mit 4x SDS-Ladepuffer (250 mM Tris-HCl, pH 6,8, 40% (v/v) Glycerin, 0,4% (w/v) SDS, 400 mg/ml Bromphenolblau, 4% (v/v) β -Mercaptoethanol) versetzt, 5 min bei 99°C denaturiert und mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt. Je nach Größe des zu detektierenden Proteins wurden 8-16%ige SDS-Gele eingesetzt. Durch das Tank-Blot-Verfahren wurden die Proteine bei 150 mA, 4°C für 120 min auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (Amersham Pharmacia) transferiert. Die Membranen wurden 1 Std mit 4% BSA in PBS blockiert und über Nacht mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS/0,05% Tween-20 wurde der entsprechende Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper für 1 Std zugegeben. Die Membranen wurden dann erneut mit PBS/0,05% Tween-20 gewaschen. Die Reaktion konnte mittels Chemilumineszenz unter Verwendung eines ECL-Reagenz (Amersham Pharmacia) und durch Exposition eines ECL-Hyperfilms (Amersham Pharmacia) sichtbar gemacht werden.

Chemikalie	Sammelgel (5%)	Trenngel 10%
Acrylamid-Bisacrylamid (30:0,8)	2,5 ml	10 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	5 ml	-
1 M Tris-HCl, pH 8,8	-	3,75 ml
10% SDS	0,2 ml	0,3 ml
1,5% APS	1 ml	1,5 ml
Wasser	11,3 ml	11,95 ml
Temed	0,015 ml	0,015 ml

Bei Verwendung von anderen Acrylamid-Konzentrationen wurde Volumen der Trenngellösung mit Wasser angeglichen.

Laufpuffer (SDS-PAGE):	25 mM Tris
	0,192 M Glycin
	0,1% (w/v) SDS
Transferpuffer (Western-Blot):	25 mM Tris
	0,192 M Glycin

3.2.16 Transfektionen

Die transiente Transfektion von MCF-7- und HT1080-Zellen wurde mit dem Transfektionsreagenz FUGENE 6 (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Transfektion wurden jeweils 3×10^5 Zellen in 6-Lochplatten ausgesät und am folgenden Tag transfiziert. Zur transienten Transfektion von MEF-Zellen wurde das Transfektionsreagenz Optifekt (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Hierzu wurden 5×10^4 Zellen in 12 Lochplatten auf Deckgläschen ausgesät, am folgenden Tag nach Herstellerangaben transfiziert und an den angegebenen Zeitpunkten für die Fluoreszenzmikroskopie präpariert.

3.2.17 Herstellung von retroviralen Überständen

Zur Herstellung von retroviralen Überständen wurde der retrovirale Vektor pCFG5-IEGZ aus dem Labor von Prof. Dr. Stephan Ludwig (Institut für Molekulare Virologie, Universität Münster) verwendet. Zur Produktion von retroviralen Überständen wurden 3×10^6 Phoenix-Zellen auf mit 0,2% (w/v) Gelatine beschichtete Zellkulturschalen ausplattiert. Am folgenden Tag wurden für die transiente Transfektion je Ansatz 30 μ l Lipofektamin 2000 und 1 ml Opti-MEM gemischt und 5 min bei RT inkubiert. 5 μ g pVSV-G, 16 μ g pGag-Pol und 7 μ g des pCFG5-IEGZ-Plasmides, das entweder nur ein GFP-Konstrukt, ein I κ B ζ -GFP-Konstrukt oder ein I κ B α -GFP-Konstrukt enthielt, wurden zum Lipofektamin-Ansatz gegeben und weitere 15 min bei RT inkubiert. Der Transformationsansatz und 5 ml DMEM wurden zu den Phoenix-Zellen gegeben und bei 37°C inkubiert. Über drei Tage wurden dann täglich retrovirale Überstände geerntet und bei -80°C konserviert.

3.2.18 Die Transduktion von Zielzellen

Die generierten Retroviren wurden zur Transduktion von HT1080- und MEF-Zellen eingesetzt. In den Zielzellen wird mittels der Reversen Transkriptase die virale RNA in DNA umgeschrieben und in das Genom integriert, woraufhin das gewünschte Protein produziert

wird. 3×10^5 MEF- oder HT1080-Zellen wurden am Vortag der Infektion in 6-Loch-Platten ausgesät. Die retroviralen Überstände wurden bei RT aufgetaut und steril filtriert. Durch die Gabe von $5 \mu\text{g/ml}$ Polybren wurde die Effektivität der Transduktion gesteigert. Pro Loch wurden die Zellen mit 2 ml Überstand für drei Stunden bei 2000 rpm (Multifuge, Heraeus) und 30°C zentrifugiert. Anschließend erfolgten ein Mediumwechsel und die Wiederholung der Infektion am folgenden Tag. Die Zellen wurden zur Entfernung der restlichen Retroviren mit PBS gewaschen. Überstände der infizierten Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten für die Luminex-Analyse eingesetzt.

3.2.19 Kryokonservierung und Auftauen eukaryontischer Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen zu einer Dichte von ca. 2×10^7 Zellen/ml angezogen und in Einfriermedium [20% fötales Kälberserum und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)] aufgenommen, auf -80°C abgekühlt und anschließend im flüssigen Stickstoff gelagert. Der Auftauvorgang erfolgte im Wasserbad bei 37°C . Die Zellen wurden hierzu in vorgewärmtes Medium überführt und mit Medium gewaschen. Die DMSO-freien Zellen wurden danach bei 37°C kultiviert.

3.2.20 Behandlung mit γ -Strahlen und Chemotherapeutika

Zur Behandlung mit ionisierenden Strahlen wurden Zellen 24 Std vor dem Versuch in einer gewünschten Konzentration ausgesät. Am Tag der Bestrahlung wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und einer Strahlendosis von 2000 Rad in An- oder Abwesenheit von 1 mM Koffein ausgesetzt (Gamma Cell1000 Elite, Nordion International Inc., Belgien). Anschließend wurden die Zellen in frisches Medium mit oder ohne Koffein überführt und für den entsprechenden Versuch ausgesät. Alternativ wurden zur Stimulation Ceramid ($100 \mu\text{M}$), Etoposid ($10 \mu\text{M}$), Staurosporin ($2,5 \mu\text{M}$) oder Camptothecin ($5 \mu\text{M}$), sofern nicht anders aufgeführt, für die jeweiligen Zeitpunkte eingesetzt.

3.2.21 Messung der Caspase-Aktivität

Die Aktivität von Caspasen wurde in einem enzymatischen Substrattest bestimmt, der auf der Substratspezifität von Caspase-3 und anderen Caspasen für die Aminosäuresequenz Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) basiert. Durch das von 7-Amino-4-Methylcoumarin abgeleiteten Substrat DEVD-AMC (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-Aminomethylcoumarin, Biomol) kann die

Aktivität der Caspase-3 durch die Bildung eines blau fluoreszierenden Farbstoffs bei 475 nm gemessen werden. Dazu wurden jeweils 50 μg Protein auf 50 μl Gesamtvolumen mit Caspasesubstratpuffer (50 mM HEPES pH 7,3, 100 mM NaCl, 10% Saccharose, 0,1% CHAPS (2-[cyclohexylamino-]1-propanesulfonsäure), 10 mM DTT) aufgefüllt. Die Proben wurden in eine 96-Loch-Platte überführt und mit 150 μl des fluorogenen Caspasesubstrats (66 μM) in Caspasepuffer inkubiert. Im Fluorometer konnte bei einer Extinktion von 360 nm die Fluoreszenz angeregt und bei 475 nm und 37°C, über den gewünschten Zeitraum alle 10 min, gemessen werden.

3.2.22 Micro-Array Analyse

Zur Micro-Array Hybridisierung wurden HUVECs mit dem GFP-Kontrollvirus pIEGZ oder dem I κ B ζ -Virus transduziert. Als weitere Kontrolle wurden nicht transfizierte HUVECs verwendet. Es wurde jeweils die Gesamt-RNA aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten mit Hilfe des *RNeasy-Kit* (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Proben wurden nach Herstellerangaben weiterverarbeitet (Affymetrix, Santa Clara, CA) und 10 μg der fragmentierte cRNA wurde bei 45°C für 16 Std mit dem *Affymetrix Human Genome 133 A Gene Chip* hybridisiert. Die Affymetrix-Analyse sowie die Auswertung der Daten wurden in Kooperation mit Prof. S. Ludwig und Prof. J. Roth (Universität Münster) durchgeführt.

3.2.23 Auswertung:

Die aufgeführten Diagramme in dieser Arbeit stellen jeweils den Mittelwert und die daraus resultierende Standardabweichung aus drei unabhängig reproduzierten Messungen dar.

4 ERGEBNISSE

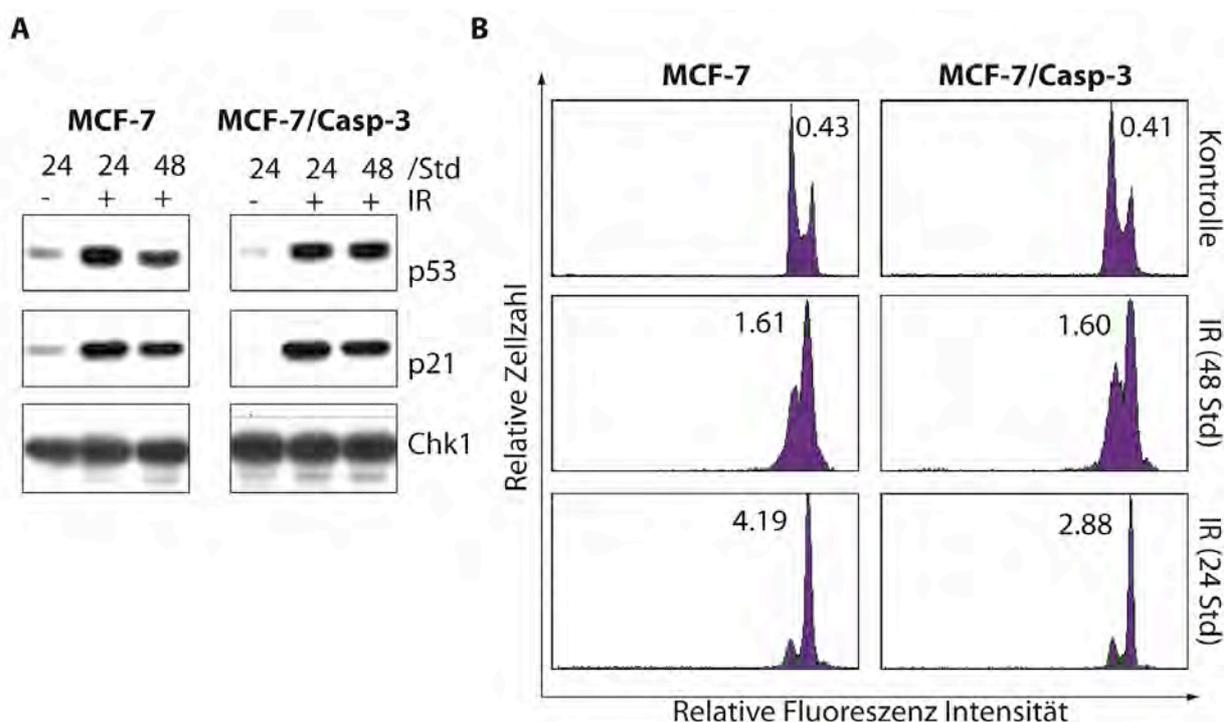
4.1 Die strahlungsinduzierte Translokation von p53 an die Mitochondrien löst keine Apoptose aus

4.1.1 Ionisierende Gammastrahlen induzieren auch in Apoptose-resistenten Zellen eine funktionelle p53-Antwort

In Abhängigkeit von multiplen Faktoren induziert das Tumorsuppressorprotein p53 als Antwort auf DNA-Schäden entweder Apoptose oder führt die Zellen in einen reversiblen oder irreversiblen (Seneszenz) Zellzyklusarrest. Die zugrunde liegenden Mechanismen, die diesen Entscheidungsprozess kontrollieren, sind aber noch weitgehend unverstanden. In verschiedenen Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten sich MCF-7-Brustkarzinomzellen äußerst resistent gegenüber der strahlungsinduzierten Apoptose, obwohl sie ein funktionelles p53-Protein exprimieren (Janicke *et al.*, 2001). Während die Bestrahlungsresistenz dieser ursprünglich Caspase-3-defizienten Zellen (Jänicke *et al.*, 1998) selbst durch die Wiedereinführung dieser Protease nicht revidiert werden konnte, wurde nur in Caspase-3-exprimierenden Zellen eine Sensitivierung durch den ATM-Inhibitor Koffein erzielt, die allerdings unabhängig von p53 vermittelt wurde (Essmann *et al.*, 2004). Da erst kürzlich eine stressinduzierte mitochondriale Translokation von p53 mit der Apoptose-Induktion in Verbindung gebracht wurde (Marchenko *et al.*, 2000; Mihara *et al.*, 2003), sollte nun untersucht werden, ob die beobachtete Bestrahlungsresistenz von MCF-7- und MCF-7/Casp-3-Zellen womöglich mit einem diesbezüglichen Defekt korreliert.

Deshalb sollte zunächst ermittelt werden, ob Gammastrahlen auch in diesen Zellen zur Stabilisierung und Aktivierung von p53 führen und ob dadurch p53-Zielgene wie z.B. p21 induziert werden. Hierfür wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Gesamtproteinextrakte von unbehandelten und bestrahlten (2000 Rad) MCF-7- und MCF-7/Casp-3-Zellen hergestellt, um diese in Western-Blot-Analysen bezüglich ihrer p53- und p21-Expression miteinander zu vergleichen. Unabhängig von der Expression der Caspase-3 wurde p53 in beiden Zelllinien durch Bestrahlung signifikant stabilisiert und führte auch zur Induktion seines Zielgens p21 (Abb. 6A). Zusätzlich wurde anhand durchflusszytometrischer Zellzyklusanalysen die Bestrahlungsresistenz von MCF-7- und MCF-7/Casp-3-Zellen verifiziert. In Übereinstimmung mit den früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe

(Janicke *et al.*, 2001), zeigten auch die vorliegenden Untersuchungen, dass Bestrahlung in diesen Zellen keine Apoptose, sondern einen permanenten Zellzyklusarrest induziert (Abb. 6B). So konnte nach Bestrahlung weder in MCF-7- noch in MCF-7/Casp-3-Zellen eine apoptotische sub-G1-Zellpopulation nachgewiesen werden. Diese Behandlung führte aber zu einer drastischen Verringerung der in der G1-Phase befindlichen Zellpopulation und zu einer gleichzeitigen Zunahme von Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Interessanterweise zeichneten sich bestrahlte Zellen beider Linien durch eine extrem abgeflachte Morphologie aus sowie durch die Vergrößerung ihres Zellvolumens (Abb. 6C, D), was darauf hinweist, dass es sich hierbei nicht um einen reversiblen, sondern um einen permanenten und irreversiblen Zellzyklusarrest (Seneszenz) handelt. Diese Annahme konnte in weiterführenden Experimenten bestätigt werden, da nur bestrahlte Zellen, nicht aber unbehandelte Zellen einen anerkannten Seneszenzmarker exprimierten, nämlich das Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Protein (Abb. 6C). Die Expression dieses Markers war dabei eindeutig von der Gegenwart eines funktionellen p53-Proteins abhängig, da sie unter Bedingungen einer supprimierten p53-Expression wie sie in p53siRNA-MCF-7- und p53siRNA-MCF-7/Casp-3-Zellen vorliegt (Essmann *et al.*, 2004), nicht mehr beobachtet werden konnte (Abb. 6D). Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass beide MCF-7-Zelllinien ein bezüglich seiner transkriptionellen Aktivität funktionelles p53-Protein exprimieren und dass andere Mechanismen für die beobachtete Bestrahlungsresistenz verantwortlich sein müssen.



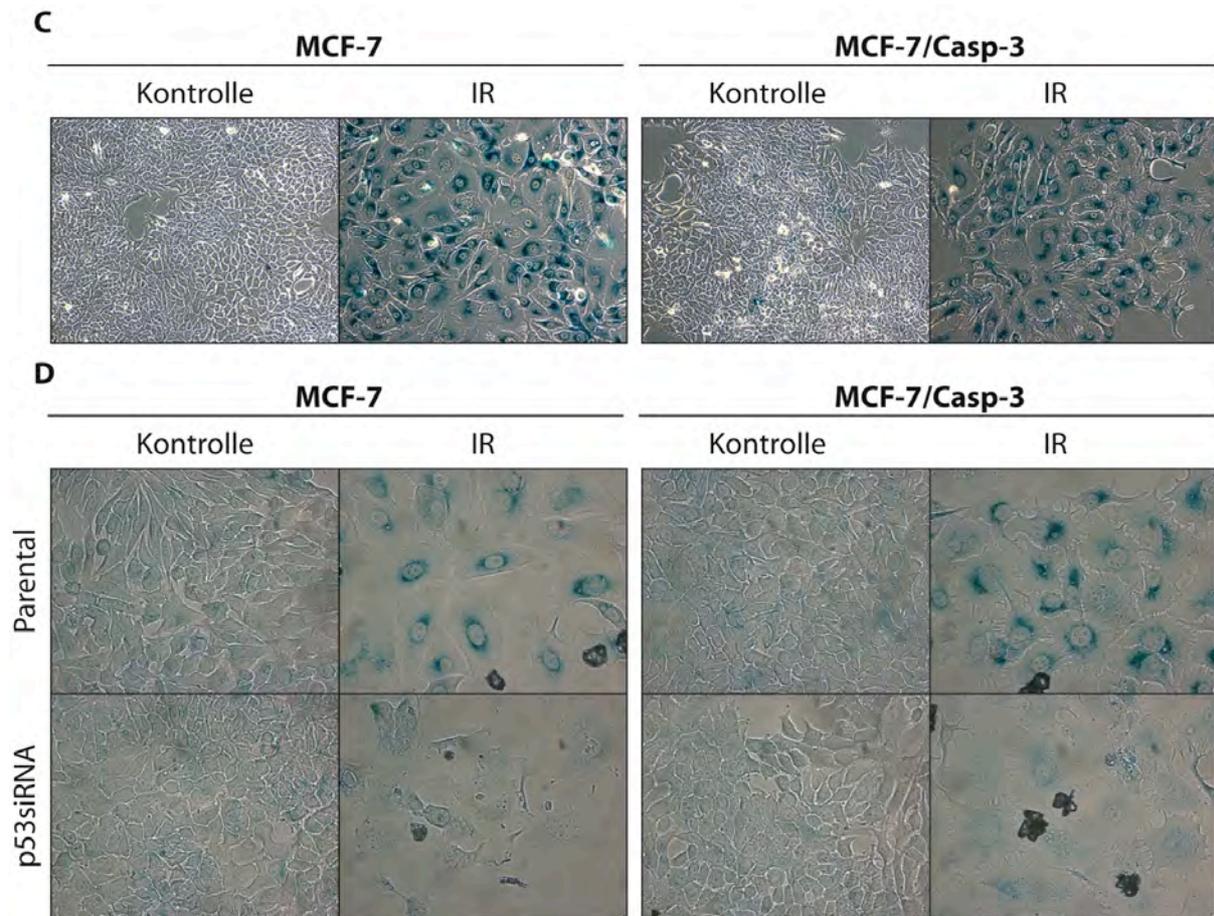


Abbildung 6: Gammastrahlen induzieren ein funktionelles p53-Protein in MCF-7-Zellen

(A) Western-Blot-Analysen zur Detektion von p53 und p21 in Gesamtllysaten von unbehandelten MCF-7- und MCF-7/Casp-3-Zellen und von bestrahlten Zellen (IR = ionisierende Bestrahlung), die zu den angegebenen Zeitpunkten hergestellt wurden. Die Expression der Chk1-Kinase diente als Ladekontrolle. (B) Durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen von unbehandelten MCF-7- und MCF-7/Casp-3 Zellen sowie von bestrahlten Zellen. Die Zahlen in den Histogrammen stellen die jeweiligen G2/G1-Verhältnisse dar. (C und D) Nachweis der bestrahlungsinduzierten Seneszenz anhand der Expression der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase in unbehandelten und bestrahlten MCF-7- und MCF-7/Casp-3-Zellen (C), sowie in unbehandelten oder bestrahlten parentalen Linien und in Zellen, die stabil eine p53siRNA exprimieren (D).

4.1.2 Bestimmung der zellulären Lokalisation des bestrahlungsinduzierten p53-Proteins

Um diese Mechanismen näher zu analysieren, wurde überprüft, ob Bestrahlung auch in dem hier beschriebenen MCF-7-Zellsystem eine Translokation des p53-Proteins an die Mitochondrien induziert. Die zelluläre Lokalisation von p53 wurde zunächst in unbehandelten und bestrahlten Zellen mittels immunfluoreszenzmikroskopischer Techniken bestimmt. Analog zu den Western-Blot-Daten (Abb. 6A), zeigten auch diese Untersuchungen eine durch Bestrahlung verstärkte p53-Expression, die aber unter diesen Bedingungen ausschließlich nukleär zu beobachten war (Abb. 7). Eine mitochondriale Expression von p53 konnte dagegen

nicht detektiert werden. Kontrollfärbungen der Zellen z.B. mit dem DNA-bindenden DAPI-Farbstoff oder mit Antikörpern gegen das Chromatin-assoziierte HMG1 (*high mobility group 1*)-Protein bestätigten die nukleäre Lokalisation von p53. Darüber hinaus konnte das bestrahlungsinduzierte p53-Protein auch mit anderen p53-Antikörpern, die verschiedene Epitope dieses Proteins erkennen, ausschließlich im Zellkern, nicht aber im Zytoplasma oder an den Mitochondrien detektiert werden (nicht gezeigt).

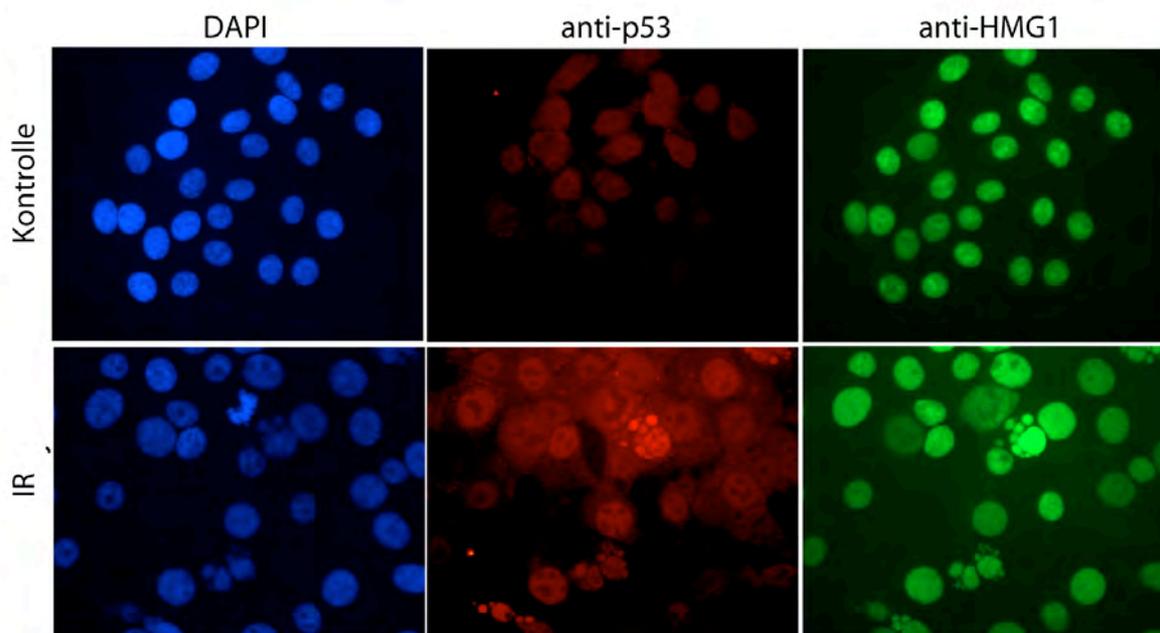


Abbildung 7: Bestrahlungsinduziertes p53-Protein wird überwiegend im Zellkern exprimiert

Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen zur Lokalisation von p53 in unbestrahlten MCF-7-Zellen (Kontrolle) und in bestrahlten Zellen, die nach 24 Std entweder mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI oder mit Antikörpern gegen p53 bzw. HMG1 inkubiert wurden. Die Visualisierung erfolgte durch Eigenfärbung (DAPI) oder durch die anschließende Inkubation mit den Alexa-Farbstoff-gekoppelten sekundären Antikörpern.

Da beschrieben wurde, dass nur ein geringer Anteil an stressinduziertem p53 an die Mitochondrien transloziert (Marchenko *et al.*, 2000), war durchaus die Möglichkeit gegeben, dass die angewandte Immunfluoreszenz-Technik nicht sensitiv genug für die Detektion von mitochondrialem p53 ist. Deshalb wurde dieser Sachverhalt auch mittels Western-Blot-Analysen von subzellulären Fraktionen unbestrahlter und bestrahlter MCF-7- und MCF-7/Casp-3-Zellen überprüft. Obwohl p53 nach Bestrahlung nicht nur im Zytoplasma, sondern tatsächlich auch in der mitochondrialen M1-Fraktion nachweisbar war, konnte in beiden Fraktionen auch das nukleäre PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) detektiert werden, aus uns unbekanntem Gründen aber nicht das ebenfalls nukleär exprimierte PARP (Poly-ADP-ribose-Polymerase) (Abb. 8A). Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass die mitochondriale M1-

Fraktion durch nukleäre Proteine kontaminiert ist, weshalb auch diese Methode sich nicht für den Nachweis einer mitochondrialen Translokation von p53 zu eignen schien.

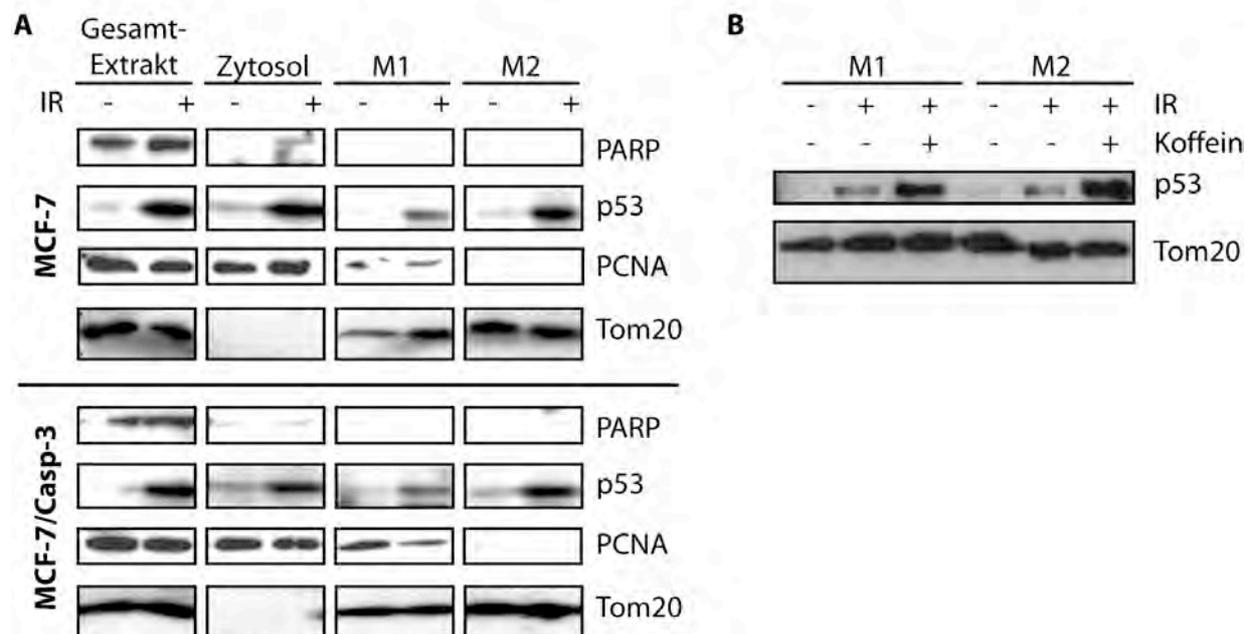


Abbildung 8: Bestrahlungsinduziertes p53 transloziert zu den Mitochondrien

(A) Western-Blot-Analysen von subzellulären Fraktionen von unbehandelten und bestrahlten MCF-7- und MCF-7/Casp-3-Zellen, die nach 24 Std präpariert und auf die Expression von p53 überprüft wurden. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde durch die An- und Abwesenheit nukleärer (PARP, PCNA) bzw. mitochondrialer (Tom20) Proteine nachgewiesen. (B) Western-Blot-Analysen zum Status der p53- und Tom20-Expression in M1- und M2-Mitochondrienfraktionen von unbehandelten MCF-7-Zellen sowie von MCF-7-Zellen, die in Ab- und Anwesenheit des ATM-Inhibitors Koffein (1 mM) bestrahlt wurden.

Deshalb wurden die M1-Mitochondrienfraktionen beider Zelllinien durch anschließende Zentrifugation in einem Saccharosegradienten einem weiteren Aufreinigungsschritt unterzogen. Western-Blot-Analysen der dadurch generierten M2-Fraktionen bestätigten die Expression von p53 an den Mitochondrien, die tatsächlich auf eine bestrahlungsinduzierte Translokation und nicht auf eine nukleäre Kontamination zurückgeführt werden konnte, da in ihnen nur das mitochondriale Markerprotein Tom20, nicht aber nukleäres PARP oder PCNA nachweisbar waren (Abb. 8B).

Da Berechnungen des p53-Gehaltes der einzelnen Fraktionen ergaben, dass nur ca. 2% des im Gesamtextrakt nachweisbaren p53-Proteins nach Bestrahlung an den Mitochondrien lokalisiert, konnte vermutet werden, dass diese Menge unzureichend für eine Apoptose-Induktion ist. Deshalb wurde die p53-Expression in mitochondrialen M1- und M2-Fraktionen von seneszenten und apoptotischen Zellen miteinander verglichen, wofür MCF-7-Zellen in An- oder Abwesenheit des ATM-Inhibitors Koffein bestrahlt wurden. Obwohl sich in Western-Blot-Analysen eindeutig nachweisen ließ, dass dadurch beide mitochondriale

Fraktionen von apoptotischen Zellen (IR + Koffein) eine deutlich verstärkte p53-Expression aufwiesen, konnten aufgrund der Tatsache, dass diese Apoptose unabhängig von p53 induziert wird (Essmann *et al.*, 2004), keine zuverlässigen Rückschlüsse auf die Funktion eines mitochondrial exprimierten p53 gezogen werden.

4.1.3 Die stressinduzierte p53-Translokation an die Mitochondrien korreliert nicht mit einer Apoptose-Induktion

Um das hier beschriebene Phänomen einer bestrahlungsinduzierten p53-Translokation zu den Mitochondrien in Abwesenheit einer Apoptose-Induktion auch in anderen Zellmodellen zu überprüfen, wurden HCT116-Kolonkarzinomzellen in die Versuche miteinbezogen. Auch in diesen Zellen wird durch Bestrahlung keine Apoptose, sondern ein permanenter G2/M-Arrest und Seneszenz induziert (Sohn *et al.*, 2006), während sie durch Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Etoposid in die Apoptose getrieben werden (Abb. 9). Obwohl beide DNA-schädigende Stimuli die Expression von p53 und die seines Zielgens p21 induzieren (Abb. 9B), kann das Auftreten zweier typischer Apoptose-Merkmale, nämlich die Generierung der sub-G1-Zellpopulation (Abb. 9A) sowie die Aktivierung der Caspase-3 (Abnahme der Pro-Caspase-3-Expression) (Abb. 9B) nur in Etoposid-behandelten Zellen, nicht aber in bestrahlten Zellen beobachtet werden. Die Tatsache, dass p21 im Vergleich zu bestrahlten Zellen nach einer Etoposid-Behandlung in einem deutlich geringeren Ausmaß exprimiert wird, ist dabei sehr wahrscheinlich auf dessen anti-apoptotische Wirkung zurückzuführen (Sohn *et al.*, 2006; Jänicke *et al.*, 2007). Dennoch kann dieses Zellsystem als ideale Ergänzung zu dem bereits beschriebenen MCF-7-Modell angesehen werden, da damit die Bedeutung einer stressinduzierten mitochondrialen p53-Translokation sowohl in seneszenten als auch in apoptotischen Zellen vergleichend untersucht werden kann.

So zeigte es sich, dass in M2-Mitochondrienfraktionen von bestrahlten und Etoposid-behandelten HCT116-Zellen vergleichbare p53-Proteinmengen nachweisbar waren, obwohl die Zellen nur durch Etoposid abgetötet werden können (Abb. 9C). Außerdem wurde in beiden Fraktionen eine annähernd identische Induktion des pro-apoptotischen BH3-only-Proteins Puma detektiert. Da die Reinheit der Fraktionen wiederum durch die An- bzw. Abwesenheit der Tom20- und PCNA-Expression bestätigt werden konnte, zeigten diese Ergebnisse zum ersten Mal, dass die bestrahlungsinduzierte p53-Translokation zu den Mitochondrien nicht notwendigerweise, wie beschrieben (Mihara *et al.*, 2003), mit einer Apoptose-Induktion korreliert.

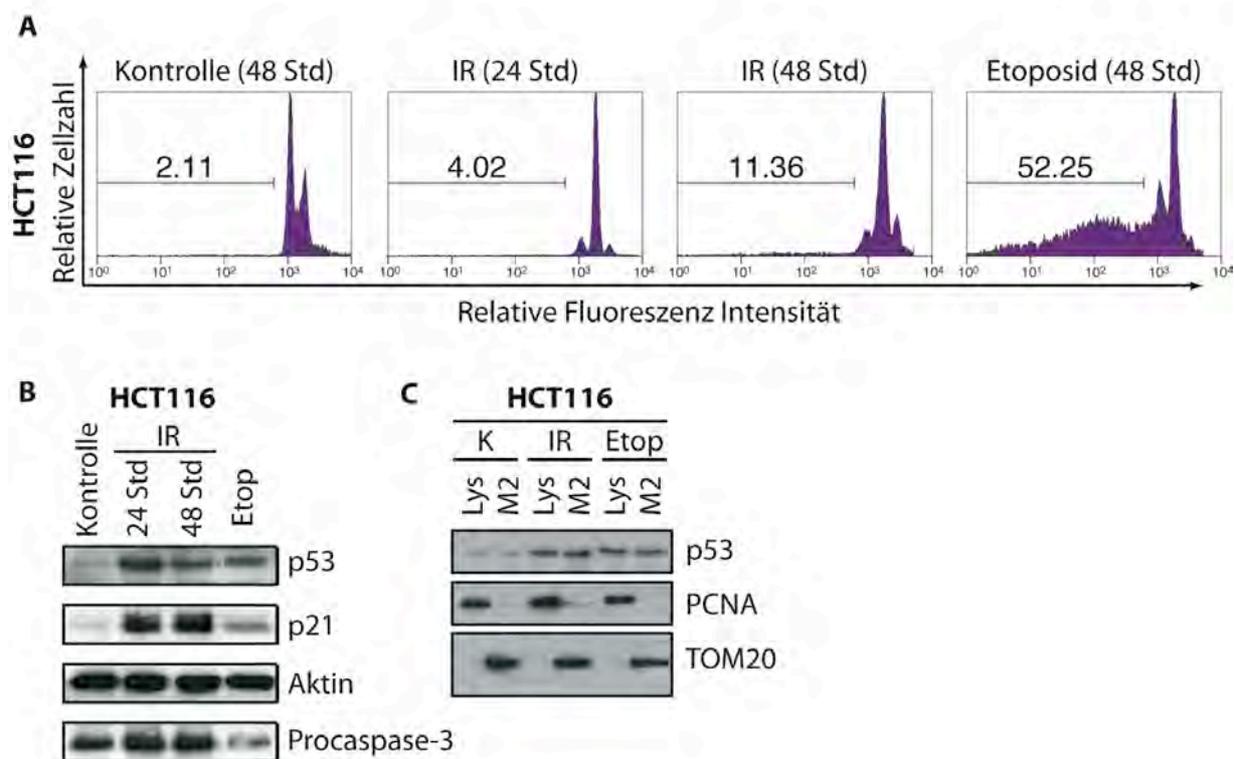


Abbildung 9: Stressinduzierte mitochondriale p53-Translokation in seneszenten und apoptotischen Zellen

(A) Durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen von unbehandelten (Kontrolle), bestrahlten (IR, 2000 Rad) und Etoposid ($10 \mu\text{M}$) behandelten HCT116-Zellen, die zu den angegebenen Zeitpunkten durchgeführt wurden. Die Prozentzahl über der Markerlinie gibt den Anteil apoptotischer Zellen mit einem geringen DNA-Gehalt (sub-G1-Zellen) wieder. (B) Western-Blot-Analysen zur Bestimmung der Expression von p53, p21 und Pro-Caspase-3 zu den angegebenen Zeitpunkten in Gesamtproteinlysaten von unbehandelten (Kontrolle), bestrahlten (IR, 2000 Rad) und Etoposid ($10 \mu\text{M}$)-behandelten HCT116-Zellen. Der Nachweis der Aktin-Expression wurde als Ladekontrolle verwendet. (C) Western-Blot-Analysen zur Bestimmung der Expression von p53, PCNA, Puma und Tom20 nach 24 Std in Gesamtproteinlysaten (Lys) und in M2-Fractionen von unbehandelten (Kontrolle), bestrahlten (IR, 2000 Rad) und Etoposid ($10 \mu\text{M}$)-behandelten HCT116-Zellen.

Um dieser offensichtlichen Diskrepanz auch in anderen Zellsystemen nachzugehen, wurden für die folgenden Experimente eine weitere Kolonkarzinomzelllinie (RKO) sowie eine B-Lymphoblastomlinie (SKW.6.4) miteinbezogen. Auch in diesen beiden Zelllinien zeigte sich keine Korrelation zwischen einer stressinduzierten mitochondrialen p53-Expression und der Apoptose-Induktion. Im Gegenteil, obwohl Apoptose in RKO-Zellen nur durch den Topoisomerase 1-Inhibitor Camptothecin, nicht aber durch Bestrahlung induziert werden konnte, war in der mitochondrialen M2-Fraktion von bestrahlten Zellen eine stärkere p53-Expression nachzuweisen (Abb. 10). M2-Fractionen von SKW6.4-Zellen dagegen zeigten eine höhere p53-Expression nach Camptothecin-Behandlung, obwohl auch Bestrahlung in diesen Zellen eine mit Camptothecin vergleichbare Apoptoserate induzierte. In

Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Daten und ungeachtet der Tatsache, dass HCT116- und MCF-7/Casp-3-Zellen unterschiedliche Stressantworten gegenüber Bestrahlung und Camptothecin zeigen (Seneszenz vs. Apoptose), führten beide Behandlungsweisen zu einer vergleichbaren p53-Expression in den entsprechenden M2-Fractionen. Schließlich konnte auch anhand der Bcl-2-Expression keine Korrelation zwischen Seneszenz- und Apoptose-Induktion hergestellt werden, da sie in den mitochondrialen M2-Fractionen der unterschiedlich behandelten Zellen nicht voneinander differierte. Zusammengefasst zeigten diese Daten, dass das p53-Protein nicht nur durch apoptotische Stimuli an die Mitochondrien transloziert, sondern auch unter Bedingungen, die zu einem Zellzyklusarrest oder sogar zur Seneszenz führen.

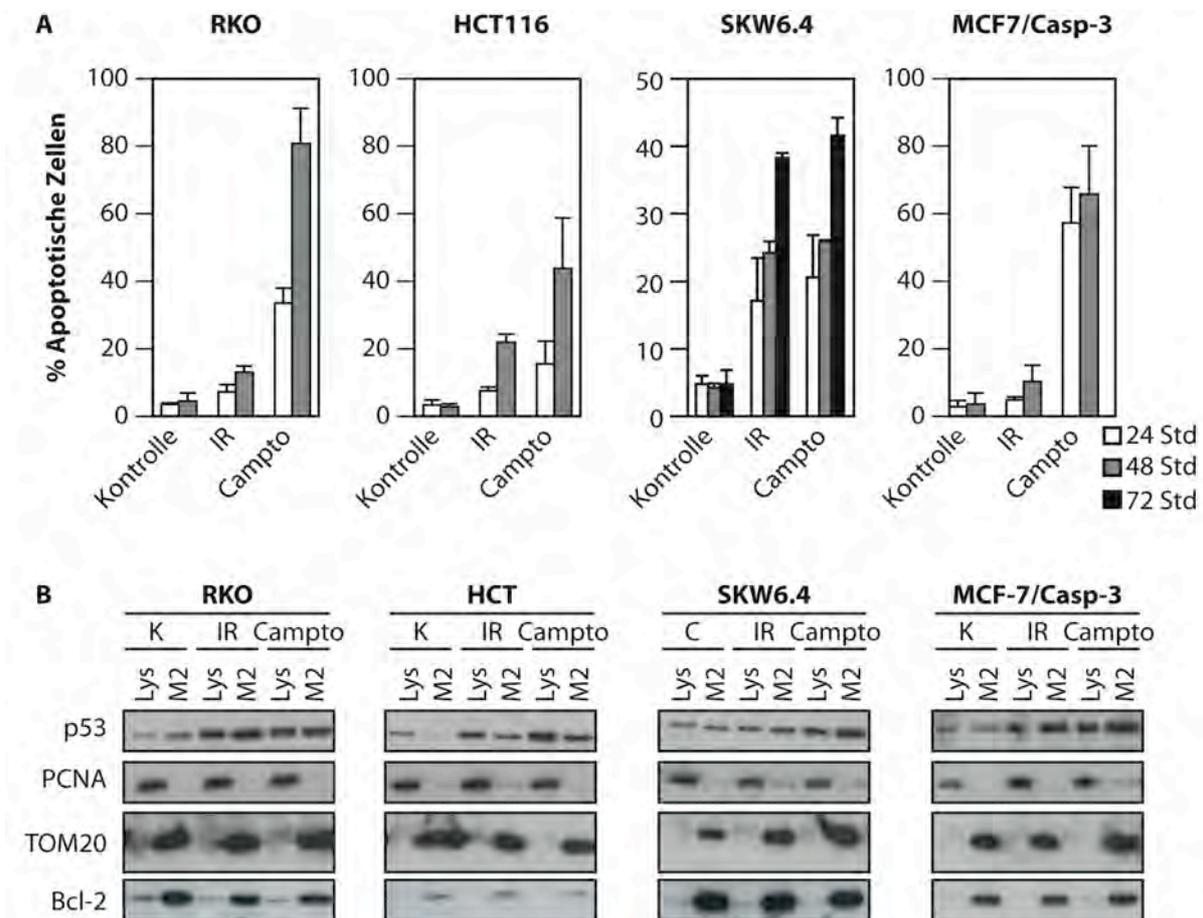


Abbildung 10: Fehlende Korrelation zwischen stressinduzierter p53-Translokation und der Apoptose-Induktion

(A) Die oben aufgeführten Zelllinien wurden entweder bestrahlt (IR, 2000 Rad), mit Camptothecin (Campto, 1 μ M) inkubiert oder blieben unbehandelt (Kontrolle) und wurden zu den angegebenen Zeitpunkten im Durchflusszytometer analysiert. Der Prozentsatz an Zellen, die einen verminderten DNA-Gehalt zeigten (sub-G1-Zellen) wurden als apoptotisch bezeichnet. (B) Western-Blot-Analysen zur Bestimmung der Expression der angegebenen Proteine in Gesamtproteinlysaten (Lys) und mitochondrialen M2-Fractionen. Die aufgeführten

Zelllinien blieben hierfür entweder unbehandelt (K), wurden bestrahlt (2000 Rad), oder mit Camptothecin (Campto; 1 μ M) inkubiert. Die subzellulären Fraktionen wurden 24 Std nach Behandlung hergestellt.

3.1.4 Der bestrahlungsresistente Phänotyp von MCF-7- und HCT116-Zellen beruht nicht auf einer deregulierten Expression von pro- und anti-apoptischen Proteinen

Da durch die bisherigen Untersuchungen zwar eindeutig dargelegt werden konnte, dass zumindest in den hier verwendeten Zellsystemen die stressinduzierte mitochondriale Translokation von p53 nicht mit einer Apoptose-Induktion korreliert, war dennoch die Möglichkeit gegeben, dass der bestrahlungsresistente Phänotyp der MCF-7- und HCT116-Zellen durch Defekte verursacht wird, die in der Signalkaskade unterhalb von mitochondrialem p53 angesiedelt sind. Hierfür wurde die bestrahlungsinduzierte Expression verschiedener Bcl-2-Familienmitglieder in Abhängigkeit von p53 untersucht. Während Bax und Puma in einer p53-abhängigen Weise durch Bestrahlung reguliert wurden, waren nach dieser Behandlung nicht nur in MCF-7/Casp-3-Zellen, sondern auch in Zellen, in denen die p53-Expression durch eine spezifische siRNA erfolgreich supprimiert wurde, vergleichbare Proteinmengen von Bak, Bcl-2 und Bcl-x_L zu detektieren (Abb. 11A). Die Expression von Puma wurde dabei nicht nur durch Bestrahlung, sondern auch durch Etoposid und Camptothecin in den vier hier verwendeten Zellsystemen induziert und zeigte darüber hinaus eine überwiegend mitochondriale Expression (Abb. 11B).

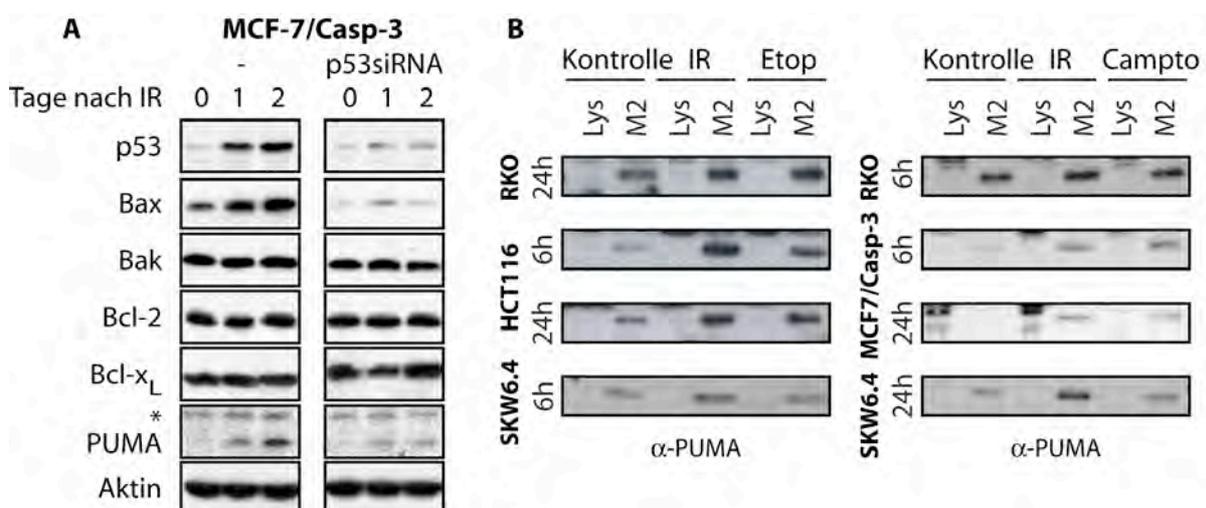


Abbildung 11: Bax und Puma werden in Abhängigkeit von p53 auch in bestrahlungsresistenten Zellen induziert

(A) Western-Blot-Analysen zum Nachweis der Expression der angegebenen Proteine in Gesamtlisaten von unbehandelten und bestrahlten (IR, 2000 Rad) MCF-7/Casp-3-Zellen in An- und Abwesenheit einer stabil exprimierten p53siRNA. Das Sternchen markiert eine Proteinbande unbekannter Herkunft. Die Detektion von

Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. **(B)** Western-Blot-Analysen zum Nachweis der Puma-Expression in Gesamtlysaten (Lys) oder in den aufgereinigten Mitochondrienfraktionen (M2). Die verschiedenen Zelllinien blieben entweder unbehandelt (Kontrolle), wurden bestrahlt (2000 Rad) oder mit Etoposid (Etop; 10 μ M) und Camptothecin (Campto; 1 μ M) inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert.

Um nun zu überprüfen, ob das durch p53 induzierte Bax-Protein auch funktionell aktiviert werden kann, wurde von der Tatsache Gebrauch gemacht, dass Bax zunächst im Zytoplasma als inaktives Monomer vorliegt, bevor es in einer Stimulus-abhängigen Weise eine Konformationsänderung erfährt, wodurch es an den Mitochondrien oligomerisiert und aktiviert wird. Diese Oligomerisierung kann in der Immunfluoreszenz einerseits durch einen Antikörper (anti-Bax-NT) visualisiert werden, der gegen den in diesem Prozess freigelegten N-Terminus gerichtet ist, und andererseits durch die Verwendung von MCF-7-Zellen, die ein GFP-markiertes Bax-Fusionsprotein exprimieren. Während durch den Apoptose-induzierenden Stimulus Etoposid in beiden Fällen ein Oligomerisierungsmuster sichtbar gemacht werden konnte, welches zu einer intensiven punktuerten Anfärbung der Mitochondrien um den Zellkern führte (Abb. 12, rechts), war dies in bestrahlten Zellen nicht zu beobachten (Abb. 12, Mitte). Hier blieben sowohl das endogene Bax als auch das exogen überexprimierte GFP-Bax gleichmäßig im Zytoplasma verteilt. Auch in bestrahlten MCF-7-Wildtypzellen, die nur endogenes Bax exprimieren, konnte durch den Bax-NT-Antikörper keine Oligomerisierung festgestellt werden (Abb. 12, links). Demzufolge kann durch diese Experimente davon ausgegangen werden, dass die hier untersuchten Zelllinien keine sekundären Defekte im p53-vermittelten Apoptose-Signalweg aufweisen. Die Tatsache aber, dass beide Stimuli, Etoposid und Bestrahlung, zur Assoziation von p53 mit den Mitochondrien führen, lässt vermuten, dass dieser Prozess nicht zwingend mit dem bestrahlungsresistenten Phänotyp korreliert.

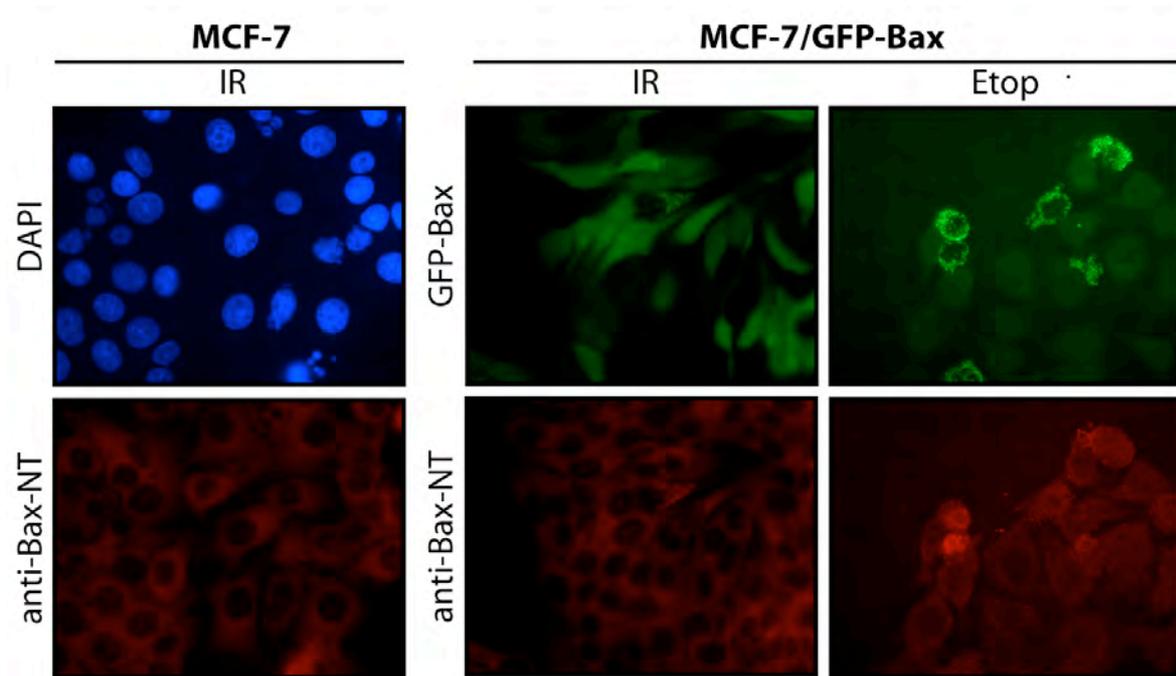


Abbildung 12: Bax wird nur durch Etoposid, nicht aber durch Bestrahlung oligomerisiert und aktiviert

Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen zum Nachweis der Bax-Oligomerisierung und Aktivierung, die in MCF-7-Zellen (linker Ausschnitt) und MCF-7/GFP-Bax-Zellen (Mitte und rechter Ausschnitt) 24 Std nach Bestrahlung durch die Inkubation mit einem konformationsspezifischen Bax-Antikörper (anti-Bax-NT; rot) bestimmt wurde (unten). MCF-7-Zellen wurden außerdem mit dem Farbstoff DAPI inkubiert. Als Positivkontrolle wurden MCF-7/GFP-Bax-Zellen auch für 24 Std mit Etoposid ($10 \mu\text{M}$) behandelt und deren Bax-Oligomerisierung mittels der punktuierter GFP-Expression (oben; grün) bestätigt.

3.1.5 Mitochondrial exprimiertes p53 induziert keine Apoptose

Um schließlich eindeutig nachweisen zu können, ob das mit den Mitochondrien assoziierte p53-Protein tatsächlich Apoptose induzieren kann, wurden MCF-7-Zellen entweder mit dem p53-Wildtyp-cDNA-Konstrukt transfiziert, oder mit einem p53-cDNA-Konstrukt, welches aufgrund einer Fusion mit der Bcl-2-Transmembrandomäne ausschließlich an den Mitochondrien exprimiert wird (p53-CTM). Western-Blot-Analysen zeigten, dass beide Proteine in vergleichbaren Mengen produziert wurden (Abb. 13C, unten). Während aber das p53-Wildtypprotein überwiegend im Zellkern lokalisiert war und, wie erwartet, die typischen apoptotischen Charakteristika wie z.B. das Abrunden und Schrumpfen der Zellen induzierte (Abb. 13B, unten links), konnte dies nach Expression des p53-CTM-Konstruktes nicht beobachtet werden. Diese Zellen zeigten keinerlei Anzeichen einer Apoptose-Induktion, obwohl mittels einer Gegenfärbung der Mitochondrien (*Mitotracker Red*) dessen Lokalisation an diesen Organellen verifiziert werden konnte (Abb. 13A). Im Gegenteil, während die überwiegende Mehrheit der Zellen, die mit dem p53-Wildtyp-Konstrukt transfiziert wurden, eine gleichzeitige Aktivierung von Bax zeigten, konnte dies in Zellen, die das mitochondriale

p53-CTM-Konstrukt exprimierten, nicht nachgewiesen werden. Dieser Sachverhalt wurde auch durch die Auszählung von p53-transfizierten Zellen, in denen aktiviertes Bax-Protein nachweisbar war, bestätigt. So zeigten mehr als 50% aller Zellen nach Transfektion mit dem p53-Wildtypkonstrukt eine gleichzeitige Aktivierung von Bax, während diese Doppelfärbung in nur ca. 8% der p53-CTM-exprimierenden Zellen zu beobachten war (Abb. 13C, oben).

Zusammengefasst bestätigten diese Ergebnisse nicht nur die ursprüngliche Beobachtung, dass die stressinduzierte Translokation von p53 auch unter seneszenten Bedingungen stattfindet, und deshalb nicht wie zuvor postuliert mit einer Apoptose-Induktion korreliert (Mihara *et al.*, 2003), sondern darüber hinaus, dass die Bestrahlungsresistenz der hier untersuchten Zelllinien nicht auf einen diesbezüglichen Defekt zurückzuführen ist.

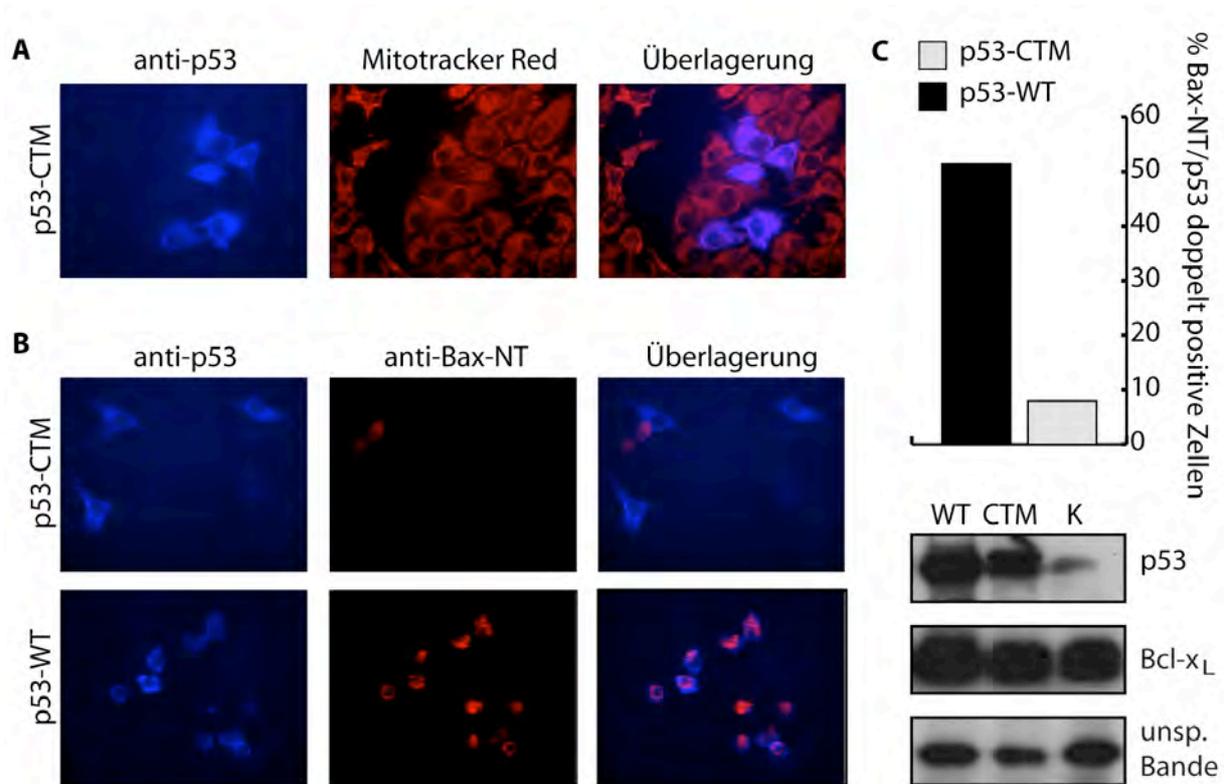


Abbildung 13: Mitochondrien-gerichtete p53-Expression führt nicht zur Apoptose-Induktion

(A) Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen zum Nachweis der Mitochondrien-gerichteten Expression des p53-CTM-Konstruktes in MCF-7 Zellen. Die intrazelluläre Lokalisation von p53 wurde 36 Std nach Transfektion durch einen p53-Antikörper sowie durch die gleichzeitige Färbung mit einem mitochondrienspezifischen Farbstoff (*Mitotracker Red*) bestätigt. (B) Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen zum Nachweis der Bax-Aktivierung in MCF-7-Zellen, die entweder mit dem p53-Wildtypkonstrukt (p53-WT) oder mit dem Mitochondrien-gerichteten p53-Konstrukt (p53-CTM) transfiziert wurden. Die Zellen wurden 36 Std nach Transfektion mit einem p53-Antikörper (links) sowie mit dem konformationsspezifischen Bax-NT-Antikörper (Mitte), der ausschließlich aktiviertes Bax erkennt, gefärbt. Die Zusammenlegung der Ausschnitte (Überlagerung) zeigt, dass p53/Bax-NT doppelt positive Zellen überwiegend nach Expression des p53-Wildtypproteins zu finden sind. (C) Auszählung von p53/Bax-NT doppelt positiven Zellen in 20 zufällig

ausgewählten mikroskopischen Ausschnitten (oben). Western-Blot-Analyse zur Expressionskontrolle beider p53-cDNA-Konstrukte im Vergleich zu einer untransfizierten Kontrolle (unten). Die unspezifische Bande diente als interne Ladekontrolle.

4.2 I κ B ζ als Schlüsselprotein bei der Induktion von Zytokinen

4.2.1 I κ B ζ aggregiert in subnukleären Körperchen

Werden NF- κ B-Inhibitoren exprimiert, so akkumulieren sie, mit Ausnahme von Bcl-3 und I κ B_{NS}, im Zytoplasma der Zelle (Siebenlist *et al.*, 2005). Da die intrazelluläre Lokalisation des von uns identifizierten humanen I κ B ζ unbekannt war, wurden fluoreszenzmikroskopische Analysen durchgeführt. HeLa-Zellen, die transient mit einem GFP-I κ B ζ -Konstrukt transfiziert wurden, zeigten eine exklusive Lokalisation dieses I κ B-Proteins im Zellkern (Abb. 14).

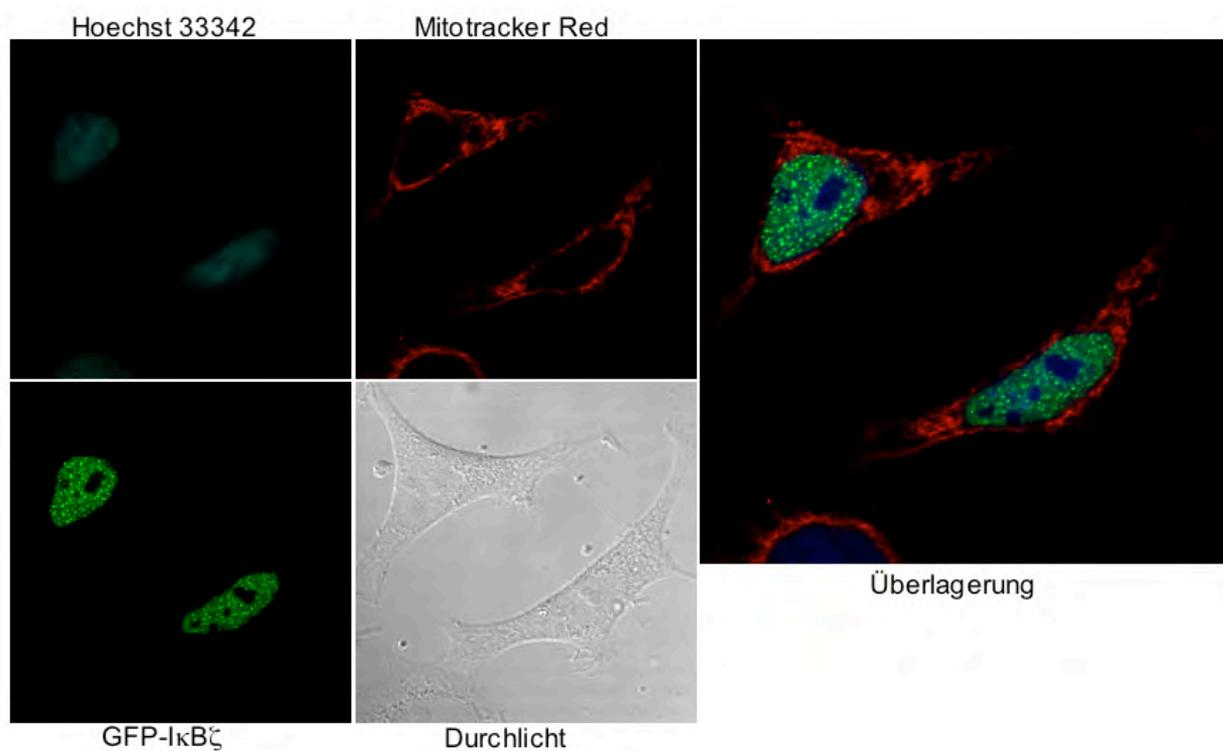


Abbildung 14: I κ B ζ ist im Zellkern lokalisiert

Fluoreszenzmikroskopische Analysen von HeLa-Zellen, die transient mit einem GFP-I κ B ζ -Konstrukt (grün) transfiziert wurden. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) und die Mitochondrien mit *Mitotracker Red* (rot) gefärbt.

Interessanterweise war I κ B ζ nicht gleichmäßig über den Kern verteilt, sondern aggregierte in distinkten granulären Strukturen. Zur genaueren Identifikation dieser subnukleären Körperchen wurden in unserer Gruppe weiterhin detaillierte Koloalisationsstudien durchgeführt, in denen eine Assoziation von I κ B ζ mit der Histon-Deacetylase 5 (HDAC5) sowie dem transkriptionellen Korepressor *silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor* (SMRT) nachgewiesen wurde. Die weitere Charakterisierung des neuen I κ B-Proteins

ergab, dass I κ B ζ mit den NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 interagiert und darüber hinaus, dass dies zu einer Inhibierung deren Bindungsaktivität an die DNA führte. Desweiteren wurde beobachtet, dass I κ B ζ die transkriptionelle Aktivität von p65 inhibierte (Totzke *et al.*, 2006). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde weiterführend der Frage nachgegangen, welche molekularen Konsequenzen die nukleäre Regulation von NF- κ B durch I κ B ζ hat.

4.2.2 I κ B ζ induziert die Expression spezifischer Zytokine in HT1080-Zellen

Da NF- κ B eine bedeutende Rolle in der Regulation inflammatorischer Prozesse spielt, sollte der Einfluss von I κ B ζ auf die NF- κ B-vermittelte Zytokininduktion untersucht werden. Um die Auswirkungen des nukleären Inhibitors I κ B ζ direkt mit denen eines klassischen zytoplasmatischen I κ B-Proteins vergleichen zu können, wurden die Versuche parallel in Abhängigkeit von I κ B α durchgeführt. Hierzu wurde die Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 verwendet, die sich aufgrund ihrer Zytokinproduktion nach NF- κ B-Aktivierung besonders gut für diese Untersuchungen eignete. Die Zellen wurden mit I κ B ζ - und I κ B α -kodierenden Retroviren sowie einem Kontrollvirus transduziert, um einen möglichst effektiven Gentransfer zu gewährleisten. Mittels Western-Blot-Analysen wurde die Expression des transduzierten I κ B ζ und I κ B α verifiziert (Abb. 15). Das transduzierte I κ B α lief im Vergleich zum endogenen I κ B α höher, da es sich um die phosphorylierungsdefiziente und nicht degradierbare Mutante Ser-32/36-Ala (Denk *et al.*, 2001) handelt. Die mRNA-Analysen zeigten, dass I κ B ζ interessanterweise bereits *per se* zu einer Induktion der IL-1 β -Expression führte. Die TNF- α -induzierte IL-1 β -Expression konnte durch I κ B ζ weiter erhöht werden (Abb. 15).

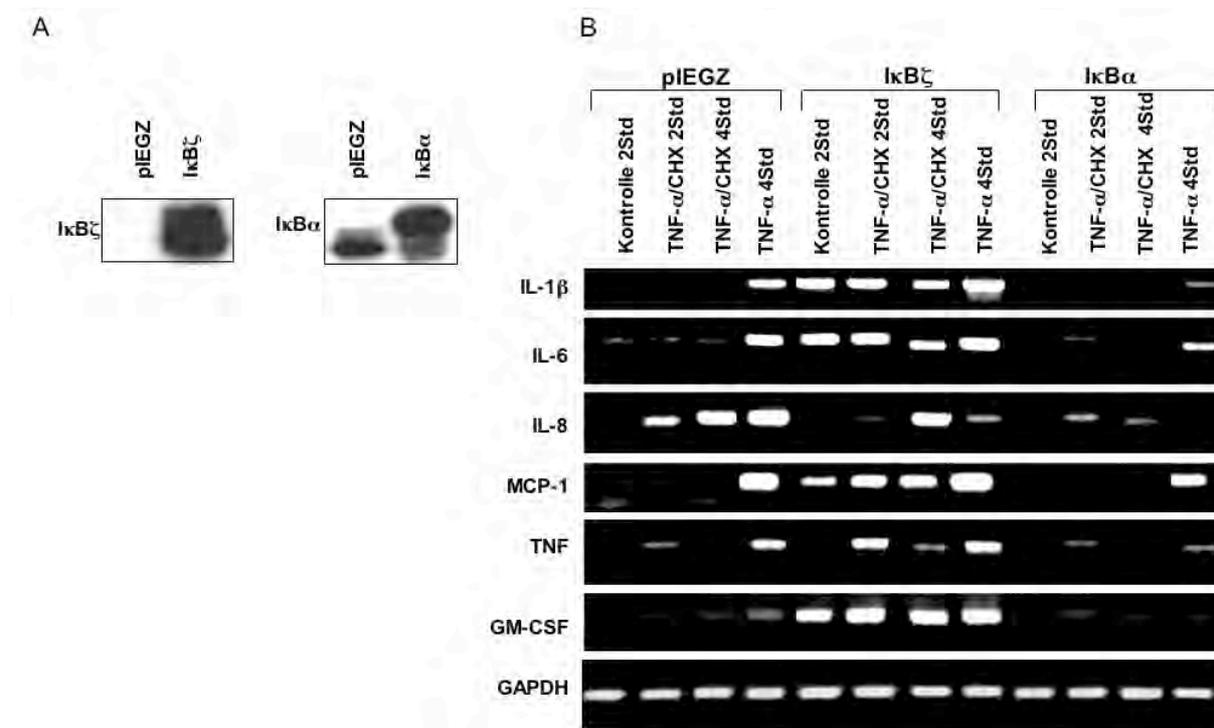


Abbildung 15: IκBζ induziert die mRNA-Expression verschiedener Zytokine

HT1080-Zellen wurden mit einem retroviralen Kontroll (pIEGZ)-, IκBζ- oder IκBα-kodierenden Retroviren, wie im Material- und Methodenteil beschrieben, transduziert. (A) Die Expression von IκBζ und IκBα wurde anhand von Western-Blot-Analysen kontrolliert und anschließend wurde (B) die mRNA-Expression der aufgeführten Zytokine mittels RT-PCR, in entweder unbehandelt belassenen oder mit TNF-α (10 ng/ml) für die angegebenen Zeiten stimulierten Zellen in Ab- und Anwesenheit von Cycloheximid (CHX, 10 μg/ml), analysiert.

Analog zu IL-1β verhielt sich die IL-6-mRNA-Expression. Im Vergleich zu Mock-transduzierten Zellen wiesen IκBζ-transduzierte Zellen unter basalen Bedingungen eine erhöhte Expression der IL-6-mRNA auf. Die Stimulation mit TNF-α förderte die IL-6-Expression. Analysen der mRNA-Expression der Zytokine *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) und GM-CSF zeigten eine ähnliche Induktion durch IκBζ und eine Amplifizierung des Signals durch TNF-α. Lediglich IL-8 und TNF-α schienen unter den gegebenen Bedingungen nicht durch die alleinige IκBζ-Überexpression induziert zu werden. Interessanterweise war im Vergleich zu den IκBζ-transduzierten Zellen in den Kontrollzellen 4 Std nach TNF-α-Stimulation ein höherer IL-8-mRNA-Gehalt nachweisbar. Da es sich bei den untersuchten Zytokinen um NF-κB-Zielgene handelt und IκBα ein potenter Inhibitor des Transkriptionsfaktors ist, fand sich, wie erwartet, in IκBα-transduzierten Zellen nach Inkubation mit TNF-α eine geringere mRNA-Expression der verschiedenen Zytokine als in den Mock-transduzierten Zellen. Die Inkubation mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) schwächte die TNF-α-induzierte mRNA-Expression der Zytokine ab, ein Hinweis darauf, dass dafür eine Proteinneusynthese notwendig ist. Zusammengefasst lässt sich

feststellen, dass $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ im Gegensatz zu dem klassischen $\text{I}\kappa\text{B}$ -Protein $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ in der Lage ist, die Genexpression verschiedener Zytokine positiv zu regulieren.

Zur Untersuchung der Expression weiterer Zytokine wurde mit der präparierten RNA ein RNase-Protektionstest durchgeführt. Die mittels RT-PCR-Analyse erhaltenen Ergebnisse bezüglich der IL-6- und IL-1 β -mRNA-Expression konnten bestätigt werden. Ansonsten übte $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ keinerlei Einfluss auf die anderen untersuchten Zytokine aus (Abb. 16).

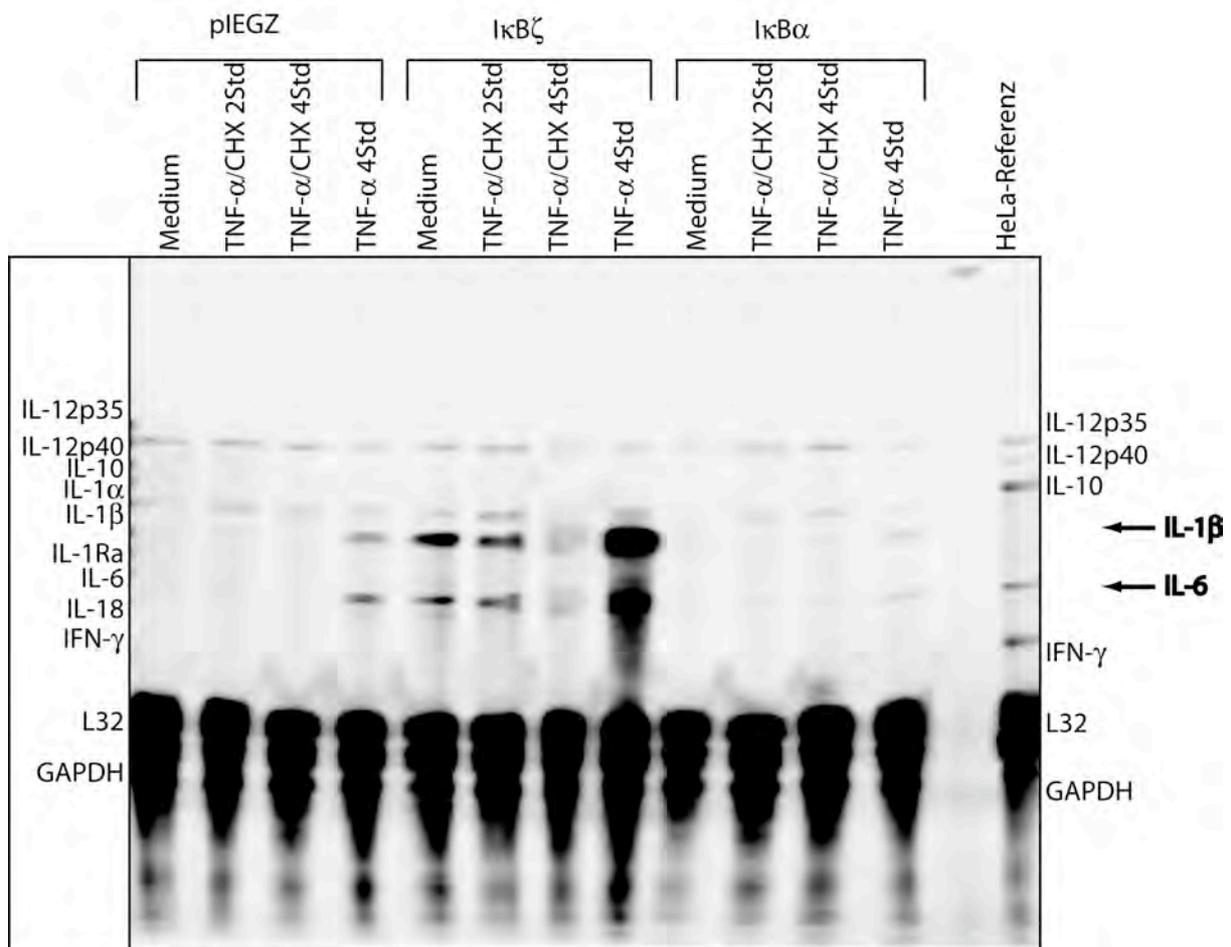


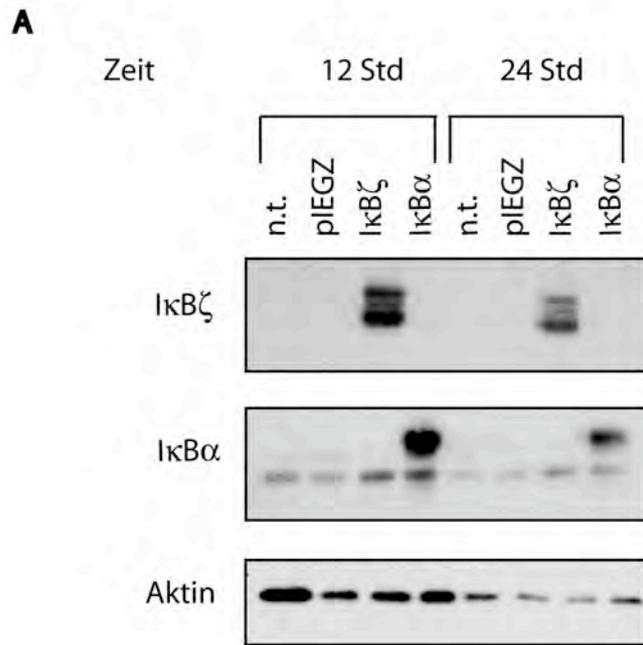
Abbildung 16: $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ induziert die mRNA-Expression von IL-1 β und IL-6

HT1080-Zellen wurden mit einem retroviralen Kontroll (pIEGZ)-, $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - oder $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Vektor, wie im Material- und Methodenteil beschrieben, transduziert und entweder unbehandelt belassen oder mit TNF- α (10 ng/ml) in Ab- und Anwesenheit von Cycloheximid (CHX, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für die angegebenen Zeiten stimuliert. Die mRNA-Expression der aufgeführten Zytokine wurde mittels des „Multi-Template“-RNase-Protektionstests untersucht. Eine isolierte HeLa-RNA diente als positive Kontrolle, L32 und GAPDH als Ladekontrolle.

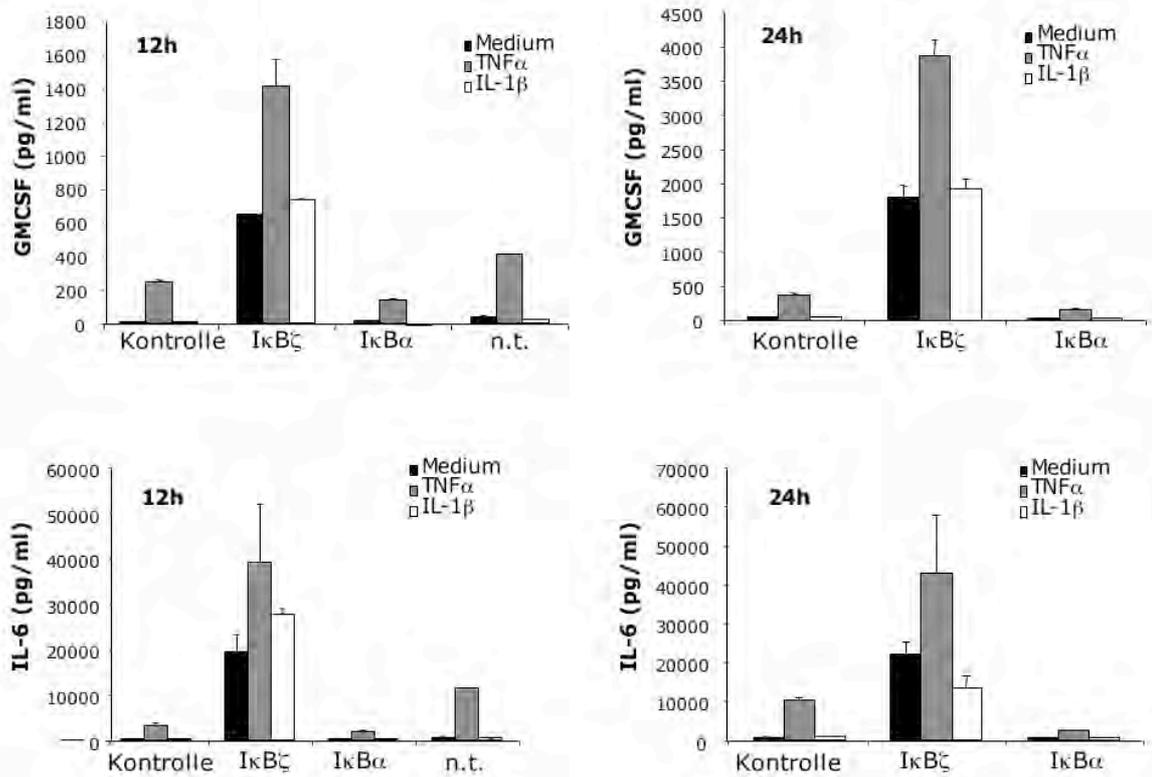
Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die durch $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -induzierte mRNA-Expression der Zytokine auch zu einer Synthese und Freisetzung von Zytokinen führte. Dazu wurde die Konzentration der Zytokine in den Zellkulturüberständen von Mock-, $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - und $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -

transduzierten Zellen, die entweder unbehandelt blieben oder 12 und 24 Std mit TNF- α oder IL-1 β behandelt wurden, mittels des Luminex-Systems bestimmt. Western-Blot-Analysen bestätigten, dass die Zellen zu den angegebenen Zeiten eine Expression ihrer transduzierten Gene aufwiesen (Abb. 17A). In einer Mehrfachanalyse wurde die Expression von GM-CSF, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ und TNF- α untersucht. Die Mengen an IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α und IFN- γ lagen bei den Messungen unterhalb der Nachweisgrenze, so dass sie nicht zur graphischen Auswertung herangezogen wurden. Hingegen induzierte TNF- α 12 Std nach Stimulation in den Kontrollzellen eine Konzentrationszunahme der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8 und GM-CSF, welche sich, mit Ausnahme von IL-8, zeitabhängig nach 24 Std steigerte. Im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigten die I κ B α -transduzierten Zellen dagegen eine partielle Reprimierung der TNF- α -induzierten Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand (Abb. 17B).

Die Gabe von IL-1 β bewirkte weder in den Kontroll- noch in den I κ B α -transduzierten Zellen eine Zytokin-Freisetzung. Die Analyse der Zytokinfreisetzung zeigte wiederum den grundsätzlichen Unterschied zwischen I κ B ζ und I κ B α , da I κ B ζ -transduzierte Zellen keinen Stimulus zur Induktion der Interleukine 1 β , 6 und 8 sowie GM-CSF benötigten. Dabei erwies sich die I κ B ζ -Transduktion in Kombination mit der TNF- α -Behandlung als sehr effizient zur weiteren Zunahme der Zytokinproduktion, welche aber nach 12 Std kaum noch weiter zeitabhängig erhöht werden konnte. Interessanterweise war auch in diesen Zellen lediglich die Expression der IL-8-mRNA nach 24 Std im Vergleich zum 12 Std Wert reduziert. In den I κ B ζ -transduzierten Zellen wurde bereits ohne Stimulus eine stärkere Aktivierung der Zytokine, mit Ausnahme von IL-8, als in den TNF- α -stimulierten Kontrollzellen beobachtet. Damit wurde bestätigt, dass I κ B ζ unabhängig von der TNF- α -Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B die Zytokinproduktion von IL-1 β , IL-6, IL-8 und GM-CSF induzieren konnte, wohingegen durch I κ B α die TNF- α -abhängige Zytokininduktion inhibiert wurde. Auch in den I κ B ζ -transduzierten Zellen konnte durch IL-1 β kein zusätzlicher Effekt auf die Zytokinsynthese nachgewiesen werden (Abb. 17).



B



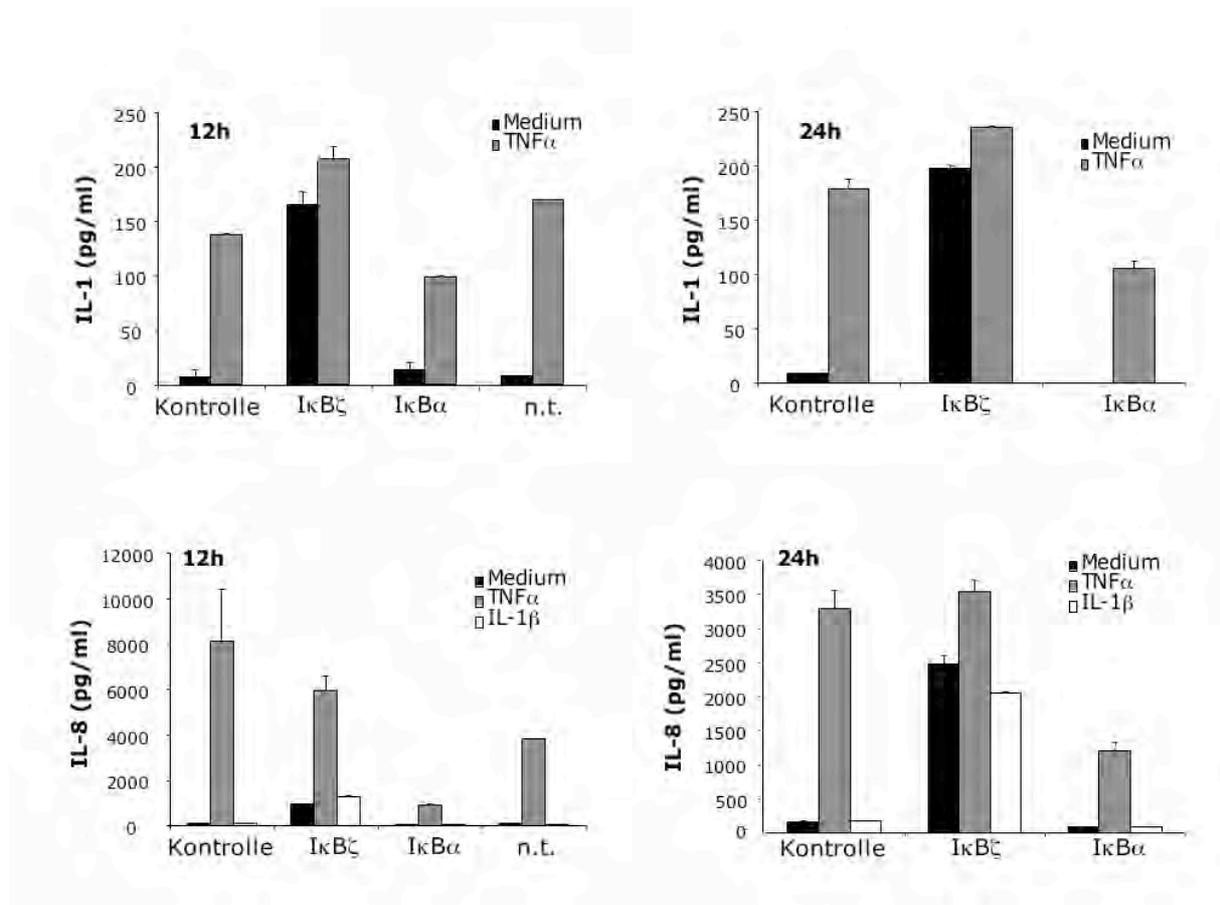


Abbildung 17: IκBζ induziert die Synthese von GM-CSF, IL-6, IL-1β und IL-8

HT1080-Zellen wurden nach Transduktion mit einem Kontroll (pIEGZ)-, IκBζ- oder IκBα-Retrovirus entweder unbehandelt belassen oder mit TNF-α (10 ng/ml) oder IL-1β (10 ng/ml) für 12 und 24 Std stimuliert. (A) Die Expression von IκBζ und IκBα wurde mittels Western-Blot-Analysen in parallel transduzierten Zellen kontrolliert. Das transduzierte IκBα wies im Vergleich zum endogenen IκBα ein höheres Molekulargewicht auf. (B) Anschließend wurde die Konzentration der sezernierten Zytokine in den Zellkulturüberstand mittels des Luminex-Systems bestimmt.

Die durch den Einsatz eines retroviralen Vektorsystems nachgewiesenen regulatorischen Effekte von IκBζ in Bezug auf die mRNA-Expression und Produktion verschiedener Zytokine sollten nachfolgend unter Verwendung von eukaryontischen Expressionsvektoren (pcDNA, pEGFP) verifiziert werden. Allerdings wurde für die Untersuchung der mRNA-Expression eine kürzere Kinetik der TNF-α-Stimulation gewählt. Für die Untersuchungen auf mRNA-Ebene wurden HT1080-Zellen mit einem Kontroll (pcDNA)- und IκBζ-Vektor transient transfiziert und anschließend entweder unbehandelt belassen oder in einer Kinetik bis zu 120 min mit TNF-α stimuliert. Western-Blot-Analysen zeigten eindeutig die Überexpression von IκBζ in den transfizierten Zellen (Abb. 18A).

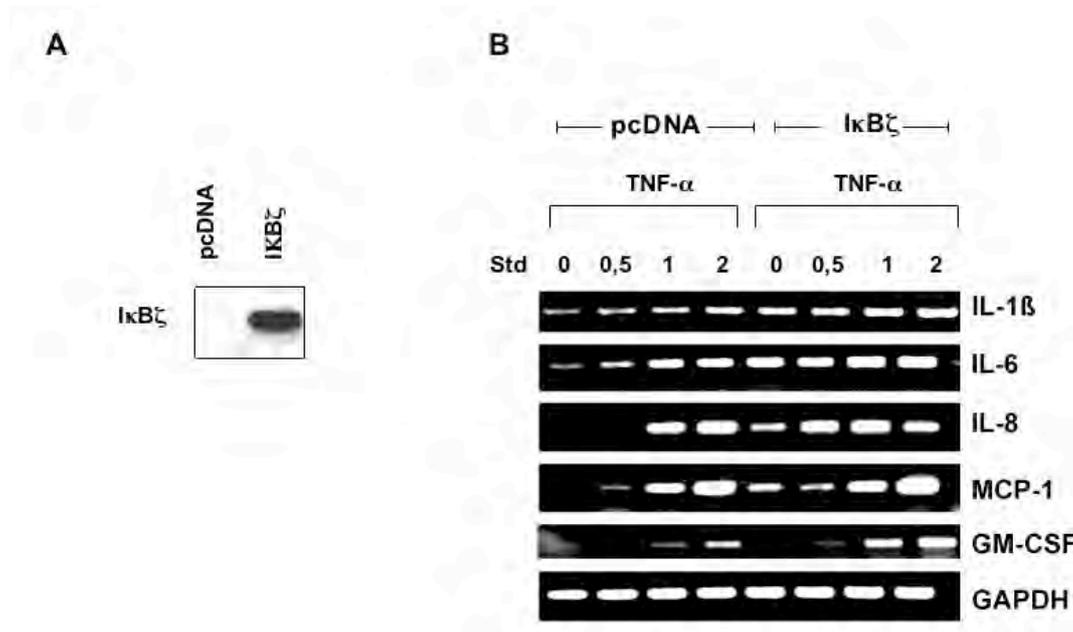


Abbildung 18: IκBζ induziert die mRNA-Expression verschiedener Zytokine

HT1080-Zellen wurden mit einem eukaryontischen Kontroll (pcDNA)- oder IκBζ-Vektor 24 Std transfiziert und anschließend entweder unbehandelt belassen oder mit TNF-α (10 ng/ml) für die angegebenen Zeiten stimuliert. (A) Die Expression von IκBζ und IκBα wurde mittels Western-Blot-Analysen in parallel transfizierten Zellen kontrolliert. (B) Die Analyse der mRNA-Expression der aufgeführten Zytokine erfolgte mittels RT-PCR. Die GAPDH-Expression diente als Ladegabe.

Generell wurden mit dem eukaryontischen IκBζ-Konstrukt die gleichen Effekte erzielt wie mit dem retroviralen IκBζ-Konstrukt. Die mRNA-Induktion der Zytokine IL-1β, IL-6, IL-8 und MCP-1 konnte in den durchgeführten Experimenten schon durch IκBζ hervorgerufen werden (Abb. 18B). In Kombination mit TNF-α wurde diese Zytokinantwort weiter amplifiziert. Interessanterweise wurde durch IκBζ die IL-8-Expression zeitlich nach vorne verlagert (siehe auch Abb. 15). Somit konnte die Vermutung bestätigt werden, dass IκBζ ein positiver Regulator der Genexpression verschiedener Zytokine ist.

4.2.3 Einfluss der funktionellen Domänen von IκBζ auf die Zytokininduktion.

Untersuchungen zur strukturellen Charakterisierung von IκBζ mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems in unserem Labor ergaben, dass IκBζ eine Transaktivierungsdomäne besitzt, die in der N-terminalen Region lokalisiert ist. Aufgrund dessen sollte im Weiteren der Mechanismus der IκBζ-vermittelten Zytokininduktion auf Proteinebene genauer untersucht werden. Hierfür wurden ein GFP-IκBζ-Konstrukt sowie GFP-markierte Deletionsmutanten verwendet, die

entweder den N-Terminus mit der Transaktivierungsdomäne oder den C-Terminus mit den Ankyrin-Wiederholungen enthielten. Die Detektion des gesamten I κ B ζ -Proteins sowie seiner N-terminalen Mutante erfolgte über eine Western-Blot-Analyse mit einem monoklonalen I κ B ζ -Antikörper und zeigte die Transfektion der HT1080-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten. Dieser Antikörper konnte allerdings sein Epitop nach Deletion des N-Terminus nicht mehr erkennen. Folglich wurde die Expression des C-Terminus mit einem GFP-Antikörper nachgewiesen (Abb. 19). Die Fähigkeit der einzelnen Mutanten, Zytokinfreisetzung zu induzieren, wurde mittels Luminex-Analyse getestet. Dazu wurden die Zellen nach Transfektion mit den entsprechenden Konstrukten entweder nicht behandelt oder 24 Std mit TNF- α stimuliert und anschließend deren Zellkulturüberstände analysiert. Die untersuchten Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8 und GM-CSF konnten in allen Zellen mit TNF- α induziert werden. Auch hier wurde erneut deutlich, dass I κ B ζ ohne zusätzliche Stimulation die Synthese dieser Zytokine induzieren kann (IL-8 weist in Anwesenheit von I κ B ζ eine Konzentration von 0,277 ng/ml und in Anwesenheit vom Kontrollvirus pIEGZ eine Konzentration von 0,067 ng/ml auf; Auswertung wurde graphisch nicht dargestellt). Die Kombination des transfizierten I κ B ζ mit TNF- α fällt durch eine sehr hohe Ausschüttung der jeweiligen Zytokine auf. Dagegen konnte weder der N-Terminus noch der C-Terminus, einen ähnlichen Effekt auf die Induktion der Zytokine auszuüben. Auch in Kombination mit TNF- α wiesen diese nur eine geringe Menge an Zytokinen auf, welche der stimulierten Kontrollen vergleichbar war (Abb. 19). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass für die I κ B ζ -vermittelte Induktion der Zytokinfreisetzung neben der Transaktivierungsdomäne auch die Ankyrin-Wiederholungs-Domäne des Proteins erforderlich ist, was darauf hinweist, dass I κ B ζ seine transkriptionelle Aktivität in NF- κ B-abhängiger Weise ausführt.

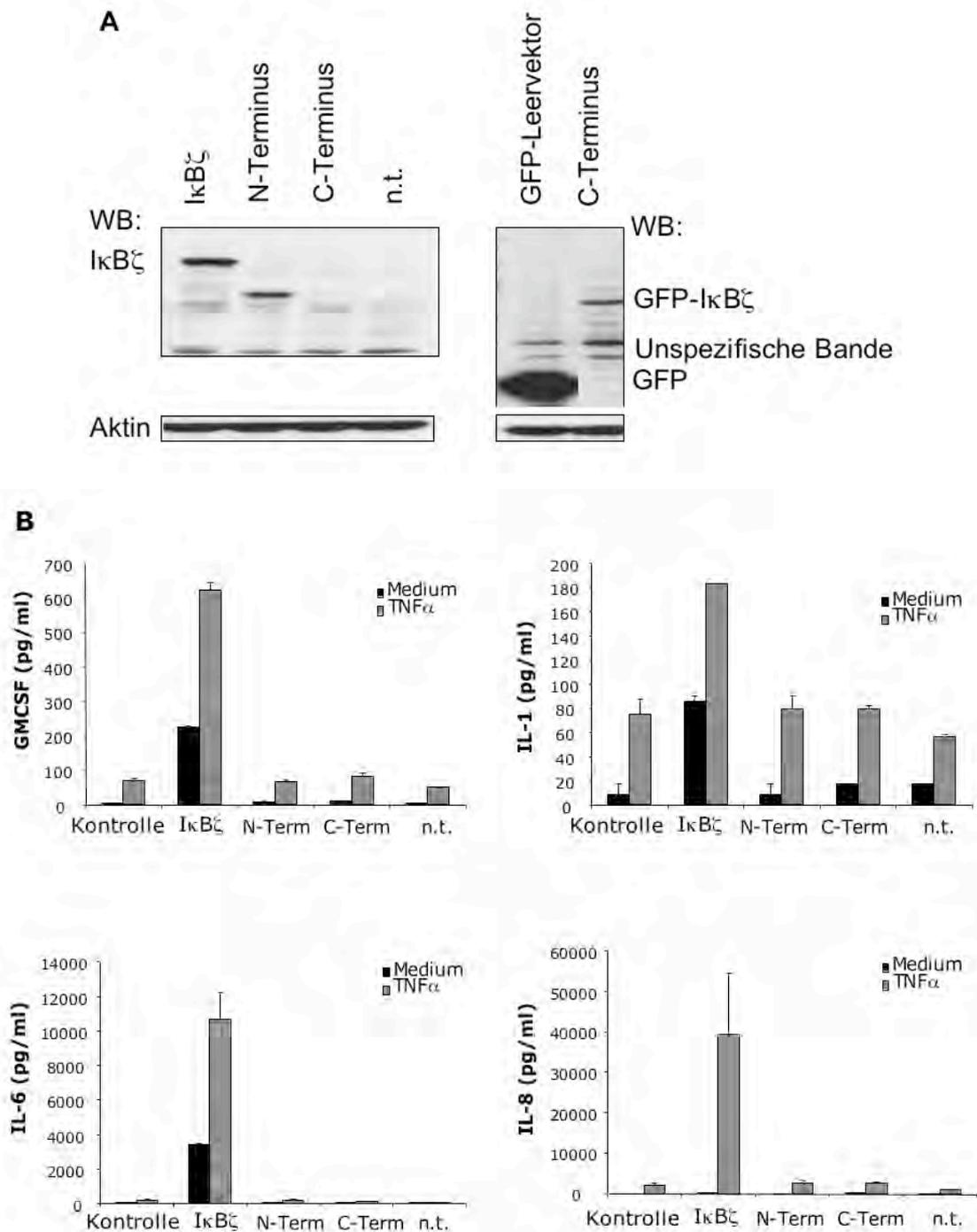


Abbildung 19: Sowohl der N- als auch C-Terminus von IκBζ sind für die Zytokin-Induktion erforderlich

HT1080-Zellen wurden mit dem N- (N-Term)- oder C-Terminus (C-Term) von IκBζ, dem gesamten IκBζ oder einem Leervektor (Kontrolle) 24 Std transfiziert und entweder unbehandelt belassen oder für weitere 24 Std mit TNF- α (10 ng/ml) behandelt. Zusätzlich wurden nicht-transfizierte Zellen (n.t.) eingesetzt. (A) Die Detektion der verschiedenen transfizierten GFP-IκBζ-Konstrukte und des Leervektors erfolgte durch Western-Blot-Analysen. Das gesamte IκBζ-Protein sowie der N-Terminus wurden mittels eines monoklonalen IκBζ-Antikörpers, der IκBζ-C-Terminus sowie der Leervektor durch einen monoklonalen GFP-Antikörper nachgewiesen. Die weiteren Banden sind unspezifisch. Die Aktin-Detektion diente als Ladekontrolle. (B) Dargestellt ist die in den Zellkulturüberstand sezernierte Zytokinmenge, die mittels des Luminex-Systems ermittelt wurde.

4.2.4 Die $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -vermittelte Induktion von Zytokinen in Abhängigkeit von p50 und p65

Um darüber genauere Kenntnisse zu erlangen, wurde die Wechselwirkung von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ mit dem Transkriptionsfaktor NF- κB näher untersucht. Insbesondere sollte hierbei die Abhängigkeit der Zytokininduktion von der p50- und p65-Präsenz analysiert werden, da bereits eine Interaktion von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ mit diesen NF- κB - Untereinheiten beschrieben wurde (Totzke *et al.*, 2006). Diese Versuche wurden mit Maus embryonalen Fibroblasten (MEF) p50^{-/-} (p50-*knock out*)-, MEF p65^{-/-} (p65-*knock out*)- sowie MEF-Wildtyp (WT)-Zellen durchgeführt. Die Inaktivierung der entsprechenden Gene konnte anhand von Western-Blot-Analysen bestätigt werden. Während MEF-WT eine Expression von p65 und p50 aufwies, zeigten die p50-defizienten Zellen eine p65-, jedoch keine p50-Expression und die p65-defizienten Zellen eine p50-, jedoch keine p65-Expression (Abb. 20). Um eine repräsentatives Ergebnis für die untersuchten Zelllinien zu erhalten, ist eine hohe Transfektionseffizienz erforderlich. Da sich die MEF-Zellen nur sehr schwach transient transfizieren ließen, wurde erneut auf die bereits erfolgreiche Transduktion mit einem Retrovirus zurückgegriffen. In den verschiedenen MEF-Zelllinien, die mit $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ oder $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ transduziert wurden, konnte die Expression der entsprechenden Proteine mittels Western-Blot-Analyse bestätigt werden (Abb. 20).

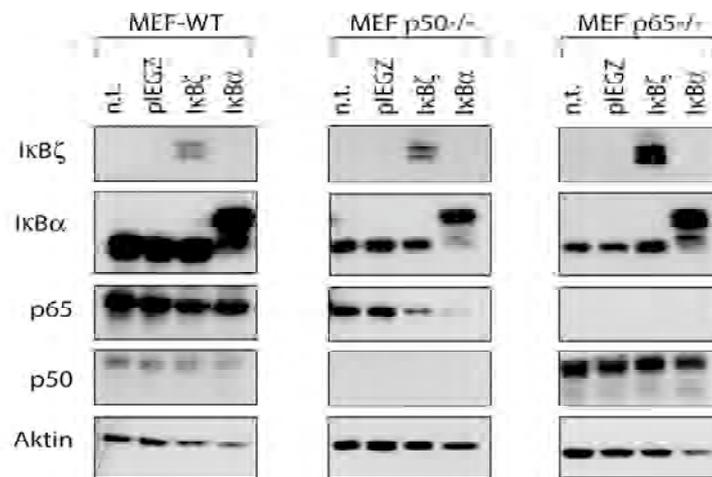


Abbildung 20: Expressionsstatus von p50 und p65 in den verschiedenen MEF-Linien und Nachweis der Expression von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ und $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ nach Transduktion der Zelllinien

MEF-WT, MEFp50^{-/-} und MEFp65^{-/-} wurden mit einem Kontroll (pIEGZ)-, $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - oder $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Vektor transduziert. 24 Std nach der Transduktion wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und mittels Western-Blot-Analyse auf die Expression der entsprechenden Proteine untersucht. Das transduzierte $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ hat ein größeres Molekulargewicht im Vergleich zum endogenen $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. Als zusätzliche Kontrolle wurden nicht-transduzierte Zellen (n.t.) mit einbezogen. Die Detektion der Aktin-Expression diente als Ladekontrolle.

Im nächsten Schritt wurde in den Zellkulturüberständen untersucht, ob die Freisetzung von Zytokinen nach I κ B ζ -Transduktion in Abhängigkeit von p50 oder p65 auftritt. So wurden die transduzierten Zellen jeweils unbehandelt belassen oder für 24 Std mit TNF- α behandelt und deren Überstände mittels des Luminex-Systems analysiert. Im Vergleich zu den Leervektor-transduzierten MEF-WT zeigten die I κ B ζ -transduzierten MEF-WT eine stark erhöhte Freisetzung der Zytokine GM-CSF und IL-6, jedoch nur eine geringe Zunahme des MCP-1 und *Keratinocyte-derived chemokine* (KC), einem Maus-Homolog von IL-8, was wahrscheinlich auf die hohe basale Produktion dieser beiden Zytokine zurückzuführen war (Abb. 21). Die Stimulation mit TNF- α hatte generell keinen oder nur einen geringen Effekt auf die Zytokinfreisetzung in den WT-Zellen. Verglichen mit den I κ B ζ -transduzierten WT-Zellen war die Zytokinfreisetzung sowohl in I κ B ζ -transduzierten p50- als auch in I κ B ζ -transduzierten p65-defizienten MEFs dramatisch herabgesetzt, woraus zu schließen ist, dass die I κ B ζ -vermittelte Induktion der Zytokine in NF- κ B-abhängiger Weise erfolgte. In MEFp50^{-/-} konnte dieser inhibitorische Effekt, mit Ausnahme von GM-CSF, interessanterweise durch TNF- α vollständig kompensiert werden. Auch in den nicht- und Mock-transduzierten MEFp50^{-/-}, die unter basalen Bedingungen, im Gegensatz zu MEF-WT, nur geringe Konzentrationen von MCP-1 und KC aufwiesen, wurde nach Stimulation mit TNF- α eine drastische Zunahme dieser Zytokine beobachtet. Dies lässt vermuten, dass die beiden NF- κ B-Untereinheiten p65 und p50 erforderlich waren, um unter basalen Bedingungen MCP-1 und KC zu synthetisieren, während das Fehlen einer der beiden Untereinheiten dieses nicht zuließ. In Kombination mit TNF- α war p65, jedoch nicht p50, dann in der Lage, diese Defizienz aufzuheben. Wie erwartet, wurde durch Transduktion der Zelllinien mit I κ B α die Zytokinausschüttung sowohl in den unstimulierten als auch in den TNF- α -stimulierten Zellen supprimiert (Abb. 21).

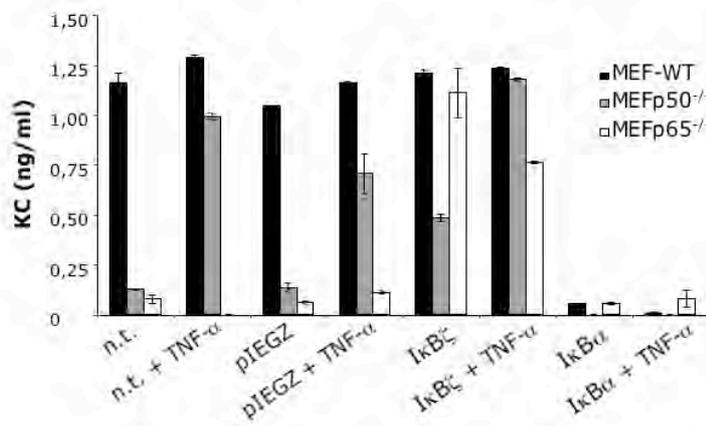
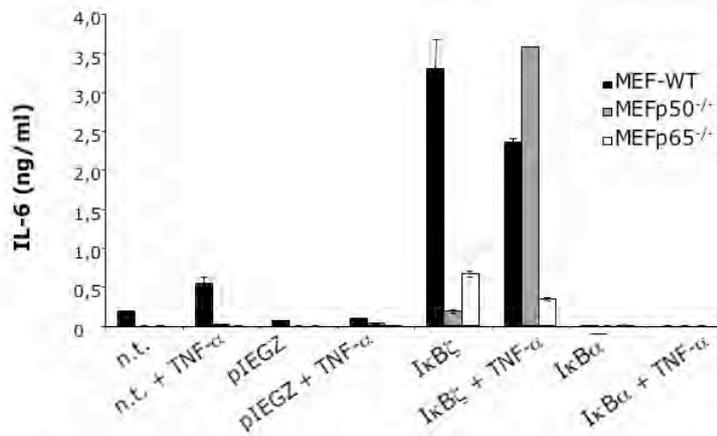
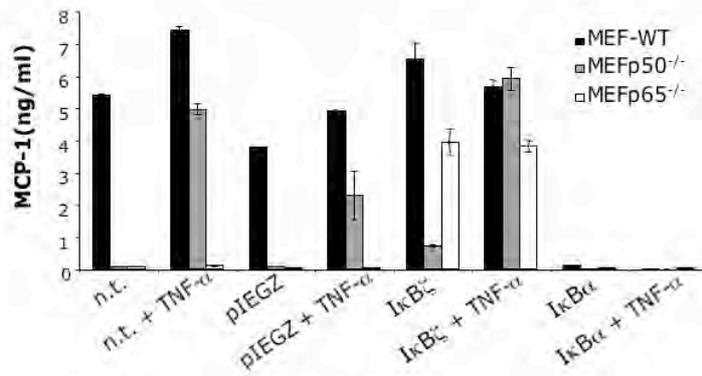
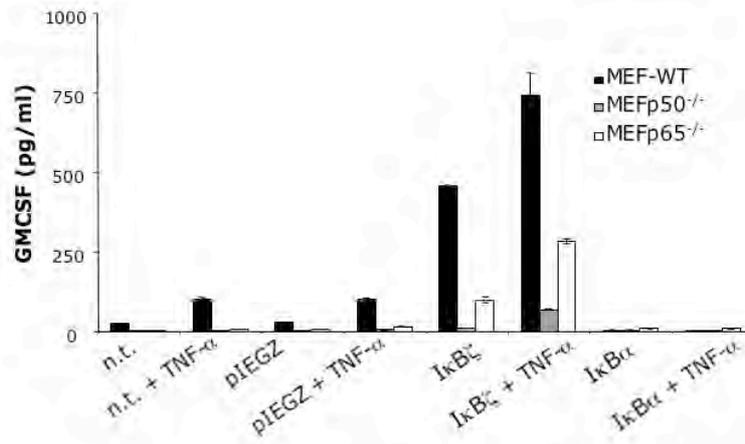
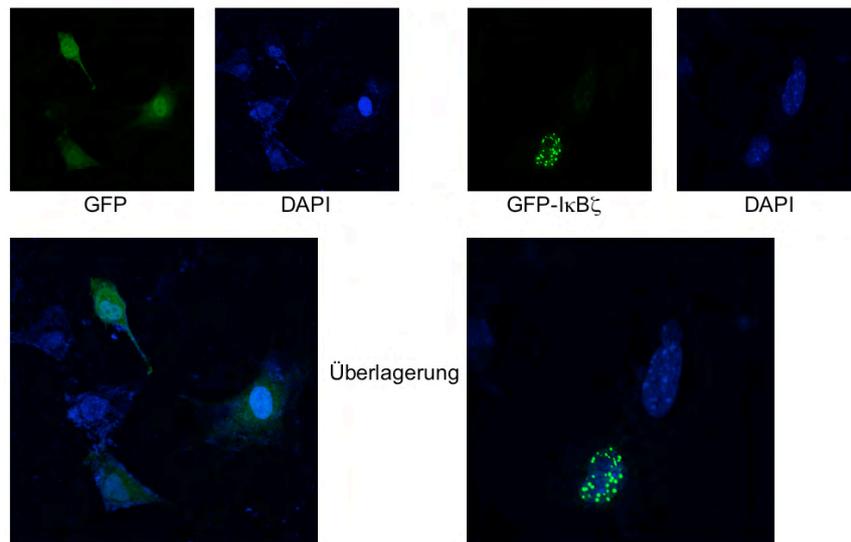


Abbildung 21: Die I κ B ζ -induzierte Synthese verschiedener Zytokine wird NF- κ B-abhängig vermittelt

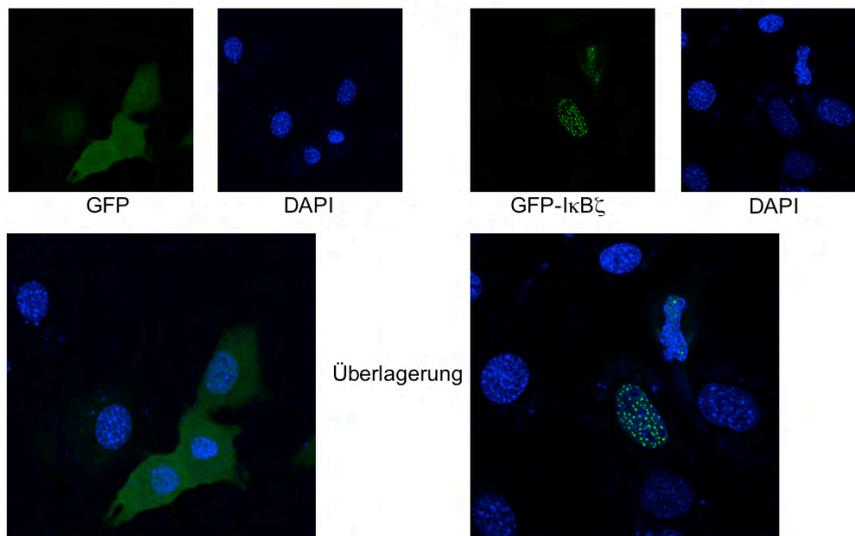
MEF-WT-, MEFp50^{-/-}- und MEFp65^{-/-}-Zellen wurden entweder nicht transduziert (n.t.) oder mit den angegebenen Retroviren transduziert. Danach blieben die Zellen entweder unbehandelt oder es erfolgte eine Stimulation mit TNF- α für 24 Std. Die Konzentration der aufgeführten Zytokine in den Zellkulturüberständen wurde mit dem Luminex-System bestimmt.

Da I κ B ζ mit p50 und p65 interagiert und diese NF- κ B-Untereinheiten für die I κ B ζ -induzierte Zytokinfreisetzung erforderlich sind, sollte als nächstes die Frage geklärt werden, ob diese NF- κ B-Proteine einen Einfluss auf die spezifische Verteilung von I κ B ζ im Kern haben. Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurden MEF-WT, MEFp65^{-/-} und MEFp50^{-/-} daher mit einem GFP-I κ B ζ -Konstrukt oder dem GFP-Leervektor transfiziert. Die GFP-Leervektor transfizierten MEF-Zellen wiesen unabhängig von ihrem p50- oder p65-Status eine ubiquitäre Verteilung des Proteins auf, welche durch die DAPI-Kernfärbung belegt wurde. In den GFP-I κ B ζ -transfizierten Zellen konnte die nukleäre Lokalisation des Proteins ebenfalls mit Hilfe der DAPI-Kernfärbung in der Überlagerung beider Bilder verifiziert werden. Bemerkenswerterweise trat nicht nur in den MEF-WT, sondern auch in den MEFp50^{-/-} sowie MEFp65^{-/-} die I κ B ζ -typische Verteilung in einer gepunkteten Struktur auf (Abb. 22). Die Präsenz bzw. das Fehlen einer der beiden NF- κ B- Untereinheiten p65 oder p50 hatte somit keinen Einfluss auf die Akkumulation von I κ B ζ in den charakteristischen punktförmigen subnukleären Körperchen der Zelle.

MEF-WT



MEF p55^{-/-}



MEF p50^{-/-}

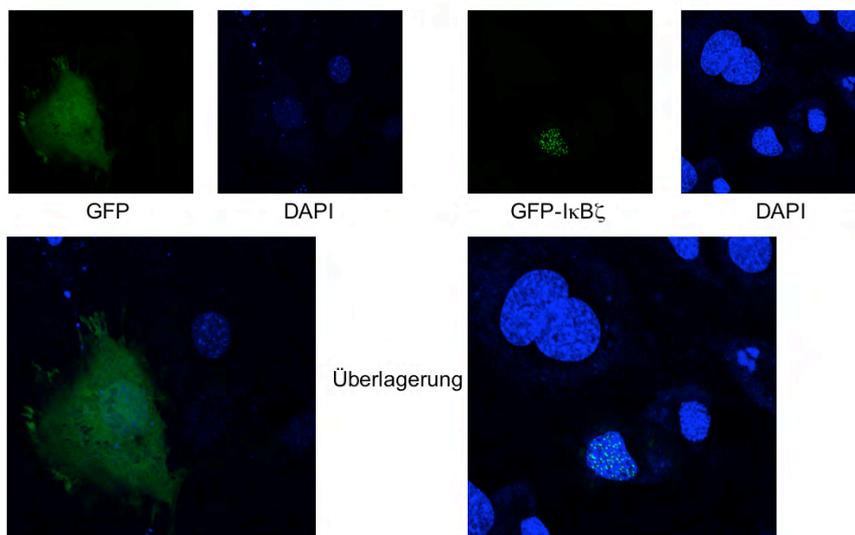


Abbildung 22: Die NF- κ B-Untereinheiten p65 und p50 haben keinen Einfluss auf die distinkte Verteilung von I κ B ζ in subnukleären Strukturen

Fluoreszenzmikroskopische Analysen von MEF-WT, MEFp65^{-/-} und MEFp50^{-/-} 24 Std nach transienter Transfektion mit einem Kontroll (GFP)- oder GFP-I κ B ζ -Vektor. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

4.2.5 Induktion der Zytokinsynthese in Endothelzellen

In einer Micro-Array-Analyse sollten weitere I κ B ζ -regulierte Gene in *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) identifiziert werden. Hierbei war von besonderem Interesse, ob I κ B ζ auch in diesem Zelltyp die mRNA-Expression verschiedener Zytokine moduliert. Für diese Untersuchungen wurden die Endothelzellen mit einem Kontroll- oder I κ B ζ -Retrovirus transduziert. Die Expression konnte in parallel behandelten Zellen durch eine Western-Blot-Analyse bestätigt werden (Abb. 23A). Bei der Auswertung der durch den Micro-Array erhaltenen Daten wurde die Expression der Gene in I κ B ζ -transduzierten Zellen in Relation zur Vektorkontrolle gesetzt und quantifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass I κ B ζ eine Vielzahl von über 100 Genen signifikant hoch- oder herunterregulierte. Auch in den HUVECs wurde eine Induktion der Zytokine IL-6 und IL-8 durch I κ B ζ verzeichnet. Diese betrug für IL-6 das 1,8-fache und für IL-8 sogar das 3,8-fache im Vergleich zur Kontrolle. Anschließend wurde dieses Ergebnis in der Real-Time RT-PCR verifiziert. Hier zeigte sich ebenfalls eine signifikante Induktion der beiden Zytokine (Abb. 23C). Diese positive Regulation durch I κ B ζ bestätigte erneut die Ergebnisse aus den bisher untersuchten Zellsystemen (MEF, HT1080).

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse auf eine Rolle von I κ B ζ in der Regulation inflammatorischer Prozesse hin. Anhand der Micro-Array-Daten konnte festgestellt werden, dass dieses Protein darüber hinaus eine Vielzahl von Genen moduliert, die ganz unterschiedlichen weiteren funktionellen Gruppen zuzuordnen sind. Somit scheint I κ B ζ unter anderem eine wesentliche Rolle in der Apoptose, bei der Adhäsion oder in der Mitose zu spielen. Besonders hervorzuheben ist dabei, dass I κ B ζ nicht nur als Aktivator, sondern auch als Repressor der Genexpression fungieren kann.

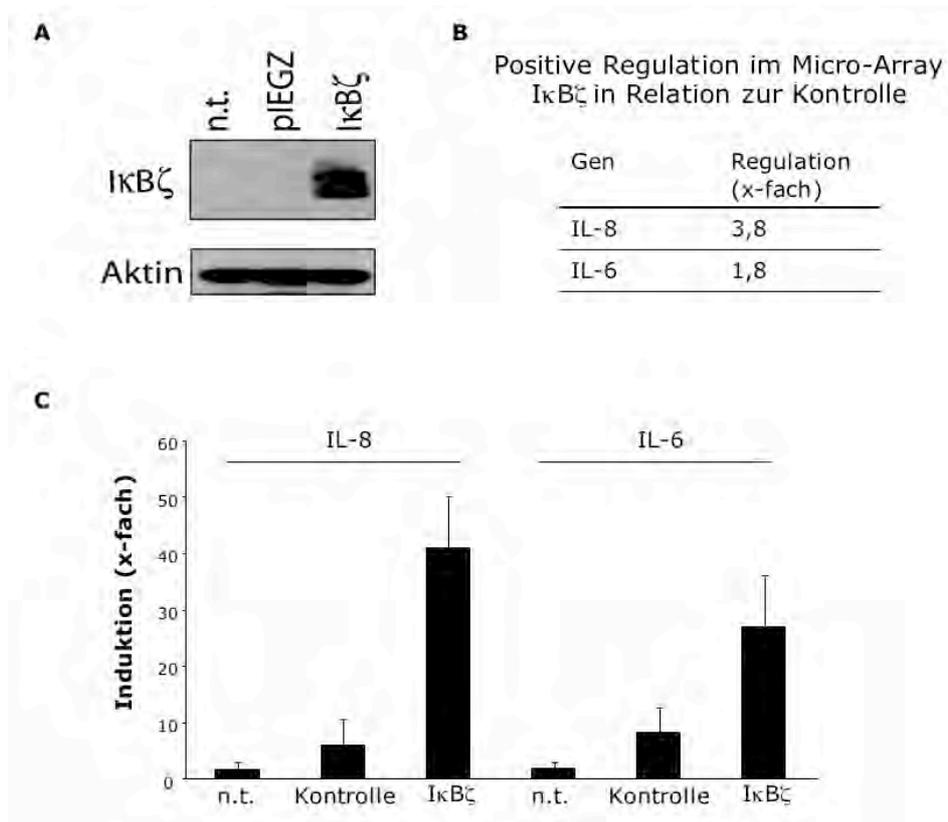


Abbildung 23: IκBζ induziert die mRNA-Expression von IL-8 und IL-6 in Endothelzellen

(A) Die Western-Blot-Analyse zeigt die Expression von IκBζ in HUVECs nach retroviraler Transduktion mit dem IκBζ-Virus. Als Kontrolle dienten nicht-transduzierte und Leer (pIEGZ)-Vektor transduzierte Zellen. Aktin fungierte als Ladekontrolle. (B) Ausschnitt aus den Ergebnissen der Micro-Array-Analyse. Die aufgeführten Gene wurden in IκBζ-transduzierten Zellen, im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle, um den jeweils genannten Wert positiv reguliert. (C) Real-Time RT-PCR zur Bestätigung der Micro-Array-Daten. Hierzu wurde die in dem Micro-Array eingesetzte RNA verwendet und auf die Expression der IL8- und IL-6- mRNA-Expression hin untersucht.

4.2.6. Effekte von I κ B ζ auf die Apoptose

I κ B ζ wurde ursprünglich als ein TNF- α -induzierbares Genprodukt in Apoptose-sensitiven Zellen durch ein differentielles *Screening* von HeLa-Zellen mit unterschiedlicher TNF- α -Sensitivität identifiziert (Totzke *et al.*, 2006). Daher wurde in weiteren Versuchen die funktionelle Rolle von I κ B ζ bei der Regulation des Zelltodes untersucht. Hierzu wurde I κ B ζ sowie I κ B α in HT1080-Zellen mittels retroviraler Transduktion exprimiert. Nach 2 Tagen konnten in einer mikroskopischen Analyse deutliche zytotoxische Effekte von I κ B ζ festgestellt werden (Abb. 24A). I κ B ζ -exprimierende Zellen lösten sich vom Untergrund des Kulturgefäßes ab und zeigten eine Apoptose-typische Kondensation des Chromatins. Dagegen blieben Zellen, die mit dem Kontrollvirus pIEGZ transduziert wurden, vital. Die Expression von I κ B α zeigte erstaunlicherweise in allen durchgeführten Untersuchungen einen geringeren zytotoxischen Effekt als I κ B ζ , obwohl beide Proteine in einem vergleichbaren Ausmaß exprimiert wurden (Abb. 24B). Ähnliche proapoptotische Effekte von I κ B ζ zeigten sich, wenn der Zelltod mittels durchflusszytometrischer Analyse und dem Nachweis hypodiploider DNA untersucht wurde (Abb. 24C). Sowohl die durch I κ B ζ als durch I κ B α induzierte Apoptose war von einer Caspase-Aktivierung abhängig, da der Zelltod nahezu vollständig durch den Caspase-Inhibitor qVD-oPH (QVD) gehemmt wurde (Abb. 24C).

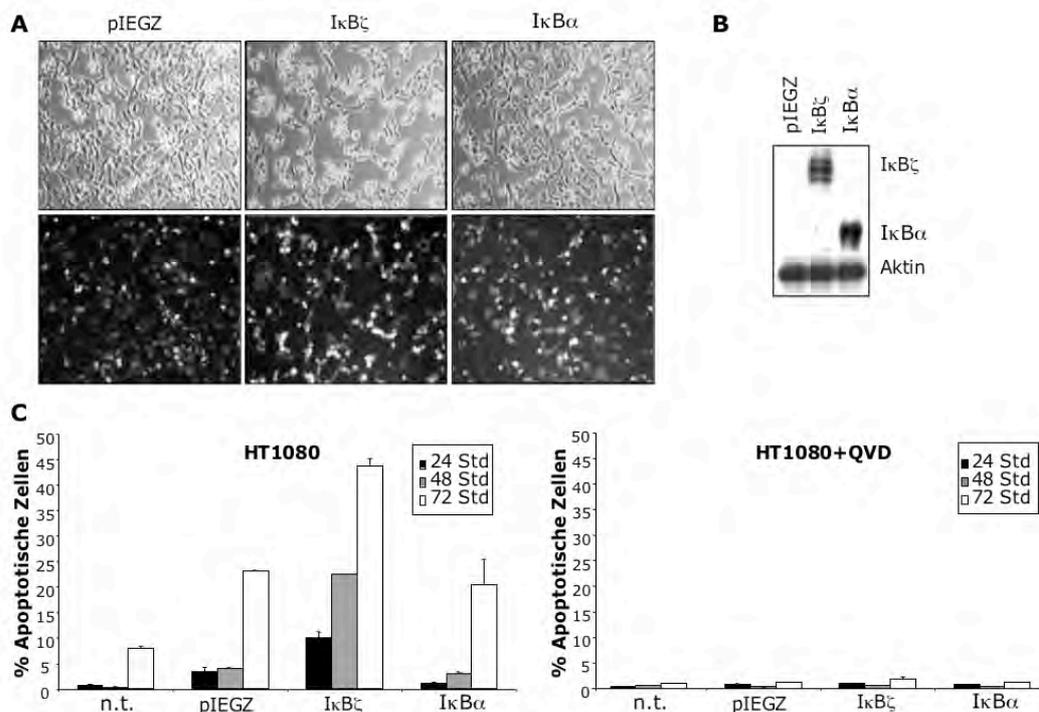


Abbildung 24: Die Überexpression von I κ B ζ induziert Apoptose in HT1080-Zellen

(A) HT1080-Zellen wurden mit den angegebenen Retroviren transduziert, die durch einen bicistronischen Vektor ebenfalls für die Expression von GFP kodieren. Oben sind Durchlichtaufnahmen und unten Fluoreszenzlichtaufnahmen 48 Std nach der Transduktion dargestellt. (B) Die Expression von I κ B ζ und I κ B α wurde anhand von Western-Blot-Analysen in parallel transduzierten Zellen kontrolliert. (C) HT1080-Zellen wurden mit den angegebenen Retroviren transduziert, in An- bzw. Abwesenheit des Caspase-Inhibitors QVD (10 μ M) kultiviert und zu den aufgeführten Zeitpunkten im Durchflusszytometer analysiert. Der Prozentsatz der Zellen, die einen verminderten DNA-Gehalt zeigten (sub-G1-Zellen) wurde als apoptotisch bezeichnet. (n.t. nicht transduziert).

Eine Beteiligung von Caspasen am I κ B ζ -vermittelten Zelltod wurde auch durch eine Westernblot-Analyse bestätigt. Hierzu wurden HT1080 Zellen mit dem I κ B ζ - und I κ B α -Virus oder dem Kontrollvirus pIEGZ transduziert und die Prozessierung der Caspase-3 in der untersucht. Es konnten eine Spaltung der Caspase-3 zu dem aktiven p17-Fragment sowie die Spaltung des Caspase-Substrats Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) in Abhängigkeit von I κ B ζ nachgewiesen werden (Abb. 25A). Diese Effekte wurden durch den Caspase-Inhibitor QVD gehemmt. Die Aktivierung der Caspase-3 wurde auch in einem fluorimetrischen Substrattest analysiert, der nur in I κ B ζ -transduzierten Zellen eine Spaltung des Caspasesubstrates DEVD-AMC zeigte (Abb. 25B). Dagegen erfolgte weder in den I κ B α -, pIEGZ-transduzierten Zellen noch in nicht transduzierten Kontrollen eine Spaltung des Caspase-3 Substrates. Zusammenfassend konnte eine Induktion der enzymatischen Aktivität von Caspase-3 durch die Überexpression von I κ B ζ in HT1080 Zellen gezeigt werden.

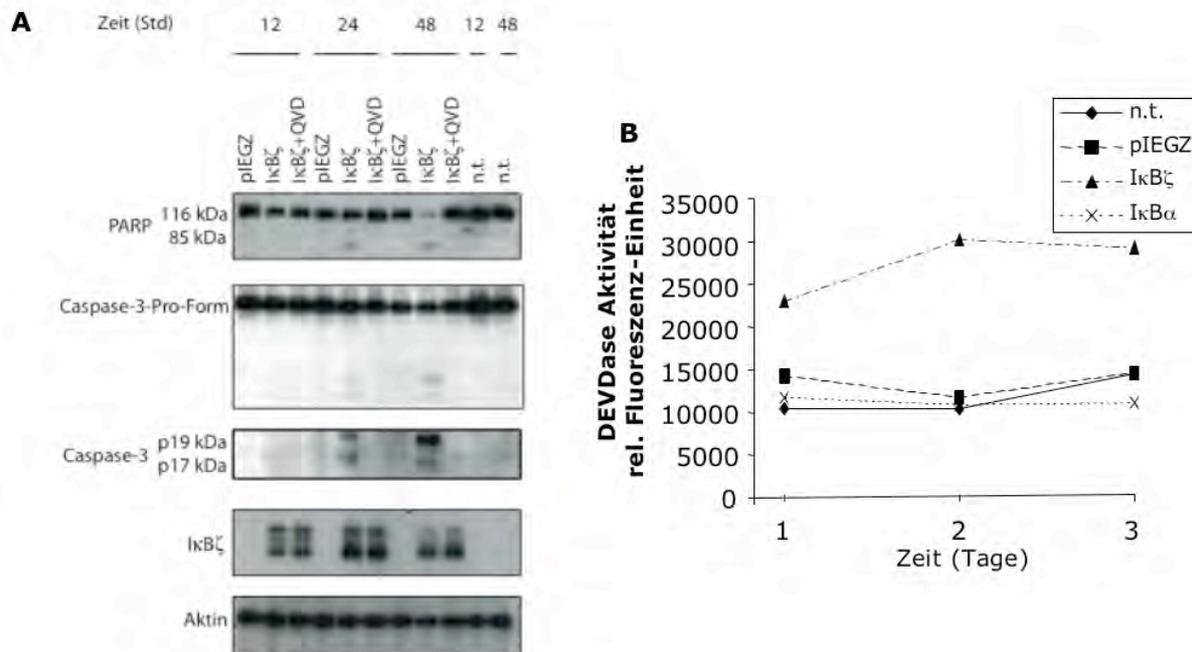


Abbildung 25: I κ B ζ induziert die Aktivierung von Caspasen

HT1080-Zellen wurden mit einem I κ B ζ - bzw. I κ B α -kodierenden Retrovirus oder dem Kontrollvirus pIEGZ in An- oder Abwesenheit des Caspase-Inhibitors QVD (10 μ M) transduziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden Zelllysate hergestellt und (A) mittels Westernblot hinsichtlich der Spaltung von Caspase-3 und PARP bzw. der Aktin- und I κ B ζ -Expression analysiert oder (B) anhand des fluorigenen Substrats DEVD-AMC bezüglich der enzymatischen Caspase-3-Aktivität untersucht (n.t. nicht transduziert).

Um eine Abhängigkeit der I κ B ζ -induzierten Apoptose von Caspasen näher zu untersuchen, wurden MCF-7-Zellen, die keine Caspase-3 exprimieren, mit den verschiedenen Retroviren transduziert. In Abwesenheit von Caspase-3 wurden nur schwache zytotoxische Effekte in I κ B ζ -transduzierten Zellen beobachtet, wohingegen MCF-7-Zellen, die mit dem I κ B α - bzw. Kontrollvirus transduziert worden waren, vital blieben (Abb. 26A). Deutliche stärkere zytotoxische Effekte wurden jedoch in stabil mit Caspase-3 transfizierten MCF-7 Zellen, beobachtet, die im Vergleich zu den parental MCF-7-Zellen eine stärkere Abrundung und Ablösung vom Plattenboden aufwiesen. Auch die durchflusszytometrische Analyse bestätigte eine erhöhte Apoptoserate in MCF-7/Caspase-3 Zellen im Vergleich zu MCF-7-Zellen nach Transduktion mit I κ B ζ (Abb. 26B). Diese Befunde stehen daher Einklang mit der ursprünglichen Identifizierung von I κ B ζ in Apoptose-sensitiven Zellen und zeigen, dass die Expression von I κ B ζ in Caspase-abhängiger Weise Apoptose induziert.

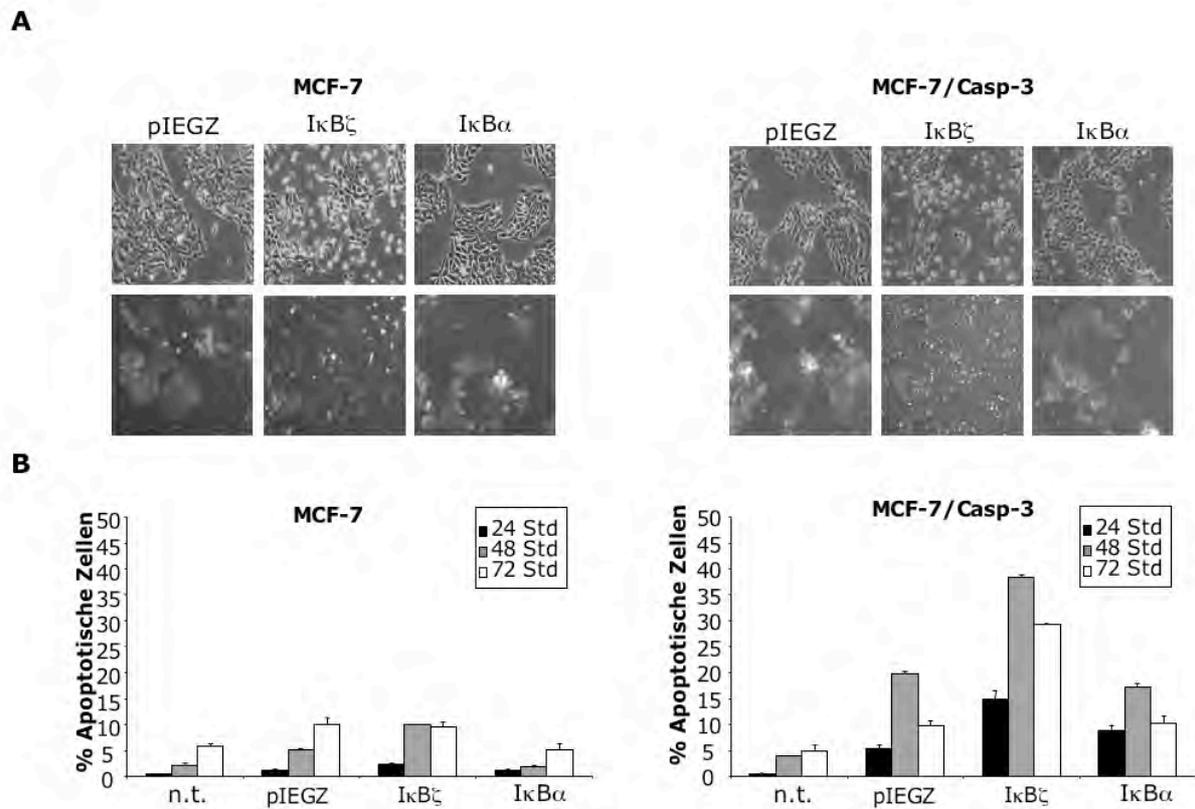


Abbildung 26: I κ B ζ induziert Apoptose in MCF-7/Casp-3-Zellen

Caspase-3-defiziente und -exprimierende MCF-7-Zellen wurde mit einem I κ B ζ - bzw. I κ B α -kodierenden Retrovirus oder dem Kontrollvirus pIEGZ transduziert. (A) Nach 48 Std wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die oberen Abbildungen zeigen Durchlichtaufnahmen, die unteren Aufnahmen zeigen die durch die bicistronischen Vektoren resultierende GFP-Expression der transduzierten Zellen. (B) Die transduzierten Zellen wurden außerdem zu den angegebenen Zeitpunkten im Durchflusszytometer analysiert. Der Prozentsatz an Zellen, die einen verminderten DNA-Gehalt zeigten (sub-G1-Zellen) wurde als apoptotisch bezeichnet (n.t. nicht transduziert).

4.3 Die Rolle von Lck in Chemotherapeutika-induzierten Apoptose

4.3.1 Die Apoptose-Resistenz von T-Zellen ist unabhängig von der Lck-Expression

Die Tyrosinkinase Lck spielt eine essentielle Bedeutung für die T-Zellaktivierung. Jüngere Arbeiten in der Literatur wiesen daraufhin, dass Lck vermutlich auch eine Bedeutung bei der Apoptose-Regulation besitzt. So wurde gezeigt, dass Lck-defiziente T-Zellen eine Resistenz gegenüber der Apoptose-Induktion durch eine Vielzahl unterschiedlicher Stimuli (u.a. HIV-Tat, Etoposid, Ceramid, Rosmarinsäure, ionisierende Bestrahlung) besitzen, wohingegen die Expression von Lck diese Zellen wieder für Apoptose sensibilisiert (Belka *et al.*, 1999). In allen publizierten Arbeiten wurden die Rolle von Lck für die Apoptose jedoch fast ausschließlich durch Experimente in dem Lck-defizienten Jurkat-Zellklon JCaM1.6 belegt, der durch chemische Mutagenese von parentalen Jurkat-Zellen generiert worden war und eine veränderte Calcium-Mobilisierung aufwies (Strauss und Weiss, 1992). Um die Bedeutung von Lck in der Apoptose näher zu untersuchen, sollten daher in dieser Arbeit zunächst weitere Lck-defiziente Jurkat-Zellklone untersucht werden. Hierzu wurden neben den in der Arbeitsgruppe vorhandenen JCaM1.6-Zellen (im folgenden als JCaM bezeichnet) JCaM1.6-Zellen von der American Type Culture Collection (ATCC) sowie ein in einer unabhängigen Mutagenese generierter Lck-defizienter Jurkat-Zellklon verwendet, der von Dr. Robert Abraham (Burnham Institute, La Jolla, USA) zur Verfügung gestellt wurde und im folgenden als JCaM/Abr bezeichnet wird.

Zu Beginn des Projektes sollte zunächst ermittelt werden, ob die Behandlung mit dem Topoisomerase-Inhibitor Etoposid und dem Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin unterschiedliche Auswirkungen auf die Chromatin-Kondensation, einem klassischen Marker der Apoptose, in den einzelnen Lck-defizienten Zellen besitzt. Dazu wurden die Zelllinien mit den Apoptose-Stimuli für 4 Std behandelt, mit dem DNA-Farbstoff DAPI gefärbt und zur mikroskopischen Analyse durch Zentrifugation auf ein Deckgläschen sedimentiert.

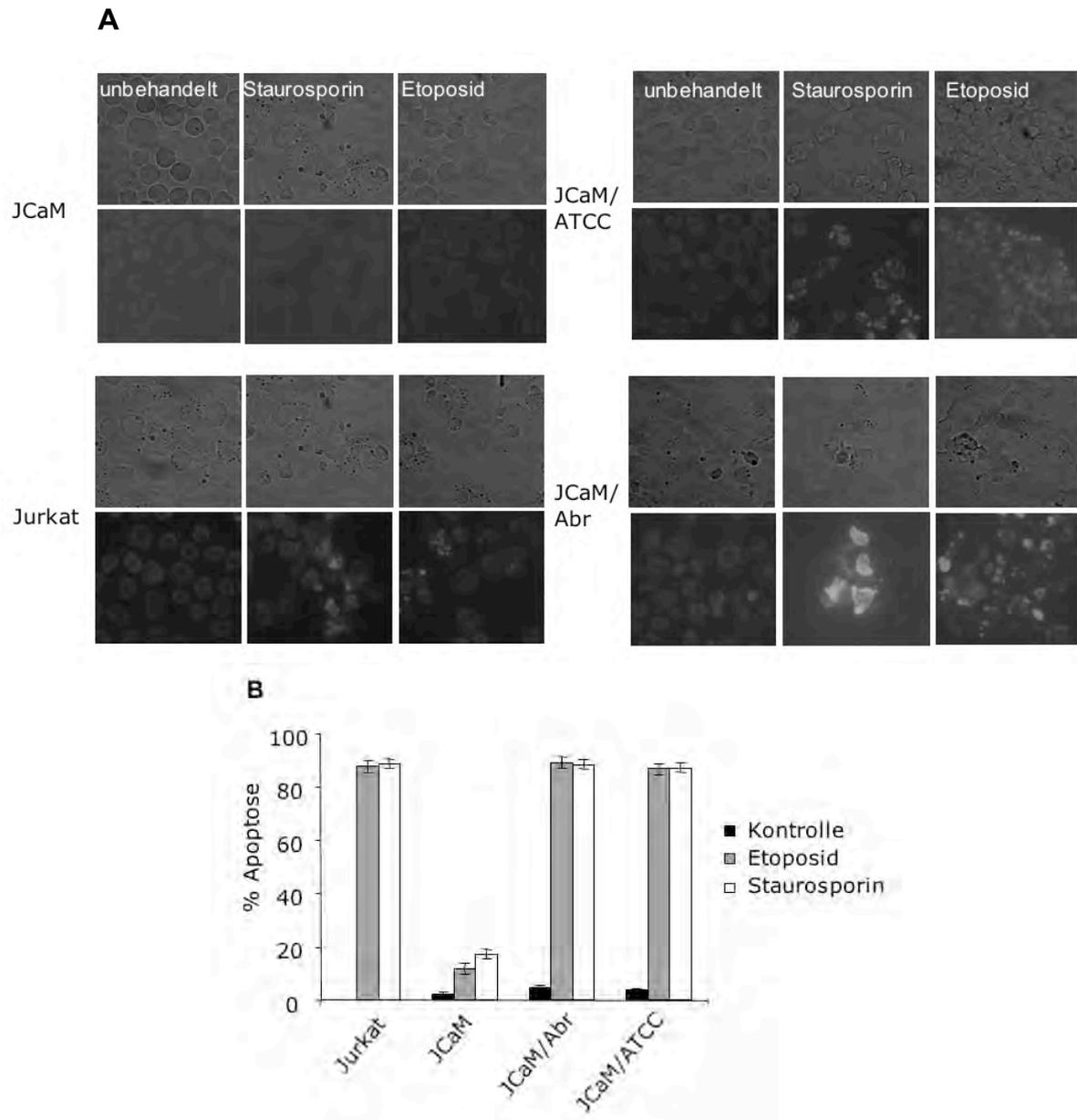


Abbildung 27: Einfluss der Chemotherapeutika-Behandlung auf verschiedene Jurkat-T-Zellen

(A) Die untersuchten Zellen wurden jeweils für 4 Std mit den Chemotherapeutika Staurosporin ($2,5 \mu\text{M}$) und Etoposid ($10 \mu\text{M}$) behandelt. Anschließend erfolgten eine Färbung mit DAPI und die Sedimentierung auf Deckgläschen. Die Zellen wurden im Durchlicht (oben) zur Untersuchung der Zellmorphologie und im Fluoreszenzlicht (unten) für die Detektion der Chromatinkondensation visualisiert. (B) Die untersuchten Zellen wurden mit angegebenen Stimuli für 24 Std behandelt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der Prozentsatz an Zellen, die einen verminderten DNA-Gehalt zeigten (sub-G1-Zellen) wurde als apoptotisch bezeichnet.

Nach Behandlung mit Staurosporin und Etoposid konnte im Fluoreszenzmikroskop in den parentalen und Lck-profizienten Jurkat-Zellen eine deutliche Chromatinkondensation nachgewiesen werden, wohingegen JCaM-Zellen in Übereinstimmung mit der Literatur keine apoptotischen Veränderungen aufwiesen (Abb. 27A). Überraschenderweise zeigten jedoch

auch die behandelten JCaM/Abr- und JCaM/ATCC-Zellen trotz einer Defizienz von Lck (siehe Abb. 27B) eine deutliche Kondensation des Chromatins.

Um diesen Befund näher zu untersuchen, wurden die Zellen über einen längeren Zeitraum (24 Std) mit Staurosporin und Etoposid behandelt und anschließend durch Nachweis hypodiploider DNA im Durchflusszytometer hinsichtlich der Apoptose-Induktion untersucht. Auch in diesem Versuch wurde eine weitgehende Apoptose-Resistenz ausschließlich in den JCaM-Zellen beobachtet (Abb. 27B). Unabhängig von An- oder Abwesenheit von Lck wurde jedoch sowohl den parentalen Jurkat-Zellen als auch in den JCaM/Abr- und den JCaM/ATCC-Zellen eine deutliche Apoptose nach Behandlung mit Staurosporin und Etoposid induziert.

4.3.2 Die Rolle von Lck in der Apoptose-Induktion durch Rosmarinsäure, Ceramid und TNF- α

Neben Chemotherapeutika und ionisierender Bestrahlung wurde berichtet, dass auch die Apoptose-Induktion durch Rosmarinsäure, einem sekundären Pflanzen-Metabolit, und dem Sphingolipid Ceramid von Lck abhängt (Hur *et al.*, 2005; Manna *et al.*, 2000). Daher wurden die verschiedenen Zellklone mit beiden Substanzen behandelt (Abb. 28A). Es stellte sich heraus, dass selbst hohe Konzentrationen von Rosmarinsäure (200 μm) in allen Zelllinien nur eine geringe Apoptoserate induzierten, die jedoch eindeutig nicht von der Expression von Lck abhängig war. Hingegen wurde eine starke Induktion der Apoptose durch Ceramid erzielt. Schon eine Ceramid-Konzentration von 50 μM führte zu einer Apoptoserate von 30% in den Jurkat-WT-Zellen sowie den JCaM/ATCC-Zellen und zu einer 90%-igen Apoptoserate in den JCaM/Abr-Zellen, wohingegen die JCaM-Zellen nicht apoptotisch wurden und keine DNA-Fragmentierung aufwiesen. In Übereinstimmung mit den vorherigen Versuchen konnte jedoch keine Abhängigkeit der Ceramid-vermittelten Apoptose von Expression von Lck nachgewiesen werden, da ein deutlicher Zelltod sowohl in den Lck-profizienten Jurkat-Zellen als auch in den Lck-defizienten Zellklonen JCaM/Abr und JCaM/ATCC beobachtet wurde.

Die bisher verwendeten Stimuli induzieren Apoptose über den mitochondrialen Signalweg. Um den Einfluss von Lck auf den Todesrezeptor-Signalweg zu untersuchen, wurden die Zelllinien auch mit TNF- α stimuliert, dessen Apoptose-Induktion ebenfalls von Lck vermittelt werden soll (Manna und Aggarwal, 2000). In der durchflusszytometrischen Analyse der TNF- α -behandelten Zellen zeigte sich ein ähnliches Ergebnis wie in den vorangegangenen Versuchen (Abb. 28B). Lediglich in JCaM-Zellen war eine Apoptose-Resistenz zu

beobachten. Hingegen induzierte TNF- α zeitabhängig sowohl in den Lck-exprimierenden parentalen Jurkat-Zellen als auch in den Lck-defizienten Zellklonen JCaM/Abr und JCaM/ATCC signifikant Apoptose. Diese Ergebnisse lassen daher schlussfolgern, dass die Apoptose-Resistenz von JCaM-Zellen über einen Lck-unabhängigen Mechanismus verursacht wird.

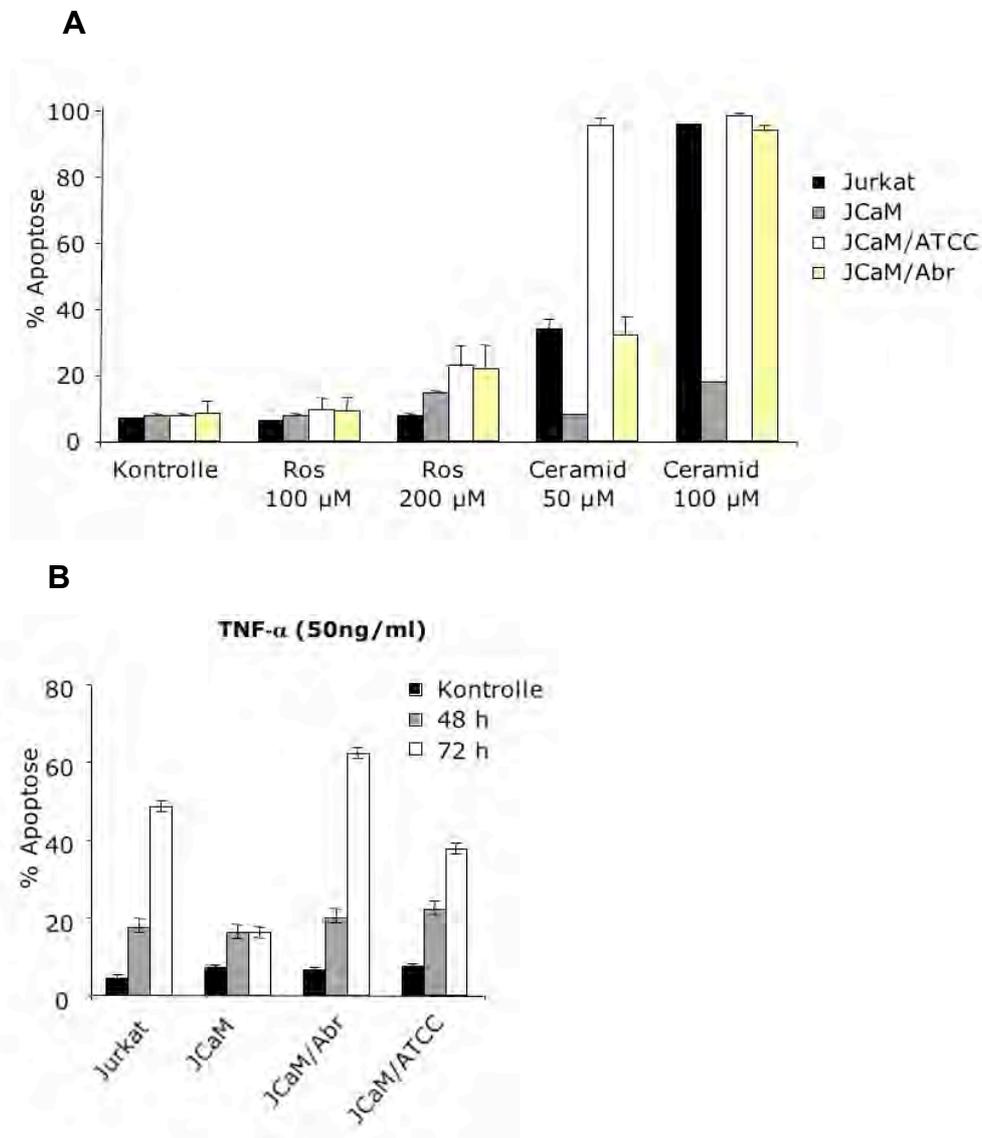


Abbildung 28: Apoptose-Induktion durch TNF- α , Ceramid- und Rosmarinsäure in Lck-defizienten und profizienten Jurkat-Zellen

(A) Die aufgeführten Zelllinien wurden steigenden Konzentrationen von Rosmarinsäure (Ros) oder Ceramid ausgesetzt. Nach 24 Std wurde Apoptose durch den Nachweis hypodiploider DNA im Durchflusszytometer bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. (B) Die untersuchten Zellen wurden mit TNF- α für 24 Std oder 48 Std behandelt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der Prozentsatz an Zellen, die einen verminderten DNA-Gehalt zeigten (sub-G1-Zellen) wurde als apoptotisch bezeichnet. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

4.3.3 Bestimmung der Caspase-Aktivität in Lck-defizienten und profizienten Jurkat-Zellen

Um Hinweise über den Mechanismus der Apoptose-Resistenz der JCaM-Zellen zu erhalten, wurde im Folgenden die Aktivierung von Caspasen analysiert. Hierzu wurden die verschiedenen Zellklone mit Staurosporin, Ceramid und Etoposid behandelt und die Aktivierung von Caspasen durch Nachweis ihrer Prozessierung in der Western-Blot-Analyse analysiert. Abb. 29A zeigt, dass in allen Zelllinien außer in JCaM-Zellen eine Reduktion der Proform von Caspase-3 sowie ihre Prozessierung zum aktiven p17-Fragment nachzuweisen war. Dieser Effekt war besonders nach Stimulation mit Staurosporin ausgeprägt. Die Aktivierung von Caspasen wurde auch durch Analyse der Caspase-9 bestätigt, die eine deutliche Reduktion ihrer Proform (p47) in allen behandelten Zellklonen, nicht jedoch in JCaM-Zellen aufwies.

Diese Befunde wurden auch durch Nachweis der Caspase-Aktivierung in einem fluorimetrischen Substrattest unterstützt. Eine Spaltung des Caspase-3-Substrats DEVD-AMC wurde nach Behandlung mit Staurosporin, Etoposid oder Ceramid in Jurkat-, JCaM/Abr und JCaM/ATCC-Zellen beobachtet, wohingegen keine Erhöhung der enzymatischen Aktivität von Caspase-3 in JCaM-Zellen nachzuweisen war (Abb. 29B). Demzufolge ist auch die Aktivierung von Caspasen unabhängig von der Lck-Expression.

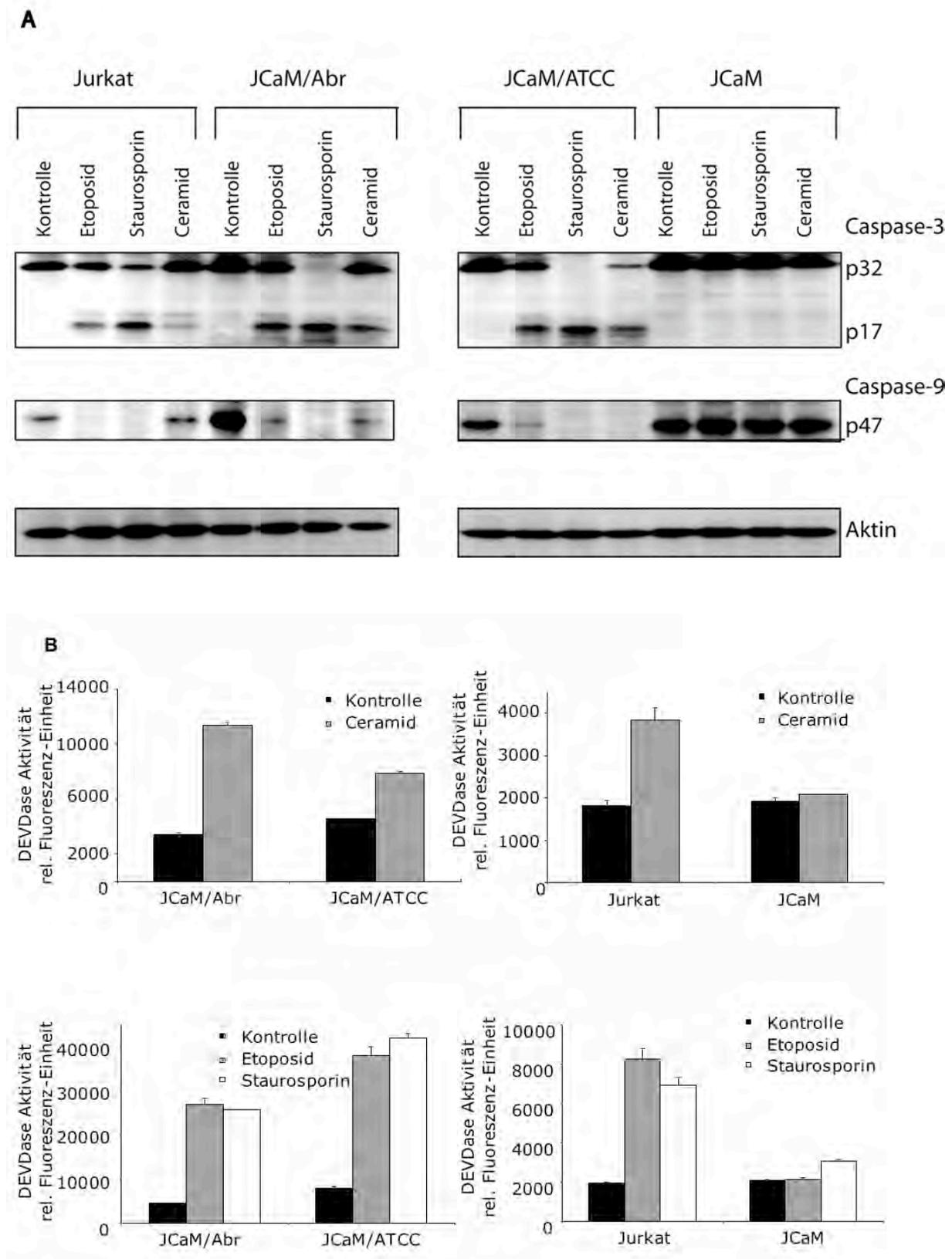


Abbildung 29: Caspasen-Aktivierung in den verschiedenen Jurkat-Zellklonen

Die angegebenen Zellklone wurden entweder für 12 Std mit Etoposid ($10 \mu\text{M}$) bzw. Staurosporin ($2,5 \mu\text{M}$) oder für 24 Std mit Ceramid ($100 \mu\text{M}$) stimuliert. Anschließend wurden Zelllysate hergestellt und (A) mittels Western-Blot hinsichtlich der Prozessierung von Caspase-3 und -9 analysiert oder (B) durch Inkubation mit dem fluorigenen Substrat DEVD-AMC hinsichtlich der enzymatischen Caspase-3-Aktivität untersucht.

4.3.4 Expression von Bcl-2 Familienproteinen in Lck-profizienten und defizienten Jurkat-Zellen

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass sowohl der mitochondriale als der Todesrezeptor-Signalweg in JCaM-Zellen supprimiert ist. Da der Todesrezeptor-Signalweg in sogenannten Typ-II-Zellen über eine Caspase-8-vermittelte Spaltung des Bcl-2-Proteins Bid mit dem mitochondrialen Signalweg konvergiert, wurde die Expression verschiedener Bcl-2-Proteine in den einzelnen Zellklonen untersucht. Die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL wurden in allen Jurkat-Zellklonen detektiert (Abb. 30). Die Apoptose-resistente JCaM-Linie exprimiert sogar leicht verringerte Mengen von Bcl-2. Auffallende Unterschiede wurden jedoch bei der Expression von Bak gefunden. Die pro-apoptotischen Bcl-2 Proteine Bax und Bak fungieren als Schlüsselmediatoren der mitochondrialen Apoptose, da sie nach Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran die Freisetzung von Cytochrom c induzieren. Bax wird in Jurkat-Zellen aufgrund einer *Frameshift*-Mutation nicht exprimiert (Brimmel *et al.*, 1998; Daten nicht gezeigt). Interessanterweise zeigten die unterschiedlichen Jurkat-Zellklone jedoch markanten Unterschiede in Expression von Bak, die eindeutig mit der Apoptose-Sensitivität der Zellen korrelierte. Während Bak in den Apoptose-sensitiven Jurkat-Zellen wie auch in JCaM/ATCC- und JCaM/Abr-Zellen detektiert wurde, fand sich keine Expression in den Apoptose-resistenten JCaM-Zellen.

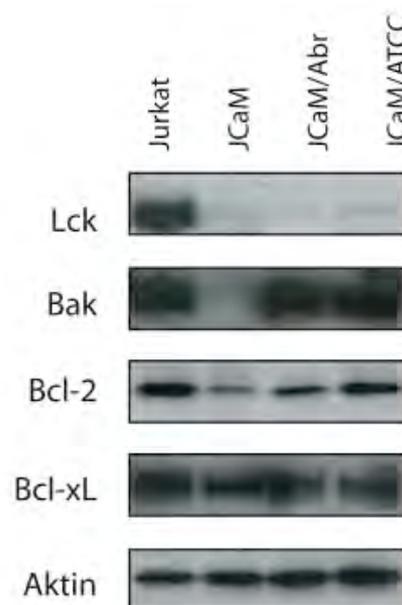


Abbildung 30: Expression von Lck und Bcl-2-Proteinen in den einzelnen Jurkat-Zellklonen

Die angegebenen Zellklone wurde hinsichtlich ihrer Expression von Lck, Bcl-2, Bcl-xL und Bak untersucht. Der Nachweis von Aktin diente als Ladekontrolle. Auffallend ist, dass nicht die Expression von Lck, sondern des proapoptotischen Bcl-2-Proteins Bak mit der Apoptose-Sensitivität der Jurkat-Zellklone korreliert.

Diese Ergebnisse weisen deshalb daraufhin, dass kein Zusammenhang zwischen der Expression von Lck und Apoptose-Sensitivität besteht, sondern dass der Apoptose-resistente Phänotyp der Lck-negativen JCaM-Zellen durch eine fehlende Expression von Bak verursacht wurde.

5 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit drei Aspekten der Signaltransduktion von apoptotischen und inflammatorischen Prozessen. Es konnte gezeigt werden, dass p53 an die Mitochondrien transloziert, jedoch eine mitochondriale Lokalisation des Tumorsuppressors nicht notwendigerweise in Apoptose von Tumorzellen resultiert. In einem weiteren Teil der Arbeit wurde entdeckt, dass das I κ B-Homolog I κ B ζ nicht nur als Repressor von NF- κ B fungiert, sonst überraschenderweise zahlreiche Zielgene direkt transkriptionell aktiviert. Schließlich wurde gezeigt, dass die Tyrosinkinase Lck im Gegensatz zu anderen Berichten keine direkte proapoptotische Funktion bei der Apoptose von T-Zellen besitzt.

5.1 Die Rolle von p53 in der mitochondrialen Apoptose

Zu Beginn dieser Arbeit stand der Arbeit der Tumorsuppressor p53 im Mittelpunkt des Interesses. Obwohl p53 schon vor mehr als 25 Jahren erstmals identifiziert wurde und ihm seitdem in einer Vielzahl von Publikationen entscheidende Funktionen in der Erhaltung der genomischen Integrität zugeschrieben wurden, die aber fast ausschließlich auf seine transkriptionellen Aktivitäten zurückzuführen waren (Levine *et al.*, 2006), deckten jüngere Untersuchungen auch transkriptionsunabhängige Effekte dieses Tumorsuppressors auf. So wurde erst kürzlich dessen stressinduzierte Translokation in das Zytoplasma beschrieben und darüber hinaus sogar eine Assoziation von p53 mit den Mitochondrien (Chipuk *et al.*, 2004; Leu *et al.*, 2004; Marchenko *et al.*, 2000; Mihara *et al.*, 2003). In beiden Fällen zeigten die Untersuchungen, dass diese Translokation ausschließlich mit einer p53-vermittelten Apoptose-Induktion korreliert, da sie unter Bedingungen, die zu einem Zellzyklusarrest führen oder in p53-unabhängigen Apoptosesystemen nicht beobachtet werden konnte (Moll und Zaika, 2001). Als mögliche Mechanismen einer Apoptose-Induktion durch die p53-Translokation wurden mehrere Modelle diskutiert, die alle auf einer Protein-Protein-Interaktion zwischen p53 und verschiedenen Mitgliedern der Bcl-2-Familie und dem daraus resultierenden Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteine beruhen.

5.1.1 Die mitochondriale Translokation von p53 nach Bestrahlung

Da in unserer Arbeitsgruppe zu diesem Zeitpunkt verschiedene Zellmodelle charakterisiert wurden, in denen DNA-schädigende Strahlen in Anwesenheit eines Wildtyp-p53-Proteins keine Apoptose sondern einen persistierenden Zellzyklusarrest induzierten (Essmann *et al.*, 2004; Janicke *et al.*, 2001), sollte in diesem Projektteil der Frage nachgegangen werden, ob

die beobachtete Bestrahlungsresistenz womöglich durch einen Defekt bei der mitochondrialen Translokation von p53 verursacht wird.

Bemerkenswerterweise ließ sich aber auch in diesen Zellsystemen (MCF-7- und MCF-7/Casp-3-Zellen) eine bestrahlungsinduzierte mitochondriale p53-Expression nachweisen, ungeachtet der Tatsache, dass diese Behandlung, wie oben erwähnt, keine Apoptose, sondern einen permanenten Zellzyklusarrest (Seneszenz) auslöst. Obwohl sich die bestrahlungsinduzierte p53-Akkumulation an den Mitochondrien sehr wahrscheinlich unterhalb der immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweisgrenze befand, konnte sie mittels Western-Blot-Analysen von hoch aufgereinigten subzellulären Mitochondrienfraktionen bestätigt werden. So waren zwar die ursprünglich verwendeten mitochondrialen M1-Fraktionen aufgrund einer Kosedimentation von sogenannten bestrahlungsinduzierten Mikronuklei noch mit nukleären Proteinen kontaminiert, die aber durch eine anschließende Aufreinigung in einem Saccharosegradienten beseitigt werden konnten. Anhand der hierdurch gewonnenen M2-Fraktionen, die sich durch die Abwesenheit nukleärer (PARP, PCNA) bzw. durch die Anwesenheit mitochondrialer (Tom20) Marker auszeichneten, konnte im Gegensatz zu Daten anderer Gruppen (Mihara *et al.*, 2003) erstmalig eine stressinduzierte mitochondriale p53-Expression unter nicht apoptotischen Bedingungen festgestellt werden. Dieses Phänomen beschränkte sich dabei nicht nur auf das MCF-7-Zellsystem, sondern konnte auch in anderen Zellmodellen (HCT116- und RKO-Zellen) beobachtet werden.

Bereits diese Ergebnisse demonstrierten, dass eine p53-Translokation an die Mitochondrien nicht notwendigerweise mit einer Apoptose-Induktion in Verbindung steht, und stimmen damit auch mit einer erst kürzlich veröffentlichten Studie überein, die besagt, dass eine transkriptionell inaktive p53-Mutante weder *in vitro* noch *in vivo* in der Lage ist, Apoptose zu induzieren (Nister *et al.*, 2005). Daneben existieren aber auch Berichte, in denen die p53-vermittelte Apoptose hauptsächlich auf transkriptionsunabhängige Ereignisse zurückgeführt wird (Speidel *et al.*, 2006). Obwohl bereits die bisherigen Experimente mit dieser Hypothese nicht in Einklang zu bringen sind, war durchaus die Möglichkeit gegeben, dass diese Diskrepanz durch unzureichende p53-Proteinmengen an den Mitochondrien bedingt ist. Aber auch diese Annahme konnte aufgrund der folgenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. So stellte sich zwar heraus, dass in MCF-7-Zellen nur ein geringer Prozentsatz des bestrahlungsinduzierten p53-Proteins an die Mitochondrien transloziert (ca. 2%), der aber durchaus mit der p53-Proteinmenge vergleichbar war, die in anderen Zelltypen zur Apoptose-Induktion führte (Marchenko *et al.*, 2000). Darüber hinaus kann auch dem erhöhten p53-Anteil in der M2-Fraktionen von MCF-7-Zellen, die in Gegenwart von Koffein bestrahlt und

damit gegenüber diesem Behandlungsmodus sensitiviert wurden, keinerlei Bedeutung zugemessen werden, da es sich hierbei um ein p53-unabhängiges Apoptosesystem handelt (Essmann et al, 2004). Somit steht auch diese Tatsache im Gegensatz zu veröffentlichten Berichten, in denen die p53-Translokation spezifisch in der p53-abhängigen Apoptose beschrieben wurde (Mihara *et al.*, 2003; Erster *et al.*, 2004). Schließlich zeigten Transfektionsexperimente eindeutig, dass auch die zielgerichtete Überexpression von p53 an den Mitochondrien nicht zu einer Apoptose-Induktion führte. Während in MCF-7-Zellen, die mit einem p53-Wildtypkonstrukt transfiziert wurden, typische Apoptosemerkmale wie z.B. das Schrumpfen und Abrunden sowie die Oligomerisierung und Aktivierung von Bax nachzuweisen waren, konnten diese Veränderungen durch die Transfektion eines mitochondrial exprimierten p53-Proteins nicht hervorgerufen werden. Interessanterweise wurde dieses Konstrukt aber in einer anderen Arbeit mit einer Apoptose-Induktion in Verbindung gebracht (Mihara *et al.*, 2003). Dieser Sachverhalt wurde aber im Gegensatz zu den hier beschriebenen Ergebnissen nicht in relevanten Apoptosesystemen, sondern anhand von Klonogenitätstests untersucht, durch die aber nur Proliferations- und keine Apoptoseereignisse bestimmt werden können und dadurch keine diesbezügliche Aussagekraft besitzen.

5.1.2 Der Einfluss der Bcl-2 Familien-Proteine auf mitochondriale Translokation von p53

Die Tatsache, dass weder die bestrahlungsinduzierte mitochondriale Translokation von endogenem p53 noch eine zielgerichtete Überexpression von exogenem p53 an den Mitochondrien eine Apoptose induzierte, könnte auch auf eine Dysregulation oder Fehlfunktion von pro- und anti-apoptotischen Proteinen zurückzuführen sein, die essentiell für den p53-vermittelten Signalweg sind. Da diesbezügliche Interaktionen von p53 sowohl mit Bax, Bak, Bcl-2 als auch mit Bcl-x_L beschrieben wurden (Chipuk *et al.*, 2004; Leu *et al.*, 2004; Marchenko *et al.*, 2000), scheinen diese Mitglieder der Bcl-2-Familie von besonderer Bedeutung für diesen Prozess zu sein. Intensive Untersuchungen zeigten aber kein aberrantes Expressionsmuster dieser Proteine. Im Gegenteil, während Bestrahlung die Expression der anti-apoptotischen Bcl-2- und Bcl-x_L-Proteine nicht modulieren konnte, wurden durch diese Behandlung insbesondere die pro-apoptotischen Familienmitglieder Bax und Puma in einer p53-abhängigen Weise stark induziert. Da darüber hinaus auch die Aktivierung von Bax nach Überexpression des p53-Wildtypproteins sowie in der Chemotherapeutika (Etoposid, Camptothecin)-induzieren Apoptose demonstriert werden konnte, zeigen diese Daten, dass der

bestrahlungsresistente Phänotyp dieser Zellen nicht auf eine generelle Resistenz oder Unempfindlichkeit gegenüber der p53-vermittelten Apoptose zurückzuführen ist.

5.1.3 Post-translationale Modifikationen von p53

Schließlich könnten unterschiedliche post-translationale Modifikationen, von denen bekannt ist, dass sie das Ausmaß einer p53-Stabilisierung und -Aktivierung beeinflussen, die Aktivität eines zu den Mitochondrien translozierten p53-Proteins modulieren. Diesbezüglich wurde zwar gezeigt, dass Phosphorylierungs- und Azetylierungsereignisse keinen Einfluss auf die stressinduzierte Translokation von p53 an die Mitochondrien ausüben (Nemajerova *et al.*, 2005), von der gleichen Gruppe wurde aber erst kürzlich beschrieben, dass die MDM2-vermittelte Monoubiquitinierung von zytoplasmatischem p53 ein kritisches Signal in diesem Prozess darstellt (Marchenko *et al.*, 2007). Demzufolge transloziert nur das monoubiquitinierte p53 an die Mitochondrien, wo es durch HAUSP (*herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease*) deubiquitiniert und dadurch aktiviert wird. Da HAUSP konstitutiv und unabhängig von Stresssignalen an den Mitochondrien exprimiert wird, ist es aber sehr unwahrscheinlich, dass dieser Prozess in den hier beschriebenen Systemen zum Tragen kommt und spezifisch das mitochondriale p53-Protein deubiquitiniert, welches durch die Chemotherapeutika-Behandlung zu diesen Organellen transloziert. Dennoch sollte auch diese Möglichkeit in zukünftigen Untersuchungen näher in Betracht gezogen werden.

Zusammengefasst konnte in diesem Projektteil die zuvor beschriebene stressinduzierte Translokation von p53 an die Mitochondrien bestätigt werden. Jedoch im Gegensatz zu den Berichten, die eine mitochondriale p53-Translokation spezifisch nur in p53-abhängigen Apoptosesystemen beobachtet haben, demonstrieren die hier vorgestellten Experimente eindeutig, dass dieser Prozess auch in der p53-unabhängigen Apoptose sowie im p53-induzierten Zellzyklusarrest stattfindet. Obwohl die Daten dieser Arbeit gegen eine spezifische pro-apoptotische Rolle von mitochondrialem p53 sprechen, ist es durchaus möglich, dass in den untersuchten Zellen weitere, hier nicht untersuchte Defekte im p53-vermittelten Signalweg vorliegen, die speziell in der bestrahlungsinduzierten Stressantwort einer pro-apoptotischen Funktion von mitochondrialem p53 entgegenwirken und dadurch für deren resistenten Phänotyp verantwortlich sind.

5.2 IκBζ als Regulator von inflammatorischen und apoptotischen Prozessen

5.2.1 IκBζ aktiviert die Expression zahlreicher Zytokine

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte eine Funktion von humanen IκBζ als Regulator von NF-κB-abhängigen inflammatorischen Prozessen beschrieben werden. In Übereinstimmung mit dem murinem Homolog (Yamazaki *et al.*, 2001) wurde eine nukleäre Lokalisation des humanen IκBζ demonstriert. In vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe wurde außerdem gezeigt, dass IκBζ im Kern mit den NF-κB Untereinheiten p50 und p65 interagiert und eine Rolle als NF-κB-Inhibitor einnimmt (Totzke *et al.*, 2006). IκBζ zeigte in diesen Experimenten eine funktionelle Analogie zu den zytoplasmatischen IκB-Proteinen wie IκBα, die exklusiv für die Inhibierung von NF-κB zuständig sind (Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1997). Da NF-κB eine zentrale Rolle bei der Regulation von inflammatorischen Prozessen spielt, wurde zunächst der Frage nachgegangen, welchen Einfluss IκBζ auf die NF-κB-vermittelte Induktion von Zytokinen hat.

Zunächst konnte mittels RT-PCR-Analysen gezeigt werden, dass IκBζ einen aktivierenden Einfluss auf die Induktion von Zytokinen hat. Die Zytokine IL-1β, IL-6, GM-CSF und MCP-1 wurden bereits ohne zusätzliche Stimulation in IκBζ-transduzierten Zellen induziert. In Kombination mit TNF-α, einem starken Aktivator von NF-κB, erfolgte eine Amplifizierung der IL-1β-, IL-6-, IL-8-, MCP-1- und GM-CSF-Expression in IκBζ-transduzierten Zellen. Um ein breites Spektrum von Zytokinen zu untersuchen, wurden RNase-Protektionsversuche durchgeführt. Hier wurde die IκBζ-induzierte Expression von IL-1β und IL-6 verifiziert, allerdings blieben die Zytokine IL-12p35, IL-12p40, IL-10, IL-1α, IL-18 und IFN-γ unbeeinflusst. Im Gegensatz zum murinen IκBζ (Yamamoto *et al.*, 2004) unterliegt die Induktion von IL-12p40 keiner Regulation durch humanes IκBζ.

Um eine Diskrepanz zwischen der verstärkten Expression der untersuchten Zytokine auf RNA-Ebene mit den letztendlich ausgeschütteten Zytokinen auszuschließen, wurde eine Luminex-Analyse durchgeführt. Die untersuchten Zytokine IL-6, GM-CSF und IL-1β wurden in Einklang mit der zusätzlichen TNF-α-Stimulation und der Kinetik in erhöhten Mengen ausgeschüttet, während die IL-8 Expression nicht zeitabhängig erhöht wurde. Um Induktion verschiedener Zytokine auch in einem anderen Zellmodell zu untersuchen, wurden außerdem Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVECs) eingesetzt. Endothelzellen spielen eine wichtige Rolle für die Initiation von Entzündungsreaktionen, in dem sie die Expression von

Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Chemokinen steuern und somit eine Rekrutierung von Leukozyten zum Entzündungsherd koordinieren (Springer, 1994). Um zu prüfen, welchen Einfluss I κ B ζ in diesem Modellsystem hat, wurden HUVEC-Zellen mit I κ B ζ transduziert und auf dessen Expression überprüft. Es zeigte sich, dass die Zellen eine ausreichend hohe Transduktionseffizienz aufwiesen und daher für eine Micro-Array-Analyse eingesetzt werden konnten. In der Tat zeigten sowohl die Micro-Array-Analyse als auch eine anschließende Real-Time-PCR eine starke Induktion von IL-6 und IL-8 in Endothelzellen durch I κ B ζ . Die Micro-Array-Analyse lieferte zudem weitere Hinweise auf die Modulation von Adhäsionsmolekülen und Mitose-relevanten Proteinen durch I κ B ζ .

Bemerkenswerterweise wurden in den Versuchen auch Unterschiede in der Induktion zwischen den einzelnen Zytokinen festgestellt. I κ B ζ induzierte eine kontinuierliche Erhöhung der IL-6 mRNA-Expression. Demgegenüber war die erhöhte Expression von IL-8-Transkripten durch I κ B ζ nur transient und nach Stimulation mit TNF- α im Vergleich zu Zellen, die I κ B ζ nicht exprimierten, mit einer beschleunigten Kinetik nachzuweisen. Ob diese zeitlichen Unterschiede in der I κ B ζ -vermittelten Expression von IL-8 und IL-6 durch unterschiedliche Chromatinmodifikationen in den Promotoren der einzelnen Zytokingene, die möglicherweise durch I κ B ζ vermittelt wird, verursacht werden, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. In diesem Zusammenhang könnte eine unterschiedliche Rekrutierung von Histonacetylasen und -deacetylasen bedeutsam sein (Vanden Berghe *et al.*, 1999; Ashburner *et al.*, 2001). Denkbar ist aber auch, dass andere durch I κ B ζ -induzierte Kontrollmechanismen wie z.B. die Aktivierung der p38 Kinase, die an der Stabilisierung von IL-8-Transkripten beteiligt sind (Holtmann *et al.*, 1999) für die unterschiedliche Expression einzelner Zytokine verantwortlich sind.

5.2.2 Rolle der Transaktivierungsdomäne von I κ B ζ und anderer NF- κ B-Proteine

Untersuchungen der Arbeitsgruppe zur strukturellen Charakterisierung von I κ B ζ mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems ergaben, dass I κ B ζ in seinem N-terminalen Bereich über eine Transaktivierungsdomäne verfügt. Daher wurde in dieser Arbeit die Funktion dieser Domäne für die Zytokin-Induktion anhand von Deletionsmutanten des N- und C-Terminus charakterisiert. In der Luminex-Analyse konnte zunächst die Rolle von I κ B ζ als Regulator der Expression von IL-6, IL-8, GM-CSF und IL-1 β bestätigt werden. Hingegen zeigte sich, dass die Deletion sowohl des N-Terminus als auch des C-Terminus die Zytokin-Induktion durch

I κ B ζ vollständig verhinderte. Für die genaktivierende Funktion sind daher sowohl der N- als auch der C-Terminus erforderlich. Ein ähnlicher Befund wurde auch für das I κ B-Homolog Bcl-3 beschrieben, das ähnlich wie I κ B ζ bestimmte Gene reprimieren, aber auch aktivieren kann und ebenfalls im Zellkern lokalisiert ist (Watanabe *et al.*, 1997). Bcl-3 bildet einen ternären Komplex mit DNA-gebundenen p50 oder p52 Homodimeren (Fujita *et al.*, 1993; Bours *et al.*, 1993; Hirano *et al.*, 1998). Ähnlich wie bei I κ B ζ ist eine genaktivierende Funktion von Bcl-3 vom N- und C-Terminus abhängig.

Diese Befunde zeigen eine Funktion von I κ B ζ in Abhängigkeit der N-terminalen Transaktivierungsdomäne und der C-terminalen Ankyrinwiederholungen, die eine Interaktion mit anderen NF- κ B-Untereinheiten vermitteln. In MEF p65^{-/-}- oder MEF p50^{-/-}-Zellen wurde daher die Interaktion und die Abhängigkeit des I κ B ζ von NF- κ B untersucht. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation von I κ B ζ im Kern in gepunkteten Strukturen unabhängig von p65 und p50 ist. Eine Defizienz von p50 oder p65 könnte durchaus entscheidend für den Einfluss von I κ B ζ sein, da I κ B ζ an p65 und p50 bindet (Totzke *et al.*, 2006). Denkbar ist daher, dass I κ B ζ an das Heterodimer p65/p50 bindet. Bei Defizienz eines dieser Proteine könnten sich jedoch andere NF- κ B-Komplexe bilden, die z.B. aus den Homodimeren (p50/p50, p65/p65) oder anderen Heterodimeren bestehen und eine unterschiedliche Affinität zu Promotoren einzelner Targetgene besitzen.

Mehrere Arbeiten zeigen, dass die Assemblierung multipler Protein-DNA-Komplexe sowohl vom Stimulus als auch Zelltyp abhängig ist (Falvo *et al.*, 2000). Des Weiteren spielt der Chromatinkontext eine wesentliche Rolle für die Zugänglichkeit der NF- κ B Dimere zum Ziel-Promotor (Saccani *et al.*, 2001). So wird die Expression der meisten Gene über eine Chromatinreorganisation gesteuert, welche ein synergistisches Zusammenspiel vieler spezifischer Faktoren für eine starke Transkription erfordert (Lomvardas und Thanos, 2002). Chromatinmodulationen werden im Wesentlichen durch die Aktivität von HDACs oder Histon-Acetyltransferasen (HAT) beeinflusst. Sie vermitteln ihre Funktion über sogenannte Koaktivatoren oder -repressoren, wie z.B. dem HDAC-Korepressor SMRT, an Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B. Durch die Deacetylierung bestimmter Zielsequenzen innerhalb des Chromatins werden die entsprechenden Transkriptionsfaktoren reprimiert. Da in unserer Arbeitsgruppe eine Interaktion von I κ B ζ sowohl mit HDAC5 als auch mit dem Korepressor SMRT gezeigt wurde, liegt die Vermutung nahe, dass die Aktivität eines NF- κ B-I κ B ζ -Transkriptionskomplexes durch HDACs bei der Induktion von Zytokinen beeinflusst werden könnte.

5.2.3. Apoptose-Induktion durch I κ B ζ

NF- κ B spielt eine wichtige Rolle beim Schutz gegenüber Apoptose und vermittelt seine protektive Wirkung über die Induktion verschiedener antiapoptotischer Zielgene wie den Mitgliedern der Bcl-2-Familie (Bcl-x_L, Bfl/1A1), den *Inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs) (c-IAP1, c-IAP2, XIAP) oder den Adaptorproteinen *TNF receptor-associated factor* (TRAF1, TRAF2). Interessanterweise konnte durch Expression von I κ B ζ Apoptose in verschiedenen Zelltypen induziert werden. Im Gegensatz zu I κ B α , welches nur in Anwesenheit von Todesliganden wie TNF- α Apoptose auslöste, wirkte die Expression I κ B ζ *per se* zytotoxisch. Dies weist möglicherweise auf unterschiedliche Mechanismen der Apoptose-Induktion durch beide I κ B-Homologe hin. Es ist denkbar, dass die zytotoxische Wirkung von I κ B ζ durch eine Genrepression von Apoptose-Inhibitoren (z.B. XIAP) oder durch eine direkte Aktivierung proapoptotischer Gene (z.B. Bax) verursacht wird. Daher wurde die Expression einer Vielzahl von Apoptose-Regulatoren in I κ B ζ -transduzierten Zellen untersucht. Obwohl ein Caspase-Inhibitor den I κ B ζ -vermittelten Zelltod blockierte und damit auf eine Beteiligung klassischer Apoptose-Signale hinweist, konnte jedoch kein apoptotischer Regulator identifiziert werden, dessen Expression durch I κ B ζ signifikant moduliert wurde. Der Einfluss von I κ B ζ auf die Expression verschiedener pro- und antiapoptotischer Proteine wurde außerdem in einem RNase-Protektionsversuch analysiert. Auch hierbei wurde keine Veränderung der Expression von Bclw, Bcl-x_L, Bif1, Bid, Bik, Bak, Bax, Mcl1, den IAPs oder TRAF-Adaptormolekülen in Anwesenheit von I κ B ζ entdeckt (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise wird daher der proapoptotischer Effekt von I κ B ζ über indirekte Mechanismen verursacht. Es ist denkbar, dass die Expression von I κ B ζ die Zellzyklusprogression beeinflusst und sekundär zur Apoptose führt. Diese Hypothese wird durch Befunde der Micro-Array-Analyse unterstützt, in der verschiedene an der Mitose-Regulation beteiligte Gene durch I κ B ζ moduliert wurden (Daten nicht gezeigt). In der Micro-Array-Analyse konnte außerdem mehrere Zelladhäsionsmoleküle identifiziert werden, die durch I κ B ζ reprimiert werden. Ein hierdurch verursachter Verlust der Zelladhäsion mit der extrazellulären Matrix könnte zur sogenannten Anoikis führen, bei der es sich um eine spezifische Form der Apoptose handelt, die durch den Verlust Integrin-vermittelter Überlebenssignale verursacht wird. Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen also, dass I κ B ζ sowohl transkriptionsaktivierende wie auch -reprimierende Funktionen besitzt, die an Zelltod- und Entzündungsprozessen beteiligt sind.

5.3 Die Rolle der Tyrosinkinase Lck in der Apoptose

5.3.1 Die Bedeutung von Lck im mitochondrialen Apoptoseweg

Die Tyrosinkinase Lck spielt eine essentielle Rolle für die Aktivierung und Differenzierung von T-Lymphozyten. Nach Stimulation des T-Zellrezeptors werden durch Lck zahlreiche Signalwege angeschaltet, die zur Aktivierung der Phospholipase C, des Phosphatidylinositol Signalwegs, der Rho-GTPasen, MAP-Kinasen und diversen Transkriptionsfaktoren (NF-AT, AP-1, NF- κ B) führen und so u.a. in der Synthese von IL-2 resultieren (Molina *et al.*, 1992; Weiss *et al.*, 1992).

Jüngere Arbeiten beschreiben, dass Lck neben seiner etablierten Funktion in der T-Zellaktivierung auch eine proapoptotische Rolle bei Zelltodprozessen besitzt. (Belka *et al.*, 1999; Hur *et al.*, 2004; Manna *et al.*, 2000). So wurde postuliert, dass Lck für die Apoptose-Induktion durch Rosmarinsäure, einem sekundärem Pflanzenstoff mit anti-inflammatorischen Eigenschaften, erforderlich ist (Hur *et al.*, 2004). In dieser Studie wurde gezeigt, dass Lck-defiziente Jurkat-Zellen gegenüber Rosmarinsäure resistent sind, wohingegen die Expression von Lck die Zellen für Rosmarinsäure sensibilisiert. Ebenso wurde eine Lck-abhängige Induktion der Apoptose für Ceramid und dem Tat-Protein von HIV demonstriert (Manna *et al.*, 2000; Manna und Aggarwal, 2000). In weiteren Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass eine Lck-Defizienz einen breiten Apoptose-Schutz gegenüber ionisierender Bestrahlung oder Chemotherapeutika verleiht (Belka *et al.*, 2003). Der molekulare Mechanismus der Apoptose-Regulation durch Lck ist jedoch weitgehend unbekannt. Eine jüngere Arbeit weist daraufhin, dass Lck möglicherweise die Expression des proapoptotischen Bcl-2-Proteins Bak reguliert (Samraj *et al.*, 2006).

Alle Studien, die eine proapoptotische Funktion von Lck postulierten, wurden bislang ausschließlich in dem Lck-defizienten Jurkat-Klon JCaM.1.6 durchgeführt. Diese Linie wurde durch chemische Mutagenese von Jurkat-Zellen generiert und ursprünglich aufgrund einer defekten Calcium-Mobilisierung nach T-Zellrezeptor-Stimulation isoliert. Spätere Arbeiten zeigten, dass JCaM.1.6-Zellen eine Punktmutation im Exon 7 des Lck-Gens aufweisen, die zur Expression eines verkürzten und Kinase-inaktiven Lck-Proteins führt (Straus und Weiss, 1992; Rouer *et al.*, 1999). In der Vergangenheit haben sich JCaM.1.6-Zellen als nützliches Modellsystem erwiesen, um die Bedeutung der Lck für die T-Zellaktivierung zu untersuchen. Da jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich bei der Apoptose-Resistenz von JCaM-Zellen um einen klonalen Effekt handelt bzw. ein durch die Mutagenese bedingter Lck-unabhängiger Apoptose-Defekt vorliegt, sollten in dieser Arbeit weitere Lck-abhängige

Jurkat-Zellklone untersucht werden. Hierzu wurden neben den in der Arbeitsgruppe vorhandenen Lck-defizienten Zellen JCaM1.6 Zellen von der *American Type Culture Collection* (JCaM/ATCC) sowie Lck-defiziente Jurkat-Zellen herangezogen, die in einer unabhängigen Mutagenese von Dr. R. Abraham (La Jolla, USA) etabliert worden waren. Mittels Westernblot-Analyse konnte in allen Zellklonen eine Lck-Defizienz bestätigt werden.

In den ersten Experimenten wurde zunächst die Sensitivität der Zellen gegenüber Aktivatoren des mitochondrialen Apoptose-Signalweges verglichen, indem die verschiedenen Zellklone mit dem Chemotherapeutikum Etoposid, einem Topoisomerase-2-Inhibitor, und Staurosporin, einem Kinase-Inhibitor, behandelt wurden. Es zeigte sich, dass die in der Arbeitsgruppe vorhandenen Lck-Zellen in der Tat eine vollständige Apoptose-Resistenz aufwiesen, während beide Substanzen in den parentalen Jurkat-Zellen Apoptose induzierten. Ähnliche Effekte wurden festgestellt, als die Zellen mit Ceramid behandelt wurden. Hingegen erwies sich Rosmarinsäure sowohl in JCaM-Zellen als auch in den parentalen Jurkat-Zellen als ein nur sehr schwacher Apoptose-Stimulus. Somit konnten eine in der Literatur beschriebene Apoptose-Resistenz von Lck-defizienten JCaM-Zellen zunächst bestätigt werden.

Überraschenderweise stellte sich jedoch heraus, dass im Gegensatz zu den in der Arbeitsgruppe vorhandenen und vermutlich auch von anderen Laboratorien verwendeten JCaM-Zellen andere Lck-defiziente Jurkat-Zellklone eine mit den parentalen Jurkat-Zellen vergleichbare Apoptose-Sensitivität aufwiesen. So konnte sowohl durch Ceramid als auch durch Etoposid und Staurosporin in JCaM/ATCC- und JCaM/Abr-Zellen eine deutliche Apoptose ausgelöst werden, die u.a. durch den Nachweis der Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung bestätigt wurde. Es zeigte sich außerdem, dass Caspase-3 und Caspase-9 in diesen Lck-defizienten Zellen durch diese Substanzen in einem ähnlichen Ausmaß wie in den parentalen Jurkat-Zellen aktiviert wurden. Diese Befunde lassen daher schlussfolgern, dass die Lck-Defizienz keine primäre Ursache für die Resistenz von Jurkat-Zellen gegenüber Aktivatoren des mitochondrialen Signalweges darstellt.

5.3.2 Die Rolle von Lck in der extrinsisch vermittelten Apoptose

Eine Apoptose-Resistenz der JCaM-Zellen wurde in der Literatur nahezu ausschließlich für Stimulantien des mitochondrialen Signalwegs beschrieben. Demgegenüber wird eine Rolle von Lck in der durch Todesrezeptoren vermittelten Apoptose sehr kontrovers diskutiert. So berichten einige Publikationen, dass in Abwesenheit von Lck keine rezeptorvermittelte Apoptose durch CD95 ausgelöst werden kann (Schlottmann *et al.*, 1996). Dagegen wird in

einer anderen Studie postuliert, dass die CD95-vermittelte Apoptose unabhängig von Lck in Jurkat-Zellen verläuft (Schraven und Peter, 1995). Eine weitgehend Lck-unabhängige Apoptose-Induktion wurde ebenso für TNF- α beschrieben (Manna *et al.*, 2000). Aufgrund der unklaren Bedeutung von Lck für Apoptose-Induktion durch Todesrezeptoren wurde daher die Apoptose-Sensitivität der verschiedenen Zellklone gegenüber TNF- α untersucht. Die Behandlung mit TNF- α löste in allen Zellklonen nach 48 Stunden eine nur wenig Apoptose aus. Eine signifikante Apoptoserate konnte jedoch nach einer dreitägigen Inkubation mit TNF- α beobachtet werden. Es zeigte sich jedoch, dass die Zellen eine ähnliche Sensitivität gegenüber TNF- α besaßen, wie diese bereits für Aktivatoren des mitochondrialen Signalwegs beobachtet worden war. Während JCaM-Zellen eine weitgehende Apoptose-Resistenz aufwiesen, konnten sowohl in den Lck-exprimierenden parentalen Jurkat-Zellen wie auch in den Lck-defizienten Zellen JCaM/ATCC und JCaM/Abr Apoptose ausgelöst werden. Diese Befunde zeigen daher eindeutig, dass die Apoptose-Sensitivität im mitochondrialen und Todesrezeptor-Signalweg nicht mit einer Expression von Lck korreliert und daher in JCaM-Zellen vermutlich durch einen Lck-unabhängigen Defekt verursacht ist.

5.3.3 Die Regulation der Bak-Expression in Lck-defizienten Zellen

Die proapoptotischen und porenbildenden Bcl-2-Proteine Bak und Bax sind essentielle Mediatoren der mitochondrialen Cytochrom c-Freisetzung. Obwohl einige Studien nahe legen, dass Bak und Bax eine unterschiedliche Bedeutung bei der Apoptose durch bestimmte Stimuli oder *BH3-only*-Proteine besitzen (Cartron *et al.*, 2003; Klee und Pimentel-Muinos, 2005), weisen die meisten Publikationen eine redundante Funktion beider Bcl-2-Proteine nach (Wei *et al.*, 2001). Jurkat-Zellen exprimieren kein funktionelles Bax-Protein und besitzen aufgrund eines Defekts in der *Mismatch*-DNA-Reparatur eine Mutation im Bax-Gen (Brimmell *et al.*, 1998). Interessanterweise wurde kürzlich beschrieben, dass Lck die Expression von Bak kontrolliert (Samraj *et al.*, 2006). So wurde demonstriert, dass Lck-defiziente JCaM-Zellen kein Bak exprimieren, wohingegen die Expression von Lck in stabilen Transfektanten die Bak-Expression wieder herstellt. Eine mangelnde Bak-Expression wurde daher als Ursache für die Apoptose-Resistenz der Lck-defizienten JCaM-Zellen postuliert. Unterstützt wird die Hypothese durch den Befund, dass eine Defizienz von Bak in Jurkat-Zellen zu einer Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika führt (Wang *et al.*, 2001).

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, dass die Apoptose-resistenten JCaM-Zellen keine Expression von Bak aufwiesen. Jedoch konnte eine Abhängigkeit der Bak-Expression vom Lck-Status nicht bestätigt werden. So wiesen die Zellen JCaM/ATCC und JCaM/Abr trotz ihrer Lck-Defizienz eine mit den parentalen Wildtypzellen vergleichbare Bak-Expression auf. Insgesamt weisen diese Befunde daraufhin, dass es sich daher bei der Bak-Defizienz um einen Lck-unabhängigen Effekt handelt. Man kann vermuten, dass beispielsweise eine längere Kultivierung der Zellen einen Verlust ihrer Bak-Expression und damit eine Apoptose-Resistenz begünstigt hat. Nichtsdestotrotz sind die hier untersuchten JCaM-Zellen, die neben Bak auch kein Bax exprimieren, sicherlich ein nützliches Zellmodell, um die Bedeutung und mögliche funktionelle Unterschiede beider Schlüsselmediatoren zu untersuchen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit verschiedenen Aspekten der Signaltransduktion von apoptotischen und inflammatorischen Prozessen. Im Mittelpunkt stand die funktionelle Charakterisierung des Tumorsuppressors p53 in Mitochondrien, die Bedeutung des neuen I κ B-Homologs I κ B ζ für die Zytokin-Induktion sowie die Rolle der Tyrosinkinase Lck in der Apoptose von T-Zellen.

6.1 Mitochondriale Translokation von p53 in Abwesenheit von Apoptose

Der Tumorsuppressor p53 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellzyklus-, Seneszenz- und Apoptose-Prozessen. In aktuellen Studien wurde eine Translokation von p53 an Mitochondrien mit einer transkriptionsunabhängigen Funktion von p53 in der Apoptose assoziiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die mitochondriale Translokation von p53 näher charakterisiert, um zu untersuchen, ob ein Defekt dieses Prozesses an der Apoptose-Resistenz von Tumorzellen beteiligt ist. Nach ionisierender Bestrahlung konnte in verschiedenen Tumorzellen eine Translokation von p53 an die Mitochondrien nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass MCF-7-Brustkarzinomzellen sowie weitere Zelllinien eine funktionelle p53-Antwort nach Bestrahlung aufweisen und die Expression der p53-Targetgene p21, Bax und Puma induzieren. Trotz einer funktionellen p53-Antwort und der mitochondrialen Translokation von p53 verursachte eine Bestrahlung der Zellen jedoch keine Apoptose, sondern zelluläre Seneszenz. Während die nukleäre Expression von nativem p53 Apoptose induzierte, konnte selbst die gezielte Expression von p53 an den Mitochondrien keinen Zelltod auslösen. Diese Daten zeigen somit, dass eine Translokation von p53 an die Mitochondrien nicht zwangsläufig Apoptose induziert und daher eine Apoptose-Resistenz vermutlich auf einem Defekt unterhalb der mitochondrialen p53-Antwort beruht.

6.2 I κ B ζ als Mediator der NF- κ B-abhängigen Zytokin-Induktion

Mitglieder der I κ B-Familie fungieren in der Regel als Inhibitoren des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B. Das kürzlich identifizierte Protein I κ B ζ weist jedoch ungewöhnliche Eigenschaften auf. Anders als klassische I κ B-Proteine ist I κ B ζ nicht konstitutiv im Zytosol, sondern im Zellkern lokalisiert, wo es induzierbar exprimiert wird. Ähnlich wie andere I κ B-Proteine besitzt I κ B ζ Ankyrinwiederholungen an seinem C-Terminus, die mit den NF- κ B-Untereinheiten p50 oder p65 interagieren. Aufgrund einer essentiellen Rolle von NF- κ B in der Immunantwort wurde in dieser Arbeit der Einfluss von

I κ B ζ auf die Synthese von Zytokinen untersucht. Überraschenderweise führte die Expression von I κ B ζ nicht zu einer Hemmung von NF- κ B-Targetgenen, sondern resultierte in einer direkten transkriptionellen Aktivierung verschiedener Zytokine. Nach Transfektion oder retroviraler Expression von I κ B ζ wurde auf mRNA- und Proteinebene eine starke Induktion von IL-8, GM-CSF, MCP-1 und IL-6 beobachtet. Struktur-Funktionsanalysen zeigten, dass für die Zytokin-Induktion sowohl der C-Terminus mit den Ankyrindomänen als auch der N-Terminus, der eine Transaktivierungsdomäne besitzt, erforderlich ist. Durch Versuche in NF- κ B p65- und p50-defizienten Zellen wurde festgestellt, dass die Zytokin-Induktion durch I κ B ζ ebenso die DNA-bindenden Untereinheiten des Transkriptionsfaktors benötigt. In einer Array-Analyse von Endothelzellen konnten neben Zytokinen weitere Targetgene identifiziert werden, die eine Rolle von I κ B ζ in der Apoptose und Mitose nahe legen. In der Tat induzierte die Überexpression von I κ B ζ die Aktivierung von Caspasen und Apoptose. Die Befunde zeigen daher, dass I κ B ζ primär nicht als Repressor, sondern als Aktivator von NF- κ B-Targetgenen fungiert und somit einen weiteren Kontrollpunkt der NF- κ B-Aktivierung darstellt.

6.3 Die Tyrosinkinase Lck und ihre Rolle in der Apoptose

Die Tyrosinkinase Lck spielt eine essentielle Rolle bei der T-Zellaktivierung. Jüngere Arbeiten deuteten daraufhin, dass Lck auch eine proapoptotische Funktion bei Zelltodprozessen in T-Zellen besitzt, jedoch wurden bislang alle Untersuchungen in dem Lck-defizienten Jurkat-Zellklon J.CaM durchgeführt. Um den Mechanismus der Apoptose-Regulation durch Lck zu charakterisieren, wurden zunächst unterschiedliche Lck-defiziente Jurkat-Zellklone untersucht, die unterschiedlicher Herkunft waren oder durch eine unabhängige Mutagenese isoliert wurden. Es stellte sich heraus, dass im Einklang mit der Literatur JCaM-Zellen eine Apoptose-Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Apoptose-Stimuli besaßen. Überraschenderweise wurde jedoch trotz einer Defizienz der Lck-Kinase keine Apoptose-Resistenz in den anderen Jurkat-Zellen nachgewiesen. Vielmehr wurde in diesen Zellen nach Behandlung mit Chemotherapeutika eine deutliche Apoptose sowohl durch Analyse des Zelltodes wie auch durch Nachweis der Caspase-Aktivierung gemessen. Westernblot-Analysen erwiesen, dass Apoptose-resistente JCaM-Zellen neben Lck ebenso einen Verlust des proapoptotischen Bcl-2-Proteins Bak besaßen. Bei dieser Bak-Defizienz handelte es sich jedoch eindeutig um einen Lck-unabhängigen Effekt, da andere Lck-defiziente Zellen eine normale Bak-Expression aufwiesen. Somit konnte zwar die beschriebene Apoptose-Resistenz von Lck-defizienten JCaM-Zellen bestätigt und auf eine

fehlende Expression von Bak zurückgeführt werden. Es ließ sich jedoch eindeutig schlussfolgern, dass die Lck-Defizienz keine primäre Ursache für eine Apoptose-Resistenz darstellt.

7 SUMMARY

7.1 Mitochondrial localization of p53 in the absence of apoptosis

The tumor suppressor p53 is known to trigger apoptosis in response to various death stimuli by transactivation of target genes. Additionally, a transcription-independent mechanism was postulated recently to contribute to p53-induced apoptosis. With regard to this, it was for instance demonstrated that stress-activated p53 translocates to the mitochondria only under conditions that lead to apoptosis, but not when cell cycle arrest is induced. At the mitochondria, p53 was shown to directly interact with the anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-xL proteins leading to activation of the pro-apoptotic Bax protein and subsequent activation of the mitochondrial death pathway. As MCF-7 breast carcinoma cells that harbour a fully active transcriptional p53 protein are sensitive to apoptosis induction by chemotherapeutic drugs, but remarkably resistant to gamma-irradiation (IR)-induced apoptosis, it was feasible to speculate that the radio-resistant phenotype of these cells might be caused by an improper or non-functional translocation of p53 to the mitochondria. In order to elucidate such a scenario, the subcellular localisation of p53 in MCF-7 cells that were either exposed to IR or to different chemotherapeutic drugs was compared. Intriguingly, similar amounts of p53 were found to be associated with mitochondria in cells treated with apoptosis-inducing chemotherapeutic drugs and in cells that were arrested in the G2/M phase of the cell cycle following exposure to IR. Similar results were obtained using other cell systems that were either resistant or sensitive to these stimuli. Furthermore, in contrast to expression of nuclear p53, targeted expression of p53 at the mitochondria was not able to induce apoptosis. Together, these data demonstrate that a stress-induced translocation of p53 to mitochondria is not necessarily associated with apoptosis induction and that other, yet undefined, mechanisms must contribute to the radio-resistant phenotype of these cells.

7.2 I κ B ζ and its function as a key regulator in inflammation and apoptosis

In the second part of this PhD thesis, a possible role of the novel I κ B protein I κ B ζ in the induction of cytokines that are crucial mediators of inflammatory processes was investigated. I κ B ζ was first identified in our laboratory by a subtractive hybridization approach using two HeLa cell lines with different apoptosis susceptibilities. Similar to all I κ B proteins, I κ B ζ contains six C-terminal ankyrin repeats that mediate binding to the p65 and p50 subunits of the transcription factor NF- κ B, thereby inhibiting its transcriptional activity. In contrast to other I κ B proteins, however, I κ B ζ is localized in the nucleus where it associates with matrix-

associated deacetylase nuclear bodies. Interestingly, and in contrast to other I κ B proteins that merely act as transcriptional repressors of NF- κ B, it was found that I κ B ζ augmented expression of various cytokines such as IL-6, IL-8, GM-CSF and MCP-1. This effect could be attributed to the N-terminal domain of I κ B ζ that was shown in parallel studies to contain a transactivation domain. However, studies using p50- or p65-deficient mouse embryonic fibroblasts demonstrated that the increased cytokine production was not mediated by I κ B ζ alone, but critically depends on its interaction with a functional NF- κ B. These findings were also verified in endothelial cells using micro-array analyses that in addition revealed activation and repression of multiple apoptosis- and mitosis- relevant genes. Indeed it could be demonstrated that I κ B ζ activates caspases and finally induces apoptosis. In summary, unlike classical NF- κ B inhibitors such as I κ B α , I κ B ζ plays a central role in the induction and repression of a selective pool of genes critical for diverse processes by differentially controlling NF- κ B activity with either its N- or C-terminus.

7.3 The role of the tyrosine kinase Lck in apoptosis

Over the past 15 years, the function of the tyrosine kinase Lck in vital cellular processes such as T-cell growth and differentiation has been intensively investigated. Recent studies indicated that Lck is also involved in apoptosis induction of T-lymphocytes which was attributed to its stimulatory effect on the expression of the pro-apoptotic Bcl-2 protein Bak. However, this conclusion was solely reached by using a single Lck-deficient cell line (JCaM) that did not express Bak and, in addition, no experiments were provided in which re-introduction of the Lck gene resulted in Bak expression. To re-evaluate the role of Lck in the regulation of Bak expression and instigation of the mitochondrial death pathway, three individual Lck-deficient JCaM cell clones (JCaM, JCaM/Abr, JCaM/ATCC) obtained from different sources were investigated. Surprisingly, only the JCaM cells were resistant to apoptosis induced by either anticancer drugs or tumor necrosis factor (TNF) that engage the mitochondrial and the death receptor pathway, respectively. JCaM/Abr and JCaM/ATCC cells, in contrast, were as sensitive as wild-type Jurkat cells. This was confirmed by immunoblot analyses as well as by substrate cleavage assays showing that caspase-3 activation was only induced by these treatments in the latter two cell lines, but not in JCaM cells. Consistent with these findings, Bak expression was found in apoptosis-sensitive Lck-deficient cells, but was undetectable in the JCaM cell line. Together, these data clearly demonstrate the absence of any correlation between Lck and Bak expression, and therefore

suggest that the apoptosis resistance of JCaM cells is solely dependent on the loss of Bak that must have occurred independently of the loss of Lck.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abraham, K.M., Levin, S.D., Marth, J.D., Forbush, K.A. and Perlmutter, R.M. (1991) Delayed thymocyte development induced by augmented expression of p56lck. *J Exp Med*, **173**, 1421-1432.
- Adams, J.M. and Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, **281**, 1322-1326.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. and Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, **87**, 171.
- Appella, E. and Anderson, C.W. (2001) Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem*, **268**, 2764-2772.
- Arends, M.J., Morris, R.G. and Wyllie, A.H. (1990) Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol*, **136**, 593-608.
- Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M., Thomas, D., Hay, R.T., Virelizier, J.L. and Dargemont, C. (1997) Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci*, **110 (Pt 3)**, 369-378.
- Ashburner, B.P., Westerheide, S.D. and Baldwin, A.S., Jr. (2001) The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol Cell Biol*, **21**, 7065-7077.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, **281**, 1305-1308.
- Ayed, A., Mulder, F.A., Yi, G.S., Lu, Y., Kay, L.E. and Arrowsmith, C.H. (2001) Latent and active p53 are identical in conformation. *Nat Struct Biol*, **8**, 756-760.
- Baeuerle, P.A. and Baltimore, D. (1988) I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science*, **242**, 540-546.
- Baeuerle, P.A. and Baltimore, D. (1996) NF-kappa B: ten years after. *Cell*, **87**, 13-20.
- Baldwin, A.S., Jr. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, **14**, 649-683.
- Belka, C., Gruber, C., Jendrossek, V., Wesselborg, S. and Budach, W. (2003) The tyrosine kinase Lck is involved in regulation of mitochondrial apoptosis pathways. *Oncogene*, **22**, 176-185.
- Belka, C., Marini, P., Lepple-Wienhues, A., Budach, W., Jekle, A., Los, M., Lang, F., Schulze-Osthoff, K., Gulbins, E. and Bamberg, M. (1999) The tyrosine kinase lck is required for CD95-independent caspase-8 activation and apoptosis in response to ionizing radiation. *Oncogene*, **18**, 4983-4992.

- Bellairs, R. (1961) Cell death in chick embryos as studied by electron microscopy. *J Anat*, **95**, 54-60 53.
- Bode, A.M. and Dong, Z. (2004) Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, **4**, 793-805.
- Bours, V., Franzoso, G., Azarenko, V., Park, S., Kanno, T., Brown, K. and Siebenlist, U. (1993) The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell*, **72**, 729-739.
- Brimmell, M., Mendiola, R., Mangion, J. and Packham, G. (1998) BAX frameshift mutations in cell lines derived from human haemopoietic malignancies are associated with resistance to apoptosis and microsatellite instability. *Oncogene*, **16**, 1803-1812.
- Cain, K., Brown, D.G., Langlais, C. and Cohen, G.M. (1999) Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem*, **274**, 22686-22692.
- Cartron, P.F., Juin, P., Oliver, L., Martin, S., Meflah, K. and Vallette, F.M. (2003) Nonredundant role of Bax and Bak in Bid-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol*, **23**, 4701-4712.
- Chen, C., Edelstein, L.C. and Gelinas, C. (2000) The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol*, **20**, 2687-2695.
- Chen, F.E. and Ghosh, G. (1999) Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene*, **18**, 6845-6852.
- Chen, Z.J., Parent, L. and Maniatis, T. (1996) Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell*, **84**, 853-862.
- Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T. and Korsmeyer, S.J. (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, **8**, 705-711.
- Chipuk, J.E. and Green, D.R. (2006) Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ*, **13**, 994-1002.
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M. and Green, D.R. (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, **303**, 1010-1014.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D. and Pavletich, N.P. (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, **265**, 346-355.
- Chow, L.M., Fournel, M., Davidson, D. and Veillette, A. (1993) Negative regulation of T-cell receptor signalling by tyrosine protein kinase p50csk. *Nature*, **365**, 156-160.
- Courtois, G. and Gilmore, T.D. (2006) Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*, **25**, 6831-6843.

- Cowland, J.B., Muta T., Borregaard N. (2006) IL-1 beta-specific up-regulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin is controlled by IkappaB-zeta. *J Immunol*, **176**, 5559-5566.
- Denk, A., Goebeler, M., Schmid, S., Berberich, I., Ritz, O., Lindemann, D., Ludwig, S. and Wirth, T. (2001) Activation of NF-kappa B via the Ikappa B kinase complex is both essential and sufficient for proinflammatory gene expression in primary endothelial cells. *J Biol Chem*, **276**, 28451-28458.
- Derudder, E., Dejardin, E., Pritchard, L.L., Green, D.R., Korner, M. and Baud, V. (2003) RelB/p50 dimers are differentially regulated by tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-beta receptor activation: critical roles for p100. *J Biol Chem*, **278**, 23278-23284.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B. and Martinou, J.C. (1999) Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*, **144**, 891-901.
- Di Somma, M.M., Majolini, M.B., Burastero, S.E., Telford, J.L. and Baldari, C.T. (1996) Cyclosporin A sensitivity of the HIV-1 long terminal repeat identifies distinct p56lck-dependent pathways activated by CD4 triggering. *Eur J Immunol*, **26**, 2181-2188.
- Dutta, J., Fan, Y., Gupta, N., Fan, G. and Gelinas, C. (2006) Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene*, **25**, 6800-6816.
- Erster, S., Mihara, M., Kim, R.H., Petrenko, O. and Moll, U.M. (2004) In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. *Mol Cell Biol*, **24**, 6728-6741.
- Essmann, F., Engels, I.H., Totzke, G., Schulze-Osthoff, K. and Janicke, R.U. (2004) Apoptosis resistance of MCF-7 breast carcinoma cells to ionizing radiation is independent of p53 and cell cycle control but caused by the lack of caspase-3 and a caffeine-inhibitable event. *Cancer Res*, **64**, 7065-7072.
- Falvo, J.V., Ugliarolo, A.M., Brinkman, B.M., Merika, M., Parekh, B.S., Tsai, E.Y., King, H.C., Morielli, A.D., Peralta, E.G., Maniatis, T., Thanos, D. and Goldfeld, A.E. (2000) Stimulus-specific assembly of enhancer complexes on the tumor necrosis factor alpha gene promoter. *Mol Cell Biol*, **20**, 2239-2247.
- Felix, W. (1889) Über das Wachstum der quergestreiften Muskulatur nach Beobachtungen am Menschen. *Z Wiss Zool*, **48**, 224-259.
- Fenwick, C., Na, S.Y., Voll, R.E., Zhong, H., Im, S.Y., Lee, J.W. and Ghosh, S. (2000) A subclass of Ras proteins that regulate the degradation of IkappaB. *Science*, **287**, 869-873.
- Fields, S. and Jang, S.K. (1990) Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science*, **249**, 1046-1049.

- 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. and Clayton, L.K. (2002) Peptide-induced negative selection of thymocytes activates transcription of an NF-kappa B inhibitor. *Mol Cell*, **9**, 637-648.
- Fischer, U., Janicke, R.U. and Schulze-Osthoff, K. (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*, **10**, 76-100.
- Franzoso, G., Bours, V., Azarenko, V., Park, S., Tomita-Yamaguchi, M., Kanno, T., Brown, K. and Siebenlist, U. (1993) The oncoprotein Bcl-3 can facilitate NF-kappa B-mediated transactivation by removing inhibiting p50 homodimers from select kappa B sites. *Embo J*, **12**, 3893-3901.
- Fujita, T., Nolan, G.P., Liou, H.C., Scott, M.L. and Baltimore, D. (1993) The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes Dev*, **7**, 1354-1363.
- Gilmore, T.D. (2006) Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680-6684
- Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M. and Harris, C.C. (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, **54**, 4855-4878.
- Griffiths, G.J., Dubrez, L., Morgan, C.P., Jones, N.A., Whitehouse, J., Corfe, B.M., Dive, C. and Hickman, J.A. (1999) Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol*, **144**, 903-914.
- Gross, A., McDonnell, J.M. and Korsmeyer, S.J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 1899-1911.
- Hardwick, J.S. and Sefton, B.M. (1997) The activated form of the Lck tyrosine protein kinase in cells exposed to hydrogen peroxide is phosphorylated at both Tyr-394 and Tyr-505. *J Biol Chem*, **272**, 25429-25432.
- Haruta, H., Kato, A. and Todokoro, K. (2001) Isolation of a novel interleukin-1-inducible nuclear protein bearing ankyrin-repeat motifs. *J Biol Chem*, **276**, 12485-12488.
- Henkel, T., Machleidt, T., Alkalay, I., Kronke, M., Ben-Neriah, Y. and Baeuerle, P.A. (1993) Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Nature*, **365**, 182-185.
- Heyninck, K. and Beyaert, R. (2006) A novel link between Lck, Bak expression and chemosensitivity. *Oncogene*, **25**, 1693-1695.
- Hirano, F., Tanaka, H., Hirano, Y., Hiramoto, M., Handa, H., Makino, I. and Scheidereit, C. (1998) Functional interference of Sp1 and NF-kappaB through the same DNA binding site. *Mol Cell Biol*, **18**, 1266-1274.

- Hirotsu, T., Lee, P.Y., Kuwata, H., Yamamoto, M., Matsumoto, M., Kawase, I., Akira, S. and Takeda, K. (2005) The nuclear I κ B protein I κ BNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J Immunol*, **174**, 3650-3657.
- Hockenbery, D., Nunez, G., Millman, C., Schreiber, R.D. and Korsmeyer, S.J. (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, **348**, 334-336.
- Hoffmann, A., Leung, T.H. and Baltimore, D. (2003) Genetic analysis of NF- κ B/Rel transcription factors defines functional specificities. *Embo J*, **22**, 5530-5539.
- Hoffmann, A., Natoli, G. and Ghosh, G. (2006) Transcriptional regulation via the NF- κ B signaling module. *Oncogene*, **25**, 6706-6716.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C.C. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science*, **253**, 49-53.
- Holtmann, H., Winzen, R., Holland, P., Eickemeier, S., Hoffmann, E., Wallach, D., Malinin, N.L., Cooper, J.A., Resch, K. and Kracht, M. (1999) Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol Cell Biol*, **19**, 6742-6753.
- Hur, Y.G., Yun, Y. and Won, J. (2004) Rosmarinic acid induces p53-dependent apoptosis in Jurkat and peripheral T cells via mitochondrial pathway independent from Fas/Fas ligand interaction. *J Immunol*, **172**, 79-87.
- Inoue, J., Kerr, L.D., Kakizuka, A. and Verma, I.M. (1992) I κ B γ , a 70 kd protein identical to the C-terminal half of p10 NF- κ B: a new member of the I κ B family. *Cell*, **68**, 1109-1120.
- Itoh, N. and Nagata, S. (1993) A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem*, **268**, 10932-10937.
- Janicke, R.U., Engels, I.H., Dunkern, T., Kaina, B., Schulze-Osthoff, K. and Porter, A.G. (2001) Ionizing radiation but not anticancer drugs causes cell cycle arrest and failure to activate the mitochondrial death pathway in MCF-7 breast carcinoma cells. *Oncogene*, **20**, 5043-5053.
- Karin, M. (1999) How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene*, **18**, 6867-6874.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**, 239-257.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Kramer, P.H. and Peter, M.E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J*, **14**, 5579-5588.

- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D. and Ashkenazi, A. (2001) Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem*, **276**, 46639-46646.
- Kitamura, H., Kanehira, K., Okita, K., Morimatsu, M. and Saito, M. (2000) MAIL, a novel nuclear I kappa B protein that potentiates LPS-induced IL-6 production. *FEBS Lett*, **485**, 53-56.
- Kitamura, H., Matsushita, Y., Iwanaga, T., Mori, K., Kanehira, K., Fujikura, D., Morimatsu, M. and Saito, M. (2003) Bacterial lipopolysaccharide-induced expression of the IkappaB protein MAIL in B-lymphocytes and macrophages. *Arch Histol Cytol*, **66**, 53-62.
- Klee, M. and Pimentel-Muinos, F.X. (2005) Bcl-X(L) specifically activates Bak to induce swelling and restructuring of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **168**, 723-734.
- Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J. and Schlesinger, P.H. (2000) 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.
- Kushner, D.B. and Ricciardi, R.P. (1999) Reduced phosphorylation of p53 is responsible for diminished NF-kappaB binding to the major histocompatibility complex class I enhancer in adenovirus type 12-transformed cells. *Mol Cell Biol*, **19**, 2169-2179.
- Kuwata, H., Matsumoto, M., Atarashi, K., Morishita, H., Hirotani, T., Koga, R. and Takeda, K. (2006) IkappaBNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation. *Immunity*, **24**, 41-51.
- Lavin, M.F. and Gueven, N. (2006) The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ*, **13**, 941-950.
- Leu, J.I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E. and George, D.L. (2004) Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol*, **6**, 443-450.
- Levine, A.J., Hu, W. and Feng, Z. (2006) The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ*, **13**, 1027-1036.
- Li, C.C., Dai, R.M., Chen, E. and Longo, D.L. (1994) Phosphorylation of NF-KB1-p50 is involved in NF-kappa B activation and stable DNA binding. *J Biol Chem*, **269**, 30089-30092.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. and Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, **94**, 491-501.
- 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. and Thompson, C.B. (2000) 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.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Lomvardas, S. and Thanos, D. (2002) Modifying gene expression programs by altering core promoter chromatin architecture. *Cell*, **110**, 261-271.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, **94**, 481-490.
- Makarov, S.S. (2000) NF-kappaB as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. *Mol Med Today*, **6**, 441-448.
- Manna, S.K. and Aggarwal, B.B. (2000) Differential requirement for p56lck in HIV-tat versus TNF-induced cellular responses: effects on NF-kappa B, activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. *J Immunol*, **164**, 5156-5166.
- Manna, S.K., Sah, N.K. and Aggarwal, B.B. (2000) Protein tyrosine kinase p56lck is required for ceramide-induced but not tumor necrosis factor-induced activation of NF-kappa B, AP-1, JNK, and apoptosis. *J Biol Chem*, **275**, 13297-13306.
- Marchenko, N.D., Wolff, S., Erster, S., Becker, K. and Moll, U.M. (2007) Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *Embo J*, **26**, 923-934.
- Marchenko, N.D., Zaika, A. and Moll, U.M. (2000) Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem*, **275**, 16202-16212.
- Micheau, O. and Tschopp, J. (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, **114**, 181-190.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P. and Moll, U.M. (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*, **11**, 577-590.
- Molina, T.J., Kishihara, K., Siderovski, D.P., van Ewijk, W., Narendran, A., Timms, E., Wakeham, A., Paige, C.J., Hartmann, K.U., Veillette, A. and *et al.* (1992) Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck. *Nature*, **357**, 161-164.
- Moll, U.M. and Zaika, A. (2001) Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS Lett*, **493**, 65-69.
- Motoyama, M., Yamazaki, S., Eto-Kimura, A., Takeshige, K. and Muta, T. (2005) Positive and negative regulation of nuclear factor-kappaB-mediated transcription by IkappaB-zeta, an inducible nuclear protein. *J Biol Chem*, **280**, 7444-7451.
- Muta, T. (2006) IkB ζ : An inducible regulator of nuclear factor- κ B. *Vitamins and Hormones*, **74**, 301-316.

- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem*, **273**, 2926-2930.
- Nemajerova, A., Erster, S. and Moll, U.M. (2005) The post-translational phosphorylation and acetylation modification profile is not the determining factor in targeting endogenous stress-induced p53 to mitochondria. *Cell Death Differ*, **12**, 197-200.
- Newmeyer, D.D. and Ferguson-Miller, S. (2003) Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*, **112**, 481-490.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F. and Riccardi, C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, **139**, 271-279.
- Nister, M., Tang, M., Zhang, X.Q., Yin, C., Beeche, M., Hu, X., Enblad, G., van Dyke, T. and Wahl, G.M. (2005) p53 must be competent for transcriptional regulation to suppress tumor formation. *Oncogene*, **24**, 3563-3573.
- Ohno, H., Takimoto, G. and McKeithan, T.W. (1990) The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell*, **60**, 991-997.
- Ostergaard, H.L., Shackelford, D.A., Hurley, T.R., Johnson, P., Hyman, R., Sefton, B.M. and Trowbridge, I.S. (1989) Expression of CD45 alters phosphorylation of the lck-encoded tyrosine protein kinase in murine lymphoma T-cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 8959-8963.
- Roninson, I.B. (2002) Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett*, **179**, 1-14.
- Rouer, E., Brule, F. and Benarous, R. (1999) A single base mutation in the 5' splice site of intron 7 of the lck gene is responsible for the deletion of exon 7 in lck mRNA of the JCaM1 cell line. *Oncogene*, **18**, 4262-4268.
- Ruiz-Vela, A., Opferman, J.T., Cheng, E.H. and Korsmeyer, S.J. (2005) Proapoptotic BAX and BAK control multiple initiator caspases. *EMBO Rep*, **6**, 379-385.
- Saccani, S., Pantano, S. and Natoli, G. (2001) Two waves of nuclear factor kappaB recruitment to target promoters. *J Exp Med*, **193**, 1351-1359.
- Sambrook, J.a.R., D W. (2001) *Molecular Cloning*.
- Samraj, A.K., Stroh, C., Fischer, U. and Schulze-Osthoff, K. (2006) The tyrosine kinase Lck is a positive regulator of the mitochondrial apoptosis pathway by controlling Bak expression. *Oncogene*, **25**, 186-197.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J*, **17**, 1675-1687.

- Scheidereit, C. (2006) I κ B kinase complexes: gateways to NF- κ B activation and transcription. *Oncogene*, **25**, 6685-6705.
- Schlottmann, K.E., Gulbins, E., Lau, S.M. and Coggeshall, K.M. (1996) Activation of Src-family tyrosine kinases during Fas-induced apoptosis. *J Leukoc Biol*, **60**, 546-554.
- Schraven, B. and Peter, M.E. (1995) APO-1(CD95)-mediated apoptosis in Jurkat cells does not involve src kinases or CD45. *FEBS Lett*, **368**, 491-494.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. and Peter, M.E. (1998) Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*, **254**, 439-459.
- Schumm, K., Rocha, S., Caamano, J. and Perkins, N.D. (2006) Regulation of p53 tumour suppressor target gene expression by the p52 NF- κ B subunit. *Embo J*, **25**, 4820-4832.
- Sen, R. and Baltimore, D. (1986) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*, **47**, 921-928.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C. and Karin, M. (2001) Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science*, **293**, 1495-1499.
- Shiina, T., Konno, A., Oonuma, T., Kitamura, H., Imaoka, K., Takeda, N., Todokoro, K. and Morimatsu, M. (2004) Targeted disruption of MAIL, a nuclear I κ B protein, leads to severe atopic dermatitis-like disease. *J Biol Chem*, **279**, 55493-55498.
- Siebenlist, U., Brown, K. and Claudio, E. (2005) Control of lymphocyte development by nuclear factor- κ B. *Nat Rev Immunol*, **5**, 435-445.
- Sohn, D., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K. and Janicke, R.U. (2006) p21 blocks irradiation-induced apoptosis downstream of mitochondria by inhibition of cyclin-dependent kinase-mediated caspase-9 activation. *Cancer Res*, **66**, 11254-11262.
- Speidel, D., Helmbold, H. and Deppert, W. (2006) Dissection of transcriptional and non-transcriptional p53 activities in the response to genotoxic stress. *Oncogene*, **25**, 940-953.
- Springer, T.A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, **76**, 301-314.
- Strasser, A. (2005) The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol*, **5**, 189-200.
- Straus, D.B. and Weiss, A. (1992) Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell*, **70**, 585-593.
- Sun, S.C., Ganchi, P.A., Ballard, D.W. and Greene, W.C. (1993) NF- κ B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science*, **259**, 1912-1915.

- Totzke, G., Essmann, F., Pohlmann, S., Lindenblatt, C., Janicke, R.U. and Schulze-Osthoff, K. (2006) A novel member of the IkappaB family, human IkappaB-zeta, inhibits transactivation of p65 and its DNA binding. *J Biol Chem*, **281**, 12645-12654.
- Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K.M. and Krammer, P.H. (1989) Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, **245**, 301-305.
- Tsujimoto, Y. (2003) Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol*, **195**, 158-167.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. and Croce, C.M. (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, **228**, 1440-1443.
- Vanden Berghe, W., De Bosscher, K., Boone, E., Plaisance, S. and Haegeman, G. (1999) The nuclear factor-kappaB engages CBP/p300 and histone acetyltransferase activity for transcriptional activation of the interleukin-6 gene promoter. *J Biol Chem*, **274**, 32091-32098.
- Viatour, P., Bentires-Alj, M., Chariot, A., Deregowski, V., de Leval, L., Merville, M.P. and Bours, V. (2003) NF- kappa B2/p100 induces Bcl-2 expression. *Leukemia*, **17**, 1349-1356.
- Viatour, P., Merville, M.P., Bours, V. and Chariot, A. (2005) Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci*, **30**, 43-52.
- Vogt, C. (1842) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (Alytes obstetricans). *Jent und Gassmann, Solothurn*.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, **10**, 45-65.
- Wang, G.Q., Gastman, B.R., Wieckowski, E., Goldstein, L.A., Gambotto, A., Kim, T.H., Fang, B., Rabinovitz, A., Yin, X.M. and Rabinowich, H. (2001) A role for mitochondrial Bak in apoptotic response to anticancer drugs. *J Biol Chem*, **276**, 34307-34317.
- Watanabe, N., Iwamura, T., Shinoda, T. and Fujita, T. (1997) Regulation of NFkB1 proteins by the candidate oncoprotein BCL-3: generation of NF-kappaB homodimers from the cytoplasmic pool of p50-p105 and nuclear translocation. *Embo J*, **16**, 3609-3620.
- 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. and Korsmeyer, S.J. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, **292**, 727-730.
- Weiss, A., Chan, A.C., Iwashima, M., Straus, D. and Irving, B.A. (1992) Regulation of protein tyrosine kinase activation by the T-cell antigen receptor zeta chain. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **57**, 107-116.

- Whiteside, S.T., Epinat, J.C., Rice, N.R. and Israel, A. (1997) I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *Embo J*, **16**, 1413-1426.
- Wu, H. and Lozano, G. (1994) NF-kappa B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. *J Biol Chem*, **269**, 20067-20074.
- Wyllie, A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **284**, 555-556.
- Wyllie, A.H. (1997) Apoptosis: an overview. *Br Med Bull*, **53**, 451-465.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. and Currie, A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, **68**, 251-306.
- Xiao, G., Harhaj, E.W. and Sun, S.C. (2001) NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell*, **7**, 401-409.
- Xu, Y. (2003) Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death Differ*, **10**, 400-403.
- 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. and Akira, S. (2004) Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature*, **430**, 218-222.
- Yamazaki, S., Muta, T., Matsuo, S. and Takeshige, K. (2005) Stimulus-specific induction of a novel nuclear factor-kappaB regulator, IkappaB-zeta, via Toll/Interleukin-1 receptor is mediated by mRNA stabilization. *J Biol Chem*, **280**, 1678-1687.
- Yamazaki, S., Muta, T. and Takeshige, K. (2001) A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei. *J Biol Chem*, **276**, 27657-27662.
- Yamin, T.T., Ayala, J.M. and Miller, D.K. (1996) Activation of the native 45-kDa precursor form of interleukin-1-converting enzyme. *J Biol Chem*, **271**, 13273-13282.
- Yonehara, S., Ishii, A. and Yonehara, M. (1989) A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med*, **169**, 1747-1756.
- Yu, J. and Zhang, L. (2005) The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun*, **331**, 851-858.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M. and Horvitz, H.R. (1993) The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, **75**, 641-652.

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. and Wang, X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, **90**, 405-413.

Zwacka, R.M., Zhang, Y., Zhou, W., Halldorson, J. and Engelhardt, J.F. (1998) Ischemia/reperfusion injury in the liver of BALB/c mice activates AP-1 and nuclear factor kappaB independently of IkappaB degradation. *Hepatology*, **28**, 1022-1030.

9 ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor-1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	<i>Bcl-2 antagonist killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated protein X</i>
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	<i>Bcl-2-like 1</i>
BH-Domäne	Bcl-2-Homologie-Domäne
Bid	<i>BH3-interacting death agonist</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CARD	Caspase-Rekrutierungsdomäne (<i>caspase recruitment domain</i>)
cDNA	komplementäre DNA
CD95	<i>cluster of differentiation 95</i>
cIAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
C-Terminus	Carboxylterminus
DD	Todesdomäne (<i>death domain</i>)
DED	Todeseffektordomäne (<i>death effector domain</i>)
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-BD	DNA-Bindungsdomäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR	Todesrezeptor (<i>death receptor</i>)
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FADD	<i>FAS-associated death domain protein</i>
FLIP	<i>FLICE inhibitory protein</i>
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	<i>granulocyte-monocyte-colony stimulating factor</i>
HDM2	<i>human double minute 2</i>
ICAM	<i>intercellular cell adhesion molecule</i>
I κ B	Inhibitor von NF- κ B
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin

INAP	<i>IL-1 inducible nuclear ankyrin-repeat protein</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MAIL	<i>molecule possessing ankyrin repeats induced by LPS</i>
MCP	<i>monocyte chemotactic protein</i>
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NF- κ B	Nuklearfaktor- κ B
NGAL	<i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
NIK	<i>NF-κB inducing kinase</i>
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NES	nukleäres Exportsignal
N-Terminus	Aminoterminus
ORF	open reading frame
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PUMA	<i>p53-upregulated modifier of apoptosis</i>
RHD	Rel-Homologie Domäne
RIP1	<i>receptor interacting protein 1</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Std	Stunden
Tab.	Tabelle
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor α</i>
TNF-R1	<i>tumor necrosis factor-receptor 1</i>
TRADD	<i>TNF-R1-associated death domain protein</i>
TRAF1/2	<i>TNF-receptor associated factor 1/2</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TZR	T-Zellrezeptor
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
X- α / β -Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- α / β -Galaktopyranosid
XIAP	<i>X chromosome linked IAP</i>

10 ANHANG

Lebenslauf:

Stephan Pohlmann

- 09.12.1977 Geboren in Dortmund-Brackel
- 1984-1988 Reichshof-Grundschule Dortmund
- 1988-1997 Immanuel-Kant-Gymnasium Dortmund
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
- 1997-1998 Zivildienst beim Behinderten Fahrdienst der Dormunder Energie
und Wasser/Stadtwerke Dortmund
- 1998-2003 Biologiestudium an der Ruhr-Universität Bochum
Diplomarbeit im Institut für Allgemeine und Molekulare Botanik
bei Prof. U. Kück/Arbeitsgruppe PD J. Nickelsen mit der
Gesamtnote: 1,2
Abschluss: Diplom-Biologe Diplom
Titel der Diplomarbeit: Molekulare Analyse photosynthetischer
Plastom Mutanten der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*
- 2003-2007 Dissertation an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
im Institut für Molekulare Medizin
bei Prof. K. Schulze-Osthoff

Teile meiner wissenschaftlichen Arbeit wurden bereits bzw. werden gerade veröffentlicht. Im Folgenden sind meine Kongressbeiträge und Publikationen meiner wissenschaftlichen Laufbahn erfasst.

Kongressbeiträge:

Essmann, F., Pohlmann, S., Schulze-Osthoff, K., Jänicke, R.U. Regulation von p53 bei Hochdosis-Bestrahlung und seine Bedeutung für die Apoptose, Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses, Juni 2005, Düsseldorf, Deutschland

Pohlmann, S., Essmann, F., Gillissen, B., Schulze-Osthoff, K., Jänicke, R.U. Irradiation induced translocation of p53 in the absence of apoptosis, 13th Euroconference on Apoptosis, Oktober 2005, Budapest, Ungarn

Jänicke, R.U., Essmann, F., Pohlmann, S. Schulze-Osthoff, K. Stress-induced mitochondrial translocation of p53 in the absence of apoptosis, Keystone Symposia Konferenz on „Stem Cells, Senescence and Cancer“, Oktober 2005, Singapore

Publikationen:

Essmann, F., Pohlmann, S., Gillissen, B., Daniel, P.T., Schulze-Osthoff, K., Jänicke, R.U. Irradiation-induced translocation of p53 to mitochondria in the absence of apoptosis Journal of Biological Chemistry, Vol. 280, Issue 44: 37169-37177, November 4, 2005

Totzke, G., Essmann, F., Pohlmann, S., Lindenblatt, C., Jänicke, R.U., Schulze-Osthoff, K. A novel member of the I κ B family, I κ B ζ inhibits transactivation of p65 and its DNA binding Journal of Biological Chemistry, Vol. 281, Issue 18: 12645-12654, May 5, 2006

Janssen, K., Pohlmann, S., Jänicke, R.U., Schulze-Osthoff, K., Fischer, U. Caspase-9, not caspase-10, mediates taxol-induced apoptosis in a Bax-controlled pathway Blood, in press, 2007

Pohlmann, S., Samraj, A., Janssen, K., Schulze-Osthoff, K. The role of the tyrosine kinase Lck in apoptosis Oncogene, in preparation, 2007

Pohlmann, S., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K., Totzke, G. I κ B ζ and its function as a key regulator in inflammation Journal of Biological Chemistry, in preparation, 2007

In dieser Dissertation wurden zahlreiche Aspekte bezüglich inflammatorischer und apoptotischer Prozesse untersucht. Die folgenden Abbildungen wurden in freundlicher Zusammenarbeit mit Dr. Frank Essmann erstellt: 6,7,8,9c,12,13a,13b,14.

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

Düsseldorf, den 11.05.2007

Danksagung:

Ich danke Herrn Prof. K. Schulze-Osthoff für die interessante Themenstellung, für die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen und für die fürsorgliche Betreuung der vorliegenden Dissertation.

Herrn Prof. H. Mehlhorn danke ich für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Gudrun Totzke für die tolle Betreuung und die gute Zusammenarbeit während dieser Arbeit. Für ihre motivierenden Worte und guten Ratschläge bin ich sehr dankbar.

Gleichermaßen möchte ich Herrn Dr. Frank Essmann danken, der mich durch meine Arbeit maßgeblich geleitet hat und mir eine große Hilfe mit seiner uneingeschränkten Unterstützung bei der Erstellung dieser Dissertation gewesen ist.

Herrn PD Dr. Reiner U. Jänicke danke ich für die außerordentliche Hilfe bei der Bearbeitung der p53-Thematik, die Durchsicht dieser Dissertation sowie für die harmonische und kollegiale Zusammenarbeit.

Frau Dr. Ute Fischer danke ich für die freundliche Zusammenarbeit, aufbauenden Worte und vor allem für die Möglichkeit einen Anteil zum „Taxol-Projekt“ zu leisten.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Dennis Sohn für die Hilfsbereitschaft und Zusammenarbeit während meiner Dissertation.

Meiner Projektkollegin Charlotte danke ich für die gute Zusammenarbeit und ein gutes Arbeitsklima.

Dem gesamten Institut für Molekulare Medizin, insbesondere Martin und Ajoy, möchte ich für eine tolle Zeit und eine „super“ Arbeitsatmosphäre danken.

Der wohl größte Dank geht an Katja, die mich durch alle Höhen und Tiefen des Doktorandenalltags begleitet und unterstützt hat. Für ihre menschliche Unterstützung bin ich sehr dankbar.

Neben meinen Arbeitskollegen möchte ich mich außerdem bei den wichtigsten Personen in meinem Leben bedanken: Meinen Eltern und meiner Freundin Amelie.

Meine Eltern danke ich für die Ermöglichung des langen Bildungsweges, die tolle Unterstützung und den uneingeschränkten Glauben an mich in all den Jahren.

Amelie danke ich für die aufbauenden Worte und die tolle Unterstützung bei allen Schwierigkeiten während meiner Promotion.