

Die Funktion des Transkriptionsfaktors AP-1 in der Apoptoseregulation

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr.rer.nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Hanna Bierbaum

aus

Bensheim

Bonn, September 2003

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Scheidtmann
2. Referent: Prof. Dr. Herrlich

Tag der Promotion:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung:	2
2.1. Der Transkriptionsfaktor AP-1	2
2.1.2. Regulation von AP-1	4
2.2. Die Apoptose	8
2.2.1. Auslöser und Signalwege der Apoptose	9
2.2.2. Apoptose in der T-Zellen-Entwicklung	12
2.2.3. Rolle von AP-1 in der Apoptose	14
2.3. Fragestellung	16
3. Material und Methoden	17
3.1. Material	17
3.1.1. Chemikalien und Bezugsquellen	17
3.1.2. Geräte und Verbrauchsmaterial	19
3.1.3. Radiochemikalien	20
3.1.4. Antikörper	20
3.1.5. Proben für Northern-Blot Analysen	21
3.1.6. Oligonukleotide für die PCR	21
3.1.7. Lösungen und Puffer	21
3.1.8. Zellen	21
3.1.9. Mäuse	22
3.2. Methoden	23
3.2.1. Allgemeine DNA -Techniken	
3.2.1.1. Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung	23
3.2.1.2. Fällung von Nucleinsäuren	23
3.2.1.3. Isolierung von genomischer DNA	23
3.2.1.4. Elektrophoretische Auftrennung von DNA	24
3.2.1.4. Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	24
3.2.1.5. Polymerase-Ketten-Reaktion	24
3.2.2. RNA-Methoden	25
3.2.2.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen	25

3.2.2.2. RT-PCR (Reverse -Transkriptase-PCR)	25
3.2.2.3. Quantitative „Real-Time“-PCR	26
3.2.2.4. Gelelektrophorese von RNA	26
3.2.2.5. Transfer von RNA auf Nylon-Membran (Northern Blot)	27
3.2.2.6. Hybridisierung von RNA	27
3.2.3. Protein-Methoden	27
3.2.3.1. Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen	27
3.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	28
3.2.3.3. SDS-Proteinacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	28
3.2.3.4. Transfer und Nachweis von Proteinen auf Membranen	29
3.2.4. Zellkultur	30
3.2.4.1. Trypsinieren von Zellen	30
3.2.4.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen	31
3.2.4.3. Apoptoseinduktion und Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Agenzien	31
3.2.4.4. Beschichtung von Zellkulturschalen	32
3.2.4.5. Isolierung primärer Zellen aus der Maus	32
3.2.5. FACS-Analyse	33
3.2.5.1. Detektion von Oberflächenproteinen mittels Antikörperfärbung	33
3.2.5.2. Detektion von Apoptose	33
4. Ergebnisse:	35
4.1. Teil 1: die Rolle von c-Fos in der Apoptoseregulation	35
4.1.1. Untersuchung der Zellpopulation der Milz von Wildtyp- und c-Fos-defizienten Mäusen	35
4.1.2. Normale Aktivierung der T-Zellen aus der Milz von c-Fos-defizienten Mäusen	37
4.1.3. Apoptoseinduktion in reifen T-Zellen ist c-Fos unabhängig	39
4.1.4. Apoptoseinduktion in c-Fos-defizienten Thymocyten	41
4.1.4.1. c-Fos ist nicht essentiell für die Apoptoseinduktion mit TPA oder Dexamethason in Thymocyten	42
4.1.4.2. Apoptoseinduktion mit CD95-L in Thymocyten ist c-Fos unabhängig	43

4.2. Ergebniss Teil 2: Die Rolle von JunB in der Apoptose	45
4.2.1. JunB Expression nach Stressinduktion	45
4.2.2. Verminderte Apoptoseantwort in JunB-defizienten Fibroblasten	45
4.2.3. Erhöhte Apoptoserate durch CD95-Ligand in JunB Null Fibroblasten	49
4.2.4. Mitochondrienaktivierung in JunB-defizienten Fibroblasten	51
4.2.5. CD95 Expression in JunB defizienten Zellen	52
4.2.5.1. Erhöhte CD95 Expression in <i>junB</i> ^{-/-} -Fibroblasten	52
4.2.5.2. JunB unabhängige CD95 Expression in verschiedenen Zelltypen	54
4.2.6. Erhöhte CD95-Liganden Expression in JunB-defizienten Fibroblasten	55
4.2.7. Normale Expression von p53 in <i>junB</i> ^{-/-} -Fibroblasten	56
4.2.8. Verminderte c-Jun Expression in JunB-defizienten Fibroblasten nach MMS- oder UV-Induktion	57
4.2.9. Expression und Aktivität der Stresskinasen in <i>junB</i> ^{-/-} -Fibroblasten	58
4.2.9.1. Expression und Phosphorylierung von p38 ist JunB unabhägig	58
4.2.9.2. Reduzierte Phosphorylierung von JNK nach UV-Bestrahlung oder MMS-Behandlung	59
4.2.10. JNK Phosphorylierung nach Anisomycin- und TNF-Behandlung	62
4.2.11. MKK4 Expression und Phosphorylierung	63
4.2.12. Phosphataseinhibitoren	64
4.2.13. Expression von MKP-1 in JunB-defizienten Fibroblasten	66
4.2.14. MKP-1 Expression in „gehungerten“ und TPA induzierten Zellen	69
5. Diskussion	70
5.1. Teil 1: Die Rolle von c-Fos in der T-Zellapoptose	70
5.1.2. Die Rolle von c-Fos in der Apoptoseinduktion von reifen, aktivierten T-Zellen der sMilz	71
5.1.3. Die Rolle von c-Fos in unreifen Thymozyten	72
5.2. JunB in der Apoptoseregulation in Fibroblasten	73
5.2.1 JunB als Repressor von CD95 und CD95-Ligand	73
5.2.1.2. JunB contra c-Jun im CD95-Signalweg	75
5.2.2. JunB in der stressinduzierten Apoptose	76
5.2.2.1. JNK in der stressinduzierten Apoptose	76
5.2.2.2. JunB als repressor von MKP-1	78

5.2.2.3. Kinasen contra Phosphatasen	80
5.2.3. JunB als pro- und antiapoptotischer Regulator der Apoptose	81
6. Literatur	84
Anhang	95

Abkürzungsverzeichnis

Die verwendeten Einheiten entsprechen dem internationalen Standard (SI-Einheiten)

Abb.	Abbildung
AP-1	Aktivator Protein-1
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF	aktivierender Transkriptionsfaktor
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bZip	basische Region und „Leucine-Zipper“
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-3'-Monophosphat
ConA	Concavalin A
cDNA	Komplementäre DNA
cpm	„counts per minute“, Signale pro Minute
d	„day“, Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	„Dulbecco's minimal essential medium“, Nährmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	„enhanced chemoluminescence“, verstärkte Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ERK	„Extracellular signal regulated Kinase“, MAP-Kinase
FACS	„Fluorescence activated cell sorter“, Durchflußzytometer
f.c.	Endkonzentration
FCS	fötales Kälberserum
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat (grün fluoreszierender Farbstoff)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GR	Glukokortikoidrezeptor
GST	Glutathion-S-Transferase
h	„hour“, Stunde
H ₂ O	deionisiertes Wasser
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanosulfonsäure
IL-1	Interleukin 1
JNK	Jun-N-terminale-Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

M	molar (Mol/Liter)
M-Phase	Mitose
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MBq	Megabequerel
MEF	embryonale Mausfibroblasten
MEK	MAPK/ERK-Kinase
min	Minute
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
MMS	Methylmethansulfonat
mRNA	„Messenger ribonucleic acid“, Boten RNA
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion
s	Sekunde
S-Phase	DNA-Synthesephase
SAPK	Stress aktivierte Proteinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat/EDTA
TCF	„Ternary complex factor“, Transkriptionsfaktor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TPA	12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
TRE	„TPA- responsive element“
Tris	tris-Hydroxymethylaminomethan
UV	ultraviolette Strahlung
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp

Zusammenfassung

Für einen adulten höheren Organismus ist es wichtig unnötige oder durch angehäufte Mutationen entartete Zellen entfernen zu können. Dies geschieht über den Vorgang des programmierten Zelltodes, Apoptose, bei dessen Regulation Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle spielen. Einer dieser Transkriptionsfaktoren ist AP-1, der in Antwort auf Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone, alkylierende Agenzien und andere Stressfaktoren Genexpression reguliert. AP-1 beschreibt eine Sammlung von Dimeren, die sich aus Proteinen der Jun-, Fos-, und ATF-Familie zusammensetzen. Frühere Studien haben gezeigt, dass einige AP-1 Mitglieder abhängig von den Stimuli und dem Zelltyp eine wichtige Rolle in der Regulation der Apoptose spielen. Während es über die Rolle von c-Fos in der Apoptose kontroverse Aussagen gibt, ist die Funktion von c-Jun in der Stressantwort durch Apoptose in Fibroblasten bisher gut untersucht. Dort ist c-Jun für die Aktivierung des CD95-Liganden verantwortlich. Über die Rolle des Antagonisten von c-Jun nämlich JunB bei der Apoptose-Regulation war bisher noch nichts bekannt.

Im ersten Teil der Arbeit habe ich die Funktion von c-Fos in der T-Zellapoptose untersucht. Dafür wurden reife T-Zellen aus dem Thymus und der Milz sowie Thymozyten von c-Fos-defizienten Mäusen isoliert, kultiviert und die Apoptoseantwort nach verschiedenen Stimuli untersucht. Es konnte kein Defekt in der T-Zellentwicklung oder Aktivierung in c-Fos-defizienten T-Zellen und Thymozyten festgestellt werden. Auch die Untersuchung des AICD (activation induced cell death) in isolierten reifen T-Zellen der Milz zeigte, dass der AICD unabhängig von c-Fos reguliert wird.

Im zweiten Teil meiner Arbeit konnte ich erstmals, unter Verwendung von JunB defizienten Fibroblasten die Rolle von JunB bei der Apoptoseregulation funktionell aufklären. Dabei nimmt JunB abhängig von dem auslösenden Signalweg sowohl pro- als auch antiapoptotische Funktionen ein. Die Überexpression von CD95 und CD95-Liganden führt, in den hier verwendeten JunB defizienten Fibroblasten, zu einer sehr deutlichen Hypersensitivität gegenüber einer Behandlung mit dem CD95-Liganden. Durch die Reprimierung der Expression von CD95 und CD95-Ligand ist JunB maßgeblich an der Regulation des CD95-Signalweges beteiligt und übt dadurch eine antiapoptotische Funktion aus. Im Gegensatz dazu wirkt bei stressinduzierenden Stimuli JunB proapoptotisch, indem es die Regulation der MKP-1 Expression negativ kontrolliert. Als Folge der erhöhten MKP-1 Menge tritt in den JunB-defizienten Zellen eine reduzierte Aktivierung von JNK auf. JunB wirkt auf alle drei neu identifizierten Zielgene (CD95, CD95-L, MKP1) reprimierend. Ob dies über eine direkte Bindung an die Promotoren oder indirekt über andere Zielgene reguliert wird, ist nicht geklärt. Für eine Aktivierung der Mitochondrien nach Stressinduktion wird die aktivierte Form der JNK benötigt. Die Befunde dieser Arbeit zeigen, dass JunB und c-Jun in der Regulation des CD95-Signalweges in Fibroblasten antagonistisch, und in der stressinduzierten Apoptose protagonistisch.

2. Einleitung:

In einem mehrzelligen Organismus werden Vorgänge wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung oder Zelltod durch die Regulation spezifischer Gene koordiniert. Die Expression dieser Gene wird durch externe Faktoren gesteuert, zu denen Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone gehören. Diese externen Faktoren aktivieren Signalkaskaden in der Zelle, die aus Proteinkinasen, Phosphatasen und Kaspasen bestehen. Am Endpunkt einer solchen Signalkaskade stehen häufig Transkriptionsfaktoren. Die Bindung dieser Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA-Sequenzen bzw. die Interaktion der gebundenen Faktoren mit dem RNA-PolymeraseII-Initiationskomplex steuert die Transkription des jeweiligen Zielgens. Allgemein regulieren Transkriptionsfaktoren die Genexpression in der Zelle und vermitteln so die Reaktion der Zelle auf bestimmte externe Faktoren.

2.1. Der Transkriptionsfaktor AP-1

AP-1 (Aktivierendes Protein-1) ist ein solcher Transkriptionsfaktor, der verschiedene Prozesse in einer Zelle reguliert. Er spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Differenzierung, Zellproliferation und bei der Apoptose, dem programmierten Zelltod. Dabei wird die von AP-1 vermittelte Genexpression durch externe Faktoren gesteuert. AP-1 setzt sich aus Proteinen der *jun-*, *fos-*, und *ATF*-Genfamilie zusammen. Die Familie der Jun-Proteine besteht aus c-Jun, JunD und JunB, die der Fos-Familie aus c-Fos, FosB, Fra-1 und Fra-2 und die der ATF-Familie aus ATF-2, ATF-3/LRF1 und BH-ATF (Übersichtsartikel siehe: Vogt und Bos, 1990; Angel und Karin 1991; Karin et al., 1997). Typisch für die AP-1 Proteine ist der Leucin-Zipper, über den die einzelnen Mitglieder der verschiedenen Proteinfamilien dimerisieren. Es gibt Homodimere aus Proteinen der Jun- oder ATF-Familie und Heterodimere aus Proteinen der Jun-Familie assoziiert mit Proteinen der ATF- und/oder der Fos-Familie. Die Mitglieder der Fos-Familie bilden keine Homodimere. Da jedoch die Dimerisierung Voraussetzung für eine DNA-Bindung ist, können diese jedoch nicht alleine an die DNA binden (Übersichtsartikel siehe: Vogt 2002).

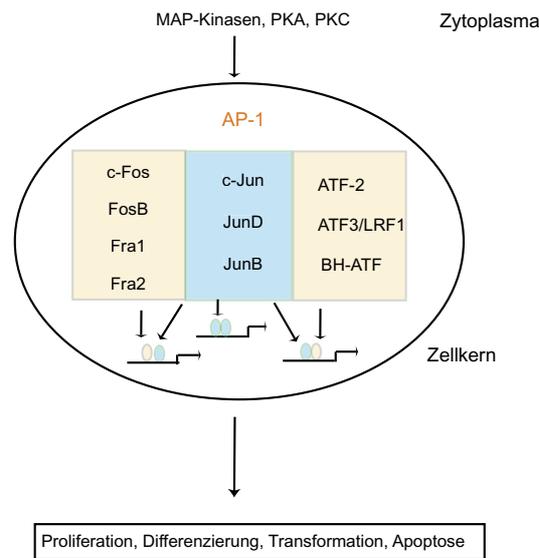


Abb.1: Schematische Darstellung der Zusammensetzung des Transkriptionsfaktors AP-1

Der Leucin-Zipper liegt in einer stark konservierten Region aus 60 Aminosäuren, der sogenannten bZIP-Region (Landschulz et al., 1988). Sie beinhaltet ausser dem Leucin-Zipper eine basische Region als eine weitere funktionale Proteindomäne (Landschulz et al., 1988; Kouzarides und Ziff 1988; Sassone-Corsi et al., 1988; Gentz et al 1989; Neuberg et al 1989). Diese besteht aus 12 bis 14 Aminosäuren und ist verantwortlich für die sequenzspezifische DNA-Bindung an die sogenannte TRE-Sequenz („TPA responsive element“ $TGA_{c}/GTCA$).

Durch die Möglichkeit verschiedene Dimere zu bilden, ergibt sich eine große Anzahl verschiedener Kombinationen der AP-1 Mitglieder untereinander. Die Spezifität, mit der die Dimere an die DNA binden, und ihre Funktion ist dabei abhängig von der Zusammensetzung der Dimere (Hai und Curran, 1991). Es gibt weitere bZIP-Proteine, die mit Jun und Fos dimerisieren, z.B. die MAF-Proteine (v-Maf, c-Maf), das Genprodukt des neuronalen retina-spezifischen Gens (Nishizawa et al., 1989, Swaroop et al., 1992), sowie JDP1 und JDP2, die mit Jun dimerisieren (Aronheim et al., 1997).

Der N-terminale Bereich der AP-1 Mitglieder ist für die Interaktion mit der Transkriptionsmaschinerie verantwortlich, wodurch die Transkriptionsrate des Zielgens beeinflusst wird (Bohmann et al., 1998; Angel et al., 1989). Mittlerweile sind eine Vielzahl verschiedener Zielgene bekannt, deren Transkription durch AP-1 reguliert wird. Dazu gehören Wachstumsfaktoren, verschiedene Metalloproteinasen, Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusregulatoren, zelltypspezifische Genprodukte und Apoptoseregulatoren (Übersichtsartikel siehe: Shaulian 2001).

Bei der Regulation der Zielgene können die einzelnen Mitglieder des Transkriptionsfaktors AP-1 auch antagonistische Funktionen haben. Dies wurde insbesondere für die zwei Mitglieder der Jun-Familie c-Jun und JunB gezeigt. So wird die Transaktivierung von verschiedenen AP-1 Reportergenen von c-Jun und JunB antagonistisch reguliert (Chiu et al., 1989) und auch bei der Ras-abhängigen Transformation von Zellen haben c-Jun und JunB gegensätzliche Funktionen (Schütte et al., 1988). Das Fehlen von c-Jun in Fibroblasten führt zu einer verlangsamten Proliferation, aufgrund einer reduzierten Transkription der c-Jun abhängigen Zellzyklus-Regulatoren Zyklin D1, p53 und dessen Zielgens p21 (Schreiber et al. 1999; Wisdom et al., 1999). Demnach wird c-Jun als ein positiver Regulator des Zellzyklusses angesehen, während JunB eher als ein negativer Regulator beschrieben wird. Die c-Jun vermittelte Zyklin D1-Expression wird von JunB antagonistisch zu c-Jun reguliert. So wird im Gegensatz zu den *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten in JunB-defizienten Zellen, Zyklin D1 verstärkt exprimiert, da p16, der Inhibitor von Zyklin D1, durch JunB in diesen Zellen nicht mehr aktiviert wird (Passague et al., 2000; Andrecht 2001). Korrespondierend zu den JunB-defizienten Fibroblasten zeigen JunB überexprimierende Fibroblasten eine reduzierte Expression von Zyklin D1 (Bakiri et al., 2000). Die Expression von KGF und GM-CSF, zwei Keratinozyten-Wachstumsfaktoren, welche die Differenzierung und Proliferation der epidermalen Zellen in der Haut regulieren, wird von c-Jun und JunB ebenfalls antagonistisch kontrolliert (Szabowski et al., 2000). Je nachdem, ob in organotypischen Kokulturen JunB-defiziente oder c-Jun-defiziente Fibroblasten verwendet wurden, zeigten sich zwei gegensätzliche Phänotypen. Kokulturen mit c-Jun-defizienten Fibroblasten entwickeln ein dünnes Epithel von Keratinozyten mit einer geringen Anzahl an proliferierenden Zellen im *stratum basale*. Im Gegensatz dazu ist das Epithel einer Kokultur mit JunB-defizienten Fibroblasten aufgrund einer Hyperproliferation der Keratinozyten verdickt (Szabowski et al., 2000; Maas-Szabowski et al., 2001).

2.1.2. Regulation von AP-1

AP-1 gehört zu den „immediate early genes“, welche sehr früh auch ohne eine vorherige Proteinsynthese exprimiert werden, und lässt sich durch verschiedene externe Faktoren aktivieren. Dies sind unter anderem Tumorpromotoren wie TPA, Zytokine, Wachstumsfaktoren, alkylierende Agenzien und UV-Strahlung. Durch diese wird AP-1 in der Zelle transkriptionell aktiviert und/oder posttranslational modifiziert.

Durch Wachstumsfaktoren und TPA wird die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, sie wirkt als Serin/Theronin Kinase und ist an der Aktivierung von AP-1 beteiligt. Die PKC-Kaskade mündet nach der Aktivierung von PKC über Raf-1 in der MAP-Kinasenkaskade (Übersichtsartikel siehe: Marshall 1995) bei ERK (Extrazellulär Signal-regulierte Kinase), welche dann Zielproteine (darunter auch einige AP-1 Mitglieder) phosphoryliert. Eine

andere Kinase, die Proteinkinase A (PKA), wird durch den sekundären Botenstoff cAMP aktiviert und reguliert ebenfalls die Aktivität von AP-1. Die Induktion der PKA-Kaskade führt im Zellkern zur Regulation von Genen, die ein sogenanntes „cAMP responsive element“ (CRE; TGACGTA) in ihrem Promotor aufweisen. Die AP-1 Mitglieder JunB, c-Fos und auch c-Jun tragen diese CRE-Sequenz in ihrem Promotor und sind daher durch veränderte cAMP-Spiegel regulierbar (Schorpp-Kistner et al., 2001). An diese CRE-Erkennungssequenzen binden hauptsächlich Proteine der CREB-Familie (CRE-bindendes-Protein). Die PKA-Signalkaskade und die Proteinkinase C-Kaskade können antagonistische Funktionen einnehmen. Eine solche antagonistische Funktion üben PKC und PKA bei der Regulation des *c-jun* Gens aus, wohingegen sie bei der Regulation des *junB*-Promotors synergetisch wirken (Karin und Smeal 1992).

Die posttranslationale Modifizierung durch Phosphorylierung geschieht durch Kinasen, die Endpunkte verschiedener Signaltransduktionskaskaden sind. Am besten ist dies für c-Jun untersucht worden. Dort führt die Phosphorylierung durch JNK (c-Jun N-terminale Kinase) an den Serine 63 und 73 zu einer verstärkten Transaktivierung (Smeal et al., 1991 und 1992) und verlängert die Halbwertszeit des Proteins (Treier et al., 1994).

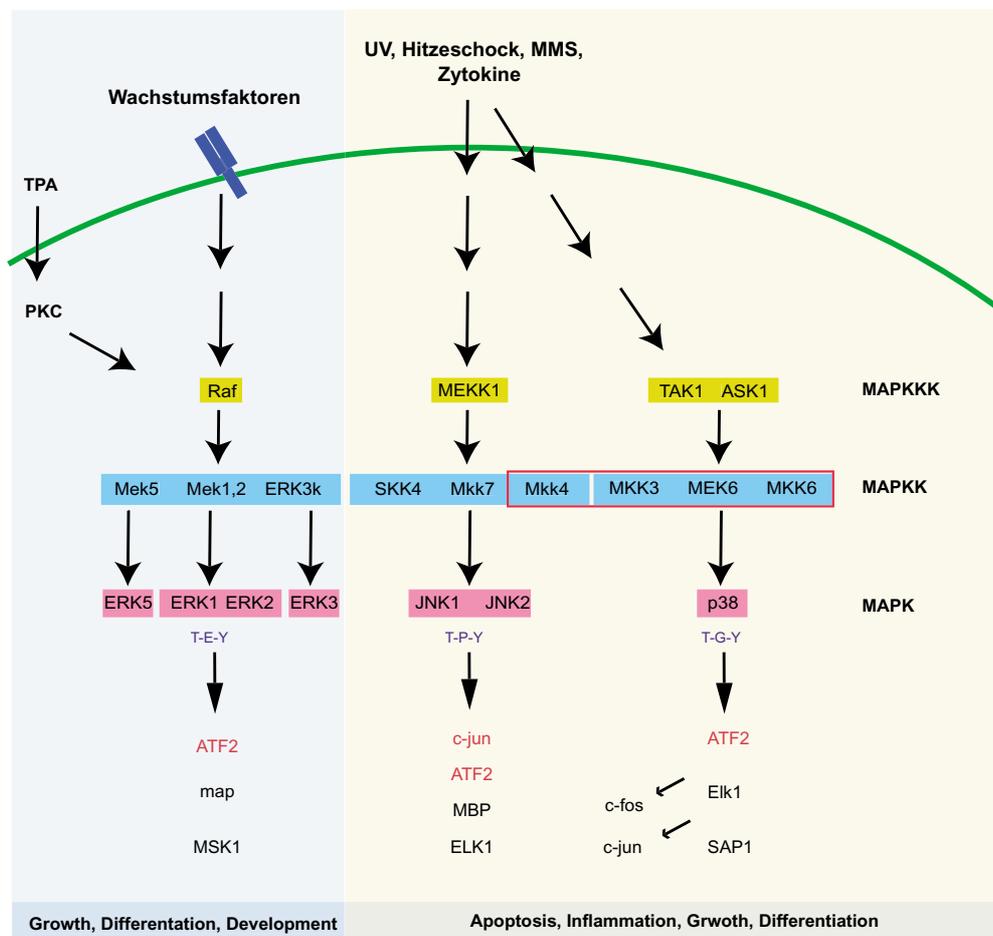


Abb.2.: Schematische Darstellung der MAP-Kinasen Kaskade

JNK ist ein Mitglied einer größeren Familie, den MAP Kinasen, die nach Behandlung der Zellen mit UV-Strahlung, Hitzeschock, zellulärem Stress, alkylierenden Agenzien, TPA, Zytokinen und Wachstumsfaktoren als Folge der Aktivierung verschiedener Rezeptoren-Tyrosin-Kinasen ebenfalls aktiviert werden. Zur Familie der MAP-Kinasen gehören neben JNK (c-Jun N-terminale Kinasen auch als Stress aktivierte Kinasen SAPK bezeichnet), ERK1 und ERK2 (extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen), und p38 (Minden und Karin 1997; Abb. 2). Die Aktivierung der MAP-Kinasen nach unterschiedlichen Stimuli ist hochkonserviert und erfolgt nach einem gemeinsamen Schema: Sie werden durch Phosphorylierung an Threonin und Tyrosin aktiviert. Hierfür sind die in der Signalkaskade oberhalb liegenden MAP-Kinasen-Kinasen verantwortlich, welche ihrerseits von stromaufwärtsliegenden Kinasen (MAPKKK) an Serin und/oder Threonin phosphoryliert und aktiviert werden (Abb. 2).

Die Signalkette, welche durch Wachstumsfaktoren und Phorbolster ausgelöst wird, aktiviert Raf, welches zur Phosphorylierung von MEK5, MEK1 und MEK2 sowie ERK3k führt. Von ihnen werden ERK1 und ERK2 aktiviert, welche ihrerseits hauptsächlich die Transkriptionsfaktoren TCF („ternary complex factor“) und Elk-1 modifizieren.

JNK und p38 sind sogenannte „Stress induzierte Kinasen“ und werden durch Zytokine und zellulären Stress wie Hitzeschock, UV-Bestrahlung, osmotischen Schock und alkylierende Agenzien aktiviert. Die Aktivierung von JNK wird von den stromaufwärts liegenden Kinasen MKK4 und MKK7 reguliert, wobei MKK4 auch p38 phosphoryliert. p38 wird neben MKK4 auch von den Kinasen MKK3 und MKK6 aktiviert (Übersichtsartikel siehe: Whitmarsh und Davis 1996). Die JNKs phosphorylieren und aktivieren bevorzugt c-Jun an den Serinen 63 und 73, darüber hinaus auch TCF/Elk1 und ATF-2 (Karin, 1995; Karin und Hunter, 1995; van Dam et al 1995). p38 aktiviert ebenfalls ATF-2 und zusätzlich den Transkriptionsfaktor Max (Kyriakis und Avruch 1996).

Die Aktivierung von TCF/Elk1, der zusammen mit SRF („serum response factor“) an das „serum response element“ (SRE) im *c-fos*-Promoter bindet, führt zur transkriptionellen Aktivierung von *c-fos*. Eine Hyperphosphorylierung von c-Jun und ATF-2, die schon in unstimulierten Zellen an den *c-jun*-Promotor gebunden sind, führt zur transkriptionellen Aktivierung von *c-jun* (Herr et al., 1994). Allgemein führt die Phosphorylierung durch die MAPK zur raschen Expression der *c-jun*-, *junB*- und *c-fos*-Gene („immediate early genes“) und zur anschließenden Modulierung der Transkription von AP-1 Zielgenen (Karin et al., 1997).

Neben der Phosphorylierung bieten die Protein-Protein-Interaktionen eine weitere posttranslationale Regulationsmöglichkeit von AP-1. So hemmen sich MyoD und c-Jun gegenseitig durch direkte Interaktion (Su et al., 1991; Li et al. 1992; Bengal et al., 1992). Der Glukokortikoid-Rezeptor (GR) ist nach Aktivierung in der Lage, die c-Jun/c-Fos

vermittelte TPA-induzierte Transaktivierung zu hemmen. Dies ist z.B. bei der Regulation des Kollagenase-Gens der Fall (Teurich und Angel 1995; Jonat et al., 1990; Yang Yen et al., 1990; Schüle et al., 1990; Miner et al., 1992). Dieser Mechanismus ist unabhängig von der Bindung des GR an die DNA (Reichardt et al., 1998; Tuckermann et al., 1999).

Die Funktionen der einzelnen AP-1 Familienmitglieder können durch unterschiedliche experimentelle Ansätze, wie Überexpression der einzelnen Proteine oder das Einsetzen von dominant-negativ wirkenden Mutanten untersucht werden. Dies ermöglicht jedoch nicht die Analyse einzelner AP-1 Mitglieder im komplexen Organismus. Das am besten geeignete System zur Analyse der Funktion eines einzelnen AP-1 Mitgliedes im Organismus ist das gezielte Ausschalten des jeweiligen Gens („knock out“), z. B. durch homologe Rekombination in der Maus. Dabei zeigte sich, dass die einzelnen Mitglieder der AP-1 Familie spezifische Funktionen übernehmen. Einige Mitglieder wie z.B. c-Jun, JunB und Fra1 sind schon während der Embryogenese lebensnotwendig. Mäuse, die eines dieser Proteine nicht exprimieren, sterben schon während der Embryonalentwicklung (Hilberg et al., 1993, Johnson et al., 1993; Schorpp-Kistner et al., 1998). c-Fos-, ATF2-, FosB- und JunD-defiziente Mäuse sind lebensfähig. Männliche *junD*^{-/-}-Mäuse zeigen altersabhängige Defekte in den Reproduktionsorganen (Thepot et al., 2000). Die *fosB*^{-/-}-Mäuse zeigen ein verändertes Verhalten in der Aufzucht und Pflege ihrer Nachkommen

Mitglied	Phänotyp	Betroffene Organ(e) und Zelltypen	Literatur
c-Fos	Osteopetrose	Knochen und Osteoklasten	Wang et al., (1992); Johnson et al., (1992)
Fos B	Aufzuchsdefekte	Gehirn und Hypothalamus	Gruda et al., (1996); Brown et al., (1996)
Fra-1	Embryonal letal (E9.5)	Extraembryonales Gewebe, Dottersack, Plazenta	Schreiber et al., (2000)
c-Jun	Embryonal letal (E12.5)	Herz, Leber, und Hepatoblasten	Hilberg et al., (1993); Johnson et al., (1993); Eferl et al., (1999)
JunD	Männliche Sterilität	Hoden und Spermien	Thepot et al., (2000)
JunB	Embryonal letal (E8.5)	Extraembryonales Gewebe,	Kistner et al., (1999)
ATF-2	Mekonium Aspiration Syndrom	Lunge, Zytotrophoblasten in der Plazenta	Maekawa et al., (1999)

Tabelle1 : Übersicht über die verschiedenen AP-1-defizienten Mäuse

(Brown et al., 1996). Mäuse, die nur sehr wenig ATF-2 Protein exprimieren, zeigen Defekte im Zentralnervensystem (Reimold et al., 1996) und in der Chondrozyten Proliferation (Beier et al., 1999). ATF-2-defiziente Mäuse sterben kurz nach der Geburt an einer Krankheit, die dem Mekonium Aspiration Syndrom des Menschen sehr ähnelt (Maekawa et al., 1999). In *c-fos*^{-/-}-Mäusen entsteht Osteopetrose, da diese Tiere keine terminale Differenzierung von Oestoklasten aufweisen (Wang et al., 1992; Grigoriadis et al., 1994). Anhand dieser verschiedenen Mausmodelle wird deutlich, dass die einzelnen Mitglieder des AP-1 Transkriptionsfaktors für unterschiedliche biologische Prozesse essentiell sind und dass es nicht bei allen Proteinen zu einer Kompensation durch andere Mitglieder der Familie kommt. Die Isolation von Zellen aus diesen Mäusen ermöglicht die Analyse der spezifischen Funktion einzelnen AP-1 Mitglieder in einem eng definierten Zellsystem. Mit Hilfe dieser isolierten Zellen wurde die Rolle einiger der verschiedenen AP-1 Mitglieder im Zellzyklus, in der Differenzierung und in der Apoptose untersucht (Übersichtsartikel siehe: Jochum et al., 2001).

2.2. Die Apoptose

Prinzipiell sind zwei verschiedene Formen von Zelltod in mehrzelligen Organismen bekannt: Nekrose und Apoptose (Übersichtsartikel siehe: Raff 1998).

Nekrose ist die passive Form des Absterbens aufgrund von physikalischen oder chemischen Einwirkungen. Hierbei kommt es um das nekrotische Gewebe herum zu einer Entzündungsreaktion, was beim programmierten Zelltod nicht auftritt. Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, ist die physiologische Form des Zelltodes und beruht auf einem bei allen höheren Organismen hochkonservierten Programm. Zu Beginn der Apoptose löst sich die Zelle vom umliegenden Gewebe ab, fängt an zu schrumpfen und zeigt nach einiger Zeit bläschenförmige Ausstülpungen auf der Zelloberfläche. Das Chromatin im Zellkern kondensiert, die DNA wird von DNAsen fragmentiert und der Zellkern zerfällt in Chromatin enthaltende Fragmente. Diese Fragmente werden mit anderen Organellen von der Zelle in sogenannten apoptotischen Körperchen („apoptotic bodies“) abgeschnürt. Die apoptotischen Körperchen werden sehr schnell von Nachbarzellen und Makrophagen phagozytiert. Daher kommt es zu keiner Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe (Übersichtsartikel siehe: Raff 1998).

Apoptose ist existentiell für jeden mehrzelligen Organismus. Während der Entwicklung eines Embryos wird ständig Gewebe durch Apoptose entfernt, so z.B. das Verbindungsgewebe zwischen den Fingern („Schwimnhäute“) während der Entwicklung eines humanen Embryos. Auch im adulten Organismus werden ständig geschädigte Zellen durch die Aktivierung des programmierten Zelltodes entfernt. Verschiedene humane Krankheiten lassen sich auf Defekte in diesem Prozess zurückführen. Bei unzureichender Apoptose kann es zu Autoimmunkrankheiten und Krebs kommen, während übermäßige Apoptose z.B. bei der Alzheimer Krankheit zu beobachten ist (Übersichtsartikel siehe: Duke et al., 1997).

2.2.1. Auslöser und Signalwege der Apoptose

Der Apoptoseprozess ist abhängig von der Aufnahme verschiedener extrazellulärer und intrazellulärer Signale, der Integration und Amplifikation dieser Signale durch sekundäre Botenstoffe und letztendlich von der Aktivierung der Todeseffektor-Proteasen (Kaspasen). Apoptose kann von extrazellulären Signalen aus der Umgebung oder von intrazellulären Sensoren, die die DNA überwachen, aktiviert oder gehemmt werden (Übersichtsartikel siehe: Dragovich et al., 1998).

Bei der Apoptoseaktivierung werden drei klassische Signalwege unterschieden. Der erste wird durch Serumentzug initiiert und wird von der Bcl-2 Familie reguliert. Der zweite Signalweg wird durch die Todesrezeptoren aktiviert und der dritte durch Schädigung der DNA, wobei unter anderem p53 eine wichtige Rolle spielt (Übersichtsartikel siehe: Dragovich et al., 1998; Abb. 3).

Für den Verlauf des programmierten Zelltodes wird zur Zeit von einem Drei-Stufen-Model ausgegangen. In der ersten Initiations-Phase werden die Signalkaskaden aktiviert. Bei der zweiten Phase, der Entscheidungs-/Effektor-Phase, kommt es zur Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Dies aktiviert dann die Signalkaskaden der Mitochondrien. In der dritten Phase, der Degradations-Phase, aktivieren aus den Mitochondrien freigesetzte Proteine Proteasen und Nukleasen (Übersichtsartikel siehe: Loeffler und Kroemer 2000; Abb. 3).

Externe Signale, die die Apoptose induzieren können, sind z.B. die Liganden der Todesrezeptoren. Die Todesrezeptoren gehören zur Superfamilie der Tumor Nekrose Faktor (TNF) Rezeptoren, für die eine Cystein-reiche extrazelluläre Domäne charakteristisch ist. Für die Weiterleitung des Signals ist eine intrazelluläre sogenannte Todesdomäne verantwortlich. Die bekanntesten und bestuntersuchten Todesrezeptoren sind TNF-R und CD95 (Fas). Durch Bindung des CD95-Liganden kommt es zur Trimerisierung und Aktivierung des Rezeptors, an den über die eigene Todesdomäne das Adapterprotein FADD (Fas assoziierte Todesdomäne) bindet. FADD enthält neben der Todesdomäne eine sogenannte Todeseffektor-Domäne, an welche Kaspase 8 bindet (Übersichtsartikel siehe: Krammer 1999). Nach der Bindung an FADD kommt es durch Autoproteolyse, zur Aktivierung von Kaspase 8, wodurch eine Kaspasenkaskade initiiert wird, an deren Ende die verschiedenen Todessubstrate stehen. Zusammen mit CD95 bilden Kaspase 8 (auch als FLICE bezeichnet) und FADD den DISC („death-inducing-signal-complex“) (Übersichtsartikel siehe: Krammer 1999; Schulze-Osthoff et al., 1998; Ashkenazi und Dixit 1998). Die direkte Aktivierung der Kaspasenkaskade durch die Todesrezeptoren findet nur in den sogenannten Typ1-Zellen statt. Dazu gehören vor allem Thymocyten und reife T-Zellen (Scaffidi et al., 1998).

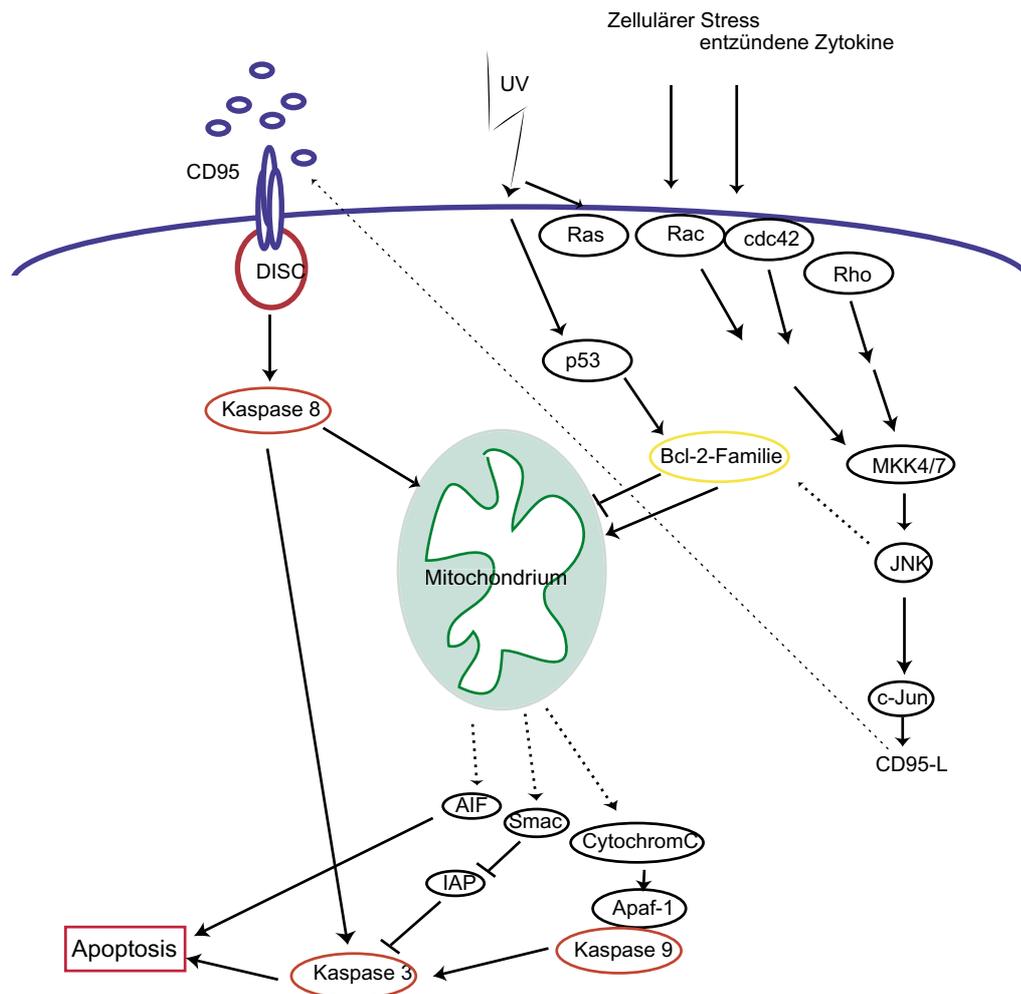


Abb. 3 Schematische Darstellung einiger der wichtigsten Signalwege im programmierten Zelltod

In den meisten Zellen, den sogenannten Typ-2 Zellen, führt die Aktivierung der Kaspase 8 zu einer Aktivierung der Mitochondrien (Scaffidi et al., 1998). Durch die Freisetzung von verschiedenen proapoptotischen Proteinen aus den Mitochondrien wird das Signal amplifiziert. Das bekannteste dieser ins Zytoplasma freigesetzten Mitochondrien-Proteine ist Cytochrom C, welches die Kaspasenaktivierung initiiert. Cytochrom C bindet im Zytoplasma Apaf-1, welches eine Kaspase-Rekrutierungs-Domäne (CARD) besitzt (Übersichtsartikel siehe: Wang et al., 2001). Dadurch wird die Affinität von Apaf-1 an ATP erhöht. Die Bindung des Nukleotids an den CytochromC/Apaf-1-Komplex verursacht eine Oligomerisierung zu einem Multimer aus mehreren Cytochrom C- und Apaf-1-Untereinheiten, das als Apoptosom bezeichnet wird. Über die CARD-Domäne der Apaf-1 Proteinuntereinheiten in diesem Multimer werden dann Prokaspasen 9 rekrutiert, die sich autokatalytisch aktivieren. Nur die Kaspase 9 ist fähig, die stromabwärts liegenden Effektor-kaspasen (z.B. Kaspase 3) zu aktivieren (Übersichtsartikel siehe: Wang et al., 2001). Außer Cytochrom C setzen die aktivierten Mitochondrien auch Smac frei, welches

IAPs (inhibierende-Apoptose-Proteine) bindet. Diese IAPs binden und hemmen die Kaspasen, wohingegen die Bindung mit Smac Kaspasen freisetzt und aktiviert (Übersichtsartikel siehe: Wang et al., 2001). AIF (Apoptosis-induzierender-Faktor) ist eine Nuklease, die ebenfalls aus den Mitochondrien freigesetzt wird, in den Nukleus wandert und dort eine Chromatinkondensation und (im großen Maßstab,) DNA Fragmentierung verursacht (LaCasse et al., 1998). Eine weitere Nuklease, die aus den Mitochondrien freigesetzt wird und die DNA Fragmentierung im Nukleus induziert, ist die Endonuklease G (EndoG). Die Identifizierung von AIF und EndoG zeigten, dass das Apoptoseprogramm nach der Aktivierung der Mitochondrien auch in der Abwesenheit der Kaspasen fortgesetzt werden kann. In diesem Fall starten die Mitochondrien ein Apoptoseprogramm, welches parallel zur Kaspasenaktivierung abläuft (Übersichtsartikel siehe: Wang et al., 2001).

Die Aktivierung der Mitochondrien ist bei Apoptoseinduktion durch Todes-Liganden kaspasenabhängig (über Kaspase 8), während die Aktivierung der Mitochondrien, z. B. nach UV-Bestrahlung oder Staurosporin, kaspasenunabhängig ist (Übersichtsartikel siehe: Green und Reed 1998). Kontrolliert wird die Aktivität der Mitochondrien von der Bcl-2 Familie, welche sowohl antiapoptotische (z. B. Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w und CED-9), als auch proapoptotische Funktionen haben (z. B. Bax, Bak, Bok, Blk). Diese Proteinfamilie bildet Membranporen, die das Membranpotential der Mitochondrien und damit ihre Aktivität regulieren (Übersichtsartikel siehe: Adams und Cory 1998; Gross et al., 1999). Nach Behandlungen wie UV-Bestrahlung und Staurosporin wird die Apoptose durch die BCL-2 Proteinfamilie gesteuert. So wird nach UV-Bestrahlung p53 aktiviert, das mehrere proapoptotische Zielgene induziert. Unter diesen befindet sich auch Bax, welches mit anderen Bcl2-Mitgliedern Mitochondrienmembranporen bildet und so an der Freisetzung der proapoptotischen Proteine maßgeblich beteiligt ist (Übersichtsartikel siehe: Wang 2001). Auch JNK scheint eine bedeutende Rolle in der Mitochondrienaktivierung zu spielen. Möglicherweise wird Bcl-2 durch JNK spezifische Phosphorylierung deaktiviert. Dies ist aber bisher noch nicht abschließend geklärt (Übersichtsartikel siehe: Davis 2000). Hinweise auf eine wichtige Rolle von JNK in der Mitochondrienaktivierung liefern die *JNK1/2^{-/-}*-Fibroblasten, welche gegen UV-Bestrahlung, Anisomycin oder MMS (Methylmethanesulfonate) Behandlung resistent sind. In diesen Zellen werden die Effektor-kaspasen nicht aktiviert, was auf die fehlende Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien zurückzuführen ist (Tournier et al 2000). Allerdings zeigen diese JNK1/2-defizienten Fibroblasten keinen Defekt in der CD95-Liganden induzierten Apoptose (Übersichtsartikel siehe: Davis 2000), wogegen andere Apoptoseinduktionen, wie z.B. durch MMS-, Anisomycin- und UV-Behandlung, durch eine Hemmung von JNK verhindert werden.

Je nach Zelltyp sind verschiedene Signalwege in der Zelle dominierend. In den meisten Zellen ist die Aktivierung der Mitochondrien maßgeblich (Typ2 Zellen). In den sogenannten Typ1 Zellen wird keine Mitochondrienaktivierung benötigt, um den programmierten Zelltod herbeizuführen. Interessanterweise sind im Immunsystem sowohl Typ1-, als auch Typ2-Zellen vorzufinden (Scaffidi et al 1998). Da in einem adulten Organismus Apoptose insbesondere bei der Entwicklung und Kontrolle der T-Zellen wichtig ist, sind diese ein sehr geeignetes System um prinzipielle Apoptosemechanismen zu analysieren.

2.2.2. Apoptose in der T-Zellen-Entwicklung

Die körpereigene Abwehr gegen bakterielle, virale und parasitäre Pathogene ist ein komplexer Vorgang, der auf einer Reihe unterschiedlicher Mechanismen beruht. Das Immunsystem muss angemessene pathogenspezifische Antworten einleiten und koordinieren. Dazu bedarf es u.a. eines Repertoires an antigenspezifischen T-Zellen. Diese werden aus einem Selektionsprogramm rekrutiert, welches auf dem Mechanismus der Apoptose beruht. Auch die Beseitigung nicht mehr benötigter, immunkompetenter Zellen durch apoptotische Vorgänge sind wichtige Prozesse des Immunsystems.

Während der T-Zelldifferenzierung präsentieren die T-Zellen ein für sie typisches Repertoire von Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Dazu gehört vor allem der TCR („T-Cell-Rezeptor“ bzw. CD3), dessen Proteine wie die MHC-Proteine („Major Histocompatibility“) und die Immunglobuline zur Immunglobulin-Superfamilie gezählt werden (Hood et al., 1983). Zu den TCR-assoziierten Proteinen werden auch die Korezeptoren („Differenzierungsantigene“) CD4 und CD8 gezählt.

Während der Ontogenese besiedeln Prothymocyten des Knochenmarks den Thymus. Diese sogenannten „doppel negativen“ (DN)-Zellen exprimieren weder den TCR noch CD4 oder CD8 (Adkins et al., 1987). Die weitere Differenzierung beginnt mit dem Rearrangement des Genlocus für die α -Kette des TCR. In der weiteren Entwicklung kommt es u.a. zum Rearrangement des α -Ketten-Genlocus. Zeitgleich werden CD4 und CD8 exprimiert, weswegen diese Zellen „Doppel positive“ (DP) -Thymocyten genannt werden (Paterson und Williams 1987). Aus ihnen gehen nach der positiven und negativen Selektion die „einfach positiven“ (SP) $CD4^+CD8^-$ - und $CD4^+CD8^+$ -T-Zellen hervor (Übersichtsartikel siehe: Hünig und Mitnacht 1991; Abb. 4). Die positive Selektion überleben nur diejenigen DP-Thymocyten, deren zufällig generierter TCR in der Lage ist die MHC-Moleküle auf den Epithelzellen im Stroma des Thymus zu erkennen (Schwartz 1989; von Boehmer 1994; Abb. 4). Während der negativen Selektion wird in Thymocyten, deren TCR MHC-Moleküle in Verbindung mit körpereigenen Peptiden erkennt, Apoptose induziert (Nossal 1994). Die reifen T-Zellen verlassen über die Medulla den Thymus und wandern in die Peripherie aus. Dazu gehören neben der Milz das Lymphsystem und der

Blutkreislauf (Abb. 4). Bei einer Immunantwort werden diese reifen T-Zellen durch Antigenpräsentation und MHC/TCR-Interaktion stimuliert. Weitere kostimulatorische Signale aktivieren Differenzierung und Proliferation der T-Zelle (Janeway und Bottomly 1994).

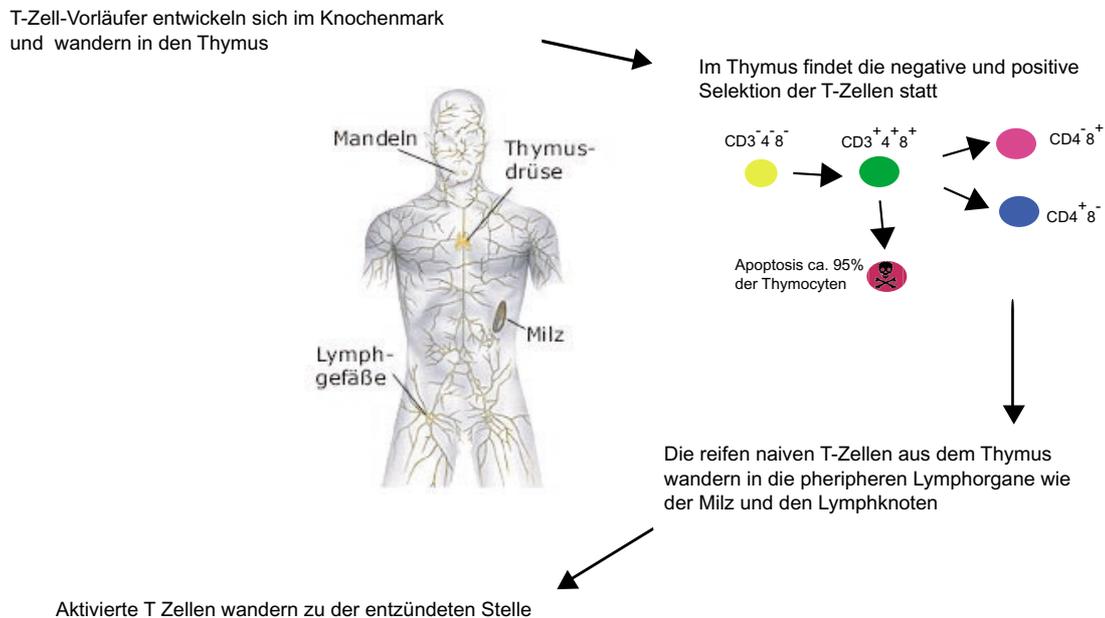


Abb.4: Schematische Darstellung der „Wanderwege“ während der T-Zellentwicklung

Diese vervielfältigten T-Zellen müssen nach der Immunantwort wieder beseitigt werden, was über den sogenannten aktivierungsinduzierten Zelltod („activation-induced-cell-death“ AICD), eine Sonderform des programmierten Zelltodes, geschieht. Frisch aktivierte reife T-Zellen sind resistent gegen Apoptoseinduktion. In einer Initiations-Phase beginnen diese Zellen IL-2, CD25-Rezeptor und auch CD95 zu induzieren. Erst wenn die aktivierte T-Zelle zu proliferieren beginnt, reagiert sie apoptotisch auf dieselben Signale, die sie vorher aktiviert haben. Dabei ist der CD95-Signalweg essentiell für den AICD (Übersichtsartikel siehe: Baumann S. 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die beschriebenen apoptoseinduzierenden Signalwege miteinander verbunden sind, so dass sich anstelle eines einzelnen Signalweges viel eher ein gesamtes Netzwerk ergibt, welches die Apoptose in der Zelle reguliert. Innerhalb dieses Netzwerkes sind die verschiedenen Wege je nach Zelltyp unterschiedlich aktiv, was am Beispiel des CD95-Signalweges deutlich wird. So reagieren Fibroblasten ohne eine vorherige Stressinduktion kaum auf den CD95-Liganden, wogegen aktivierte T-Zellen sehr sensitiv auf den CD95-Liganden reagieren. Welche Zellen für welche Stimuli sensitiv sind, liegt vor allem an ihrem Expressionstatus. Fibroblasten exprimieren kaum CD95, während unreife und aktivierte T-Zellen dies im großen Umfang tun. Verantwortlich

für den Expressionstatus einer Zelle ist das jeweilige Repertoire an aktiven Transkriptionsfaktoren. Es ist offensichtlich, dass in verschiedenen Zelltypen je nach Stimuli Transkriptionsfaktoren unterschiedlich aktiviert oder reprimiert werden, wodurch sie direkt in die Apoptoseregulation eingreifen.

2.2.3. Rolle von AP-1 in der Apoptose

Wie bereits erwähnt, wird die Expression einiger AP-1 Mitglieder durch Stressinduktion aktiviert. Da eine Zelle häufig apoptotisch auf eine starke Stressinduktion reagiert, lässt dies vermuten, dass AP-1 ein Transkriptionsfaktor ist, der in der Stressantwort und damit auch in der Apoptoseregulation einer Zelle eine wichtige Funktion besitzt. Tatsächlich konnte bisher für einige AP-1 Mitglieder die Funktion in der Apoptoseinduktion geklärt werden. Nach Behandlung von Zellen mit UV-Bestrahlung oder anderen DNA schädigenden Substanzen tritt z.B. eine verstärkte Expression von c-Fos auf. Dabei nimmt c-Fos in unterschiedlichen Zellen verschiedene Funktionen in der Apoptoseregulation wahr. So sind Photorezeptor-Neuronen, denen c-Fos fehlt, resistent gegen Licht-induzierte Apoptose (Hafezi et al., 1997; Wenzel et al., 2000). In diesem System hat c-Fos folglich eine proapoptotische Funktion. Allerdings lässt sich dies nicht pauschal auf andere Zelltypen und Stimuli übertragen, was am Beispiel der UV-induzierten Apoptose in c-Fos-defizienten Fibroblasten deutlich wird. Im Gegensatz zu den Photorezeptor-Neuronen reagieren *c-fos*^{-/-}-Fibroblasten sensitiver auf UV-Induktion als *wildtyp*-Fibroblasten. Hier hat c-Fos also eine antiapoptotische Funktion (Schreiber et al. 1998). c-Fos-defiziente Mäuse sind lebensfähig, wodurch sich die Möglichkeit eröffnet, dessen Funktion in der Apoptoseregulation auch in primären unreifen und reifen T-Zellen durch den Vergleich von *wildtyp*- mit *c-fos*^{-/-}-Genotyp zu untersuchen. c-Fos-defiziente Thymocyten reagieren sensitiver auf apoptoseinduzierendes TPA, Dexamethason und Forskolin und weisen im Vergleich zu Wildtyp-Thymocyten eine erhöhte spontane Apoptose auf (Ivanov et al., 1996). Nach der Behandlung mit Etoposid, welches ebenfalls Apoptose induziert, verhielten sich die c-Fos-defizienten Thymocyten allerdings wie Wildtyp-Zellen. Auch in reifen T-Zellen der Milz hat c-Fos keine wichtige Funktion in der Etoposid induzierten Apoptose (Gajate et al., 1996). Bei reifen T-Zellen scheint die Funktion abhängig von Stimuli zu sein. So reagieren diese sensitiver auf die apoptoseinduzierende Behandlung mit ionisierender Strahlung oder Dexamethason (Pruschy et al., 1997). Die bisherigen Daten zeigen, dass c-Fos in verschiedenen Zelltypen essentiell für eine funktionierende Apoptoseregulation ist. Die Zelltyp abhängigen, unterschiedlichen Funktionen von c-Fos könnten z.B. auf die in diesen Systemen zur Verfügung stehenden verschiedenen Dimerisierungspartner zurückzuführen sein.

Einer der Dimerisierungspartner von c-Fos, c-Jun, ist bezüglich der Apoptoseregulation ebenfalls bereits gut untersucht. Da c-Jun ein Substrat der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) ist, welche in der Apoptoseregulation eine wichtige Funktion hat, liegt die Vermutung nahe, dass auch c-Jun, bzw. seine Zielgene, wichtig für die Regulation des programmierten Zelltodes nach Stressinduktion sind. Eine Überexpression von c-Jun induziert Apoptose in 3T3 Fibroblasten (Bossy-Wetzel et al., 1997). Demnach hat c-Jun in Fibroblasten eine proapoptotische Funktion. Entsprechend ähnlich wirkt sich die Hemmung von c-Jun durch Mikroinjektion von c-Jun neutralisierenden Antikörpern in PC12 Zellen und Neuronen aus. In diesen Zellen wird die durch NGF- („Nerve growth factor“-) Entzug induzierte Apoptose durch die c-Jun Antikörper-Behandlung gehemmt (Estus et al., 1994; Ham et al., 1995; Xia et al. 1995). Der direkteste Hinweis auf die proapoptotische Funktion von c-Jun brachten Untersuchungen von immortalisierten c-Jun-defizienten Fibroblasten. Diese Zellen reagieren auf Stressinduktion mit einer reduzierten Apoptoseantwort (Kolbus et al., 2000). Verantwortlich für diese reduzierte Apoptoseantwort ist die fehlende Expression des CD95-Liganden. Allerdings führt das Fehlen von c-Jun in Hepatoblasten und Erythroblasten in der sich entwickelnden Mausleber zu massiver Apoptose (Eferl et al., 1999).

Von einem weiteren Mitglied der Jun-Familie, JunD, liegen erste Hinweise auf die Rolle im programmierten Zelltod vor. Hinweise für eine antiapoptotische Funktion liefern JunD-defiziente Fibroblasten, die eine Hypersensitivität gegenüber UV-Strahlung und TNF-Behandlung aufweisen. Auch Hepatozyten von JunD-defizienten Mäusen reagieren sensitiver auf TNF α (Weitzmann et al., 2000). Allerdings führt die Überexpression von JunD in ML-1 Zellen zu einer verstärkten Kaspase 3-Aktivität nach UV-Induktion und somit zu einer erhöhten Apoptoseantwort. Dies weist auf eine proapoptotische Funktion in diesem System hin (Li et al., 2002). Das dritte Mitglied der Jun-Familie, JunB, wurde bisher noch nicht auf seine mögliche Funktion in der Apoptose untersucht. Bisher ist nur bekannt, dass in myeloiden Zellen die Inaktivierung von JunB zu einer erhöhten Expression der zwei antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie, Bcl₂ und Bcl_{xl}, führt (Passegue et al., 2001).

2.3. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollten die vielfältigen offenen Fragen zur Funktion von c-Fos und JunB in der Apoptoseregulation detaillierter untersucht werden. Eine Funktion von c-Fos in der Apoptoseregulation wurde für verschiedene Zelltypen beschrieben. Allerdings ist bisher noch nicht abschliessend geklärt, ob c-Fos-defiziente T-Zellen einen Defekt in der Apoptoseregulation aufweisen und ob dies von den verwendeten Stimuli abhängig ist. Um dieser Frage nachzugehen, verwendete ich daher im ersten Teil meiner Arbeit c-Fos-defiziente T-Zellen der Milz und des Thymus und analysierte in diesen den programmierten Zelltod nach verschiedenen Stimuli.

Da sowohl c-Jun (proapoptotisch), als auch JunD (antiapoptotisch) eine wichtige Funktion in der Apoptoseregulation einnehmen (Übersichtsartikel siehe: Jochum 2001), kann man vermuten, dass auch JunB für die Regulation der Apoptose wichtig sein könnte. Diese Annahme stützt sich vor allem auf die Tatsache, dass JunB in bestimmten zellulären Prozessen als Antagonist von c-Jun wirkt und dass sich die unterschiedlichen AP-1 Mitglieder gegenseitig regulieren können.

Daher habe ich im zweiten Teil meiner Arbeit die Rolle von JunB in der stressinduzierten Apoptose von immortalen *junB*^{-/-}-Fibroblasten analysiert. Dies beinhaltet auch die Fragen nach den Signalwegen des Apoptosenetzwerkes, die in Abwesenheit von JunB/cFos betroffen sind, und den Zielgenen, die für beobachtete Phänotypen verantwortlich sind.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien und Bezugsquellen

Alle Chemikalien wurden in der höchst-möglichen Reinheitsstufe verwendet. Wäß-rige Lösungen wurden mit Wasser, das über ein Milli-Q-Reinstwasser-System der Firma Millipore entsalzt wurde, in sterilen Gefäßen angesetzt und autoklaviert.

Allgemein gebräuchliche Chemikalien

Merck, Darmstadt

Roth, Karlsruhe

Serva, Heidelberg

Sigma, Deisenhofen

Fluka, Buchs

Azetyl-Coenzym A	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0,8)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	BioRad, München
Ampicillin	Roche, Mannheim
Anisomycin	Sigma, Deisenhofen
Aprotinin	Roche, Mannheim
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
2',3'-Didesoxynukleosid-5'-Triphosphate	Roche, Mannheim
2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphate	Roche, Mannheim
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Di-Natriumkarbonat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Roche, Mannheim
DMEM (synthetisches Kulturmedium)	Gibco, Karlsruhe
DMSO	Merck, Darmstadt
EDTA	Merck, Darmstadt
EGTA	Merck, Darmstadt
Eichproteine, vorgefärbt	BioRad, München
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylazetat	Merck, Darmstadt

Formamid	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum	Sigma, Deisenhofen
Glutathion	Fluka, Buchs
Glutathion-Agarose	Sigma, Deisenhofen
Glyzin	Merck, Darmstadt
Guanidinhydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HEPES	Roth, Karlsruhe
Interleukin-1	R+D Systems, Wiesbaden
Interleukin-2	(von Dr. Hartenstein zur Verfügung gestellt; von Zellüberstand von IL-2 Überexpremierern nach Karasuyama H. et al. 1988)
JC-1	Molecular Probes, Leiden Niederlande
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe
Leupeptin	Roche, Mannheim
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methansulfonsäure-Methylester	Fluka, Buchs
Natriumarsenic	Merck, Darmstadt
Natriumazetat	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Fluka, Buchs
Nonidet P40	Roche, Mannheim
Nukleosid-5'-Triphosphate	Roche, Mannheim
Okadaiksäure	Sigma, Deisenhofen
Pepstatin	Roche, Mannheim
Phosphatasen-Inhibitor-Cocktail I	Sigma, Deisenhofen
Phosphatasen-Inhibitor-Cocktail II	Sigma, Deisenhofen
Poly dI/dC Amersham	Pharmacia, Freiburg
Proteinasen-Inhibitor-Cocktail	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin, Fraktion V	Sigma Deisenhofen
RNase A	Sigma, Deisenhofen
RO-31-8220	zur Verfügung gestellt von Hr. Dr. Fürstenberger
Sephadex G25/G50	Amersham Pharmacia, Freiburg
TEMED	Sigma, Deisenhofen

TPA	Abt. Hecker, DKFZ
TNF α	PeptoTech Inc. Rocky Hill NJ
Triton X-100	BioRad, München
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
Tween20	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Zinkchlorid	Sigma, Deisenhofen

3.1.2. Geräte und Verbrauchsmaterial

Leica-Mikroskop	Leica, Bensheim
Bakterien-Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Brutschrank	Heraeus, Hanau
DNA-Engine Opticon	Biozym, Oldenburg
ECL-System	Amersham Pharmacia, Freiburg
Elektrophorese-Apparaturen	BioRad, München
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme	(Curix 60) Agfa, München
FACScan/FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Geltrockner	BioRad, München
Gene Screen-Membran	NEN Life Science Products, Köln
Mikrozentrifugenröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Nitrocellulose-Membran	Schleicher und Schuell, Dassel
Perkin Elmer Cetus 9600	Perkin Elmer Cetus, Norwalk
Phosphoimager (Fuji BAS 1500)	Raytest, Straubenhardt
Plastikzentrifugenröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Polyvinyliden-Difluorid- (PVDF-) Membran	Millipore, Bedford
Röntgenfilme (Fuji RX)	Siemens AG, Stuttgart
Spektralphotometer (Gene Quantd pro)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Szintillationsmeßgerät (LS5000TD)	Beckman, München
Tischzentrifuge (Biofuge 13)	Heraeus, Hanau
Titertek Multiscan PLUS MKII	Labsystems, Finnland
Transferapparat für Western-Blot	BioRad, München
Transilluminator	Stratagene, Heidelberg
UV-Lampe	Vetter, Wiesloch
UV-Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg
Vakuum-Konzentrator („speed vac“)	Bachhofer, Reutlingen
Whatman 3MM Papier	Schleicher und Schuell, Dassel
Zellkulturartikel	Greiner, Frickenhausen

3.1.3. Radiochemikalien

α - 32 P-dCTP 370 MBq/ml

γ - 32 P-ATP 370 MBq/ml

α - 35 S-dATP 370 MBq/ml

D-threo-(dichlorazetat-1-14 C)-Chloramphenicol 7,4 MBq/ml

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Pharmacia (Freiburg) bezogen.

3.1.4. Antikörper

primäre Antikörper

alle unten genannten Antikörper sind gegen Maus-Antigene gerichtet

α p53	CM1 und CM5 Medac, Hamburg
α JunB N17	Santa Cruz, Heidelberg
α c-Jun	Transduction Laboratories, Heidelberg
α β -actin	Sigma, Deisenhofen
α MKP1 (M-18)	Santa Cruz, Heidelberg
α JNK1 (D2)	Santa Cruz, Heidelberg
α JNK2 (F-3)	Santa Cruz, Heidelberg
α p38 (C-20)	Santa Cruz, Heidelberg
α Activ-p38	Promega, Mannheim
α Activ-JNK	Promega, Mannheim
α MKK4 (K-18)	Santa Cruz, Heidelberg
α Phospho-Sek1/MKK4	(Thr261) Cell Signaling
α CD4-PE	Becken Dickinson, Heidelberg
α CD8- APC	Becken Dickinson, Heidelberg
α CD19-PE	Becken Dickinson, Heidelberg
α CD25-FITC	Becken Dickinson, Heidelberg
α CD69-FITC	Becken Dickinson, Heidelberg
α CD95	Pharmingen, Heidelberg

Sekundäre Antikörper:

Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Maus-IgG gerichtet (Dianova, Hamburg)

Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen-IgG gerichtet (Dianova, Hamburg)

FITC-konjugierter Antikörper aus Kaninchen gegen Syrian-Hamster-IgG gerichtet

(Dianova, Hamburg)

3.1.5. Proben für Northern-Blot Analysen

GAPDH: PstI-Fragment des Plasmids pGAPDH-13 (Fort et al., 1985)

MKP-1: Fragment des Plasmids („mit Klon AI096961; IMAGE Consortium, Resource Center of the Human Genome Project, Berlin, Deutschland“) (Kassel et al. 2001)

3.1.6. Oligonukleotide für die PCR

<i>junB-B2</i>	5'-GGG AAC TGA GGG AAG CCA CGC CGA GAA AGC-3'
<i>junB-B10</i>	5'-AAA CAT ACA AAA TAC GCT GG-3'
5'- <i>β-tubulin</i>	5'-TCA CTG TGC CTG AAC TTA CC-3'
3'- <i>β-tubulin</i>	5'-GGA ACA TAG CCG TAA ACT GC-3'
5'- <i>CD95-Ligand</i>	5'-CAG CAG TGC CAC TTC ATC TTG G-3'
3'- <i>CD95-Ligand</i>	5'-TTC ACT CCA GAG ATC AGA GCG G-3'
5'- <i>CD95</i>	5'-GCA CAG AAG GGA AGG AGT AC-3'
3'- <i>CD95</i>	5'-GTC TTC AGC AAT TCT CGG GA-3'
<i>MKP-1-S</i>	5'-GAC CGG GGC ACC TCT ACT ACC ACA-3'
<i>MKP-1-AS</i>	5'-CAA GCG AAG AAA CTG CCT CAA ACA-3'

3.1.7. Lösungen und Puffer

PBS:	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM CaCl ₂ ; 0,6 mM MgCl ₂ ; 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,6
20x SSC:	3 M NaCl; 0,25 M Na-Citrat; pH 6,5
TBE:	90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA
TE:	10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA

3.1.8. Zellen

Maus-Wildtyp-Fibroblasten

3T3-7 nach dem 3T3 Protokoll (Todaro und Green, 1963) immortalisierte Maus-Fibroblasten; von Andrea Kolbus zur Verfügung gestellt; in der vorliegenden Arbeit als Wildtyp Fibroblasten bezeichnet

Maus-Fibroblasten ohne funktionelles JunB

3T3-10 nach dem 3T3 Protokoll (Todaro und Green, 1963) immortalisierte Maus-Fibroblasten; von Andrea Kolbus zur Verfügung gestellt; in der vorliegenden Arbeit als JunB-defiziente (*junB*^{-/-}) Fibroblasten bezeichnet.

Maus-Fibroblasten mit überexprimiertem JunB

ubi-JunB

Mit einem Expressionsvektor für JunB unter der Kontrolle des Ubiquitin C–Promotors (Ubi) stabil transfizierte Wildtyp-Fibroblasten (von Dr. Bettina Hartenstein zur Verfügung gestellt).

3.1.9. Mäuse

c-fos^{-/-}-Mäuse wurden von Prof. Erwin und Wagner Dr. Agamemnon Grigoriadis, I.M.P. Forschungsinstitut für Molekulare Pathologie, Wien zur Verfügung gestellt und seit 1995 kongen in den C57BL/6-Hintergrund eingekreuzt.

junB^{-/-}-Mäuse (Schorpp-Kistner et al.1999) befanden sich in der F5-Generation der Aufzucht und wurden in den C57B16/NMRI Hintergrund eingekreuzt.

Alle Mäuse wurden im zentralen Tierlabor des DKFZ unter SPF-(spezifiziert Pathogen frei)-Bedingungen in einem 12 stündlichen Lichtzyklus gehalten. Die Tiere hatten freie Verfügung über Futter (Purina Chow 5008) und Wasser.

Die Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten erfolgte in Übereinstimmung mit den Empfehlungen der ATBW (Arbeitsgemeinschaft der Tierschutzbeauftragten in Baden-Württemberg). Unter Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes. Die Embryo-, Organ- und Gewebeentnahme zum Zweck des Anlegens von Zellkulturen war den Regierungspräsidium angezeigt (DKFZ 124) bzw. erfolgte in Rahmen eines genehmigten Tierversuchsvorhabens (910199)

3.2. Methoden

3.2.1. Allgemeine DNA -Techniken

3.2.1.1. Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm im Abgleich gegen das verwendete Lösungsmittel. Einer OD 260 = 1 entsprechen 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA bzw. 33 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotid-DNA. Zur Bestimmung der Verunreinigung mit Proteinen wurde außerdem die OD bei 280 nm bestimmt. Bei einem Quotienten OD 260 / OD 280 zwischen 1,6 und 2,0 kann die DNA ohne weitere Reinigung verwendet werden.

3.2.1.2. Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Reinigung von Nukleinsäure-Lösung von Proteinen wurde diese mit dem gleichen Volumens eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (50:49:1) gut gemischt. Zur Phasentrennung wurde 3 Min bei 13000 rpm und RT in der Heraeus-Tischzentrifuge zentrifugiert, die obere Phase abgenommen und noch einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform auf die gleiche Weise extrahiert.

3.2.1.3. Fällung von Nukleinsäuren

Die gelöste DNA wurde mit 1/10 des Volumens 3 M Natriumazetatlösung (pH 4,8) und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol gemischt. Das Präzipitat wurde bei 13000 rpm in der Heraeus-Tischzentrifuge, 10 Min pelletiert. Zur Entfernung von Salzresten mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet.

3.2.1. 4. Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung von genomischer DNA aus Zellen wurden diese trypsiniert und mit PBS gewaschen. Der Aufschluß der Zellen erfolgte über Nacht in 500µl Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1% SDS; 25 µl 10 mg/ml Proteinase K) bei 55°C. Am nächsten Tag wurden 200 µl 6 M NaCl zugegeben, 5 Min gemischt und für 7 Min bei 10000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol versetzt, gemischt und für 3 Min bei 10000 rpm und RT zentrifugiert. Zur Entfernung von Salzresten wurde das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet.

3.2.1.4. Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Isolierung eines bestimmten DNA-Fragmentes wurde die DNA-Lösung in einem Agarosegel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde die DNA im Gel durch UV-Durchlicht sichtbar gemacht, die gewünschte Bande ausgeschnitten und mit Hilfe des „Qiaquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen) aufgereinigt.

3.2.1.5. Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Zur Sondenherstellung wurde die „Random Primer“-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983) benutzt. Hierbei wird das zu markierende DNA-Fragment durch Erhitzen denaturiert und das Anhybridisieren kurzer zufälliger DNA-Sequenzen an die resultierenden Einzelstränge erlaubt. Die anhybridisierten Stücke dienen als Startstelle für die nachfolgende DNA-Verlängerung durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli*. Durch den Einbau radioaktiv markierter Nukleotid-Triphosphate werden die entstehenden Doppelstränge radioaktiv markiert. Es wurde das Protokoll des „rediprime-Kits“ der Firma Amersham verwendet: 10-20 ng des DNA-Fragment wurden in einem Volumen von 45 µl durch 5 minütige Inkubation bei 100°C denaturiert, anschließend 5 Minuten auf Eis abgekühlt und in ein „rediprime“-Röhrchen gegeben. Dieses enthält ein Lyophilisat aus Desoxynukleotid-Triphosphaten, DNA-Polymerase und Reaktionspuffer. Nach Zugabe von 5 µl α -³²P-dCTP erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 10 Min. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,5 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Zur Trennung des markierten Fragments von nicht eingebauten Nukleotiden wurde der Ansatz über eine Sephadex-G50-Säule geleitet (Gelfiltration). Die Packung dieser Säule mit in TE äquilibriertem Sephadex-G50 und die chromatographische Auftrennung von Fragment und freien Nukleotiden erfolgte unter Zentrifugation bei 800 rpm für jeweils 4 Min. Anschließend wurde 2x mit je 100 µl TE pH 8,0 gewaschen. Der Einbau der radioaktiv markierten Nukleotide wurde durch Messen von 2 µl des Eluates im Szintillationszähler (LS5000TD, Beckman) bestimmt.

3.2.1.6. Polymerase-Ketten-Reaktion („polymerase-chain-reaction“, PCR)

In der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden ausgehend von zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primer), die komplementär zu den Endbereichen der vorgelegten Matrizen-DNA sind, DNA-Fragmente, die innerhalb der Primer liegen, mit der temperaturbeständigen Taq-Polymerase kopiert und amplifiziert. Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen in einem „Thermo-Cycler“ der Fa. Perkin-Elmer (Norwalk, USA): 1/10 Volumen 10 x PCR-Puffer (500 mM KCl; 100 mM Tris pH 8,4; 15 mM MgCl₂), 1/10 Volumen 10 x dNTP-Lösung (je 2 mM dATP; dCTP; dGTP; dTTP; pH 7,0), je 1/10 Volumen 10 x Primer (2,5 mM), 1-2 U Taq-Polymerase und 10-500 ng Matrizen-DNA wurden mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Die Denaturierung

der DNA erfolgte bei 94°C für 1 Min, die Hybridisierung bei der für die verwendeten Primer optimalen Temperatur und die DNA-Synthese bei 72°C (als Faustregel gilt, daß die Taq-Polymerase pro Minute DNA-Fragmente von 1 kb synthetisieren kann). Die Amplifikationsprodukte wurden durch Gelelektrophoretische Auftrennung und Anfärben mit Ethidiumbromid kontrolliert.

3.2.2. RNA-Methoden

3.2.2.1. Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen

(Chomczynski u. Sacchi, 1987)

Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 2 ml Lösung D (4 M Guanidinthiocyanat, 25 mM Na-Citrat pH 7,0; 0,5% Na-Sarcosyl, 0,1% Antifoam, 100 mM β -Mercaptoethanol) versetzt. Die so lysierten Zellen wurden mit einem Gummischaber von der Gewebekulturschale abgelöst. Mittels einer Injektionsspritze wurde durch mehrmaligem Auf- und Abziehen, die genomischen DNA geschert und in ein steriles 15 ml Greiner-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 200 μ l 2 M Ammoniumazetat (pH 4,0) und 2 ml wassergesättigtem Phenol wurde gut geschüttelt, und anschließend 400 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) zugegeben und erneut geschüttelt (ca. 1 Min.). Nach einer Inkubation von 10 Min bei 4°C wurde das Gemisch abzentrifugiert (10000 rpm; 20 Minuten; 4°C), die wäßrige Phase abgenommen und mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Die RNA wurde ca. 1 h bei -20°C gefällt und erneut zentrifugiert (10000 rpm; 20 Minuten; 4°C). Das RNA-Pellet wurde nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem Ethanol (80%) getrocknet, in 100 μ l DEPC-behandeltem Wasser gelöst und die Konzentration bestimmt.

3.2.2.2. RT-PCR (Reverse Transkriptase PCR)

Jeweils 1-2 μ g denaturierte Gesamt-RNA (70°C für 3 Min) wurde in einem Volumen von 20 μ l mit den Oligonukleotid-Primern „Oligo dT“ (Gibco) wie folgt revers transkribiert: 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1 mM Desoxynukleotid-triphosphate, 50 pmol Primer, 2,5 U AMV-Reverse Transkriptase sowie 1,7 U RNase-Inhibitor. Der Ansatz wurde 40 Min bei 41°C und 10 Min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. In der daran anschließenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden ausgehend von zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden, die komplementär zu den Endbereichen der vorgelegten Matrizen-DNA sind, cDNA-Fragmente, die innerhalb der Primer liegen, mit der temperaturbeständigen Taq-Polymerase amplifiziert. Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen in einem „MJ-Cycler“ (Biozym, Hess. Oldendorf): 1/10 Volumen 10x PCR-Puffer (500 mM KCl; 100 mM Tris pH 8,4; 15 mM MgCl₂), 1/10 Volumen 10 x dNTP-Lösung (je 2 mM dATP; dCTP; dGTP; dTTP; pH 7,0), je 1/10 Volumen 10 x Primer (100 pmol), 1-2 U Taq-Polymerase und 10-500 ng Matrizen-DNA wurden mit

Wasser auf das Endvolumen (20-25 µl) aufgefüllt. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94°C für 1 Min, die Hybridisierung bei der für die verwendeten Primer optimalen Temperatur für 1 Min und die DNA-Synthese bei 72°C für 1-2 Min. Die Amplifikationsprodukte (nach 30-35 Zyklen) wurden durch gelelektrophoretische Auftrennung kontrolliert.

3.2.2.3. Quantitative „Real-Time“-PCR (DNA-Engine Opticon)

Für die quantitative „Real Time“-PCR mit dem DNA-Engine Opticon Gerät der Fa. Biozym (Oldenburg) wurde das QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) verwendet. Der Verlauf der Reaktion wurde mit dem DNA-Engine Opticon Gerät der Fa. Biozym verfolgt und aufgezeichnet. Für den Mengenabgleich der eingesetzten cDNAs wurde die Menge an Tubulin in jeder Probe gemessen. Im selben Durchgang parallel dazu wurde als Mengenstandard eine Konzentrationsreihe bestehend aus definierten Mengen des Tubulin-PCR-Produkts eingesetzt. Für die MKP-1-PCR wurde jeweils dieselbe c-DNA Menge an cDNA eingesetzt wie bei der Tubulin-PCR. Hierbei wurde ebenfalls, ein Mengenstandard mitamplifiziert, der aus einer Konzentrationsreihe bestehend aus definierten Mengen des MKP-1 PCR-Produkts bestand.

Mit der Hilfe der jeweils mitamplifizierten Konzentrationsreihe des PCR-Produkts, wurde für jede Probe die darin enthaltene Menge an Tubulin bzw. MKP-1 von dem DNA-Engine Opticon Gerät berechnet (angegeben in pg). Aus diesen beiden Mengenangaben wurde das Verhältnis Tubulin:MKP-1 bestimmt. Die Menge an MKP-1, im Verhältnis zu Tubulin, einer bestimmten Probe wurde gleich eins gesetzt. Die Werte der anderen Proben wurde auf diese Probe bezogen. Die sich daraus ergebenden Werte sagen aus, wievielfach MKP-1 in den Probe, im Vergleich zu der Probe deren Verhältnis von Tubulin:MKP-1 auf eins gesetzt wurde, erhöht oder erniedrigt war.

3.2.2.4. Gelelektrophorese von RNA

Zur Auftrennung der RNA wurden horizontale Gelkammern verwendet. Dazu wurden 3,5 g Agarose in Wasser gelöst und anschließend wurden 5 ml 50x MOPS (400 mM 3-(N-Morpholino)-Propan-Sulfonsäure), 100 mM Na-Azetat, 10 mM EDTA, pH 8), 5 ml 37% Formaldehyd zugegeben und in das Gelbett mit Kamm gegossen. 20-30 µg Gesamt-RNA wurde an Luft vorsichtig getrocknet, in 15 µl Denaturierungspuffer (54% Formamid, 18% Formaldehyd (37%), 1x MOPS, 0,4% Bromphenolblau) gelöst, 5 Min bei 65°C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung. Nach der Auftrennung wurde das Gel zweimal für ca. 5 Min mit Leitungswasser gewaschen, dann 10 Min in 250 ml Wasser mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid angefärbt, erneut zweimal gewaschen und die RNA mit UV-Durchlicht sichtbar gemacht.

3.2.2.5. Transfer von RNA auf Nylon-Membranen (Northern-Blot)

Das RNA-Gel wurde nach beendeter Elektrophorese unter UV-Licht mit einem Lineal fotografiert. Das Gel wurde auf einer Glasplatte plaziert, worauf sich 3-MM-Papier, mit 10 x SSC getränkt, befand. Auf das Gel wurde luftblasenfrei eine Nylon-Membran (Gene Screen plus) gelegt, auf diese wiederum 3-lagig 3-MM-Papier (ebenfalls mit 10 x SSC getränkt), über welches ein Kleenex-Stapel, der mit Gewicht beschwert wurde, geschichtet wurde. Über Kapillarkräfte wurde die Flüssigkeit nach oben gesaugt und somit die RNA auf die Membran transferiert. Der Transfer erfolgte über Nacht; anschließend wurde die Membran in 2x SSC gewaschen und danach bei 80°C eine Stunde inkubiert. Zur kovalenten Fixierung der RNA an die Membran, wurde die Membran zusätzlich mit UV-C (254 nm, 1.200 Joule) bestrahlt.

3.2.2.6. Hybridisierung der RNA

Nach kovalenter Fixierung der RNA an die Membran wurde diese in einer Hybridisierungsröhre mit 5 ml Hybridisierungslösung (1 mM EDTA, 0,25 M Phosphatpuffer, 7% SDS) in einem Ofen bei 65°C unter Rotation prähybridisiert. Danach wurden ca. $1-3 \times 10^7$ cpm einer radioaktiv-markierten Probe, die zuvor durch 5 Min kochen denaturiert wurde, zugegeben. Die Hybridisierung mit einer homologen Sonde erfolgte bei 65°C über Nacht. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Radioaktivität wurde die Membran unter Rotieren der Röhre wie folgt mit 20 mM Phosphatpuffer mit 1% SDS gewaschen: 1x 5 Min, dann 2x 5 Min und 1x 20-40 Min. Anschließend wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und je nach Stärke des Signals mit Verstärkerfolie bei -80°C belichtet. Sollte eine Membran noch mit einer anderen Probe hybridisiert werden, so wurde die ursprüngliche Probe durch 10 Minütige Inkubation in kochender 0,1% SDS / 2 mM-EDTA Lösung entfernt. Die erneute Hybridisierung erfolgte dann wie oben beschrieben.

3.2.3. Protein-Methoden

Zur Verhinderung von Protease- und Phosphataseaktivitäten wurden sämtliche Arbeiten mit Proteinen stets auf Eis und mit kalten Lösungen (Lysispuffer und PBS wurden zusätzlich Proteinase- und Phosphatase-Inhibitoren zugesetzt) durchgeführt. Außerdem wurden sämtliche Zentrifugationsschritte in einer Kühlzentrifuge bei 4°C durchgeführt.

3.2.3.1. Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen

Für die Proteinextraktion wurden die Zellen entsprechend den jeweiligen Versuchsbedingungen kultiviert und anschließend zu den verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen, danach wurde 1 ml PBS (1mM NaVO; 1mM NaF, 1mM DTT, 10mM PMSF) auf der Zellkulturschale verteilt und die

Zellen mit einem Gummischaber abgeschabt. Die Zellen wurden anschließend in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt bei 3000 rpm und 4°C in der Eppendorf-Zentrifuge sedimentiert. Nach der Zugabe des dreifachen Sedimentvolumens an Lysispuffer (mit den Proteinaseinhibitoren und Phosphataseinhibitoren „Cocktail 1“ und „Cocktail 2“ der Fa. Sigma) für 5 Min auf Eis lysiert. Nach der Lyse und Zentrifugation bei 15000 rpm 4°C in der Eppendorf-Zentrifuge wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Mit einem kleinem Aliquot wurde die Proteinkonzentration bestimmt, der restliche Überstand wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

(nach Lowry et al., 1951)

Für die Erstellung einer Eichkurve wurden 5 bis 40 µl einer BSA-Stammlösung (1 mg/ml, gelöst in Lowry-Lösung I) und 5 µl 250 mM Tris-HCl pH 7,5 (oder der jeweilige Lysispuffer) mit Lowry-Lösung I (2% Na₂CO₃, 0,1 M NaOH) auf 150 µl aufgefüllt und mit 250 µl frisch hergestellter Lowry-Lösung IV (10 ml Lowry-Lösung I mit 100 µl 2% NaK-Tartrat und 100 µl 1% CuSO₄) gemischt. Nach 5-Minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 30 µl 50% Folin-Reagens, zugegeben und 60 Min im Dunkeln, inkubiert. Von den zu bestimmenden Proteinextrakten wurden jeweils 5 µl mit 145 µl Lowry-Lösung I und 250 µl Lowry-Lösung IV gemischt, wobei nach Zugabe von 50% Folin-Reagens ebenfalls im Dunkeln und bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Von den so hergestellten Eichkurven und den zu bestimmenden Proben wurden jeweils 100 µl in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die OD der Farbreaktion im „Elisa-Reader“ der Firma Titertek („Multiskan PLUS MK II“) bei 600 nm bestimmt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte anhand der Eichkurve.

3.2.3.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970). Dabei richtete sich der Vernetzungsgrad im Trenngel nach dem Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins. Hierfür wurde die entsprechende Acrylamid-Lösung (Trenngel-Lösung: 6-12% Acrylamid; 0,16-0,32% N,N'-Methylenbisacrylamid; 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,05% TEMED) zwischen zwei mit Abstandhaltern fixierte Glasplatten (0,75-1,5 mm dicke Abstandhalter) luftblasenfrei bis ca. 4 cm zum oberen Glasrand ausgegossen, mit Isopropanol überschichtet und zum Auspolymerisieren stehen gelassen. Nach Entfernen des Gelüberstandes wurde das Sammelgel (Sammelgel-Lösung: 4% Acrylamid; 0,1% N,N'-Methylenbisacrylamid; 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED) gegossen und ein entsprechender Kamm eingesetzt. Bei der Denaturierung der Proben im Probenpuffer (0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 20% Glycerin; 0,02% Bromphenolblau; 5% â-

Mercaptoethanol) wird die Eigenladung der denaturierten Proteine vollständig durch die negativen Ladungen der SDS Sulfatgruppen überlagert, so dass im elektrischen Feld die Mobilität der SDS-Proteinkomplexe weitestgehend durch den Siebeffekt der Polyacrylamidmatrix bestimmt wird. Dadurch wird eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erreicht. 30 bis 50 µg Proteinextrakt (je nach nachzuweisendem Protein) wurden mit Lysispuffer auf ein Gesamtvolumen von 20 µl eingestellt und mit 5 µl 5x Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben für 4 Min bei 100°C denaturiert und kurz anzentrifugiert. Die Geltaschen wurden mit Laufpuffer gut gespült und die Proben mit einer Hamilton-Spritze direkt in die Geltaschen gegeben. Der Sammelgellauf erfolgte bei konstanten 20 mA in 1x Laufpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 0,1% SDS). Der Trenngellauf erfolgte je nach Größe und Auftrennung des gewünschten Proteins bei konstant 30 mA für 2-3 h. Der Gellauf wurde beendet, sobald die entsprechenden blau-markierten Molekulargewichtsmarker eine gute Auftrennung aufwiesen. Das Gel wurde zwischen den beiden Glasplatten entfernt und geblottet („Western-Blotting“).

3.2.3.4. Transfer und Nachweis von Proteinen auf Membranen

(Western Blot)

Der Transfer der im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran erfolgte mittels einer „semi-dry“ Western-Blot-Apparatur (BioRad) in der folgenden Weise: 3 Lagen 3-MM Papier, Trenngel, Nitrocellulose- oder PVDF-Membran, 3 Lagen 3-MM Papier, wurden mit Western-Blotting-Puffer (20 mM Tris; 192 mM Glyzin; 20% Methanol) getränkt und luftblasenfrei zu einem Sandwich zusammengesetzt. Zuvor wurde die PVDF-Membran 2 Min in Methanol aktiviert bzw. die Nitrocellulose-Membran kurz in Western-Blotting-Puffer aquilibriert. Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei Raumtemperatur bei einer Spannung von 18 Volt und einer Stromstärke die sich aus der Größe des Gels ergab (cm^2 des Gels x 2 mA) für Mindestens eine Stunde. Nach Abbau des Sandwiches wurden die Proteine auf der Membran mit einer Ponceau-S-Lösung (Sigma) angefärbt, um den Transfer der Proteine auf die Membran zu überprüfen. Danach wurde die Membran 30 Min in Blockierungspuffer (5% (w/v) Magermilchpulver, 0,1% Tween 20 in TBS oder 5% (w/v) BSA, 0,1% Tween 20 in TBS) inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Die Inkubation des jeweiligen Antikörpers (JNK1 und JNK2 1:1000; MKP1 1:200; Active-JNK 1:5000; Aktin 1:1000, p38 1:500, Active-p38 1:2000; c-Jun 1:500; JunB 1:500, MKK4 1:400; Active MKK4 1:200; verdünnt in Blockierungspuffer) erfolgte für Mindestens 2 h, wobei die Membran zusammen mit der Antikörperlösung in eine Folie eingeschweisst war, bei RT oder über Nacht bei 4°C. Dann wurde die Membran mit Waschpuffer (0,1% Tween 20 in TBS) gewaschen (3x 5 Min) und mit Meerrettich-

Peroxidase-konjugiertem Zweitantikörper (1:2.500 verdünnt) in Blockierungs-Puffer Mindestens 1 h inkubiert. Zum Schluss wurde die Membran mit Waschpuffer erneut gewaschen (3x10 Min.). Schließlich wurde die Membran nach Abtropfen auf der Proteinseite mit 6 ml einer frisch zubereiteten 1:1-Mischung der beiden ECL-Detektionslösungen (Amersham Pharmacia, Freiburg) genau 1 Min bedeckt. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgetropft und die Membran, bedeckt mit einer Frischhaltefolie, in eine Filmkassette gelegt. Das Auflegen des Filmes erfolgte zuerst für eine Minute und dann, je nach Signalintensität, kürzer oder länger. Das Detektionssystem basiert auf der von Chemolumineszenz begleiteten Oxidation eines zyklischen Diacylhydrazides, die in Gegenwart von Wasserstoffperoxid durch die Meerrettich-Peroxidase katalysiert wird. Sollte eine Membran erneut mit einem anderen Antikörper hybridisiert werden, wurde der erste ursprünglich gebundene Antikörper entfernt. Hierzu wurde die Membran in Strip-Puffer (100 mM 2-Mercaptoethanol, 2% Natriumdodecylsulfat, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7) eingeschweisst und 15 Min bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde der Strip-Puffer von der Membran kurz mit 0,1% Tween 20 in TBS abgewaschen und die Membran erneut wie oben beschrieben blockiert und hybridisiert.

3.2.4. Zellkultur

Die Maus-Fibroblasten wurden routinemäßig in DMEM mit 10% FCS und 2mM L-GlutaMin auf Plastikschalen kultiviert, auf denen sie adhärent wuchsen. Die T-Zellen und Thymozyten wurden in Suspension in DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 50 µM β -Mercaptoetanol (Gibco), 1 mM Natrium-Pyruvat (Gibco), 1x essentielle Aminosäuren (Gibco), 2 mM L-GlutaMin (Gibco) und 1x Pencillin und Streptomycin (Gibco), ebenfalls in Plastikschalen kultiviert. Die Kultivierung fand in einem Brutschrank bei 37°C und 6% CO₂ statt. Sämtliche Arbeitsgänge wurden unter Einhaltung steriler Bedingungen an einer Sicherheitsbank der Klasse 2 (Baker) durchgeführt.

3.2.4.1. Trypsinieren von Zellen

Bei 80% Konfluenz, wurden die Zellen, nachdem sie verdünnt wurden, in neue Schalen transferiert. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 1 ml 0,25% Trypsin überschichtet und bis zum beginnenden Ablösen bei 37°C oder RT inkubiert. Durch Zugabe von FCS-haltigem Medium wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1000 rpm, 3 Min) sedimentiert und nach Absaugen des Überstands in einem entsprechenden Volumen Medium resuspendiert und gezählt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe in einer Neubauer-Zählkammer oder eines Zellzählgerätes Coulter Z2 (Beckman Coulter). Danach wurden die Zellen in der gewünschten Zellzahl ausplattiert.

3.2.4.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden zunächst trypsiniert und gezählt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Plastik-Zentrifugenröhrchen überführt und in diesem für 3 Min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellsediment (ca. 1×10^6 Zellen) in 1 ml Einfriermedium (20% FCS-Medium + 10% DMSO) resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen transferiert. Die Zellen wurden anschließend für 1,5 h auf Eis inkubiert und dann auf -80°C gebracht (unter diesen Bedingungen können die Zellen bis zu 2 Monate aufbewahrt werden). Die längerfristige Aufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C . Zum Auftauen wurden die Zellen im Einfrierröhrchen schnell auf 37°C erwärmt, in ein Plastik-Zentrifugenröhrchen mit 5 ml vorgelegtem Medium überführt, 3 Min bei $300 \times g$ sedimentiert und nach Absaugen des Überstandes in Medium aufgenommen und in eine Kulturschale transferiert.

3.2.4.3. Apoptoseinduktion und Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Agenzien

3.2.4.3.1. T-Zellen

Die T-Zellen und Thymocyten wurden in einer Konzentration von 1-2 Mio. Zellen pro ml kultiviert. Zur Aktivierung und Apoptoseinduktion wurden die Substanzen in den angegebenen Endkonzentration (10 ng/ml TPA, 1 $\mu\text{g/ml}$ Ionomycin, 1×10^{-6} M Dexamethason, 5 $\mu\text{g/ml}$ ConA ins uMedium zugeben. Zur Behandlung der T-Zellen mit CD95-Ligand wurde eine 1:7 Verdünnung der CD95-Stammlösung (von Dr. Ingrid Herr erhalten) verwendet.

Die Apoptoseinduktion und Aktivierung mit CD3 und CD28 erfolgte mit CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturschalen. Die Inkubation der T-Zellen erfolgte im Brutschrank.

3.2.4.3.2. Fibroblasten

Die Behandlung der Fibroblasten erfolgte Mindestens 12 Stunden, aber nicht länger als 16 Stunden nach dem Ausplattieren. Durch die Zugabe der jeweiligen Substanzen in das serumhaltige Medium in den gewünschten Endkonzentration (0,4 mM MMS; 20 ng/ml TNF α , 1 mg/ml Anisomycin, 50 μM As^{3+} , 10 nM Okadaiksäure, 5 mM RO-31-8220) wurden die Zellen induziert. Zur Behandlung der Fibroblasten mit dem CD95-Ligand wurde eine 1:50 Verdünnung der Stammlösung (von S. Baumann erhalten) verwendet. Die Zellen wurden anschließend in Brutschrank weiter inkubiert.

Zur UV-Bestrahlung der Zellen wurden diese mit 37°C warmem PBS gewaschen und trocken in einem *StrataLinker* der Firma Stratagene mit 40 J/m^2 bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde das konditionierte Medium wieder auf die Zellen geben und diese weiter inkubiert. Alle Bestrahlungen erfolgten bei Raumtemperatur.

3.2.3.4. Beschichtung von Zellkulturschalen

Der Boden von Zellkulturschalen wurde mit einem Antikörper, der in PBS verdünnt worden war beschichtet und für Mind. 12 Stunden bei 4°C oder bei Raumtemperatur für ca. 3 Stunden inkubiert. Vor der Benutzung der beschichteten Schalen wurde das überstehende PBS abgenommen, die Schale vorsichtig mit PBS abgewaschen und die T-Zellen draufgegeben.

3.2.3.5. Isolierung primärer Zellen aus der Maus

3.2.3.5.1. Isolierung von primären Fibroblasten Mausembryonen

(Klone Nr. 47 und Nr. 49)

Die weiblichen *junB*^{+/-} Mäuse wurden am Tag 9,5 der Schwangerschaft getötet und die Embryonen entnommen. Die Embryonen wurden in eine Petrischale mit PBS gegeben und unter sterilen Bedingungen in der Zellkultur weiterverarbeitet. Der Embryo wurde mit einer Pinzette und Schere klein geschnitten und für 5 Min bei 37°C in 0,25%-igem Trypsin im Brutschrank inkubiert. Das dabei entstehende Zellgemisch wurde mit Medium aufgefüllt und bei 1000 rpm in der Hereus-Zentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Medium aufgenommen und auf einer Zellkulturschale ausplattiert. Aus dem Dottersack der Embryonen wurde genomische DNA isoliert, die für die Genotypisierung verwendet wurde.

Zur Immortalisierung wurden die Zellen nach dem 3T3 Protokoll kultiviert (Todaro und Green, 1963).

3.2.4.5.2. Isolierung von primären Thymozyten und Milzzellen aus der Maus

Den Mäusen im Alter von ca. 6 Wochen wurde nach der Tötung, Milz und/oder Thymus entnommen und kurz in kaltem PBS aufbewahrt. Anschließend wurde Milz und Thymus einzeln mit einer Pinzette und Schere in kleine Stücke zerteilt und mit Hilfe eines 5 ml Spritzenkolbens durch eine 30 µm-Nylonnetz getrieben. Anschließend wurde das Netz mehrfach mit Medium nachgewaschen. Die Zellen wurden zweimal mit Medium gewaschen und die Zellzahl bestimmt.

Die Thymozyten wurden direkt nach der Isolierung mit einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen pro ml in einem Brutschrank kultiviert.

Aus dem Zellgemisch aus der Milz wurden, im Anschluss an die Isolierung, die T-Zellen aufgereinigt. Dazu wurde die Zellen auf eine große Zellkulturschale (96 mm Durchmesser) gegeben und zum Absetzen der Makrophagen für 1 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und zum Absetzen der B-Zellen auf eine mit IgM-beschichteten Zellkulturschale gegeben und für weitere 2 Stunden inkubiert.

Anschließend wurde das Medium abgenommen und die darin enthaltenen Zellen (hauptsächlich T-Zellen) erneut gezählt. Die T-Zellen wurden mit einer Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen pro ml ausplattiert und im Brutschrank inkubiert.

3.2.5. FACS-Analyse

Die FACS („Fluorescence Activated Cell Sorter“)-Analyse ermöglicht die Detektion von Zellen oder deren DNA-Gehalt anhand von Fluoreszenzmarkierungen. Hierbei werden in Tröpfchen die einzelne Zellen aus einer markierten Zellsuspension mit Laserlicht angeregt und die emittierte Fluoreszenz detektiert. Zudem gestatten Beugung und Streuung des Laserlichtes Aufschluß über Größe und Granularität der Zelle. Verwendet wurde ein FACS-Gerät (FACScan/FACSCalibur) der Firma Becton Dickinson, Heidelberg. Zur Fluoreszenzmarkierung dienten FITC-, PE- und APC- konjugierte Antikörper oder Propidiumjodid als Vitalitäts- oder DNA-Farbstoff.

3.2.5.1. Detektion von Oberflächenproteinen mittels Antikörperfärbung

Zellen wurden, wenn adhärent wachsend, erst trypsiniert, während Suspensionzellen direkt sedimentiert werden konnten. Anschließend wurden die Zellen in PBS gewaschen und in PBS mit 5% FCS und dem entsprechenden Antikörper 10 Min. bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Waschlösung (PBS mit 5% FCS) gewaschen. Falls der erste Antikörper nicht direkt mit einem Fluorochrom gekoppelt war, wurde mit einem zweiten Antikörper der Fluorochrom-gekoppelt war, 10 Min bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 50 µl PBS aufgenommen und im FACS-Gerät gemessen.

3.2.5.2. Detektion von Apoptose mittels FACS-Analyse

3.2.5.2.1 AnnexinV-Messung

Zur Apoptosebestimmung von Fibroblasten mit Hilfe von FITC-gekoppeltem AnnexinV wurde das Medium von den Zellen genommen, um die apoptotischen Zellen die sich von der Zellkulturschale abgelöst haben mitzumessen, wurde dieses in ein 15 ml-Reaktionsröhrchen gegeben. Die Fibroblasten wurden mit PBS gewaschen und das PBS mit dem vorherigen Mediumüberstand vereinigt. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert und nachdem die Zellen sich abgelöst hatten, das Trypsin mit Annexin-Puffer verdünnt und ebenfalls mit dem Medium in dem 15 ml-Röhrchen vereinigt. Die Zellen wurden in der Heraeus-Zentrifuge mit 1200 rpm bei 4°C für 5 Min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Annexin-Puffer aufgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden erneut bei 3000 rpm mit einer Hereaus-Tischzentrifuge für 5 Min sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Annexin-Puffer mit 2 µl AnnexinV aufgenommen und für 30 Min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Annexin-Puffer zugegeben und bei 3000 rpm für 5 Min mit

einer Heraeus-Zentrifuge zentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 µl Annexin-Puffer aufgenommen. Direkt vor dem Messen im FACS-Gerät wurde zu jeder Probe 2 µl Propidiumiodid zugegeben.

3.2.5.2.2. Nicoletti-Methode

Die Messung der T-Zellen erfolgte nach der durch Nicoletti beschriebenen Methode (Nicoletti et al., 1991). Die frisch geernteten Zellen wurden drei Minuten bei 4900 rpm in einer Heraeus-Tischzentrifuge pelletiert und in 0,5 ml Nicoletti-Lösung (0,1% Na-Citrat, 0,1% Triton X-100 und 50 ng/ml PI) vorsichtig resuspendiert und über Nacht bei 4°C inkubiert.

3.2.5.2.3. Mitochondrien-Färbung mit JC-1

Die Fibroblasten wurden trypsinisiert und sedimentiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 0,5 ml FCS-freiem Zellmedium mit 5 µg/ml JC-1 resuspendiert und für 15 Min einem Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen (5 Min Zentrifugation bei 4000 rpm Heraeus Tischzentrifuge), in 100µl PBS (mit Magnesium und Calcium) aufgenommen. Die Menge an aktivierten Mitochondrien wurde mit dem FACS-Gerät gemessen.

4. Ergebnisse:

4.1. Teil 1: die Rolle von c-Fos in der Apoptoseregulation

Während der Zucht der c-Fos-defizienten Mäuse wurde beobachtet, dass die *c-fos*^{-/-}-Mäuse, trotz steriler Haltungsbedingungen, im Vergleich zu *wildtyp*-Mäusen sehr häufig Infektionen bekommen. Eine Ursache dafür könnte ein falsch regulierter Apoptosemechanismus sein, der zu Fehlern im Immunsystem beitragen könnte (Autoimmunkrankheiten). Da allerdings die bisher durchgeführten verschiedenen Studien an c-Fos-defizienten T-Zellen kein einheitliches Apoptose-Bild für die Funktion von c-Fos in diesem Zellsystem ergaben (zur Übersicht Jochum et al., 2001) und vorläufige Studien an primären Thymocyten zeigten, dass c-Fos eine protektive Rolle in der Thymocytenapoptose haben könnte (Diplomarbeit Eberlein) war eine detaillierte Analyse zur Funktion von c-Fos in T-Zellen erforderlich.

Bestärkt wurde diese Fragestellung durch die Beobachtung, dass die Funktion von c-Fos in der Regulation des programmierten Zelltods sowohl Zelltyp, als auch Stimuli abhängig ist (zur Übersicht: Jochum et al., 2001). Hierzu verwendete ich primäre unreife T-Zellen aus dem Thymus und primäre reife T-Zellen aus der Milz von *wildtyp*- und *c-fos*^{-/-}-Mäusen und analysierte die Apoptose nach der Behandlung mit verschiedenen Stimuli.

4.1.1. Untersuchung der Zellpopulation der Milz von Wildtyp- und c-Fos-defizienten Mäusen

Zunächst wurde der Einfluss von c-Fos auf die Entwicklung von Lymphozyten über die Bestimmung der Verteilung von B- und T-Zellen in Thymus und Milz mittels FACS Analyse untersucht. Dazu wurde die Milz von Wildtyp- und c-Fos-defizienten Mäusen, sowie ihr Gesamtgehalt an Zellen, direkt nach der Präparation bestimmt.

Der Anteil an T- und B-Zellen in der Milz von 6-8 Wochen alten Wildtyp-Mäusen lag bei 52% (+ 6%) T-Zellen und 28% B-Zellen (+ 6%), von c-Fos-defizienten Mäusen lag der Anteil an T-Zellen bei 42% (+7) und der Anteil an B-Zellen bei 15% (+3) (Abb. 5A). Im Verhältnis von T- zu B-Zellen ist zwischen den beiden Genotypen also ein Unterschied zu beobachten (T/B wt=2; T/B *fos*^{-/-} = 2,5). Dies ist in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten, nämlich, dass die Anzahl der T-Zellen im Vergleich zu den B-Zellen in *c-fos*^{-/-}

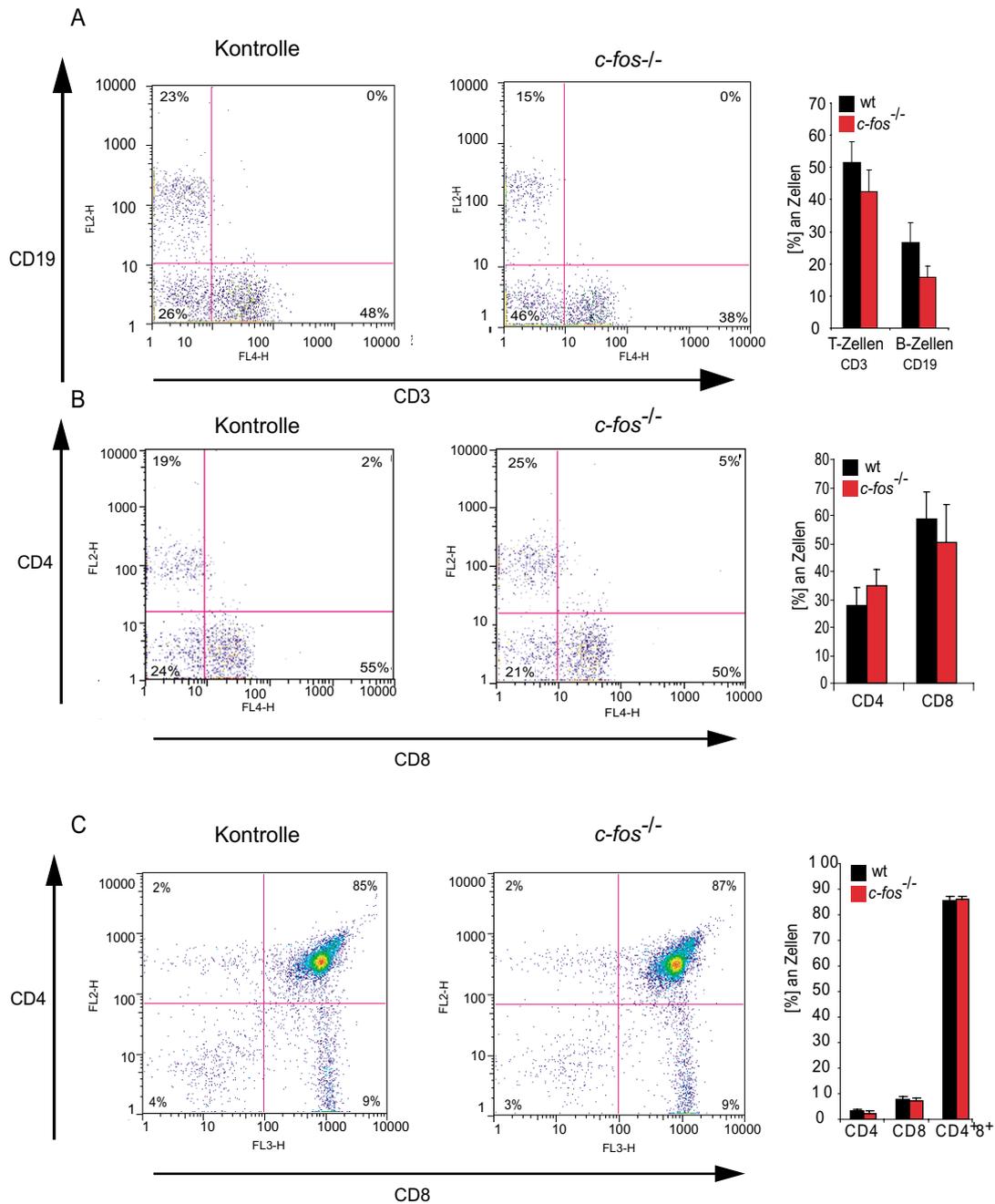


Abb.5: c-Fos-defiziente Mäuse zeigen eine normale Verteilung in der Zellpopulation in Milz und Thymus

Zellen der Milz aus fünf c-Fos-defizienten und drei Wildtyp-Mäusen wurden nach der Erythrozytenlyse mit verschiedenen Antikörpern markiert und mit dem FACS-Gerät analysiert.

A) Die Zellen wurden mit anti-CD3-APC (T-Zellmarker) und anti-CD19-PE (B-Zellmarker; A) markiert. Der Anteil an T-Zellen (CD3) und B-Zellen (CD19) innerhalb der lymphoiden Zellpopulation wurde analysiert, wobei unmarkierte Zellen (unten linke Ecke) myeloide Zellen sind.

B) Zellen der Milz wurden mit anti-CD3, anti-CD4 und anti-CD8 markiert. Anschließend wurde die Verteilung an CD4⁺ und CD8⁺ innerhalb der CD3 markierten Zellpopulation untersucht.

C) Für die Analyse des Verhältnisses zwischen CD4⁺, CD8⁺ und CD4⁺CD8⁺ T-Zellen des Thymus wurden aus drei *c-fos*^{-/-}-Mäusen und 3 Wildtyp-Mäusen der Thymus präpariert. Die T-Zellen mit anti-CD4 und anti-CD8 markiert und mit Hilfe des FACS-Gerätes analysiert.

Mäusen tendenziell leicht, aber nicht signifikant, erhöht ist (Wang et al., 1992). Ein Unterschied zwischen den beiden Genotypen lässt sich auch in der Menge an myeloiden Zellen in der Milz nachweisen, wobei diese in c-Fos-defizienten Mäusen erhöht ist. Es wurde bereits diskutiert, dass es sich sehr wahrscheinlich um eine erhöhte Anzahl an Makrophagen handelt (Wang et al., 1992).

Die Verteilung an CD4⁻- und CD8⁺-Antikörpern T-Zellen in der Milz wurde ebenfalls bestimmt. Hierzu wurden die T-Zellen mit CD4 oder CD8 markiert und die Verteilung mit dem FACS-Gerät gemessen. Zwischen beiden Genotypen waren mit einem Anteil von ca. 20-25% CD4⁺ und einem Anteil von ca. 50-55% CD8⁺ kein signifikanter Unterschied zu erkennen. (Abb. 5B).

Die Analyse der T-Zellpopulation aus den Thymus von 6-8 Wochen alten c-Fos-defizienten Mäusen zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Größe des Thymus oder in der Zellzahl bzw. auch nicht in der anteiligen Menge an CD4⁺, CD8⁺ und CD4⁺CD8⁺ T-Zellen (Abb. 5C).

In beiden Genotypen waren ca. 85% der T-Zellen CD4⁺8⁺, 2-3% waren CD4⁺ und 7-8% CD8⁺ (Abb. 5C).

4.1.2. Normale Aktivierung der T-Zellen aus der Milz von c-Fos-defizienten Mäusen

Zur Induktion von Apoptose in primären reifen T-Zellen aus der Milz ist erst eine Aktivierung der T-Zellen erforderlich. Ein möglicher Defekt in der Aktivierung der T-Zellen könnte in der Folge zu einer veränderten Apoptoseantwort führen. Daher wurde zunächst die Aktivierung der T-Zellen anhand der Expression von zwei sehr frühen Aktivierungsmarkern CD25 und CD69 bestimmt. Die T-Zellen wurden nach ihrer Isolation aus der Milz mit ConA (Concavalin A; 5 µg/ml) und IL-2 (zu 5% im Medium) behandelt, um die Aktivierung über den T-Zellrezeptor zu erzielen. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Aktivierung wurde die Expression von CD25 und CD69 auf der Zelloberfläche mit dem FACS-Gerät analysiert (Abb. 6A).

Es konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen in der Expression von CD25 und CD69 beobachtet werden. Beide Aktivierungsmarker konnten erstmals drei Stunden nach der Aktivierung mit ConA/IL-2 nachgewiesen werden. 20 Stunden nach der Aktivierung erreichten beide Marker ihren Expressionshöhepunkt, wobei die Expression von CD25 über mehrere Tage auf diesem Maximalwert blieb. Die Expression von CD69 fiel dagegen nach ca. 48 Stunden wieder ab und erreichte ca. 120 Stunden nach der Aktivierung wieder den Ausgangswert (Daten nicht gezeigt).

Da beide Genotypen gleichgut aktivierbar waren, kann angenommen werden, dass c-Fos entweder nicht entscheidend ist für die Aktivierung von T-Zellen, oder dass das Fehlen von c-Fos durch andere AP-1 Mitglieder kompensiert werden kann.

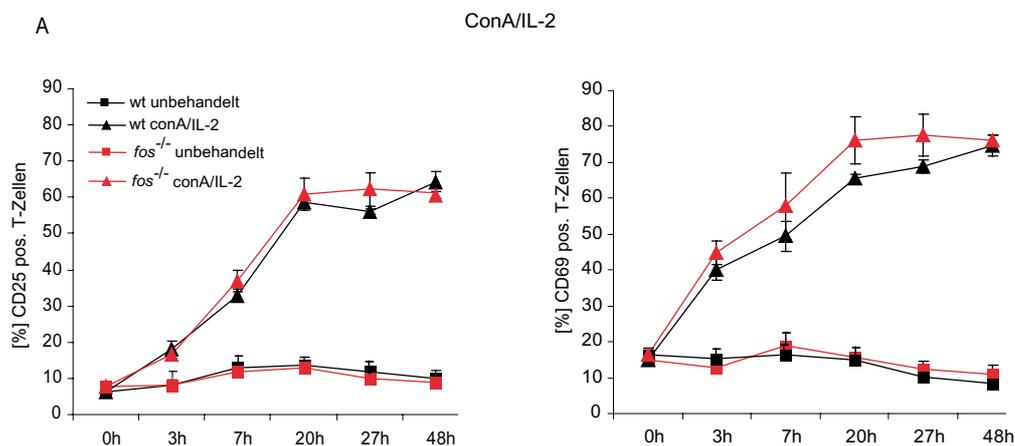


Abb.6 A: CD25 und CD69 Expression nach Aktivierung reifer T-Zellen von Wildtyp- und c-Fos-defizienten Mäusen

T-Zellen aus der Milz von *wildtyp*- und *c-fos*^{-/-}-Mäusen wurden mit anti-CD25 und anti-CD3 oder mit anti-CD69 und anti-CD3 markiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden mit dem FACS-Gerät innerhalb der CD3 positiven Zellen die Expression von CD25 und CD69 gemessen.

A: Unbehandelte oder mit ConA (5 µg/ml) / IL-2 (5% ig im Medium) aktivierte T-Zellen von jeweils zwei *wildtyp*- und zwei *c-fos*^{-/-} Mäusen.

Dies konnte durch die Behandlung der T-Zellen mit den physiologischen Aktivatoren CD3 und CD28 bestätigt werden. Ein ähnliches Ergebnis wurde nach Verwendung der sehr starken Aktivatoren TPA (10 ng/ml) und Ionomycin (1 µg/ml) erzielt, die über die gleichen Signalwege wirken wie der aktivierte T-Zellrezeptor. Nach beiden Behandlungen konnte eine Expression von CD25 nach ca. 7 Stunden beobachtet werden, während die CD69-Expression schon nach 3 Stunden deutlich angestiegen war (Abb. 6B). Die c-Fos-defizienten T-Zellen konnten vergleichbar gut nach beiden Behandlungen aktiviert werden (Abb. 6B).

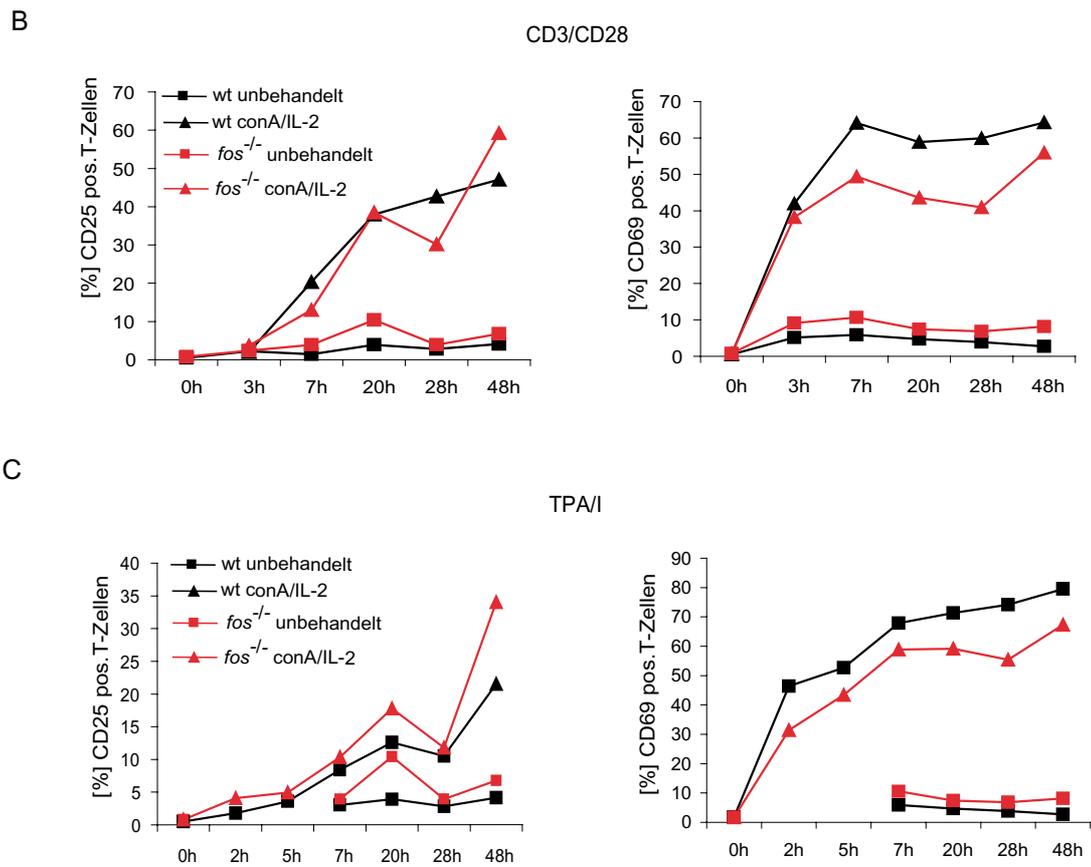


Abb.6 B und C: CD25 und CD69 Expression nach Aktivierung reifer T-Zellen von Wildtyp- und c-Fos-defizienten Mäusen

T-Zellen aus der Milz von *wildtyp*- und *c-fos*^{-/-}-Mäusen wurden mit anti-CD25 und anti-CD3 oder mit anti-CD69 und anti-CD3 markiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden mit dem FACS-Gerät innerhalb der CD3 positiven Zellen die Expression von CD25 und CD69 gemessen.

B und C: T-Zellen aus der Milz von einer *wildtyp*- und einer *c-fos*^{-/-} Maus wurden unbehandelt oder mit CD3 und CD28 (beschichteten Platten) (B) oder mit TPA/I aktiviert (C). Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde im FACS-Gerät die Expression von CD25 und CD69 in den CD3 positiven Zellen gemessen.

4.1.3. Apoptoseinduktion in reifen T-Zellen ist c-Fos unabhängig

Die Apoptoserate in reifen T-Zellen aus der Milz wurde mit Hilfe von Annexin-V im FACS gemessen. AnnexinV ist ein Protein, welches an Phosphatidylserin (PS) bindet. Dies ist in der gesunden Zelle in der inneren Zellmembran lokalisiert. Im frühen Stadium der Apoptose wird PS von der inneren Zellmembranseite auf die äußere Zellmembranseite verlagert, wo AnnexinV an PS bindet und so die apoptotische Zelle markiert. Das hier verwendete AnnexinV ist an das Fluorochrom FITC gekoppelt und wurde im FACS quantitativ gemessen (Abb. 7).

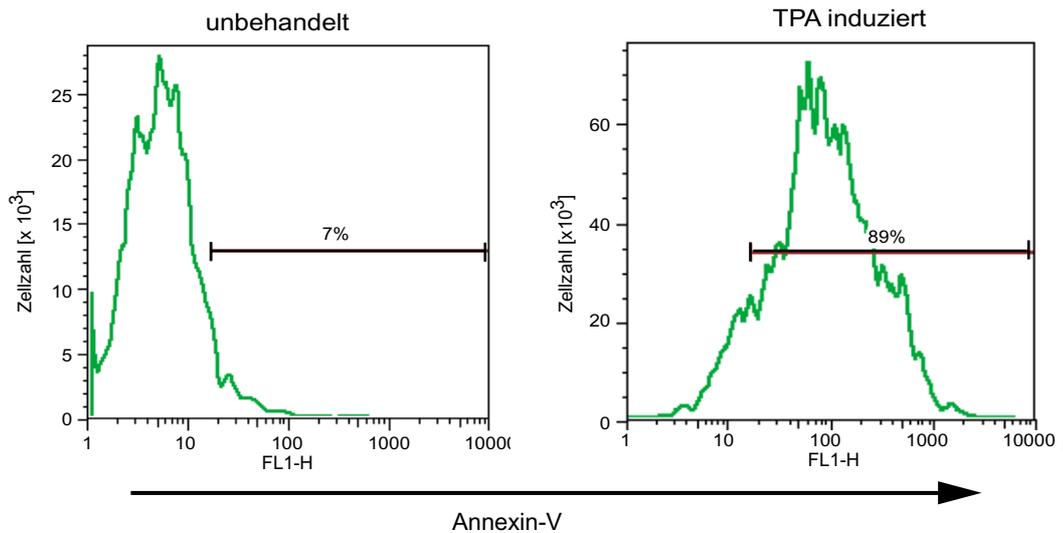


Abb.7: Darstellung der AnnexinV Methode

TPA behandelte und unbehandelte T-Zellen aus der Milz wurden 18 Stunden nach der TPA Behandlung mit Annexin-V-FITC markiert und mit einem FACS-Gerät gemessen.

Für die Bestimmung der Apoptoserate in reifen T-Zellen aus der Milz von Wildtyp- und c-Fos-defizienten Mäusen wurden diese mit ConA/IL-2 aktiviert und fünf Tage kultiviert. In dieser Zeit kommt es u.a. zur Expression von CD95 und einer allgemeinen Sensibilisierung für Apoptosesignale (Übersicht Baumann 2001). Nach der initialen Aktivierung der T-Zellen wurde mit einer zweiten Aktivierung der programmierte Zelltod induziert. Dazu wurden die T-Zellen am fünften Tag (Kontrolle t0) nach der ersten Aktivierung durch ConA/IL-2 entweder wieder mit ConA/IL-2 oder TPA/I behandelt oder zur Kontrolle unbehandelt belassen (Kontrolle). 18 Stunden nach dieser zweiten Aktivierung wurden mit Hilfe von AnnexinV die Apoptoserate im FACS-Gerät bestimmt. Es zeigte sich, dass c-Fos-defiziente T-Zellen mit ca. 28% apoptotischen Zellen dieselbe spontane Apoptoserate (Abb. 8 Kontrolle und Kontrolle t0) wie Wildtyp-T-Zellen aufweisen. Auch die Apoptoseinduktion mit TPA/I oder ConA/IL-2 war in beiden Genotypen mit ca. 75% apoptotischen Zellen ähnlich effizient.

Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass die Apoptose durch die Aktivierung mit TPA/I oder ConA/IL-2 in reifen aktivierten T-Zellen c-Fos unabhängig ist.

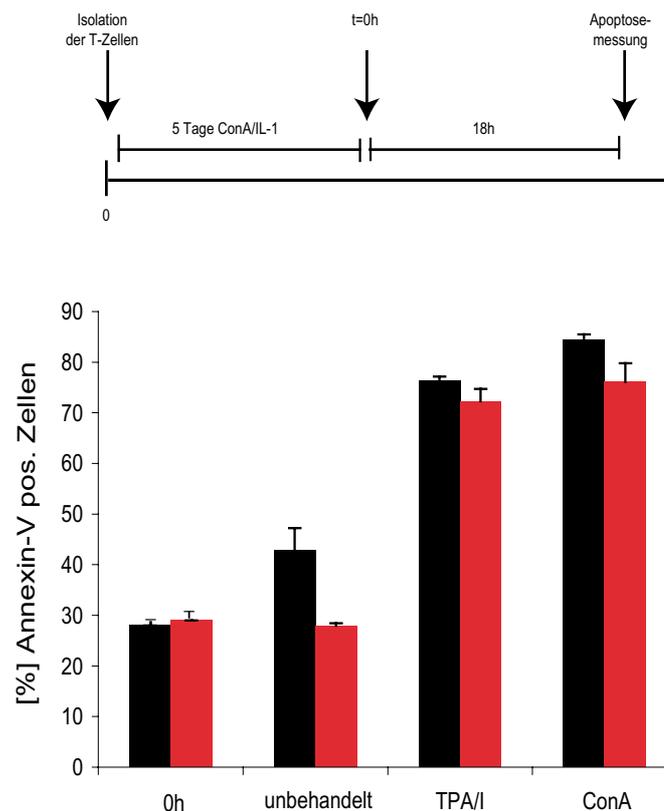


Abb.8: Unveränderte Apoptoserate in c-Fos-defizienten T-Zellen aus der Milz

Wildtyp- und *c-fos*^{-/-}-T-Zellen aus der Milz wurden mit ConA/IL-2 aktiviert und 5 Tage kultiviert. Am fünften Tag (Kontrolle t0) wurden die T-Zellen mit ConA/IL-2 oder TPA/I behandelt, oder unbehandelt (Kontrol) gelassen. 18 Stunden nach der zweiten Aktivierung wurden die Zellen mit AnnexinV-FITC markiert und die Apoptoserate im FACS gemessen.

4.1.4. Apoptoseinduktion in c-Fos-defizienten Thymocyten

Während der Reifung der T-Zellen im Thymus erfolgt die Selektion über den Mechanismus der Apoptose. Dazu ist eine genaue Kontrolle des programmierten Zelltodes absolut notwendig. Aus der Literatur gibt es Hinweise, dass c-Fos in diesem System eine Rolle spielen könnte. Thymocyten ohne c-Fos, die mit Forskolin, TPA oder Dexamethason behandelt wurden, reagierten sensitiver als *Wildtyp*- Thymocyten; auch eine erhöhte spontane Apoptose wurde nachgewiesen (Ivanov et al., 1997). Andererseits reagierten c-Fos-defiziente Thymocyten nicht unterschiedlich auf eine Etoposidebehandlung (Gajate et al., 1996) Bisher gibt es jedoch noch keine abschließenden Ergebnisse, die die Rolle von c-Fos in der Apoptoseregulation in Thymocyten tatsächlich zeigen. Daher sollte untersucht werden, ob c-Fos mitverantwortlich ist für die Apoptoseregulation in unreifen T-Zellen des Thymus.

Die Apoptoserate in den primären Thymocyten wurde mit Hilfe einer AnnexinV-Färbung und der Nicoletti-Methode (Nicoletti et al., 1991) im FACS-Gerät gemessen.

Für die Nicoletti-Methode werden die Zellen fixiert und die DNA mit Propidiumiodid markiert. Im FACS-Gerät wird der DNA-Gehalt der Zelle gemessen wobei man einzelne Zellzyklusphasen anhand des DNA-Gehalts unterscheiden kann. Während der Apoptose wird die DNA fragmentiert, weshalb apoptotische Zellen einen DNA-Gehalt zeigen, der kleiner ist als der in der G1-Phase gemessene Wert (Abb. 9).

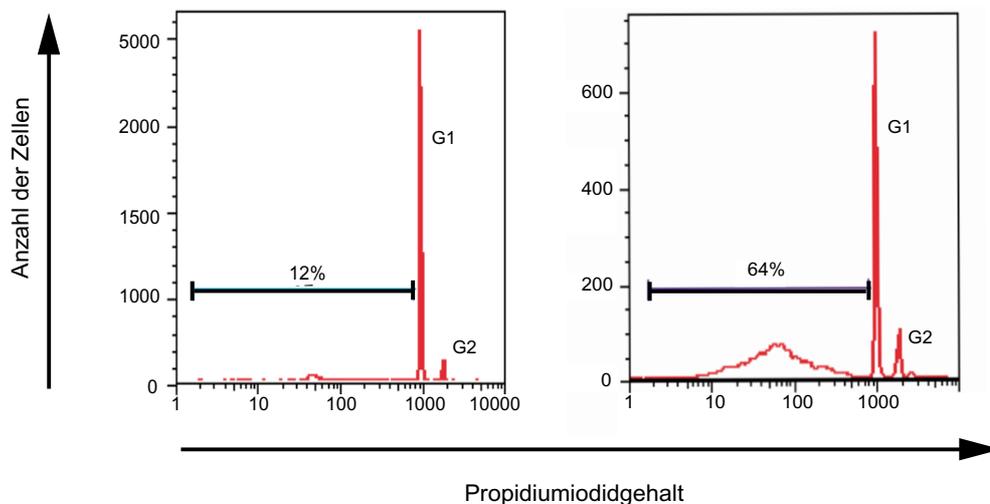


Abb.9: Darstellung der Nicoletti-Methode

FACS-Profil von T-Zellen des Thymus, die nach der Nicoletti-Methode behandelt wurden. Links unbehandelte T-Zellen mit 12% apoptotischen Zellen, rechts T-Zellen die 18 Stunden mit TPA behandelt wurden. Davon sind 64% apoptotische Zellen.

4.1.4.1. c-Fos ist nicht essentiell für die Apoptoseinduktion mit TPA oder Dexamethason in Thymocyten

Wie bereits erwähnt wurde, wird in unreifen T-Zellen durch Aktivierung Apoptose induziert. Die T-Zellen wurden aus dem Thymus isoliert, kultiviert und mit TPA oder Dexamethason aktiviert. TPA aktiviert die Thymocyten über den TCR, während Dexamethason ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) zur Aktivierung des Glucocorticoidrezeptors und somit auch zur Apoptoseinduktion führt, indem proapoptotische Gene aktiviert werden, oder indem die Transkription von „Überlebensgenen“ inhibiert werden (Übersichtsartikel siehe: Greenstein et al., 2002).

Die Apoptoseinduktion wurde parallel nach TPA bzw. Dexamethason jeweils mit AnnexinV- und der Nicoletti-Methode gemessen, wobei ähnliche Ergebnisse erhalten wurden.

Zehn Stunden nach der TPA Stimulation waren 25% der Thymocyten den programmierten Zelltod eingegangen. Nach Dexamethason Behandlung wurde ein Wert von 40% erreicht. Zwischen den beiden Genotypen konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden (Abb. 10). Demnach ist der durch Aktivierung induzierte Zelltod in Thymocyten c-Fos unabhängig.

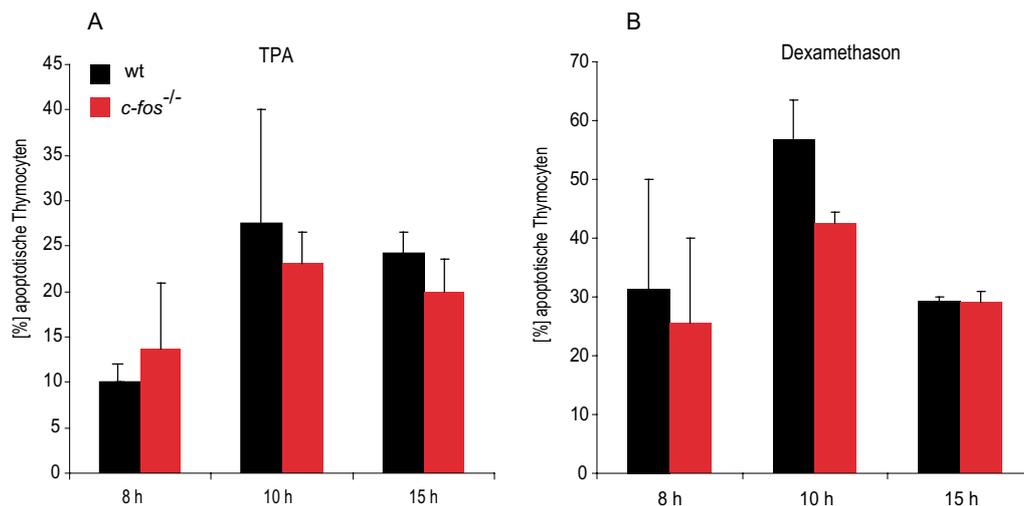


Abb.10.: Unveränderte Apoptoserate von Thymocyten aus c-Fos-defizienten Mäusen

Aus dem Thymus von *wildtyp*- und *c-fos*^{-/-}-Mäusen wurden die unreifen T-Zellen isoliert und mit TPA (10ng/ml) (A) oder Dexamethason (10⁻⁶M) (B) behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen nach der Nicoletti-Methode aufbereitet und im FACS gemessen. Bei den hier dargestellten Werten ist die spontane-Apoptose bereits subtrahiert.

4.1.4.2. Apoptoseinduktion mit CD95-L in Thymocyten ist c-Fos unabhängig

Eine weitere Möglichkeit in Thymocyten Apoptose zu induzieren, ohne den TCR zu aktivieren, ist die Inkubation der Zellen mit dem CD95-Liganden. Daher sollte untersucht werden, ob dieser CD95 Signalweg in primären c-Fos Null Thymozyten beeinträchtigt ist. Dazu wurden die Thymocyten mit CD95-Liganden haltigem Medium von Zellen behandelt, die mit einem replikationsdefizienten Virus infiziert wurden, der einen Expressionsvektor (pBabe) für *cd95-Ligand* inseriert hatte. Diese Zellen sind selbst immun gegen den CD95-Liganden, überexprimieren und sezernieren diesen ins Medium, welches dann zur Apoptoseinduktion verwendet werden kann. Als Kontrolle wurden Thymocyten mit dem Medium von Zellen behandelt, die mit einem Kontroll-Virus infiziert wurden, der nicht die Sequenz des CD95-Liganden inseriert hatte.

Die isolierten Thymozyten wurden unbehandelt belassen, oder mit den verschiedenen Überständen behandelt. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde mit Hilfe der Nicoletti-Methode im FACS-Gerät die Apoptoserate gemessen. In der spontanen Apoptose der unbehandelten T-Zellen, zeigte sich mit einer Rate von ca. 10% (+5) für die beiden

Genotypen kein Unterschied (Abb.11). Auch auf den CD95-Liganden reagierten die Thymocyten ohne c-Fos gleich sensitiv wie *Wildtyp*- Thymocyten (Abb. 11). Bereits 8 Stunden nach Zugabe des CD95-Liganden konnten ca. 40% (+10%) apoptotische Zellen beobachtet werden. Nach 12 bis 18 Stunden waren alle Thymocyten beider Genotypen apoptotisch und zeigten die typische DNA-Fragmentierung.

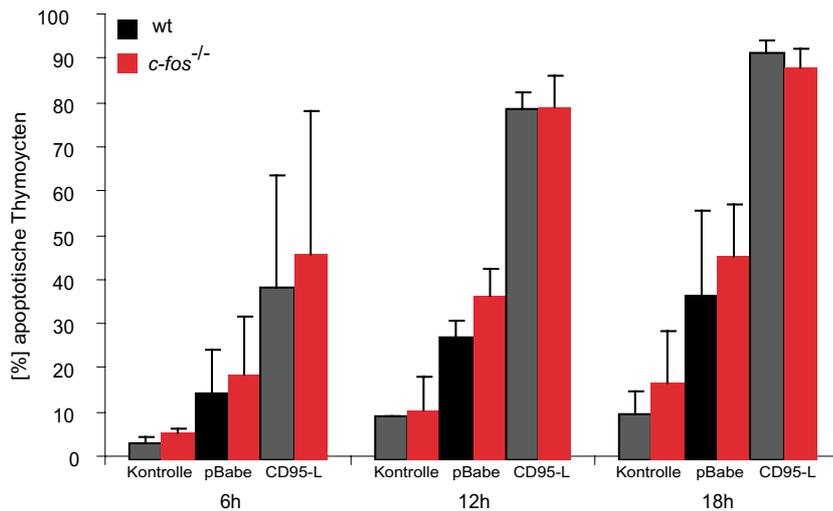


Abb.11.: Unveränderte Apoptoserate in Thymocyten ohne c-Fos nach CD95-L Behandlung

Aus dem Thymus von *Wildtyp*- und *c-Fos*-defiziente Mäusen wurde der Thymus präpariert und daraus T-Zellen isoliert. Die T-Zellen wurden mit dem Überstand von Zellen behandelt, welche mit einem Virus infiziert sind, der einen Expressionsvektor für den CD95-L enthält. Diese Zellen sezernieren den CD95-Liganden ins Medium. Als Kontrolle wurde Überstand von Zellen zu den T-Zellen gegeben die nur mit dem Virus transfiziert wurden, der den leeren Expressionsvektor beinhaltet (pBabe) oder die T-Zellen wurden unbehandelt belassen (Kontrolle).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Apoptoseinduktion durch den CD95-Liganden in Thymocyten *c-Fos* unabhängig abläuft.

Zusammenfassend lässt sich aus den unterschiedlichen experimentellen Ansätzen schließen, dass die Aktivierung der reifen T-Zellen aus der Milz *c-Fos* unabhängig reguliert wird. Desweiteren zeigen die hier beschriebenen Ergebnisse, dass in primären reifen T-Zellen der Milz oder in unreifen T-Zellen des Thymus *c-Fos* für eine effektive Apoptoseantwort nicht erforderlich ist. Somit kann angenommen werden, dass die Apoptoseinduktion in T-Zellen *c-Fos* unabhängig reguliert wird, oder dass in *c-fos*^{-/-}-Mäusen das Fehlen von *c-Fos* bei der Regulation des programmierten Zelltodes durch andere AP1-Mitglieder kompensiert wird.

4.2. Ergebniss Teil 2: Die Rolle von JunB in der Apoptose

Die Familie der Jun-Proteine stellt eine wichtige Gruppe innerhalb des AP-1 Transkriptionsfaktors dar. Die Funktion dieser Protein-Familie in der Apoptoseregulation ist für bisher nur die Mitglieder c-Jun und JunD genauer untersucht worden. An immortalen Fibroblasten wurde gezeigt, dass c-Jun im Gegensatz zu JunD eine proapoptotische Funktion in der Regulation des programmierten Zelltodes hat. C-Jun-defiziente Fibroblasten weisen eine verringerte Apoptoseantwort nach Stressinduktion auf. Verantwortlich für diesen Phänotyp ist eine reduzierte Expression des c-Jun Zielgens CD95-Ligand (CD95-L) (Kolbus et al. 1999).

Ein wichtiger Gegenspieler von c-Jun in der Zelle ist, wie bereits beschrieben, JunB. Beide Proteine regulieren antagonistisch die Ras-induzierte Transformation (Schütte et al. 1988), die Expression von AP-1 abhängigen Reportergenen (Chiu et al. 1988), den Zellzyklus (Baikiri et al. 2000; Passegue und Wagner 2000; Andrecht et al. 2002) und die Proliferation und Differenzierung in der Haut (Szabowski et al. 2001). Aufgrund dieser Befunde könnte man von JunB annehmen, dass dieses Protein ebenfalls eine wichtige Funktion in der Regulation des programmierten Zelltod hat. Um dies zu überprüfen, habe ich die Apoptoseantwort nach Stressinduktion in *junB*^{-/-}-Fibroblasten analysiert.

4.2.1. JunB Expression nach Stressinduktion

Voraussetzung für eine wichtige Funktion von JunB in der Stressantwort wäre, ähnlich wie bei c-Fos und c-Jun, eine Veränderung der Expression oder Aktivität von JunB nach Behandlung von Zellen mit Apoptose auslösenden Signalen. Daher wurde zunächst die Expression von JunB in der Stressantwort von Zellen analysiert, indem immortale Wildtyp-Fibroblasten mit UV (40J/m²) bestrahlt oder mit MMS (1 mM) behandelt wurden und zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Western Blot die Menge des JunB Proteins bestimmt wurde. In unbehandelten Zellen (t₀) konnte JunB im Western Blot nicht nachgewiesen werden. 10 Min nach UV-Bestrahlung war jedoch eine deutliche Induktion vorhanden, wobei die Menge an JunB auch nach 120 Min konstant blieb. In MMS behandelten Zellen konnte JunB erst nach 30 Min nachgewiesen werden, erreichte ein Maximum nach 60 Min und sank nach 120 Min wieder ab (Abb. 12).

Diese Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass JunB eine Funktion in der Stressantwort der Zelle haben könnte.



Abb.12: JunB Expression wird nach UV-Bestrahlung oder MMS-Behandlung in Wildtyp-Fibroblasten induziert

Die Menge an JunB in Wildtyp-Fibroblasten wurde mittels Western Blot zu den angegebenen Zeitpunkten nach A) UV-Bestrahlung (40J/m^2) und nach B) MMS-Behandlung (1mM) im Vergleich zur Aktin-Kontrolle untersucht

4.2.2. Verminderte Apoptoseantwort in JunB-defizienten Fibroblasten

Zur Untersuchung der Rolle von JunB in der Apoptose stand eine JunB-defiziente immortalisierte Fibroblastenlinie zur Verfügung (Andrecht et al. 2002). Um auszuschließen, dass eine Mutation während der Immortalisierung aufgetreten ist, die für die beobachteten Effekte verantwortlich sein könnte, generierte ich eine weitere, unabhängige JunB-defiziente Linie, die zur Reproduktion und Absicherung der Daten verwendet werden sollte.

Dazu wurden die Fibroblasten zweier Geschwister-Embryonen isoliert, wovon ein Embryo (Nr. 49) den Genotyp *junB*^{-/-} und ein Embryo (Nr. 47) den Genotyp *wildtyp* hatte. Diese isolierten Fibroblasten wurden nach dem 3T3-Protokoll immortalisiert (Abb. 13A). Aus den Fibroblasten des Embryos Nr. 49 wurde die *junB*^{-/-}-Zelllinie 49 und aus denen des Embryos Nr. 47 aus demselben Wurf die korrespondierende *wildtyp*-Zelllinie 47 neu etabliert.

Zur Untersuchungen der Funktion von JunB in der Apoptoseantwort wurden die beiden zwei *wildtyp*- und *junB*^{-/-}-Fibroblastenzelllinien mit UV (40J/m^2) bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten mit AnnexinV und Propidiumiodid gefärbt (Abb. 15A) und mit einem FACS-Gerät die apoptotischen Zellen bestimmt. Die spontane Apoptoserate (0 h; Abb. 13) war in den verschiedenen Zelllinien annähernd gleich (Abb. 13B). 16 Stunden nach der UV-Bestrahlung waren in den Wildtyp-Kulturen ca. 15-20% der Zellen apoptotisch, nach 24 Stunden stieg der Anteil auf 25-35% (Abb. 13B). Diese Zahlen stimmen mit bereits publizierten Daten bezüglich der Apoptose von Wildtyp Fibroblasten überein (Kolbus et al. 1999). Im Vergleich dazu waren in den beiden *junB*^{-/-}-Fibroblastenlinien keine oder nur eine sehr geringe Menge an Zellen apoptotisch. Auch 24 Stunden nach der UV-Bestrahlung betrug der Anteil an apoptotischen Zellen nur 12% (Abb. 13B).

Offenbar führt das Fehlen von JunB zu einer Hemmung der UV induzierten Apoptose.

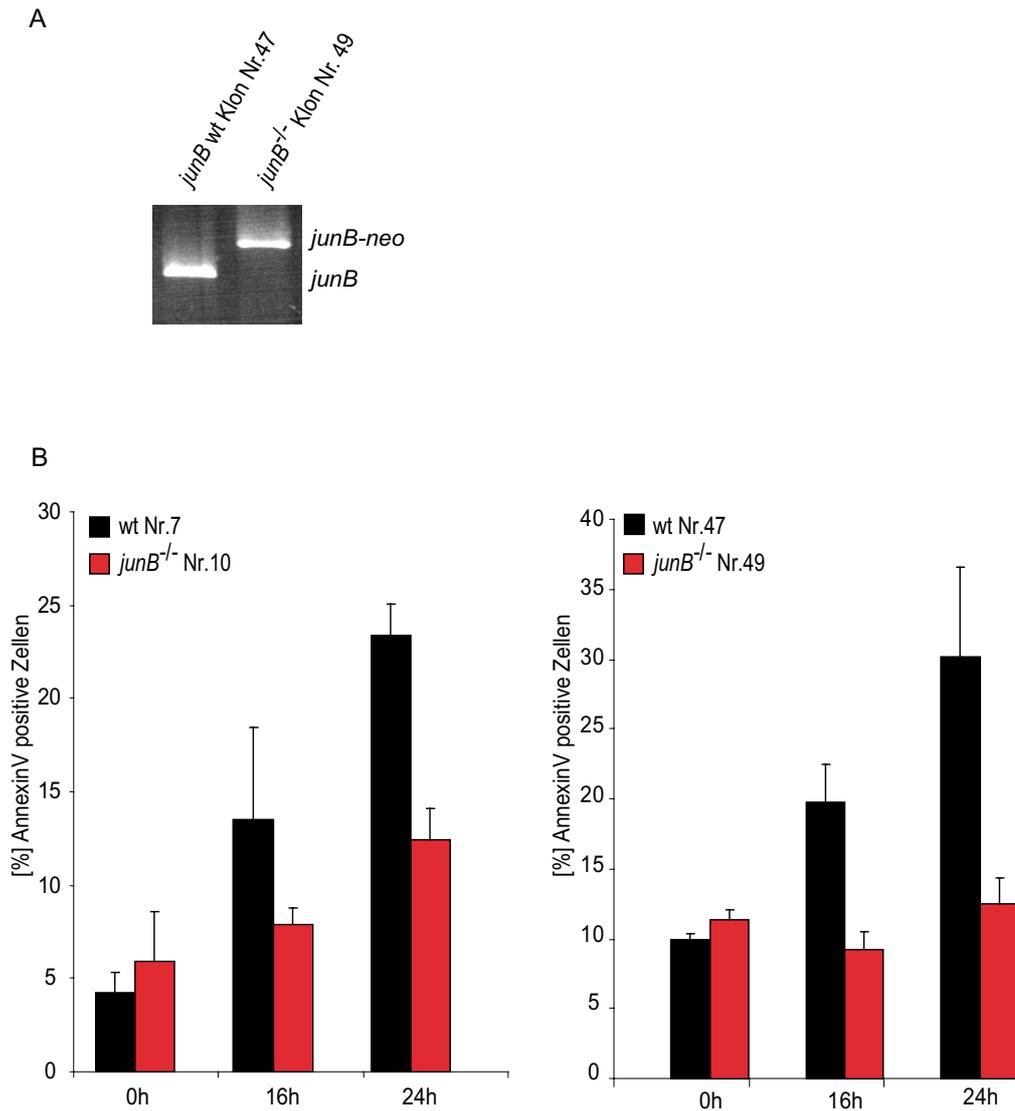


Abb.13.: Verminderte Apoptose in JunB-defizienten und Wildtyp-Fibroblasten nach UV Bestrahlung

Genotypisierung mittels PCR von zwei neu generierten 3T3 Fibroblasten-Zelllinien, die aus den Embryonen eines Wurf gewonnen wurden. Während Klon Nr. 47 das typische Amplifikationsprodukt des *junB* Gens zeigt, wird für den Klon Nr. 49 ein größeres Produkt amplifiziert, welches indikativ für einen mutierten JunB Locus ist (Schorpp-Kistner et al., 1999).

Zur Messung der Apoptose wurden *wildtyp*- und *junB^{-/-}*-Fibroblasten mit UV bestrahlt (40 J/m²). Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit AnnexinV und Propidiumiodid markiert und die Apoptoserate im FACS-Gerät gemessen.

Apoptose kann über verschiedene Stress-Signalwege in immortalisierten Fibroblasten induziert werden. Die Behandlung von Zellen mit genotoxischen Substanzen wie z.B. dem DNA-methylierenden Agens MMS induziert ebenfalls über Stress-Signalwege Apoptose. Wie gezeigt, führt die MMS-Behandlung ähnlich wie die UV-Bestrahlung zu einer Induktion der JunB Expression in Fibroblasten (Abb. 12). Um zu überprüfen, ob die reduzierte Apoptoseantwort spezifisch für die UV-induzierte Apoptose ist, wurden die Zellen mit MMS behandelt und die Apoptoserate im FACS-Gerät analysiert.

Es zeigte sich, dass die JunB-defiziente Fibroblasten auch nach der Behandlung mit 0,4 mM MMS eine reduzierte Apoptoserate aufweisen. Analog zu der UV-Bestrahlung zeigt sich bei den Wildtyp-Zellen nach 16 h eine deutliche Induktion der Apoptoserate (29%), die nach 24 Stunden zum Teil noch höher lag (Abb. 14). Im Gegensatz dazu lag der Wert in JunB-defizienten Zellen zu jedem Zeitpunkt deutlich niedriger (24 Stunden ca. 12%; Abb. 14).

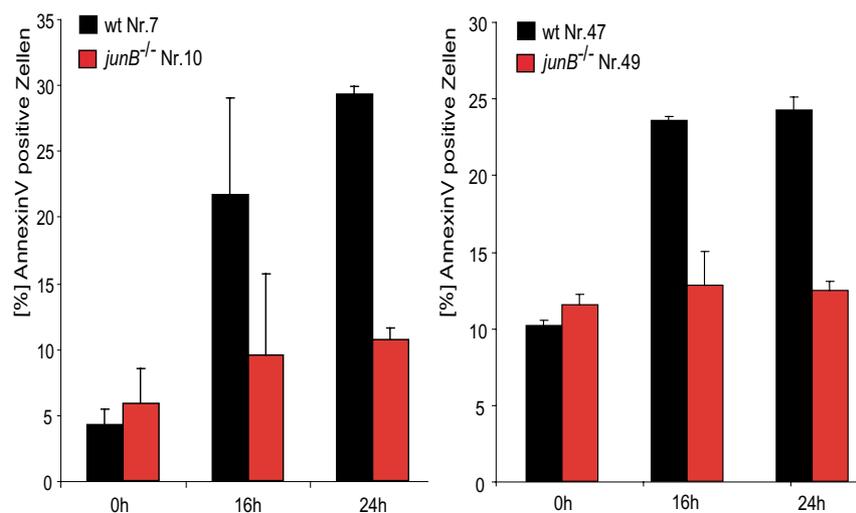


Abb.14: Verminderte Apoptose in *junB*^{-/-}-Fibroblasten nach MMS Behandlung

wildtyp- und *junB*^{-/-}-Fibroblasten wurden mit MMS (0,4 mM) für die angegebene Zeitpunkte inkubiert anschließend mit AnnexinV und Propidiumiodid gefärbt und die Apoptoserate im FACS-Gerät gemessen.

Das Fehlen von JunB in den Fibroblasten führt sowohl nach UV-Bestrahlung, als auch nach MMS-Behandlung zu einer reduzierten Apoptoseantwort. JunB ist daher essentiell für die stressinduzierte Apoptose in Fibroblasten.

4.2.3. Erhöhte Apoptoserate durch CD95-Ligand in JunB Null Fibroblasten

Einer der wichtigsten Signalwege, der zur Auslösung der Apoptose beiträgt, ist der CD95-Signalweg, welcher durch den gleichnamigen Liganden induziert wird. Dadurch kommt es im Anschluss an die Rezeptorbindung und Trimerisierung zu einer Kettenreaktion, die in der Aktivierung der Mitochondrien und der Kaspasenkaskade mündet. Bei Defekten innerhalb dieses Signalweges kann es zu einer veränderten Apoptoseantwort kommen. In c-Jun-defizienten Fibroblasten führt die fehlende CD95-Liganden-Expression zu einer verringerten Apoptoseantwort nach UV und MMS Behandlung. Um zu klären, ob ein solcher Defekt auch in den *junB*^{-/-}-Fibroblasten vorhanden ist, wurden die Zelllinien *wildtyp* Nr.7 und *junB*^{-/-} Nr.10 mit dem CD95-Liganden behandelt und im Anschluss die Apoptoserate mit einer AnnexinV- und Propidiumiodid-Färbung im FACS-Gerät bestimmt (Abb. 15A).

In Wildtyp-Fibroblasten konnten 16 Stunden nach der Behandlung mit dem CD95-Liganden die ersten apoptotischen Zellen nachgewiesen werden (maximal 5% spezifische Apoptose, Abb. 15). Die *junB*^{-/-}-Fibroblasten reagierten schon nach 4 Stunden sehr sensitiv mit über 20% apoptotischen Zellen auf den Liganden. 16 Stunden nach der Behandlung waren über 50% der Zellen apoptotisch (Abb. 15B). Ein ähnliches Ergebnis wurde mit den Zelllinien Nr.47 und Nr.49 nach 16 Stunden CD95-Liganden Behandlung erhalten (Abb. 15B).

Offensichtlich führt das Fehlen von JunB in den Fibroblasten zu einer deutlichen Sensibilisierung gegenüber den CD95-Liganden.

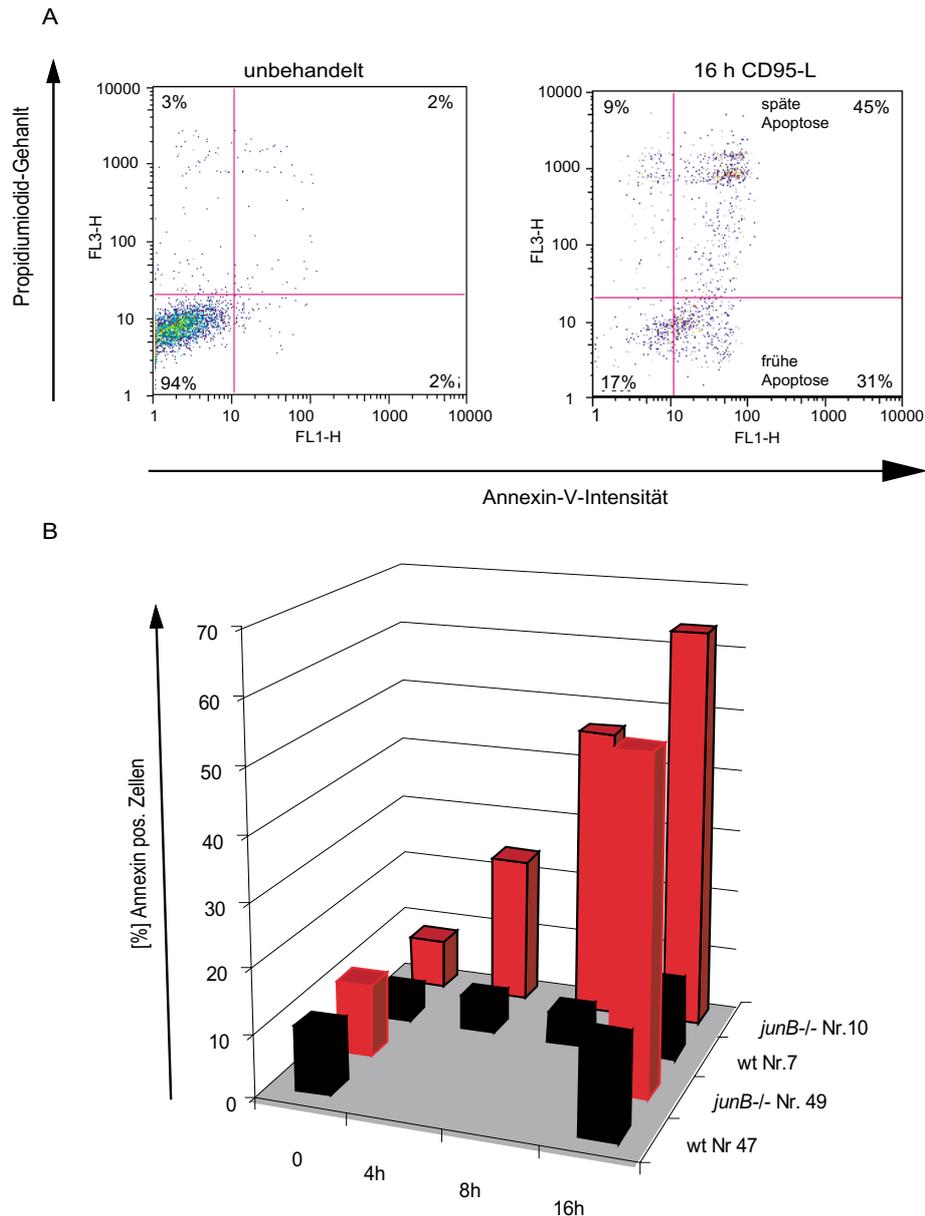


Abb.15: Verstärkte Apoptoseinduktion mit CD95-L in *junB*^{-/-}-Fibroblasten

A: Für die Messung der apoptotischen Zellen im FACS-Gerät wurden die Fibroblasten mit AnnexinV und Propidiumiodid (PI) behandelt. Im FACS lassen sich früh (rechts oben) und späte (rechts unten) apoptotische Zellen unterscheiden. Die Population, deren Zellen nur PI markiert sind, beinhaltet nekrotische Zellen und Zelltrümmer (links oben). Zellen, die weder AnnexinV noch PI markiert sind, sind gesunde, nicht apoptotische Zellen (links unten).

B: *Wildtyp*- und *junB*^{-/-}-Fibroblasten wurden mit dem CD95-Liganden behandelt und nach den angegebenen Zeitpunkten mit AnnexinV und Propidiumiodid gefärbt und im FACS-Gerät gemessen.

4.2.4. Mitochondrienaktivierung in JunB-defizienten Fibroblasten

Die Aktivierung von Mitochondrien, die eine Induktion der Kaspasen-kaskade nach sich zieht, ist ein wichtiger Schritt der Apoptose-Signalkaskade.

In manchen Zelltypen wie Thymocyten und periphere T-Zellen (Scaffidi et al. 1999) wird nach der Aktivierung von CD95 direkt die Kaspasen-kaskade über die Kaspasen 8 und 3 aktiviert (Scaffidi et al. 1999). In Fibroblasten jedoch ist nach den meisten Apoptosestimuli zunächst eine Aktivierung der Mitochondrien notwendig (Scaffidi et al. 1999). Der Befund, dass die JunB-defizienten Fibroblasten durch die Behandlung mit dem CD95-Liganden sehr effizient in Apoptose gehen, könnte auf einer effizienteren Mitochondrienaktivierung beruhen. Zur Bestimmung der Mitochondrienaktivierung wurde der Farbstoff JC-1 verwendet, der in die Mitochondrienmembran interkaliert und bei einer Veränderung des Membranpotentials seine Farbe von rot nach grün wechselt. Somit lässt sich die Veränderung des Membranpotential der Mitochondrien im FACS-Gerät messen. Wildtyp- und JunB-defiziente Fibroblasten wurden mit MMS oder mit dem CD95-Liganden behandelt. 24 Stunden nach der Behandlung mit MMS und 8 Stunden nach der Behandlung mit dem CD95-Liganden wurden die Zellen mit JC-1 gefärbt und mit dem FACS-Gerät analysiert. Es zeigte sich, dass in den Wildtyp-Kulturen nach der Behandlung mit dem CD95-Liganden 10% der Mitochondrien aktiviert wurden. Der Wert war in den JunB-defizienten Zellen deutlich erhöht (65%; Abb. 16A). Umgekehrt wurde durch die Zugabe von MMS nur bei 11% der *junB*^{-/-}-Zellen eine Mitochondrienaktivierung erreicht, während in den *wildtyp*-Zellen ca. 36% der Mitochondrien aktiviert worden waren (Abb. 16B). Das bedeutet, dass prinzipiell die Aktivierung der Mitochondrien in den *junB*^{-/-}-Fibroblasten sehr effizient, wenn nicht gar effizienter als in den Wildtyp-Fibroblasten erreicht werden kann. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass die Ursache für die verringerte Aktivierung der Mitochondrien und der daraus resultierenden reduzierten Apoptose nach MMS Behandlung wahrscheinlich oberhalb der Mitochondrien liegt. Der Defekt scheint dazu zu führen, dass das durch MMS ausgelöste Stresssignal nicht bei den Mitochondrien ankommt, weshalb es zur reduzierten Apoptoseantwort nach UV oder MMS Behandlung kommen kann. Andererseits werden die Mitochondrien durch den CD95-Liganden in den *junB*^{-/-}-Fibroblasten verstärkt aktiviert. Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass in den JunB-defizienten Zellen ein weiterer Defekt, ebenfalls oberhalb der Mitochondrien vorliegen muss, der zu dieser verstärkten Aktivierung beiträgt.

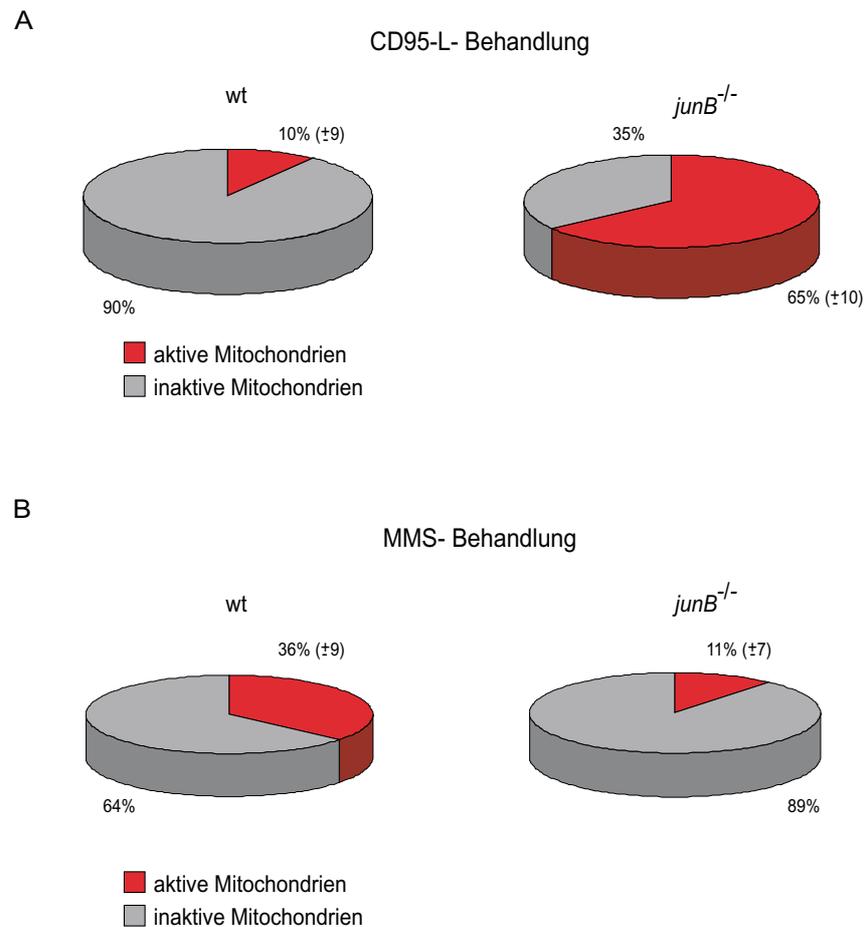


Abb. 16: Mitochondrienaktivierung in *junB*^{-/-}-Fibroblasten nach CD95-L- oder MMS-Behandlung

Fibroblasten wurden für 8 Stunden mit CD95-Ligand (A) oder für 24 Stunden mit MMS (B) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit JC-1 gefärbt und im FACS-Gerät analysiert. Die spontane Aktivität der Mitochondrien in den unbehandelten Zellen wurde subtrahiert. Hier dargestellt ist nur die spezifische Aktivierung der Mitochondrien

4.2..5. CD95 Expression in JunB-defizinten Zellen

4.2.5.1 Erhöhte CD95 Expression in *junB*^{-/-}-Fibroblasten

Da die *junB*^{-/-}-Fibroblasten sehr schnell (nach 4 Stunden) apoptotisch auf die Zugabe des CD95-Liganden reagieren, wird höchstwahrscheinlich keine neue Proteinsynthese nach der Induktion mit dem Liganden benötigt. Folglich muss der Defekt schon in unbehandelten Fibroblasten vorliegen. CD95-Ligand bindet an CD95, welcher in der Zellmembran lokalisiert ist und durch Liganden Bindung trimerisiert. Dies führt zur Aktivierung der DISC und der nachgeschalteten Aktivierung der Kaspasen-Kaskade. Der human-Promotor von CD95 enthält mindestens eine AP-1 Bindestellen (Behrmann et al. 1994). Es ist anzunehmen, dass diese AP-1 Bindestelle auch im Promotor des Mausgens konserviert ist, und eventuell von JunB reguliert wird. Daher wurde zunächst die Menge an CD95-RNA in unbehandelten Wildtyp- und JunB-defizienten Fibroblasten analysiert. Mittels semi-

quantitativer RT-PCR konnte eine bis zum siebenfach erhöhte Expression der CD95-RNA in den JunB-defizienten Zellen beobachtet werden (Abb. 17A). Dies spiegelt sich auch auf Proteinebene wieder (Abb. 17B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass JunB die Expression von CD95 direkt oder indirekt negativ reguliert.

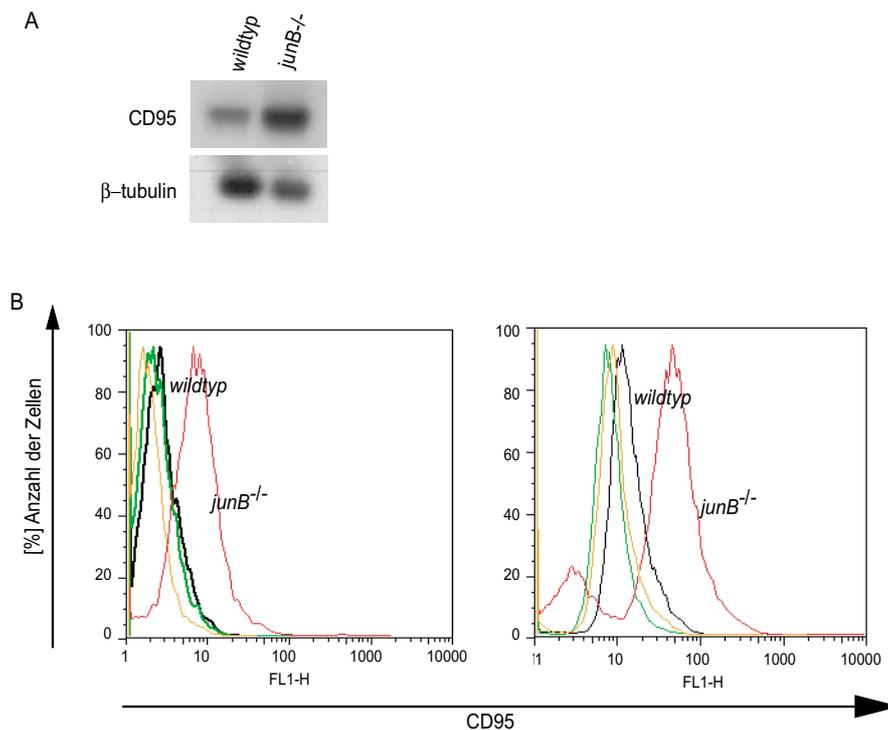


Abb.17: CD95-Überexpression in *junB*^{-/-}-Fibroblasten

Die CD95 Expression wurde mittels einer RT-PCR auf Gesamt-RNA von *wildtyp*- und *junB*^{-/-}-Fibroblasten im Vergleich zur Tubulin-Kontrolle untersucht. Zur Quantifizierung wurde das PCR-Produkt mittels Southern-Blot auf eine Membran gebracht und mit einer CD95-Sonde hybridisiert, ähnlich wurde mit Tubulin verfahren. Anschließend wurden die CD95 RT-PCR mit Hilfe der Tubulin-Kontrolle mit dem Programm TINA ausgewertet.

Die Menge an CD95-Protein wurde mittels anti-CD95 Markierung von unbehandelten Wildtyp- und JunB Null Fibroblasten im FACS-Gerät gemessen .

Dies wirft die Frage auf, ob auch im Umkehrschluss eine Überexpression von JunB die CD95-Menge reduziert. Dazu wurde in zwei stabil transfizierten Fibroblasten-Zelllinien, die JunB unter der Kontrolle des menschlichen UbiquitinC-Promotors verschieden stark überexprimieren, die CD95-Expression im FACS-Gerät gemessen. Alle drei Zelllinien wiesen dabei ähnlich geringe Mengen an CD95 auf. Eine Überexpression von JunB reicht daher nicht aus, um die geringen Mengen von CD95 in Fibroblasten vollständig zu hemmen (Abb. 18).

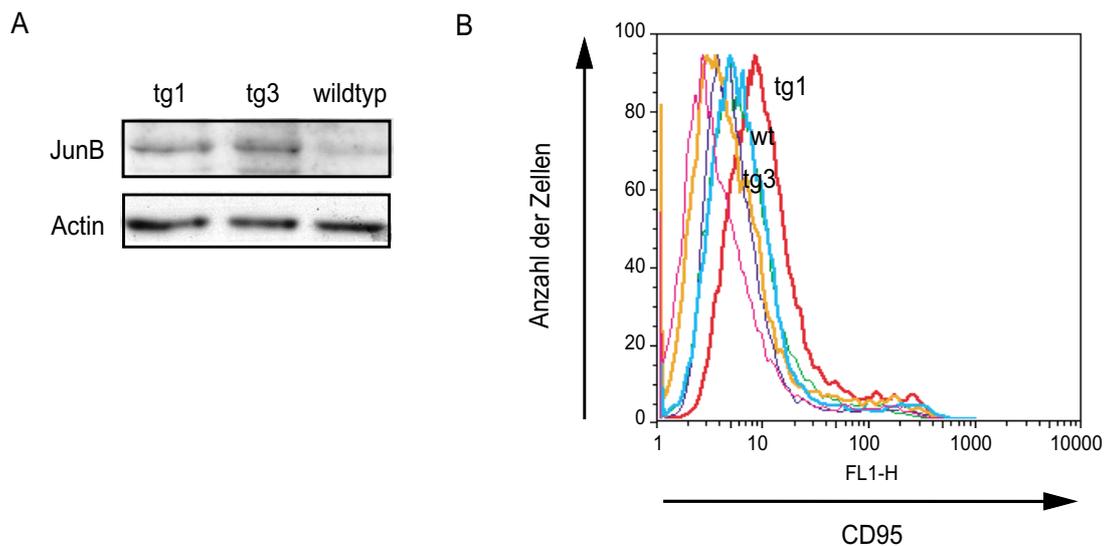


Abb.18: Normale CD95 Expression in JunB überexprimierenden Zellen

Analyse der JunB Menge in den Zelllinien tg1 und tg3 wurde mittels Western-Blot, im Vergleich zu Aktin-Kontrolle nachgewiesen. Wobei tg1 und tg3 JunB im Vergleich zum Wildtyp stark überexprimieren (zur Verfügung gestellt von Dr. B. Hartenstein).

Die Wildtyp-, tg1- und tg3-Zelllinien wurden mit anti-CD95 markiert und die CD95-Expression mittels FACS-Gerät gemessen.

4.2.5.2. JunB unabhängige CD95 Expression in verschiedenen Zelltypen

Um zu klären, ob die Repressorfunktion von JunB ubiquitär oder zelltypabhängig ist, wurde die Expression von CD95 in anderen JunB-defizienten Zellsystemen gemessen (Abb.19): in primären, mesenchymalen Stromazellen (von Dr. Hess zur Verfügung gestellt), in einer Endothelioma Zelllinie (von Dr. Schmidt und Dr. Schorpp-Kistner zur Verfügung gestellt) und in primären Thymocyten (von Dr. Hartenstein zur Verfügung gestellt; Abb. 19). Keine dieser *junB*^{-/-}-Zelltypen zeigte eine veränderte CD95 Expression im Vergleich zu entsprechend homologen *wildtyp*-Zellen (Abb. 20). In JunB-defizienten B- und T-Zellen der Milz konnte ebenfalls kein Unterschied in der CD95-Expression nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung Dr. Hartenstein). Aufgrund dieser Daten muss angenommen werden, dass die Repressorfunktion von JunB auf das *cd95*-Gen zelltypabhängig und für Fibroblasten spezifisch ist.

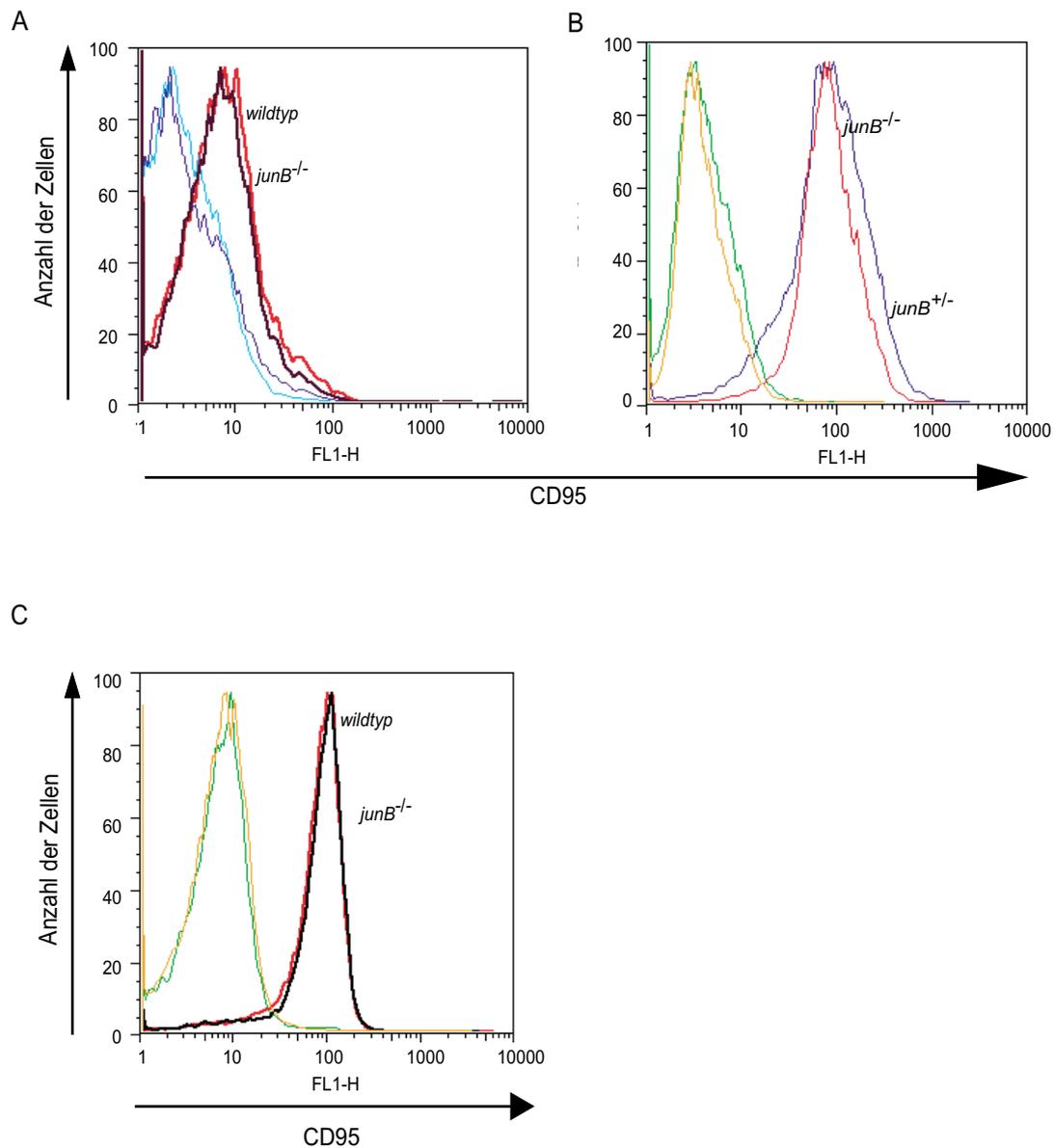


Abb.19: Normale CD95-Expression in verschiedenen JunB-defiziente Zelltypen

Wildtyp- und *junB*^{-/-} A) primäre mesenchymale Stromazellen aus dem Knochenmark, B) Endothelioma Zellen und C) primäre Thymocyten wurden mit anti-CD95 markiert und die CD95-Expression im FACS-Gerät gemessen.

4.2.6. Erhöhte CD95-Liganden Expression in JunB-defizienten Fibroblasten

Es ist bekannt, dass sich in der Promotorregion des zum CD95 gehörige CD95-Liganden funktionelle AP-1 Bindestellen befinden. Die Aktivierung des CD95-Ligand nach MMS-Behandlung wird in Fibroblasten von c-Jun reguliert. Aufgrund des Befundes, dass JunB CD95 reprimiert, war es notwendig zu klären, ob JunB die Expression des CD95-Liganden reguliert. Dazu wurden die RNA von MMS behandelten Fibroblasten isoliert und die Menge an CD95-Liganden-RNA mittels semi-quantitativer RT-PCR analysiert. In den unbehandelten Wildtyp-Zelllinien konnte keine Expression des CD95-Liganden nachgewiesen werden. Erst nach Behandlung mit MMS war eine transiente Induktion in

den Wildtyp-Zellen messbar. Allerdings zeigten sowohl die unbehandelten als auch insbesondere die MMS behandelten JunB-defizienten Zellen eine deutliche Überexpression des CD95-Liganden (Abb.20).

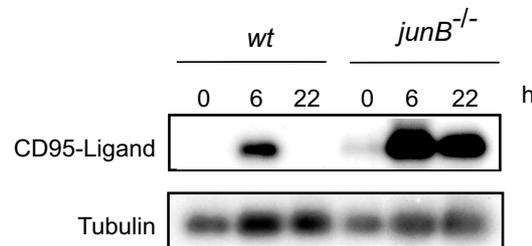


Abb. 20: Verstärkte Aktivierung des CD95-Liganden in JunB-defizienten Fibroblasten

Analyse der CD95-Liganden Expression nach MMS Behandlung von Wildtyp- und JunB-defizienten Fibroblasten mittels RT-PCR im Vergleich zur Tubulin-Kontrolle. Die Quantifizierung erfolgte mittels Southern Blot. Hierzu wurde das PCR-Produkt auf eine Membran gebracht und mit einer CD95-Liganden-Sonde hybridisiert, ähnlich wurde mit der Tubulin-Kontrolle verfahren. Die Intensität der Banden wurde mit dem Programm TINA ausgewertet.

Diese Daten lassen den Schluß zu, dass die Expression des CD95-Liganden von JunB negativ reguliert wird.

Es kann angenommen werden, dass die in dieser Arbeit nachgewiesene Fibroblastenspezifische Überexpression von CD95 für die hohe Sensitivität der *junB*^{-/-}-Fibroblasten auf den CD95-Liganden verantwortlich ist. Dies kann angesichts der sogar erhöhten Menge an CD95-Ligand allerdings nicht die reduzierte Apoptoseantwort nach Stressstimuli (MMS, UV) erklären. In den JunB-defizienten Zellen muss daher ein weiterer Defekt vorliegen, der für diesen Phänotyp verantwortlich ist.

4.2.7. Normale Expression von p53 in *junB*^{-/-}-Fibroblasten

Ein wichtiges regulatorisches Protein in der UV-induzierten Apoptose ist p53. Nach UV-Bestrahlung zeigen p53-defiziente Fibroblasten keine Apoptose (Weitzman et al. 2000). p53 ist ein Zielgen von c-Jun, daher wäre es möglich, dass auch das Fehlen von JunB die p53-Expression verändert. Die könnte die verminderte Apoptoseinduktion nach UV-Bestrahlung erklären. Daher wurde die Proteinmenge an p53 in JunB-defizienten Fibroblasten nach UV-Bestrahlung mittels Western Blot bestimmt. p53 wurde in den *wildtyp*- und *junB*^{-/-}-Zellen 8 Stunden nach UV Behandlung induziert, wobei die Menge des Proteins über den Zeitraum von 24 Stunden deutlich zunahm. Es wurde kein Unterschied in der Expression von p53 im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen gefunden (Abb. 21). Das gleiche Ergebnis wurde nach MMS-Behandlung beobachtet (Daten nicht gezeigt). Daher kann die veränderte Apoptoseantwort nach UV- oder MMS- Behandlung in den *junB*^{-/-}-Fibroblasten nicht durch veränderte p53 Mengen erklärt werden.

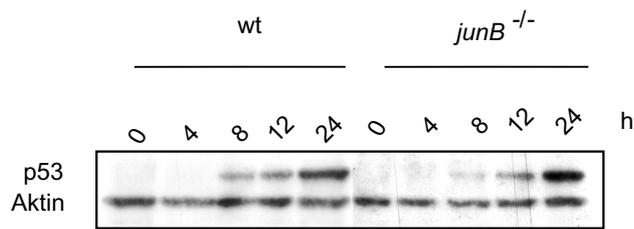


Abb.21: Unveränderte p53 Expression in JunB-defizienten Fibroblasten nach UV Behandlung

Analyse der p53 Menge in Gesamtproteinextrakten von UV bestrahlten JunB-defizienten und Wildtyp-Fibroblasten, mittels Western-Blot im Vergleich zur Aktin-Menge.

4.2.8. Verminderte c-Jun Expression in JunB-defizienten Fibroblasten nach MMS- oder UV-Induktion

Die einzelnen AP1-Mitglieder können einerseits gegenseitig ihre Expression induzieren und andererseits kann das Fehlen eines Mitgliedes durch ein verwandtes Mitglied kompensiert werden. So ist es vorstellbar, dass ein Mitglied der Jun-Familie das Fehlen von JunB in der Apoptoseregulation kompensiert. Alternativ könnte das Fehlen von JunB dazu führen, dass ein anderes Jun-Familienmitglied reprimiert oder überexprimiert wird. Wie bereits erwähnt ist c-Jun essentiell für die Regulation der Apoptose, da *c-jun*^{-/-} Fibroblasten aufgrund der fehlenden CD95-Liganden Expression hyposensitiv gegenüber der Behandlung mit Stressinduktoren sind.

Um die Expression von c-Jun in JunB-defizienten Zellen zu bestimmen, wurden Proteinextrakt von MMS oder UV induzierten Fibroblasten mittels Western Blot untersucht.

In Wildtyp-Zellen war 30 Min nach MMS Zugabe eine deutliche Induktion von c-Jun sichtbar, die bis 120 Min nach der Behandlung deutlich anstieg. Mit einer ähnlichen Kinetik wird c-Jun nach UV Bestrahlung deutlich induziert. Im Gegensatz dazu ist die c-Jun Expression in den *junB*^{-/-}-Fibroblasten nach beiden Stimuli deutlich reduziert (Abb. 22). Erst eine Stunde nach UV Bestrahlung kann eine schwache Induktion beobachtet werden. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass das Fehlen von JunB die c-Jun Expression nach Stress beeinträchtigt.

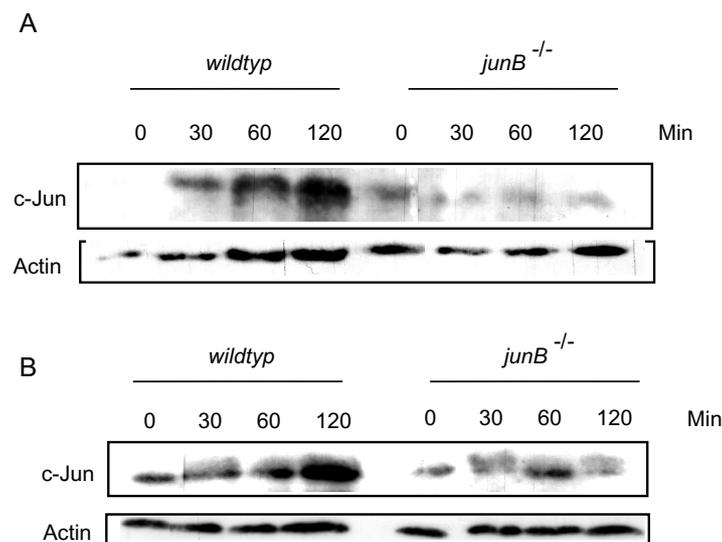


Abb.22: Verminderte c-Jun Expression in JunB-defizienten Fibroblasten nach UV- oder MMS- Behandlung

Die c-Jun Menge wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach MMS-Behandlung (1mM) B) oder UV-Bestrahlung (40J/m²) B) in Gesamtproteinextrakt aus Wildtyp- und JunB-defizienten Fibroblasten mittels Western Blot zur Normalisierung wurde parallel die Aktin-Menge bestimmt.

4.2.9. Expression und Aktivität der Stresskinasen in *junB*^{-/-}-Fibroblasten

Die Apoptoseantwort in Zellen umfasst die Aktivierung verschiedener Kinasenkaskaden. Eine der wichtigsten Kinasekaskaden, der MAPK-Signalweg, führt bei Stressinduktion zu Aktivierung der Kinasen p38 und JNK. Beide Kinasen aktivieren AP-1, wobei p38 den c-Jun Dimerisierungspartner ATF-2 und JNK sowohl ATF-2 als auch c-Jun aktiviert. c-Jun reguliert über die Bindung als c-Jun/ATF-2 Dimer an seinen Promotor seine eigene Transkription.

Somit könnte aufgrund einer Veränderung in der Expression oder Aktivität der p38 Kinasen und JNK eine reduzierte c-Jun und/oder ATF-2 Aktivität Ursache für die verminderte c-Jun Expression sein. Im folgenden wurde daher überprüft, ob die beobachteten Defekte in der c-Jun Expression auf eine veränderte Expression oder Aktivität der beiden Kinasen zurückzuführen ist.

4.2.9.1 Expression und Phosphorylierung von p38 ist JunB unabhängig

Die Expression und Phosphorylierung von p38 nach UV-Behandlung wurde mittels Western-Blot untersucht. Dabei wurden Antikörper eingesetzt die entweder nur phosphoryliertes p38 erkennen, oder sowohl mit phosphoryliertem als auch mit nicht phosphoryliertem p38 reagieren. Die Proteinmenge von p38 wurde durch die UV-Behandlung nicht beeinflusst (Abb. 23A), während, wie erwartet, die p38 Phosphorylierung konnte eine bis zum siebenfach erhöhte Expression der CD95-RNA in den JunB-defizienten Zellen beobachtet werden (Abb. 17A). Dies spiegelt sich auch auf Proteinebene wieder).

durch UV induziert wurde. Die größte Menge an phosphoryliertem p38 konnte schon 10 Min nach der UV-Bestrahlung nachgewiesen werden, die nach ca. 60 Min wieder auf den Ausgangswert sank.

In Bezug auf die p38 Menge als auch auf die Phosphorylierung von p38 konnte kein Unterschied zwischen *wildtyp*- und *junB*^{-/-}-Fibroblasten festgestellt werden (Abb. 23B). Daher kann p38 für die reduzierte Apoptoseantwort nach UV-Bestrahlung und MMS-Behandlung nicht verantwortlich sein.

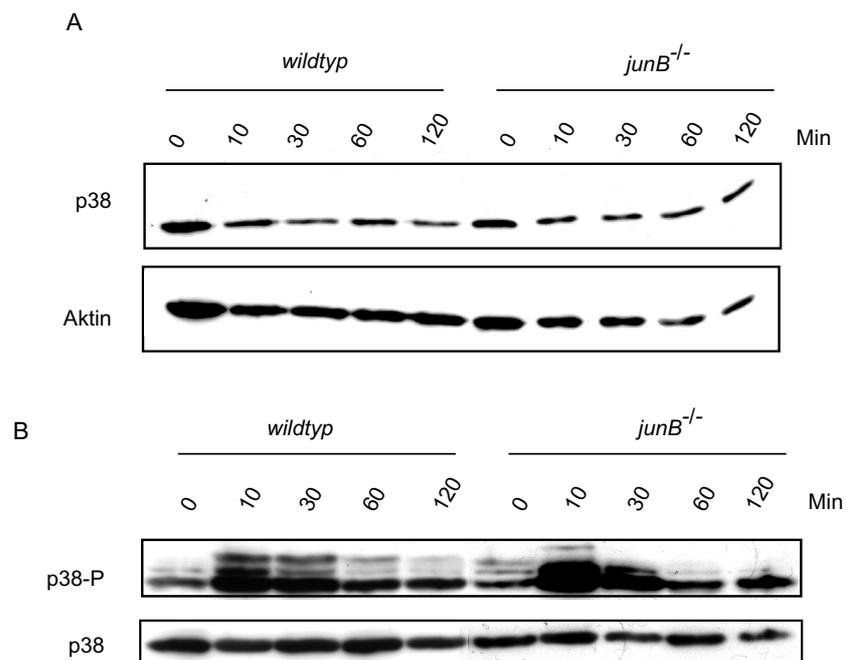


Abb.23: Unveränderte p38 Expression und Phosphorylierung in *junB*^{-/-}-Fibroblasten nach UV- Behandlung.

Von Wildtyp- und JunB-defizienten Fibroblasten wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach UV-Behandlung (40 J/m²) Gesamtproteinextrakte hergestellt. Mittels Western Blot wurde A) die p38 Menge und B) die Menge an phosphoryliertem p38 analysiert.

4.2.9.2. Reduzierte Phosphorylierung von JNK nach UV-Bestrahlung oder MMS-Behandlung

Die JNK Menge veränderte sich in beiden Zelllinien durch die MMS-Behandlung nicht und war auch in beiden Genotypen gleich groß (s. Abb. 24A). Etwa 1 Stunde nach der Induktion mit MMS konnte in den Wildtyp-Fibroblasten (Nr. 7 und Nr. 47) phosphorylierte JNK nachgewiesen werden. Die JNK Aktivierung hatte ihr Maximum vier Stunden nach der Behandlung (Nr. 7). Sechs Stunden nach der MMS-Behandlung nimmt die JNK Phosphorylierung wieder ab (Nr. 7 und Nr. 47; Abb. 24). Im Gegensatz dazu ist die JNK

Phosphorylierung in den beiden Fibroblasten JunB-defizienten Zelllinien (Nr. 49 und Nr. 10) deutlich reduziert, wobei die Reduktion in der Zelllinie Nr. 10 im Vergleich zur Wildtyp-Zelllinie Nr. 7 am stärksten sichtbar ist.

Der Verlust von JunB führt also zu einer verminderten JNK Phosphorylierung.

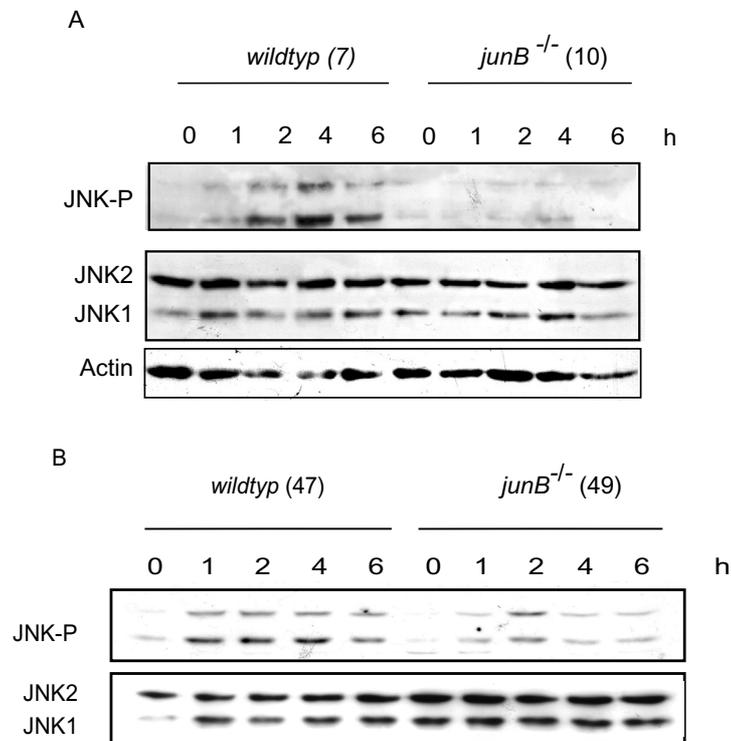


Abb.24: Verminderte JNK Phosphorylierung in JunB-defizienten Fibroblasten nach MMS Behandlung

Die Menge an JNK und an phosphoryliertem JNK wurde nach MMS-Behandlung (0,4mM) zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Western Blot Analyse nachgewiesen. Als Kontrolle für die gleichen Proteinmengen diente A) in den Zelllinien Nr.7 und Nr.10 die Aktin-Menge und B) in den Zelllinien Nr. 47 und Nr. 49 die JNK-Menge.

Falls die reduzierte JNK Phosphorylierung nach MMS-Behandlung zur verminderten Apoptoseantwort beiträgt, dann sollte dies in ähnlicher Weise auch nach UV-Bestrahlung zu beobachten sein. Tatsächlich ist in Fibroblasten ohne funktionelles JunB die JNK Phosphorylierung deutlich reduziert. In den *junB*^{-/-}-Fibroblasten ist eine geringe Phosphorylierung von JNK 10 Min nach der UV-Bestrahlung zu beobachten, erreicht ein Maximum nach 30 Min und sinkt wieder ab. Bereits nach 60 Min (Nr. 7) bzw. 120 Min (Nr. 47) ist kein phosphoryliertes JNK mehr nachzuweisen (Abb. 25). Im Gegensatz dazu wird das Maximum der phosphorylierten JNK Menge in Wildtyp-Fibroblasten schon 10 Min nach UV-Bestrahlung erreicht und sinkt dann langsam ab, ist aber auch 120 Min nach der UV-Behandlung noch deutlich vorhanden (Abb. 25).

Zusammengefasst führt der Verlust von JunB in den Fibroblasten sowohl nach UV-Bestrahlung als auch nach der Behandlung mit MMS zu einer deutlich reduzierten Phosphorylierung von JNK.

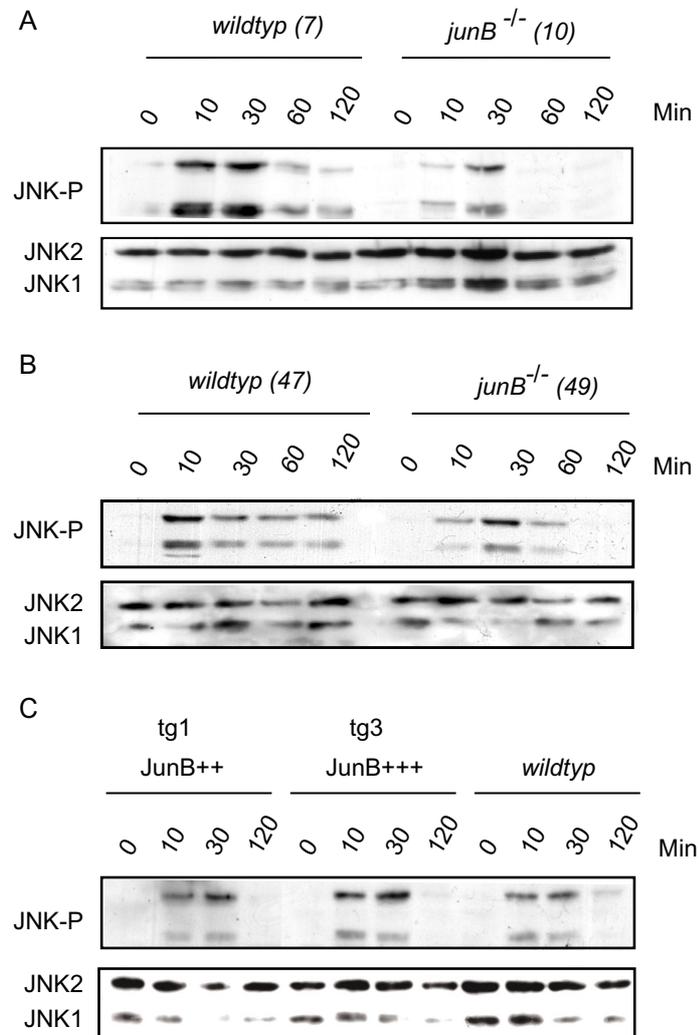


Abb.25: Verminderte Phosphorylierung in *junB*^{-/-}-Fibroblasten nach UV-Behandlung. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde nach UV-Behandlung (40 J/m²) aus Fibroblasten Gesamtproteinextrakte hergestellt. Mittels Western Blot wurde in den (A) Zelllinien Nr. 7 und Nr. 10 und B) Nr. 47 und Nr. 49 und C) in den JunB überexprimierenden Zelllinien die Menge an phosphorylierter JNK analysiert. Als Normalisierung wurde die JNK Gesamtmenge verwendet.

Um zu klären, ob eine Überexpression von JunB, ähnlich wie das Fehlen von JunB, auch Auswirkungen auf die JNK Phosphorylierung hat, wurde in den bereits vorgestellten JunB überexprimierende Zellen die JNK Phosphorylierung nach UV-Bestrahlung untersucht.

Allerdings war in diesen Zellen die JNK Phosphorylierung nicht verändert (Abb. 25C), woraus sich schließen lässt, dass die Überexpression von JunB keinen Einfluß auf die JNK Phosphorylierung hat.

4.2.10. JNK Phosphorylierung nach Anisomycin- und TNF-Behandlung

Neben den verwendeten Stressinduktoren wird die Phosphorylierung von JNK auch durch physiologische Stimuli, z. B. $\text{TNF}\alpha$. Über die Aktivierung von MKK7 führt $\text{TNF}\alpha$ zu einer Phosphorylierung von JNK. Desweiteren wurde Anisomycin, ein Inhibitor der Proteinsynthese, als sehr starker JNK spezifischer Induktor beschrieben. Um zu klären, ob es sich bei der reduzierten JNK Phosphorylierung in den *junB*^{-/-}-Fibroblasten um einen generellen Defekt handelt, oder ob dies spezifisch für die beiden Stressinduktoren MMS-Behandlung und UV-Strahlung ist, wurden die JNK Phosphorylierung nach der Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ oder Anisomycin analysiert.

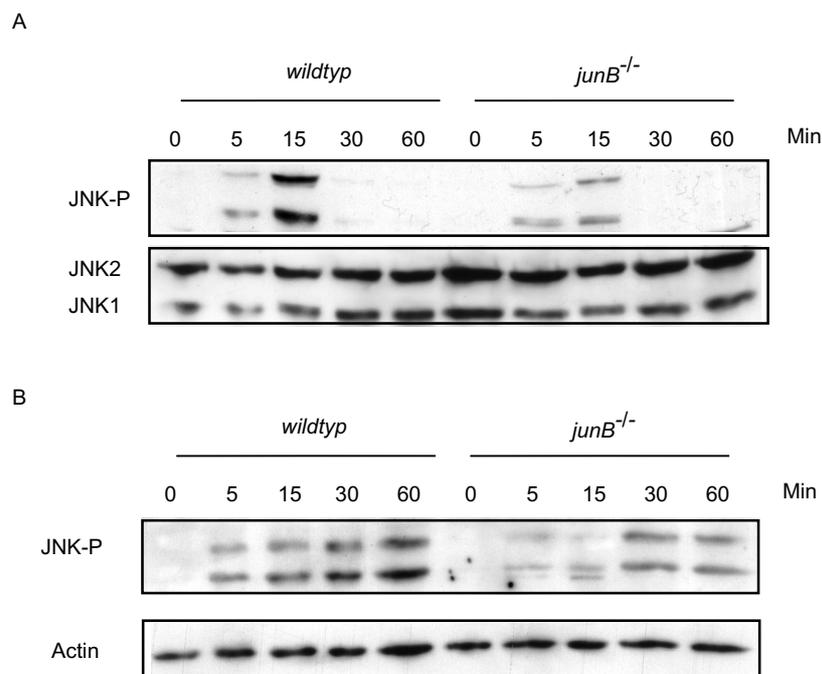


Abb.26: Reduzierte JNK Phosphorylierung in JunB-defizienten Fibroblasten nach $\text{TNF}\alpha$ - oder Anisomycin-Behandlung

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde nach A) $\text{TNF}\alpha$ (20 ng/ml)- oder B) Anisomycin (1 mg/ml)- Behandlung aus Fibroblasten Gesamtproteinextrakt hergestellt. Mittels Western Blot wurde die JNK Phosphorylierung im Vergleich zur A) JNK-Menge oder B) Aktin-Menge untersucht.

Eine JNK Phosphorylierung konnte schon 5 Min nach der Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ nachgewiesen werden. Nach 15 Min wurde ein Maximum erreicht, sank aber sehr schnell ab, so dass schon nach 30 Min keine phosphorylierte Form von JNK mehr nachgewiesen werden konnte. Ähnlich schnell, ebenfalls nach 5 Min, wurde JNK nach der Zugabe von

Anisomycin phosphoryliert. Hierbei stieg aber die Menge an phosphorylierter JNK kontinuierlich bis zu 60 Min nach der Behandlung an. Nach beiden Stimuli war in den *junB*^{-/-}-Fibroblasten eine ähnliche Kinetik zu beobachten, wobei allerdings die Phosphorylierung von JNK im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen deutlich reduziert war (Abb. 26).

Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die reduzierte JNK-Phosphorylierung auf einem generellen Defekt beruht und unabhängig von den verwendeten Stimuli ist.

4.2.11. MKK4 Expression und Phosphorylierung

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, wird JNK nach Stressinduktion hauptsächlich von der Map-Kinase-Kinase4 (MKK4) phosphoryliert und aktiviert (zur Übersicht Davis 2000). Eine Veränderung in der Expression oder Aktivierung von MKK4 in den JunB-defizienten Zellen könnte der Grund für die reduzierte Phosphorylierung von JNK sein. Um diese Frage zu klären, wurden Extrakte von UV behandelten Fibroblasten mittels Western Blot auf die MKK4 Expression und Phosphorylierung untersucht. Dabei konnte kein Unterschied zwischen der Expression von MKK4 in UV behandelten *wildtyp*- und *junB*^{-/-}-Zellen nachgewiesen werden. Für den Nachweis der MKK4 Phosphorylierung wurden vier voneinander unabhängige Experimente durchgeführt und Autoradiogramme mit Hilfe des Programms TINA quantitativ analysiert. Daraus ergab sich, dass auch in der Phosphorylierung von MKK4 nach UV-Bestrahlung kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen vorliegt (Abb. 27). Ähnliche Ergebnisse wurden für die MKK4 Expression und Phosphorylierung nach MMS Behandlung erhalten (Daten nicht gezeigt).

Demnach ist kein Defekt auf der Ebene von MKK4 oder oberhalb von MKK4 verantwortlich für die reduzierte JNK Phosphorylierung in den JunB-defizienten Fibroblasten.

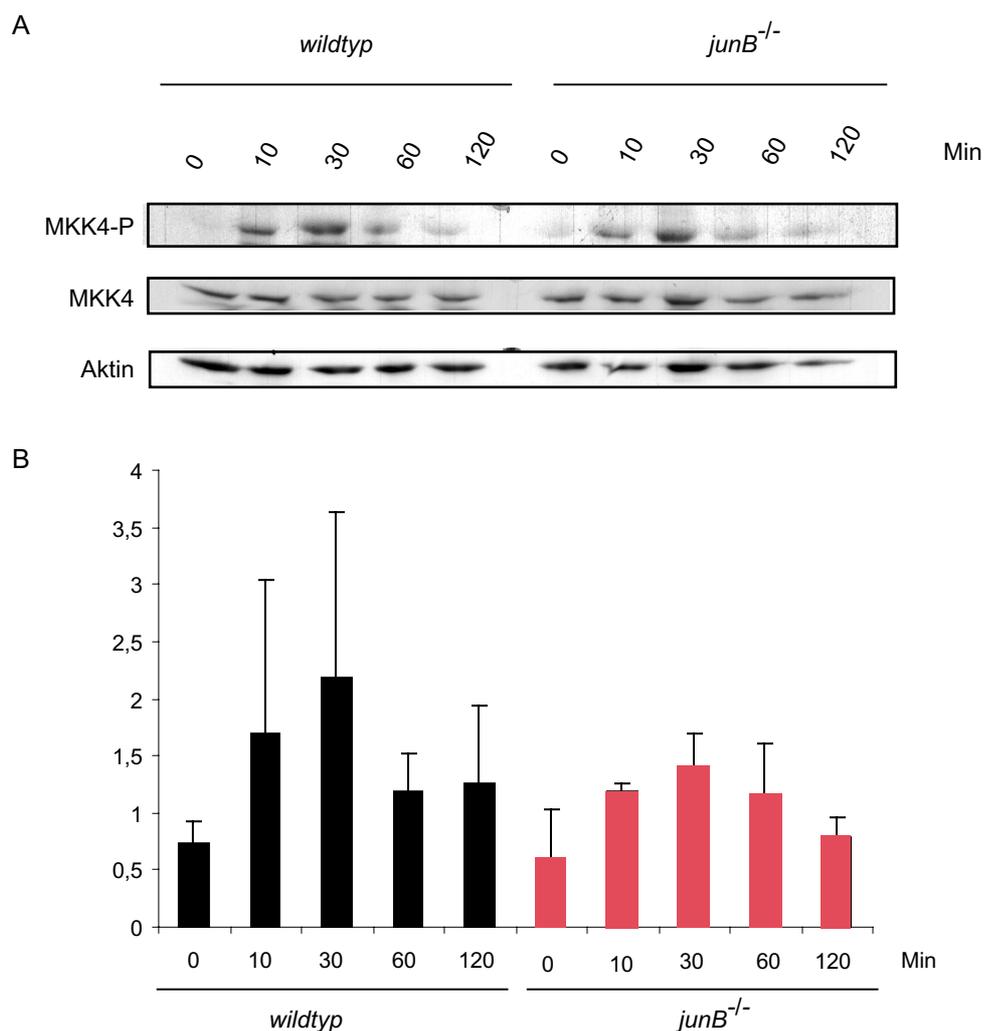


Abb.27: Unveränderte MKK4 Expression und Phosphorylierung in JunB-defizienten Fibroblasten nach UV-Behandlung

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde nach UV-Behandlung (40 J/m²) aus Fibroblasten Gesamtproteinextrakt hergestellt.

A) Mittels Western Blot wurde die MKK4 Menge mit Antikörper gegen MKK4 und die Menge an phosphorylierter MKK4 mit einem MKK4-P spezifischen Antikörper analysiert.

B) Zur Quantifizierung wurden vier von einander unabhängige durchgeführte Experimente mit Hilfe von dem Programm TINA ausgewertet und im Diagramm dargestellt.

4.2.12. Phosphataseinhibitoren

MKK4 ist nach Stressinduktion die wichtigste JNK-Kinase (zur Übersicht Davis 2000). Da weder die Expression noch die Aktivität von MKK4 in den *junB*^{-/-}-Fibroblasten verändert ist, ist anzunehmen, dass der Defekt im Signalweg nicht oberhalb von JNK liegt. Allgemein wird die Aktivität von JNK auch durch verschiedene Proteine beeinflusst, die selbst nicht direkt von der MAP-Kinasen-Kaskade reguliert werden. Eine bedeutende Rolle in der Regulation der Kinasenaktivität haben die Phosphatasen, welche die Kinasen

dephosphorylieren und sie dadurch in der Regel deaktivieren. Diese könnten in *junB*^{-/-}-Zellen verändert vorliegen, und dadurch JNK Aktivität regulieren. Bisher sind mindestens zehn verschiedene Map-Kinasen-Phosphatasen (MKPs) bekannt. Sie gehören zur Familie der „Dual-spezifischen“ Phosphatasen und dephosphorylieren die Kinasen an Threonin und Tyrosin (zur Übersicht Camps et al. 1999; und Keyse 1998).

Durch die Zugabe spezifischer Inhibitoren kann Aufschluss über die involvierten Phosphatasen gewonnen werden. Für die Hemmung der verschiedenen MKPs, welche auch JNK dephosphorylieren, stehen verschiedene Inhibitoren zur Verfügung. Für die Inhibition der Phosphatasen wurden zunächst die Inhibitoren RO31-8220 (Beltmann et al. JBC 1996) und As³⁺ (Cavigelli et al. EMBO 1996) verwendet. Die beiden Substanzen sind als spezifisch wirksam für die Hemmung der JNK spezifischen Phosphatase beschrieben. Zum Überprüfen der Spezifität wurde parallel Okadainsäure eingesetzt, welche sehr spezifisch PP1A und PP2A hemmt (zur Übersicht Fernandez et al. 2002). Diese beiden Serin/Threonin-Phosphatasen wurden bisher noch nicht mit JNK in Verbindung gebracht, daher kann davon ausgegangen werden, dass diese keine Funktion in der Regulation von JNK haben (zur Übersicht Janssens und Goris 2001). Die Zellen wurden mit den verschiedenen Inhibitoren für eine Stunde vorbehandelt, mit UV bestrahlt und zwei Stunden später geerntet.

Reproduzierbar führte die UV Bestrahlung in Wildtyp-Zellen zu einer JNK Phosphorylierung, während in den JunB-defizienten Fibroblasten keine Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte (Kontrollen Abb. 28). Wie erwartet hatte die Vorbehandlung der Zellen mit Okadainsäure keinen Einfluß auf die unterschiedliche JNK Phosphorylierung in *wildtyp*- und *junB*^{-/-}-Fibroblasten. Allerdings führte die Zugabe von den JNK Phosphatase-spezifischen Inhibitoren RO31-8220 und As³⁺ bereits in den unbestrahlten Wildtyp-Zellen zu einer JNK Phosphorylierung, welche durch UV-Bestrahlung verstärkt wurde (Abb.28). Interessanterweise konnte nach Zugabe dieser Inhibitoren auch in den *junB*^{-/-}-Fibroblasten eine deutliche JNK Phosphorylierung nachgewiesen werden, die nach UV-Bestrahlung ebenfalls leicht verstärkt wurde (Abb.28).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die JNK-Phosphorylierung in den *junB*^{-/-}-Zellen prinzipiell möglich ist, und dass höchstwahrscheinlich Phosphatasen, die sich durch RO31-8220 oder As³⁺, hemmen lassen in diesen Phänotyp involviert sind.

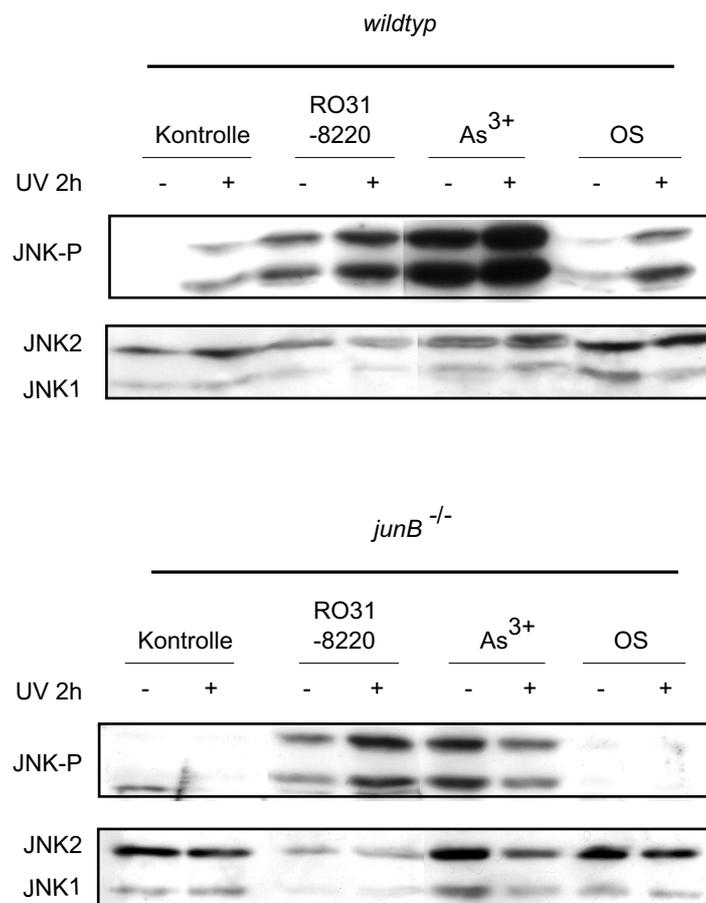


Abb.28: Verstärkte JNK Phosphorylierung nach der Behandlung mit Phosphataseinhibitoren

Oben) Wildtyp und unten) JunB-defiziente Fibroblasten wurden mit den verschiedenen Phosphataseinhibitoren As³⁺ (50 µM), RO31-8220 (5 µM) und Okadainsäure (OS; 10 nM) eine Stunde vorbehandelt, mit UV (40 J/m²) induziert und nach weiteren zwei Stunden wurde aus den Fibroblasten Gesamtproteinextrakt hergestellt. Mittels Western Blot wurde die Menge an phosphorylierter JNK im Vergleich zur JNK-Gesamtmenge analysiert.

4.2.13. Expression von MKP-1 in JunB-defizienten Fibroblasten

Das Auftreten einer JNK Phosphorylierung nach Behandlung der Zellen mit den spezifischen MKP Inhibitoren lässt vermuten, dass die Expression der MKPs in den JunB-defizienten Zellen erhöht ist. Dabei ist MKP-1 von speziellem Interesse, da diese Phosphatase als JNK-spezifisch beschrieben wurde. Da der beobachtete Defekt in der JNK Phosphorylierung sehr früh auftritt, nämlich schon 10 Min nach der Bestrahlung, kann davon ausgegangen werden, dass keine neue Proteinsynthese notwendig ist.

Diese Vermutung wurde mit der Hilfe einer RT-PCR („Reverse-Transkriptase-PCR“) auf MKP-1-RNA in den Fibroblasten erhärtet. MKP-1 wird schon in unbehandelten (Abb. 29 t0) JunB-defizienten Zellen deutlich überexprimiert. Eine UV-Bestrahlung führt in Wildtyp- und JunB-defizienten Zellen zu einer starken Induktion von MKP-1, wobei die Induktionskinetik in den *junB*^{-/-}-Zellen deutlich verstärkt ist (Abb.29).

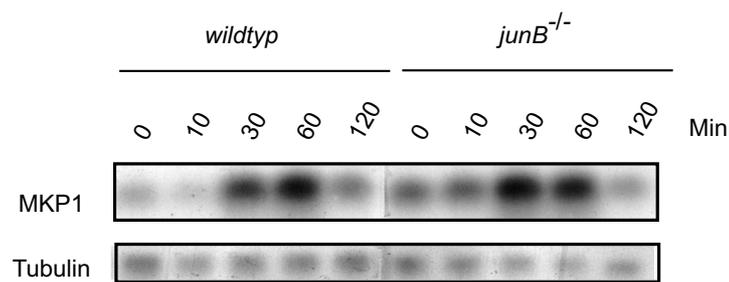


Abb. 29: Erhöhte MKP-1-Expression in *junB*^{-/-}-Fibroblasten nach UV-Behandlung

Induktion der MKP-1 Expression in Wildtyp- und JunB defiziente Fibroblasten. Gesamt-RNA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten aus UV bestrahlten Fibroblasten isoliert und auf ihre MKP-1 Menge im Vergleich zur Tubulin-Menge in einer RT-PCR mit anschließendem Southern Blot untersucht.

Zur genauen Quantifizierung der Überexpression von MKP-1 wurde eine „Real-Time-PCR“ mit Hilfe des DNA-Engine Opticons^(TM) von Biozym^(TM) durchgeführt. Die dabei erhaltenen Daten wurden mit den Daten des internen Standards (β -Tubulin) verrechnet. Anschließend wurde die Induktion von MKP-1 zum Zeitpunkt t0 auf 1 gesetzt und die restlichen erhaltenen Werten dazu in Bezug gesetzt.

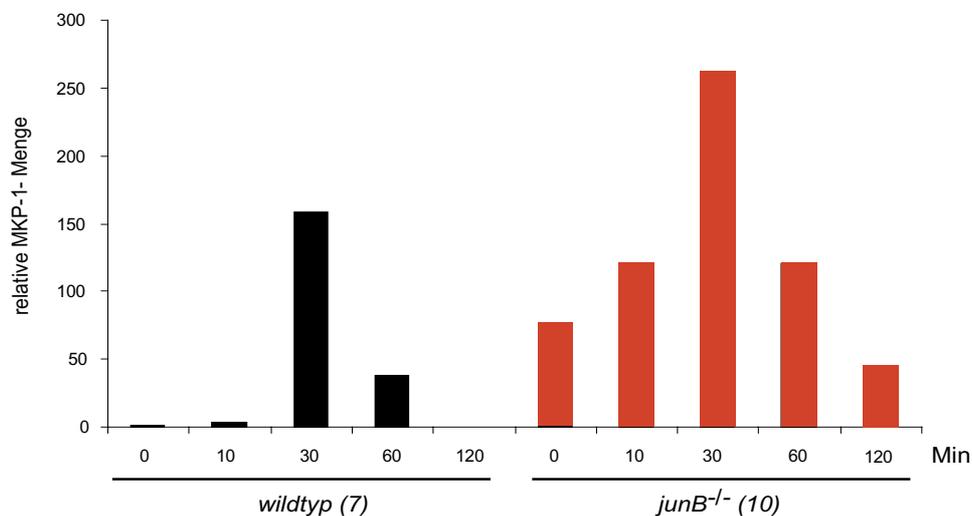


Abb.30: Nachweise der erhöhten MKP-1-Expression durch eine quantitative „Real-Time“-PCR der *wildtyp*- und *junB*^{-/-}-Fibroblasten nach UV Behandlung

Die MKP-1 Expression wurde, mittels einer quantitativen „Real Time“-PCR mit Hilfe des DNA-Engine Opticons^(TM) von Biozym^(TM), in der Gesamt-RNA nach den angegebenen Zeitpunkten aus UV-behandelten *wildtyp*- und *junB*^{-/-}-Fibroblasten untersucht. Zur Auswertung wurden die Werte gegen die Tubulin-Menge in den Proben verrechnet. Die Menge an MKP-1 wurde in den unbehandelten Wildtyp-Zellen zum Zeitpunkt t0 auf 1 gesetzt und die anderen Proben in Bezug gesetzt.

Dabei zeigte sich, dass 30 Min nach der UV-Behandlung MKP-1 stark induziert wurde, nach 60 Min. einen Maximal-Wert erreicht und nach 120 Min. wieder absinkt (Abb. 30). Diese Induktionskinetik lässt sich für beide Genotypen beobachten, wobei die Menge an MKP-1-RNA in den JunB-defizienten Zellen immer deutlich höher liegen als im Wildtyp. In unbehandelten Zellen und 10 Min nach der UV-Induktion zeigte der Klon Nr. 10 bei den hier berechneten Werten den größten Unterschied in der MKP-1-RNA-Menge. Hier wurden in Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Klon Nr. 7 bis zu 100x erhöhte Mengen gemessen.

30 Min nach der Induktion war die MKP-1-Expression in den *junB*^{-/-}-Zellen noch doppelt so hoch wie in den Wildtyp-Zellen. 120 Min nach der UV-Bestrahlung wurde keine MKP-1 Expression mehr in den Wildtyp-Zellen nachgewiesen, während die JunB-defizienten Zellen noch deutlich MKP-1-RNA aufwiesen.

Die Überexpression von MKP-1 konnte für beide JunB-defizienten Fibroblasten Zelllinien (Nr. 10 und Nr. 49) im Vergleich zu den Wildtyp—Linien (Nr. 7 und Nr. 47) nachgewiesen werden. Die MKP-1 Expression erwies sich dabei in der Zelllinie Nr. 49 dreimal höher als im vergleichbaren Wildtyp Nr. 47 (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression von MKP-1 auf RNA-Ebene JunB abhängig ist und dass JunB für die Repression von MKP-1 verantwortlich ist.

Die MKP-1 Regulation in der Zelle ist sehr komplex. Sie findet nicht nur auf der transkriptionellen Ebene statt, sondern insbesondere auch über Proteinstabilität (Kassel et al. 2001). Demnach war es notwendig zu überprüfen, ob die beobachtete Überexpression an MKP-1-RNA auch zu einer erhöhten Proteinmenge in der Zelle führt. Mittels Western Blot Analyse konnte der Nachweis der erhöhten MKP-1 Menge in JunB-defizienten Zellen erbracht werden (Abb. 31).

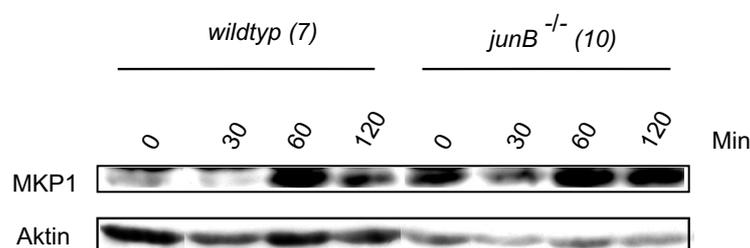


Abb.31: Überexpression von MKP-1 nach UV-Bestrahlung in *junB*^{-/-}-Fibroblasten

Die MKP-1-Menge wurde im Vergleich zur Aktin-Menge in UV-bestrahlten *wildtyp*- und *junB*^{-/-}-Fibroblasten nach den angegebenen Zeitpunkten mittels Western Blot analysiert.

Die Induktionskinetik vom MKP-1-Protein verhielt sich vergleichbar zu der RNA-Kinetik. Ebenso wie auf RNA-Ebene ist die Proteinmenge von MKP-1 schon in den unbehandelten JunB-defizienten Zellen erhöht und wird ebenfalls stärker induziert in Vergleich zu den Wildtyp-Zellen.

4.2.14. MKP-1 Expression in „gehungerten“ und TPA induzierten Zellen

Durch die Kultivierung von Zellen in Medium mit geringer Serumkonzentration wird erreicht, dass die meisten Signalübertragungswege nicht aktiv sind. In „gehungerten“ Zellen die in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklusses arretiert sind, lässt sich keine mRNA von JunB nachweisen (Andrecht et al. 2002), während eine nachfolgende Induktion mit TPA zu einer starken Induktion von JunB führt. Um das Verhalten von MKP-1 in gehungerten Zellen und TPA induzierten Zellen zu beobachten, wurde die RNA dieser Zellen zur Northern Blot Analyse verwendet. In den unbehandelten, arretierten Zellen war zum Zeitpunkt t₀ keine MKP-1-RNA vorhanden. Durch eine Induktion der Zellen mit TPA kam es nach einer Stunde zu einer deutlichen Expression vom MKP-1 (Abb. 31). 5 Stunden nach TPA Zugabe war die Menge an MKP-1 allerdings in den Wildtyp-Fibroblasten wieder unter der Nachweisgrenze. MKP-1 zeigt damit in den Wildtyp-Zellen die für ein „immediate early“ Gen typische, schnelle transiente Induktion.

In den JunB-defizienten Fibroblasten wird durch die Zugabe von TPA die MKP-1 Expression sehr viel stärker aktiviert als in Wildtyp-Zellen. MKP-1-RNA lässt sich in *junB*^{-/-}-Fibroblasten auch noch acht Stunden nach der TPA Zugabe nachweisen. Die fehlende Induktion von JunB und damit verbunden die fehlende Repression in den *junB*^{-/-}-Fibroblasten bewirkt eine verstärkte und verlängerte Induktion der MKP-1-RNA. Dieses Experiment zeigt deutlich, dass JunB maßgeblich zur Regulation von MKP-1 beiträgt.

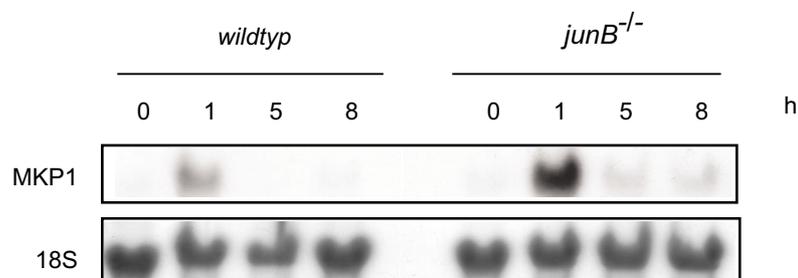


Abb.32: MKP-1-Expression in gehungerten und TPA induzierten in Wildtyp- und JunB-defizienten Fibroblasten

Gehungerte Wildtyp- und JunB-defiziente Fibroblasten wurden nach den angegebenen Zeitpunkten mit TPA induziert und Gesamt-RNA hergestellt (zur Verfügung gestellt von Dr. Andrecht und Dr. Schorpp-Kistner). Mittels Northern Blot Verfahren wurde die MKP-1-RNA Menge im Vergleich mit 18S-RNA analysiert.

Aufgrund der erhöhten Mengen an MKP-1 in den JunB-defizienten Zellen ist MKP-1 ein sehr guter Kandidat, der für die nachweisbar verringerte Phosphorylierung von JNK verantwortlich sein könnte. Da JNK eine wichtige Kinase in den stressinduzierten Signalwegen ist, kann die verminderte Apoptoseantwort in den JunB defizienten Fibroblasten durch die reduzierte JNK Phosphorylierung und Aktivität erklärt werden.

5. Diskussion

Etliche Studien haben sich mit der Aufklärung der molekularen Vorgänge in der Apoptose beschäftigt. Einige davon haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor AP-1 bei diesem Prozess eine wichtige Rolle spielt. In der vorliegenden Arbeit wurde analysiert, ob c-Fos die T-Zellapoptose und JunB die Apoptoseregulation in Fibroblasten beeinflussen. Dabei konnte einerseits nachgewiesen werden, dass die Apoptose in T-Zellen der Milz und des Thymus nach verschiedenen Stimuli unabhängig von c-Fos ist, andererseits ist in Abwesenheit von JunB die Apoptose in Fibroblasten sehr stark beeinträchtigt. Mit Hilfe dieses Zellsystems konnte gezeigt werden, dass JunB sowohl anti- als auch proapoptotische Funktion besitzt.

Der erste Teil der Diskussion behandelt die Rolle von c-Fos in der T-Zellapoptose, im zweiten Teil wird die Funktion von JunB in der Apoptose von Fibroblasten diskutiert.

5.1. Teil 1: Die Rolle von c-Fos in der T-Zellapoptose

T-Zellen reagieren während ihrer Reifung abhängig von ihrer Differenzierung und Aktivierung verschieden auf Apoptose-induzierende Stimuli. In Übereinstimmung mit früheren Studien mit c-Fos-defizienten Zellen (Wang et al., 1992; Jain et al., 1994) war in der vorliegenden Studie das Verhältnis zwischen CD4⁺CD8⁺-, CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen im Thymus und in der Milz nicht beeinflusst. Demnach liegt in *c-Fos*^{-/-}-Mäusen kein Defekt in der T-Zellreifung vor, welcher zu einer veränderten Apoptoseregulation führen könnte. Das unterschiedliche Verhältnis von T-Zellen zu B-Zellen und die erhöhte Menge an Makrophagen in der Milz (Wang et al., 1992; J. Eberlein persönliche Kommunikation) beeinflusst die Messungen der Apoptose in dieser Arbeit nicht, da hier aufgereinigte T-Zellen *in vitro* untersucht wurden. So ist eine Beeinflussung der T-Zellen durch andere Zellen, z. B. durch B-Zellen oder durch Zytokine, und somit eine mögliche Veränderung der Apoptose auszuschließen.

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass c-Fos für die späte T-Zellaktivierung nicht notwendig ist (Jain et al 1994). In dieser Arbeit konnte durch die Bestimmung der beiden frühen T-Zellmarkern CD25 und CD69 gezeigt werden, dass die frühe T-Zellaktivierung c-Fos unabhängig ist. Demnach ist in Übereinstimmung mit anderen Studien (Wang et al., 1992; Jain et al., 1994) sowohl die T-Zellreifung, als auch die T-Zellaktivierung c-Fos unabhängig. Beide sollten daher die Apoptoseantwort in den c-Fos-defizienten T-Zellen nicht beeinflussen.

5.1.2. Die Rolle von c-Fos in der Apoptoseinduktion von reifen, aktivierten T-Zellen der Milz

Für die Analyse des AICD („activation induced cell death“) wurden reife, aktivierte T-Zellen aus der Milz verwendet. Nach einem zweiten Aktivierungsstimulus mit TPA/I oder ConA/IL-2 konnte kein signifikanter Unterschied in der Apoptoseantwort zwischen c-Fos-defizienten und Wildtyp-T-Zellen nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit Studien an Etoposid behandelten, c-Fos-defizienten T-Zellen, bei denen keine Unterschiede in der Apoptoseantwort zu beobachten waren (Gajate et al., 1996). Andere frühere Studien an c-Fos-defizienten T-Zellen aus der Milz, in denen Apoptose durch DNA-Schädigung mit Gamma-Bestrahlung induziert wurde (Pruschy et al., 1997) oder durch die Behandlung mit Etoposide, welches die TopoisomeraseII inhibiert (Gajate et al., 1996), oder aber über den Glucocorticoid-Signalweg mit einer Dexamethason-Behandlung (Pruschy et al., 1997), kamen zu einer konträren Schlussfolgerung. Nach den Stimuli Dexamethason und Gamma-Bestrahlung zeigten c-Fos-defiziente T-Zellen eine verminderte Apoptose (Pruschy et al., 1997). Diese kontroversen Daten können darauf beruhen, dass sich alle Messungen früherer Studien schon im Versuchsansatz von denen dieser Arbeit unterschieden. Durch die Verwendung von aktivierten T-Zellen und durch die Induktion der Apoptose durch einen zweiten Aktivierungsstimulus wurde in dieser Arbeit der AICD simuliert, während in den anderen Studien T-Zellen direkt nach der Isolation aus der Milz, bzw. den Lymphknoten, ohne vorherige Aktivierung verwendet wurden. Desweiteren wurden in diesen Studien Stimuli verwendet, die keinen T-Zell-spezifischen Apoptosemechanismus induzieren. Im Falle der Behandlung mit Etoposide wird eine Replikationshemmung eingeleitet, bei der Gamma-Bestrahlung wird eine DNA-Schädigung induziert, die Behandlung mit Dexamethason beeinflusst die Apoptose durch eine veränderte Transkriptionsregulation. All diese verwendeten Stimuli aktivieren eher universelle Apoptosesignalwege. Das bedeutet, die T-Zellen wurden hier als allgemeingültiges Modellsystem genutzt, da T-Zellen besonders sensitiv auf Apoptoseinduktion reagieren.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Apoptoseinduktion über eine zweite Aktivierung der T-Zellen ist für diese spezifisch und somit wahrscheinlich die physiologisch relevanteste Untersuchungsform für reife T-Zellen. Aufgrund dessen erlauben die in dieser Arbeit gewonnenen Daten die Annahme, dass die Eliminierung der überschüssigen T-Zellen nach einer Immunantwort durch die Aktivierung des AICD c-Fos unabhängig ist, oder dass das Fehlen von c-Fos durch andere AP-1 Mitglieder kompensiert wird.

5.1.3. Die Rolle von c-Fos in unreifen Thymozyten

In dieser Arbeit wurde auch untersucht, ob die Apoptoseregulation in unreifen T-Zellen aus dem Thymus (Thymozyten) c-Fos abhängig ist. In dieser Studie wurde für jede Maus der Aktivierungsstatus der T-Zellen der Milz untersucht. Daher stammen auch die verwendeten Thymocyten immer von Mäusen, deren Immunsystem nicht aktiviert war. T-Zellen und Thymocyten von Mäusen, die ein schon aktiviertes Immunsystem aufwiesen, z.B. in Folge einer Augenentzündung, wurden nicht für die Analysen verwendet.

Durch die Behandlung der Thymocyten mit verschiedenen Stimuli wie Dexamethason, TPA/I und CD95-Ligand wurden zusätzliche unterschiedliche molekulare Mechanismen analysiert. So führt die Behandlung mit Dexamethason zur Hemmung von AP-1, während durch TPA/I-Behandlung AP-1 aktiviert wird. Zur direkten Apoptoseinduktion wurde der CD95-Ligand, ein AP-1 Zielgen, verwendet (Übersichtsartikel siehe: Bauman 2002). Allerdings konnte nach keinem dieser drei Klassen von Stimuli ein unterschiedliches Verhalten der beiden Genotypen *wildtyp* und *c-Fos^{-/-}* nachgewiesen werden.

Dies steht in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen, die ebenfalls keinen Unterschied in der Dexamethason- (Eberlein 2000) oder in der mit Etoposid-Behandlung (Gajate et al., 1996) induzierten Apoptose nachweisen konnten.

Zum Teil kamen frühere Studien, in denen die Thymocyten mit Forskolin, TPA oder Dexamethason behandelten wurden (Eberlein 2000; Ivanov et al., 1997), aber auch zu konträren Ergebnissen. Hierbei ist anzumerken, dass diese beobachtete verstärkte Apoptose in *c-Fos^{-/-}*-Thymocyten zu späten Zeitpunkten, nach 15 und 24 Stunden, untersucht wurde, wobei der größte Unterschied in der Apoptoserate erst 24 Stunden nach der Behandlung auftrat. 15 Stunden nach der Behandlung wurde nur in den mit Dexamethason behandelten Zellen eine Differenz zwischen den beiden Genotypen nachgewiesen. Da Thymocyten sehr sensitiv und daher sehr schnell auf Apoptoseinduktion reagieren, wurde in der hier vorgestellten Arbeit der letzte Zeitwert absichtlich schon 15 Stunden nach der Behandlung genommen. Ein weiterer Grund dafür war, dass das zu untersuchende c-Fos zu den „immediate early genes“ gehört, also zu den Genen, die sehr schnell und transient auf Stimuli hin aktiviert werden. Insofern war es fraglich, ob es sich bei den in früheren Studien beobachteten Unterschieden in der Apoptoseantwort zu späten Zeitpunkten überhaupt um direkte Effekte aufgrund des Fehlens von c-Fos handeln konnte.

Anhand der hier vorgestellten Daten zeigt sich, dass c-Fos in der Apoptoseregulation von Thymocyten keine wesentliche Rolle spielt. Demnach ist c-Fos im AICD und sehr wahrscheinlich auch in der Apoptoseregulation von Thymocyten nicht essentiell. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Fehlen von c-Fos in T-Zellen von einem anderen AP-1-Familien-Mitglied, höchstwahrscheinlich aus der Fos-Familie, kompensiert wird. An sogenannten „knock-in“ Mäusen konnte in der Tat schon bestätigt werden, dass

c-Fos-Aufgaben zum Teil von Fra-1 übernommen werden können. Dazu wurden Mäuse generiert, in denen die kodierenden Sequenzen von c-Fos durch die von Fra-1 ersetzt wurden, so dass diese Mäuse Fra-1 anstelle von c-Fos exprimieren. In diesen Mäusen war sowohl die c-Fos abhängige Knochenentwicklung, als auch die Licht-induzierte Apoptose der Photorezeptoren normal (Fleischmann et al., 2000; Wenzel et al., 2002). Bislang sind die molekularen Mechanismen, über welche c-Fos die Apoptose in Fibroblasten nach UV-Bestrahlung (Schreiber et al., 1995) oder nach Licht-Induktion in den Photorezeptoren der Retina reguliert, noch nicht analysiert. Aufgrund der hier vorgestellten Daten kann aber vermutet werden, dass es sich dabei um Mechanismen und Zielgene von c-Fos handelt, die zumindest in T-Zellen keine entscheidende Rolle spielen.

5.2. JunB in der Apoptoseregulation in Fibroblasten

In der vorliegenden Arbeit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass JunB für die Apoptoseregulation in Fibroblasten essentiell ist. Dabei hat JunB bei der Regulation des CD95-Signalweges und der stressinduzierten Apoptose wichtige, aber unterschiedliche Aufgaben. Im folgenden wird zunächst die Funktion von JunB im CD95-Signalweg und darauffolgend die Aufgaben von JunB in der stressinduzierten Apoptose diskutiert.

5.2.1 JunB als Repressor von CD95 und CD95-Ligand

JunB-defiziente Fibroblasten weisen nach der Behandlung mit dem CD95-Liganden eine verstärkte Apoptoseantwort auf, was sich auf die Überexpression von CD95 zurückführen lässt. Für den CD95-Liganden selbst konnte eine basal erhöhte RNA-Menge und eine verstärkte Induktion nach MMS-Behandlung nachgewiesen werden. Somit hat JunB einen negativen regulatorischen Einfluß auf CD95 und den CD95-Liganden sowohl in unbehandelten, als auch in MMS behandelten Zellen. Von solchen Zellen, die sowohl CD95 als auch seinen Liganden überexprimieren, könnte man annehmen, dass sie eine erhöhte spontane Apoptoserate aufweisen. Dies konnte allerdings bei den JunB-defizienten Fibroblasten nicht nachgewiesen werden. Die in dieser Arbeit beobachtete erhöhte basale Expression des CD95-Liganden konnte bisher nur auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Eine Analyse der Proteinmenge steht noch aus. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass die Proteinmenge unterhalb eines Schwellenwertes liegt, der für eine Apoptoseinduktion notwendig ist. Eine andere Möglichkeit für das Fehlen einer erhöhten Spontanapoptose könnte im Auftreten eines weiteren CD95-unabhängigen Defekts liegen. Zunächst stellt sich aber die Frage, ob CD95 und sein Ligand direkte JunB Zielgene sind. Über den CD95-Promotor der Maus liegen bisher keine Veröffentlichungen vor. Allerdings enthält der humane CD95-Promotor mindestens eine funktionelle AP-1-Bindestelle (Behrmann et al., 1994), von welcher bisher noch nicht geklärt ist, welche AP-1-Mitglieder daran binden können. Es ist jedoch bekannt, dass c-Jun und p53 die Expression von CD95

aktivieren (Lasham et al., 2000; Munsch et al., 2000). Es ist anzunehmen, dass diese funktionelle AP-1-Bindestelle im murinen Promotor konserviert ist. Da bekannt ist, dass JunB antagonistisch zu c-Jun wirken kann, insbesondere was Zielgene mit nur einer Bindestelle betrifft, wie z.B. bei der Kollagenase (Chiu et al., 1988) oder Zyklin D1 (Bakiri et al., 2000), kann man spekulieren, dass JunB als direkter Repressor auf den CD95 Rezeptor wirkt. Künftige in vitro Protein/DNA-Bindungsstudien als auch transiente Ko-Expressionsstudien mit einem Reporterogen, das unter der Kontrolle des AP-1 Elements von CD95 steht, könnten zur Klärung dieser Frage beitragen. Auch der Promotor des CD95-Liganden enthält eine funktionelle AP-1-Bindestelle (Harwood et al., 1999), an die c-Jun bindet und die Expression des CD95-Liganden aktiviert (Kolbus et al., 2000; Eichhorst et al., 2000). Hier könnte JunB ebenfalls als direkter Repressor wirken. Es ist auch vorstellbar, dass die hier beschriebene basale Erhöhung von c-Jun in den JunB-defizienten Fibroblasten für die basal erhöhte Expression von CD95 und CD95-Ligand verantwortlich ist. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings gezeigt, dass diese basal erhöhte c-Jun-Expression nicht weiter induzierbar ist und dass p53 unverändert vorliegt. Demnach können erhöhte c-Jun-Level allein nicht für die erhöhte Induktion des CD95-Liganden verantwortlich sein. In anderen Studien an denselben Zellen wurde ebenfalls eine erhöhte basale Menge an c-Jun-Protein in JunB-defizienten Fibroblasten nachgewiesen. Ebenso kommt eine verspätete, aber auch verlängerte Induktion von c-Jun nach TPA-Behandlung gezeigt werden (Passague et al., 2000; Andrecht et al., 2002). Desweiteren wurde gefunden, dass die Expression von p53 nach Serumstimulation reduziert ist (Andrecht 2001). Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen beider Arbeiten bezüglich der Expression von c-Jun und p53 lassen sich auf die verwendeten Stimuli zurückführen. Die hier beschriebenen Untersuchungen wurden an normal wachsenden, sich im Zellzyklus befindlichen Fibroblasten durchgeführt, die dann mit den verschiedenen stressinduzierenden Stimuli behandelt wurden. Durch die Behandlung der Fibroblasten mit verschiedenen stressinduzierenden wurden sogenannten „stressinduzierten Signalwege“, wie z.B. die MAP-Kinasen mit JNK und mit p38, aktiviert. Im Gegensatz dazu ergaben sich die Ergebnisse der vorangegangenen Studie (Andrecht et al., 2002) aus „gehungerten“, synchronisierten und in der G0-Phase arretierten Fibroblasten, die mit Serum oder TPA induziert wurden. Sowohl Serum als auch TPA aktivierten die sogenannten „Überlebens-Signalwege“, wie z.B. die MAP-Kinase ERK, nachdem das vorherige Hungern der Zellen solche Signalwege deaktiviert hatte. Daher fällt eine sich anschließende Induktion sehr viel deutlicher aus, da auch alle antagonistischen Signalwege in der Zelle nicht aktiv sein sollten.

Es ist bisher nicht klar, welcher Defekt in den JunB-defizienten Fibroblasten zu der Überexpression von CD95 und des CD95-Liganden führt. Neben den erhöhten Mengen an c-Jun wird die verstärkte Induktion des CD95-Liganden höchstwahrscheinlich durch einen anderen Transkriptionsfaktor wie z.B. p53 aktiviert (Lasham et al., 2000; Munsch et al., 2000). Es ist vorstellbar, dass JunB die Expression der beiden Zielgene direkt über Bindung an die AP-1-Bindestellen in den beiden Promotoren reprimiert und aus der Abwesenheit dieses Repressors eine Überexpression resultiert. Möglich wäre auch, dass es sich nicht um ein direktes Zielgen von JunB handeln, sondern JunB über c-Jun und p53 indirekt die Expression von CD95 und den CD95-Liganden reguliert. Alternativ könnte JunB die Expression eines noch unbekanntes Proteins aktivieren oder reprimieren, welches dann CD95 und CD95-Ligand aktiviert bzw. reprimiert. In den letzten beiden Fällen würde es sich um einen sekundären Effekt des Fehlens von JunB handeln und CD95 und CD95-Ligand keine direkten Zielgene von JunB darstellen. Unabhängig vom Wirkungsmechanismus machen diese Daten deutlich, dass JunB durch seine reprimierende Funktion bei der Regulation von zwei entscheidenden Komponenten des CD95-Signalweges einen sehr wichtigen Regulator der Apoptose darstellt.

Die Überexpression von CD95 konnte nur in Fibroblasten beobachtet werden, während die Expression in Thymozyten, in T- und B-Zellen, in Stromazellen aus dem Knochenmark und in Endothelioma vom Genotyp unabhängig ist. Daher ist diese Funktion von JunB höchstwahrscheinlich spezifisch für Fibroblasten. Im Vergleich zu T-Zellen spielt der CD95-Signalweg in Fibroblasten eine geringere Rolle. Eine physiologische Funktion von JunB könnte darin liegen, den CD95-Signalweg in den Zellsystemen zu unterdrücken, in denen er keine oder eine untergeordnete Funktion hat. Aus der Regulation der verschiedenen Apoptose-Signalwege innerhalb der verschiedenen Zelltypen ergibt sich für den Organismus eine effiziente Steuerungsmöglichkeit. So ist es für den Organismus zum Beispiel wichtig, nach einer Immunantwort die aktivierten T-Zellen zu eliminieren, was vor allem über den CD95-Signalweg geschieht. Die Resistenz gegenüber dem CD95-Liganden wäre eine denkbare Möglichkeit, um auszuschließen, dass dabei auch andere Zelltypen eliminiert werden.

5.2.1.2 JunB contra c-Jun im CD95-Signalweg

Interessanterweise wurde in den c-Jun-defizienten Zellen eine deutlich reduzierte Expression des CD95-Liganden nach MMS-Behandlung nachgewiesen (Kolbus et al., 2000). Eine reduzierte Expression von CD95 wäre aufgrund der beschriebenen aktivierenden Funktion von c-Jun auf die Expression von CD95 (Lasham et al., 2000) in den *c-Jun*^{-/-}-Fibroblasten ebenfalls zu erwarten. Dies konnte bisher allerdings noch nicht nachgewiesen werden (Kolbus et al., 2000). Diesbezüglich ist aber zu beachten, dass Fibroblasten per se eine sehr geringe Menge an CD95 exprimieren, weshalb sich der

Nachweis von einer nochmals verringerten Menge an Protein mittels FACS-Analyse als sehr schwierig erweist. Die Menge an CD95-RNA in den c-Jun-defiziente Fibroblasten im Vergleich zu Wildtyp-Zellen wurde bisher noch nicht untersucht.

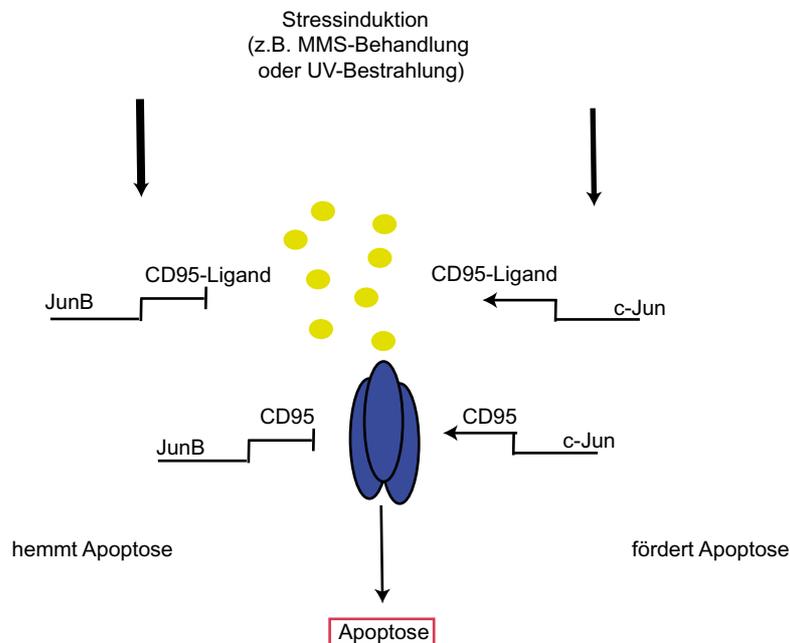


Abb.1 Antagonistische Funktion von JunB und c-Jun in der Regulation des CD95 Signalweges

Darüber hinaus müssen weitere Studien auch klären, mit welchen Dimerpartnern die beiden Mitglieder des AP-1-Transkriptionsfaktors c-Jun und JunB ihre aktivierende, bzw. reprimierende Funktion auf die Expression des CD95-Liganden und CD95 ausüben.

Unabhängig vom genauen Mechanismus erlauben die Daten der vorliegenden Arbeit erstmals die Aussage, dass c-Jun durch die Aktivierung der Expression von CD95 und seinem Liganden eine proapoptotische Funktion ausüben und JunB durch die Reprimierung der beiden gleichen Zielgene antiapoptotisch wirkt. Diese antagonistische Wirkungsweise von c-Jun und JunB auf die CD95 abhängige Apoptose steht in Einklang mit Aktivitäten wie der Regulation des Zellzyklus (Andrecht et al., 2002) und der Hautdifferenzierung (Szabowski et al., 2000).

5.2.2. JunB in der stressinduzierten Apoptose

5.2.2.1 JNK in der Apoptoseregulation

Neben der Überexpression von CD95 und CD95-Ligand wurde in der vorliegenden Arbeit eine reduzierte JNK-Phosphorylierung in *junB*^{-/-}-Fibroblasten detektiert.

Die verminderte Phosphorylierung von JNK in *junB*^{-/-}-Fibroblasten führt zu einer verringerten JNK-Aktivität, was sich in einer reduzierten c-Jun-Phosphorylierung niederschlägt. Es gibt mehrere Hinweise dafür, dass die reduzierte Aktivierung von JNK

für die verminderte Apoptoseantwort der JunB-defizienten Fibroblasten nach UV- oder MMS-Behandlung, verantwortlich ist. So haben Studien an *jnk1/2^{-/-}*-Zellen gezeigt, dass für die stressinduzierte Apoptoseantwort in Fibroblasten JNK essentiell ist (Tournier et al., 2000). Dabei ist auffällig, dass diese mutanten Fibroblasten einen Phänotyp aufweisen, der dem in dieser Arbeit untersuchten JunB-defizienten Fibroblasten sehr ähnlich ist. Auch die JNK1/2-defizienten Fibroblasten zeigen eine deutlich reduzierte Apoptoseantwort nach Stimuli wie MMS-, UV- und Anisomycin-Behandlung. Sie reagieren auf eine Behandlung mit dem CD95-Liganden mit einer den Wildtyp-Zellen vergleichbaren Apoptoseinduktion (Tournier et al., 2000). Zwar war in den JunB-defizienten Zellen eine deutlich höhere Apoptoseinduktion nach Behandlung mit dem CD95-Liganden zu beobachten, was aber auf die Überexpression von CD95 zurückzuführen ist. In beiden Zelllinien wird durch das Fehlen, bzw. durch die reduzierte Aktivität von JNK der CD95-Signalweg nicht negativ beeinflusst.

Eine sehr wichtige Rolle in der durch DNA-Schädigung, wie z.B. durch UV-Bestrahlung, induzierten Apoptose spielt p53. p53 wird als „guardin-of-the-genome“ postuliert und aktiviert bei DNA Schäden Apoptose oder DNA-Reparatur Mechanismen (Übersichtsartikel siehe: Sharpless et al., 2002). In den JunB-defizienten Zellen ist p53 im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen nach UV-Bestrahlung nicht verändert. Ähnliches wurde auch in den JNK-defizienten Fibroblasten gefunden. Auch in diesen Zellen ist p53 nicht für die reduzierte Apoptose nach UV-Bestrahlung verantwortlich (Tournier et al., 2000). Die beiden defizienten Zelllinien verhalten sich auch in Bezug auf die Aktivierung der Mitochondrien sehr ähnlich. In den *jnk^{-/-}*-Zellen wird nach einer Bestrahlung mit UV kein Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt. Dies ist auf eine fehlende Depolarisierung der Mitochondrien zurückzuführen. In den *junB^{-/-}*-Fibroblasten werden, wie in den JNK1/2-defizienten Zellen, die Mitochondrien nach UV-Bestrahlung und MMS-Behandlung ebenfalls nicht aktiviert. Für diese Hemmung der Depolarisierung der Mitochondrienmembran ist in den JNK1/2-defizienten Fibroblasten keine neue Proteinsynthese notwendig (Tournier et al., 2000). Auch in Herzmuskelzellen verursacht oxidativer Stress eine Aktivierung der JNK, was zur Freisetzung von Cytochrom C und nachfolgender Apoptose führt, ohne dass eine Neusynthese von Proteinen notwendig ist (Aoki et al., 2002). Folglich kann man davon ausgehen, dass es sich bei der Depolarisierung der Mitochondrien durch JNK um einen Regulationsmechanismus handelt, der nicht über eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren gesteuert wird. Demnach muss man davon ausgehen, dass JNK die Mitochondrien direkt aktiviert, was kürzlich in einer Studie auch bestätigt wurde. In einem zellfreien System werden durch die Zugabe von aktivierter JNK die Mitochondrien direkt depolarisiert und somit eine Freisetzung von Cytochrom C verursacht (Aoki et al., 2002).

Die Studien an *jnk1/2^{-/-}*-Fibroblasten und der Nachweis, dass JNK direkt die Mitochondrien depolarisiert, unterstreicht die essentielle Funktion von JNK für die stressinduzierte Apoptoseantwort. Die große Ähnlichkeit zwischen den JNK und JunB-defizienten Fibroblasten in der Apoptoseantwort ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die reduzierte Phosphorylierung von JNK nach Stressinduktion einen wichtigen Beitrag an der verminderten Apoptose in *junB^{-/-}*-Fibroblasten leistet.

5.2.2.2 JunB als Repressor von MKP-1

Bisher sind verschiedene regulatorische Proteine bekannt, die die JNK-Phosphorylierung modulieren. Wichtig sind hierbei die oberhalb von JNK liegenden Kinasen MKK4 und MKK7. MKK7 wird hauptsächlich durch Zytokine aktiviert, während MKK4 für die JNK-Phosphorylierung nach Stressinduktion verantwortlich ist (Übersichtsartikel siehe: Davis 2000). Die hier vorgestellten Daten weisen keine signifikanten Unterschiede in der MKK4 Phosphorylierung zwischen JunB-defizienten und Wildtyp-Fibroblasten auf. Andere bekannte Regulatoren, die Einfluss auf die Phosphorylierung von JNK haben, sind hsp72 (Gabai et al., 2002), Gadd45 (De Smaele et al., 2001) und XIAP (Tang et al., 2001). Weiterhin ist zu beachten, dass sich die Aktivität einer Kinasenkaskade als Summe der Aktivitäten von Kinasen und der dazugehörigen Phosphatasen darstellt. Die für den MAPK-Kinasen Signalweg spezifischen Phosphatasen sind die MAP-Kinasen-Phosphatasen (MKPs). Erste Hinweise darauf, dass MKPs für die verminderte JNK Phosphorylierung in den JunB-defizienten Fibroblasten verantwortlich sein könnten, ergab der Einsatz von spezifischen Phosphatase-Inhibitoren, der zu deutlichen Effekten bezüglich der JNK-Phosphorylierung in den JunB-defizienten Zellen führte. Tendenziell ergab sich für die beiden unabhängigen JunB-defizienten Zelllinien („49“ und „10“) dasselbe Ergebnis, nämlich dass in diesen Zellen JNK nach der Zugabe der MKP-spezifischen Inhibitoren RO-31-8220 und Ar³⁺ phosphoryliert wird. Durch die Zugabe der Inhibitoren wurde bei der Zelllinie „49“ und der dazu gehörigen Wildtyp-Linie „47“ der Unterschied in der JNK-Phosphorylierung vollständig aufgehoben, während bei der Zelllinie *junB^{-/-}* Nr. 10 bzw. wildtyp Nr. 47 noch ein kleiner Unterschied in der JNK Phosphorylierung nachzuweisen war. Dieses unterschiedliche Verhalten der beiden JunB-defizienten Zelllinien im Phosphatase-Assay ist sehr wahrscheinlich auf die leicht unterschiedlich starke Ausprägung der MKP-1-Überexpression zurückzuführen. In der Tat sind sowohl die Menge an MKP-1-RNA als auch an MKP-1-Protein in der Fibroblastenlinien Nr. 10 deutlich stärker erhöht als in Nr. 49.

Eine andere mögliche Ursache für die unterschiedlich starke Ausprägung des Phänotyps könnte in den verschiedenen genetischen Hintergründen der Embryonen beruhen aus denen die Fibroblasten isoliert wurden. Da die beiden neu etablierten Zelllinien Nr. 47 und Nr. 49 sich von Embryonen ableiten, die aus Mäusen stammen, die über mehrere Generationen

weiter gezüchtet wurden, hat sich der genetische Hintergrund mit hoher Wahrscheinlichkeit etwas verändert. Dadurch kann es zu einer Veränderung der Genexpression von Faktoren, sogenannten „Modifier“-Genen, kommen, die von anderen Genloci kodiert werden und die die verschieden starken Ausprägung des Phänotyps beeinflussen können. Neuere funktionelle Studien an solchen „Modifier“-Genen tragen wesentlich zum Verständnis solcher variabler Ausprägungen bei (Nadeau 2001).

MKP-1, auch als CL100 bezeichnet, ist eine Phosphatase aus der Familie der „Dual-spezifischen-Phosphatasen“, die ihr Substrat an Tyrosin und Threonin dephosphorylieren. Mittlerweile sind neben MKP-1 mindestens neun weitere Phosphatasen entdeckt worden, die zur Familie der MKPs gezählt werden. MKP-1 wurde in den ersten Studien als eine ERK-spezifische Phosphatase beschrieben. Mittlerweile haben allerdings neuere Studien gezeigt, dass MKP-1 mindestens ebenso effizient JNK und p38 dephosphoryliert, wobei JNK das bevorzugte Substrat *in vivo* ist (zur Übersicht Camps et al., 1999). Auch mit der Zwei-Hybriden-Methode und Bindungsstudien ist inzwischen nachgewiesen worden, dass die Bindungsaffinität von MKP-1 zu JNK sehr viel höher ist, als zu ERK2, wobei ERK2 ebenso gut als Substrat erkannt wird wie p38 β (Slack et al., 2001). Andere MAP-Kinasen, wie z.B. ERK5, ERK3, ERK7, p38a, oder p38 α , werden von MKP-1 nicht als Substrat erkannt (Slack et al., 2001). Ein weiterer wichtiger Hinweis darauf, dass MKP-1 nicht bevorzugt ERK dephosphoryliert, hat die Analyse von MKP-1-defizienten Mäusen geliefert, in denen die ERK Phosphorylierung nicht beeinflusst ist (Dorfman et al., 1996). Auch in den JunB-defizienten Zellen konnte trotz der MKP-1-Überexpression keine reduzierte Phosphorylierung von p38 beobachtet werden. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass p38 zumindest *in vivo* kein physiologisches Substrat darstellt und MKP-1 JNK sehr spezifisch dephosphoryliert. Diese Ergebnisse stützen die Daten aus Überexpressionstudien mit MKP-1 in HEK293-Zellen. Auch in diesen Zellen bleibt die p38-Aktivität durch die Überexpression von MKP-1 unverändert. Interessanterweise wird durch die Überexpression von MKP-1 die durch Cisplatin induzierte Apoptose verhindert. Verantwortlich dafür ist die Hemmung der JNK-Aktivität (Sanchez-Perez 2000). In menschlichen Leukämiezellen führt die Überexpression von MKP-1 ebenfalls zu einer reduzierten Apoptoseantwort nach UV-Induktion, wofür wiederum die Hemmung der JNK-Aktivität verantwortlich ist (Franklin et al., 1998). Aus diesen Studien kann abgeleitet werden, dass die Überexpression von MKP-1 in den JunB-defizienten Fibroblasten für die stark reduzierte Apoptoseantwort nach Stressinduktion verantwortlich ist.

5.2.2.3. Kinasen kontra Phosphatasen

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass nicht nur die MAP-Kinasen AP-1 regulieren, sondern, dass auch ein Zielgen von AP-1 die MAP-Kinasen reguliert. Dabei handelt es sich um die direkte oder indirekte Hemmung der MKP-1 Expression durch JunB. Die MKP-1 Überexpression in JunB-defizienten Fibroblasten ist höchstwahrscheinlich für die verringerte Aktivierung von JNK nach verschiedenen Stimuli, wie z.B. die Behandlung mit MMS, TNF, Anisomycin oder UV-Bestrahlung, verantwortlich, was wiederum in einer drastischen Reduzierung des programmierten Zelltodes resultiert.

Die Überexpression von MKP-1 konnte, wie bereits erwähnt, nicht nur auf RNA-Ebene mittels RT-PCR nachgewiesen werden, sondern zeigte sich auch in einer deutlich größeren Menge an MKP-1-Protein in den JunB-defizienten Zellen. Sowohl auf RNA- als auch Proteinebene konnte die für ein „immediate early gene“ typische schnelle und transiente Induktion beobachtet werden. Dabei stimmt die beobachtete Kinetik von MKP-1 mit der Phosphorylierung von JNK durch MKK4 in den Wildtyp-Fibroblasten überein. Die deutlichste Phosphorylierung von JNK tritt schon 10 Min nach der UV-Bestrahlung auf, während zu diesem Zeitpunkt noch keine MKP-1-Expression nachgewiesen werden kann. MKK4, die Kinase oberhalb von JNK, welche vor allem nach Stress aktiviert wird (zur Übersicht Davis 2000), ist zwar ebenfalls schon 10 Min nach der UV-Bestrahlung aktiv, ihre maximale Aktivität wird allerdings erst nach 30 Min erreicht, und lässt dann langsam nach. Da die Expression von MKP-1 30 Min nach UV-Bestrahlung ebenfalls sehr hoch ist, führt die hohe Aktivität von MKK4 zu diesem Zeitpunkt zu keiner weiteren Verstärkung der Phosphorylierung von JNK (Abb. 2).

In den JunB-defizienten Zellen ist die Situation aufgrund der hohen MKP-1 Expression verändert. Wie in den Wildtyp-Zellen, wird die maximale Aktivität von MKK4 nach 30 Min erreicht. Nur zu diesem Zeitpunkt lässt sich eine Phosphorylierung von JNK in diesen Zellen deutlich nachweisen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass zu diesem Zeitpunkt die Differenz in der Expression von MKP-1 zwischen *junB*^{-/-} und *wildtyp*-Zellen am geringsten ist. Zu den 10 Min und 2 Stunden Zeitpunkten wird die Aktivität von MKK4 durch die hohe Menge an MKP-1 aufgehoben und die JNK-Phosphorylierung bleibt aus. Diese Daten machen deutlich, dass das Verhältnis zwischen den MKPs und den MAP-Kinasen (hier JNK) die stressinduzierte Signalwege kontrolliert.

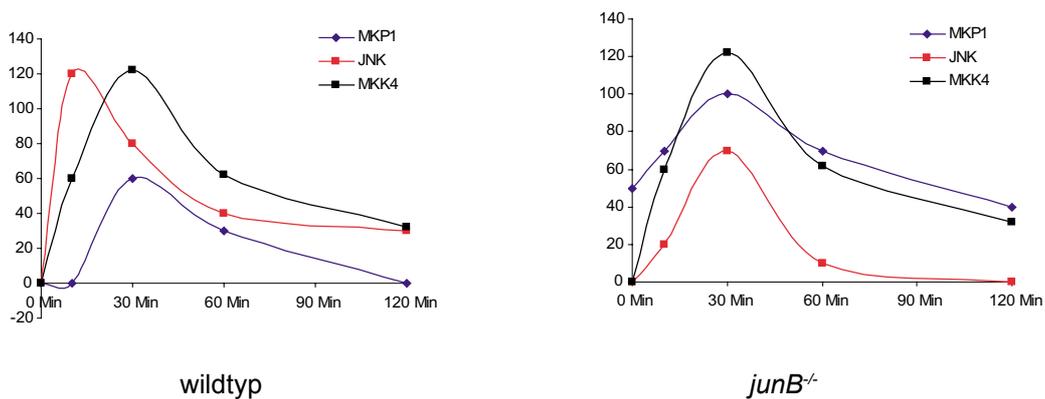


Abb. 2: Schematische Darstellung der Kinetiken der Aktivität von JNK, MKP-1 und MKK4 in *junB*^{-/-}- und *wildtyp*-Zellen

Der MKP-1-Promotor enthält zwar keine AP-1-Bindestelle, jedoch zwei CRE-(„cyclic AMP responsive element“)-Bindestellen (Sommer et al., 2000), die in Mensch und Maus konserviert sind. Möglicherweise hemmt JunB über diese CRE-Bindestellen direkt die Expression von MKP-1. Bisher gibt es nur ein Beispiel für eine reprimierende Wirkung von JunB über eine CRE-Bindestelle. Die Expression von Zyklin D1 wird antagonistisch über c-Jun und JunB reguliert, wobei JunB die Expression von Zyklin D1 hemmt (Bakiri et al., 2000, Andrecht et al., 2001). Ob JunB die MKP-1-Expression auch in anderen Zellsystemen reguliert, oder ob es sich ähnlich wie bei der CD95-Überexpression um ein Fibroblasten-spezifischen Phänotyp handelt, wurde bisher noch nicht analysiert.

5.2.3. JunB als pro- und antiapoptotischer Regulator der Apoptose

Interessanterweise hat JunB, abhängig vom Zelltyp und von den Stimuli, mit denen das Apoptoseprogramm eingeleitet, wird verschiedene Funktionen in der Apoptoseregulation. Dabei ist auffällig, dass beide Funktionen von JunB in der Apoptoseregulation durch eine Repression der Zielgene verursacht werden.

Die Repression von CD95 und CD95-Ligand durch JunB in Fibroblasten wirkt der Apoptoseinduktion entgegen. Hier ist die Funktion von JunB also antiapoptotisch. Andererseits führt die Repression von MKP-1 zu einer reduzierten Apoptoseantwort nach Stressinduktion. Hier hat JunB demnach in der stressinduzierten Apoptose eine proapoptotische Funktion. Allerdings muss die Zelotypspezifität dieser Funktion noch analysiert werden.

Auch in der Zellzyklusregulation hat JunB sowohl positive, als auch negative Funktionen. Durch die Aktivierung des Inhibitors p16 (Passegue et al., 2000) und der Repression von Zyklin D1 (Bakiri et al., 2000; Andrecht 2001) wird die Zellzyklusprogression verlangsamt, während die Aktivierung von ZyklinA-CDK2-Komplexen den Übertritt von der S- in die G2/M-Phase des Zellzyklus fördert (Andrecht et al., 2002). Inwieweit die hier beobachteten

Defekte in der Apoptoseregulation mit den Defekten in der Zellzyklusregulation zusammenhängen, bleibt noch zu untersuchen. Momentan liegen aber keine Hinweise für einen Zusammenhang vor. Ein Protein, das für die Interaktion zwischen Zellzyklus und Apoptoseinduktion mitverantwortlich ist, ist p53 (Admunson et al., 2002). Die Tatsache, dass p53 in den JunB-defizienten Zellen nicht für die Defekte in der Apoptoseregulation verantwortlich ist, weist ebenfalls darauf hin, dass sich die Defekte im Zellzyklus nicht unmittelbar auf die Apoptoseregulation auswirken.

Die vorliegenden Daten der JunB-defizienten Fibroblasten zeigten auch erstmals, dass die beiden Apoptose-Signalwege, CD95-Signalweg und stressinduzierter Signalweg, unabhängig voneinander in der Zelle reguliert werden. Bisher wurde vermutet, dass es nach Stressinduktion zu einer über JNK regulierten Aktivierung von c-Jun und einer darauf folgenden Aktivierung der c-Jun-Zielgene kommt. Zu diesen Genen gehört auch der CD95-Ligand, dessen Expression durch Stress stimuliert wird und zur Aktivierung des CD95-Signalweges führt. Diese Aktivierung des CD95-Signalweges, als sekundärer Effekt der Aktivierung von JNK und c-Jun, würde dann schlussendlich zu einer Depolarisierung der Mitochondrienmembran und somit zur Apoptose führen. Unter der Annahme dieses Modells sollte allerdings die verstärkte Expression des CD95-Liganden in den *junB*^{-/-}-Fibroblasten nach MMS-Behandlung und die zeitgleiche Überexpression von CD95 zu einer deutlich verstärkten Apoptoseantwort nach zellulärem Stress führen. Die trotz erhöhter CD95- und CD95-Ligand-Expression verminderte Apoptoseantwort in den Mutanten Zellen lässt den Schluss zu, dass für die stressinduzierte Apoptose die Aktivierung des CD95-Signalweges weder verantwortlich noch zwingend notwendig ist. Neuere Studien, in denen JNK ohne Protein-Neusynthese direkt die Mitochondrienmembran aktiviert und diese Aktivierung durch eine JNK-Hemmung verhindert werden konnte, belegen diese Hypothese (Tournier et al 2000; Aoki et al., 2002). Es gibt erste Hinweise darauf, dass die Depolarisierung der Mitochondrien durch JNK über die Regulation der Bcl2-Familie erfolgt. Bei der Behandlung menschlicher Fibroblasten (IMR90) mit TNF α wird über JNK das proapoptische Mitglied der Bcl-2-Familie Bid aktiviert (Aoki et al., 2002). Nach diesen Studien wäre die Induktion des CD95-Liganden nach Stressbehandlung nicht notwendig für die Mitochondrienaktivierung und Apoptoseinduktion. Tatsächlich lassen die Daten der JunB-defizienten Fibroblasten den Schluss zu, dass die Induktion des CD95-Liganden nach MMS-Behandlung allein, ohne die Aktivierung von JNK, keine Apoptose induzieren kann. Um diese These genauer zu untersuchen, wäre es interessant, die Apoptoseantwort nach Stressinduktion in CD95- oder CD95-Ligand-defizienten Fibroblasten zu analysieren. Die hier beschriebenen Daten lassen vermuten, dass kein Unterschied in der Apoptoseregulation nach Stressinduktion im Vergleich zu Wildtyp-Zellen auftritt sollte.

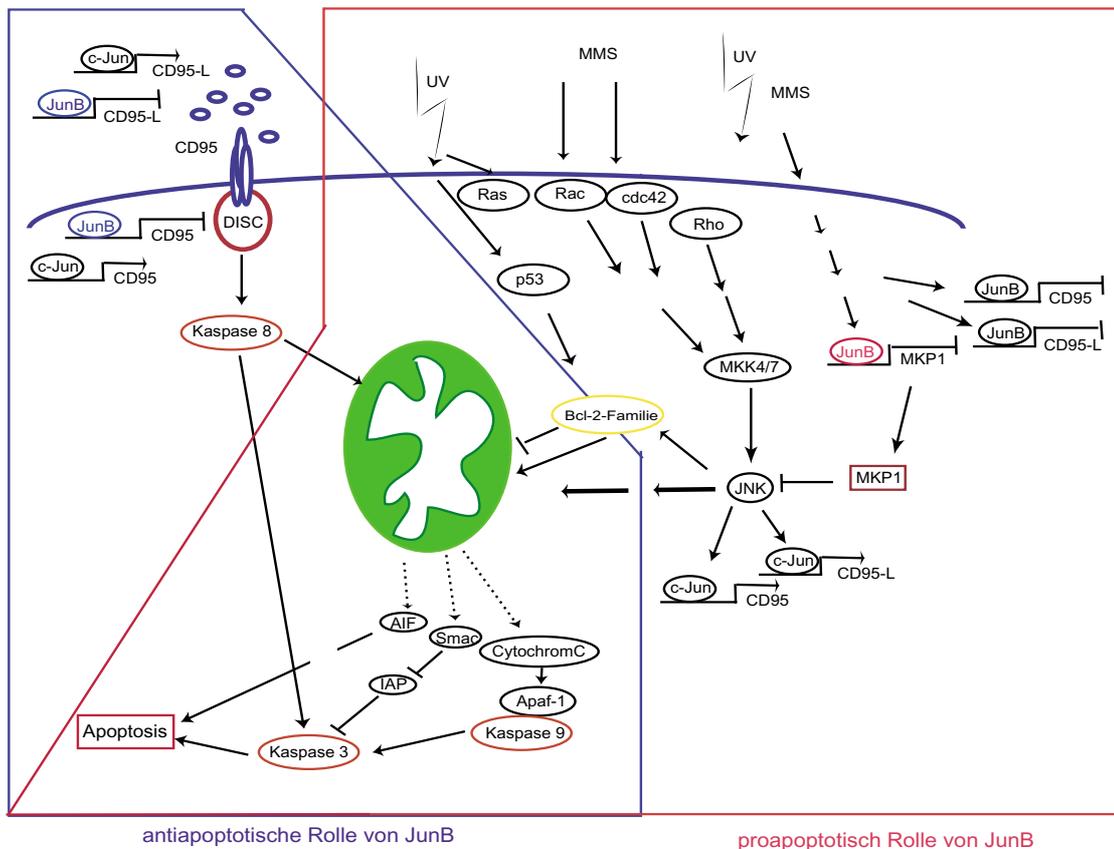


Abb. 3: Schematische Darstellung der Rolle von JunB in der Regulation der Apoptosesignalwege in Fibroblasten

Die hier beschriebenen Hypothesen lassen sich allerdings bisher nur auf Fibroblasten anwenden. Eventuell benötigen andere Zelltypen für die stressinduzierte Apoptose die Aktivierung des CD95-Signalwegs. Da die Repression von CD95 bisher nur in Fibroblasten beobachtet wurde, ist es möglich, dass JunB in anderen Zelltypen keine oder eine andere Rolle in der Apoptoseregulation spielt. Demnach könnten c-Jun und JunB in diesen Zellen in einem anderen stöchiometrischen Verhältnis stehen. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Daten liefern einen weiteren Beweis für die stetig wachsende Komplexität aus negativen und positiven Interaktionen der einzelnen AP-1 Mitglieder im Schaltkreis zelluläre Signalwege.

6. Literatur

- Adams, J.M. and Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281, 1322-1326.
- Adkins, B., Mueller, C., Okada, C.Y., Reichert, R.A., Weissman, I.L. and Spangrude, G.J. (1987) Early events in T-cell maturation. *Annu Rev Immunol*, 5, 325-365.
- Amundson SA, Patterson A, Do KT, Fornace AJ Jr (2002) A nucleotide excision repair master-switch: p53 regulated coordinate induction of global genomic repair genes. *Cancer Biol Ther* 2, 145-9
- Andrecht, S., Kolbus, A., Hartenstein, B., Angel, P. and Schorpp-Kistner, M. (2002) Cell cycle promoting activity of JunB through cyclin A activation. *J Biol Chem*.
- Andrecht S. Identifikation von positiven und negativen Funktionen des Transkriptionsfaktors JunB bei der Zellzyklusregulation (2001) Dissertation an der Universität Hannover
- Angel, P. and Karin, M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*, 1072, 129-157.
- Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M. (1988) The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell*. 5, 875-85
- Aoki H, Kang PM, Hampe J, Yoshimura K, Noma T, Matsuzaki M, Izumo S. (2002) Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes. *J Biol Chem* 277, 10244-50
- Aronheim A, Zandi E, Hennemann H, Elledge SJ, Karin M (1997) Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol Cell Biol* 17, 3094-102
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305-1308.
- Bakiri, L., Lallemand, D., Bossy-Wetzel, E. and Yaniv, M. (2000) Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *Embo J*, 19, 2056-2068.
- Baumann, S., Krueger, A., Kirchhoff, S. and Krammer, P.H. (2002) Regulation of T cell apoptosis during the immune response. *Curr Mol Med*, 2, 257-272.

- Behrmann I, Walczak H, Krammer PH.(1994) Structure of the human APO-1 gene. *Eur J Immunol.* 24; 12 3057-62
- Beltman, J., McCormick, F. and Cook, S.J. (1996) The selective protein kinase C inhibitor, Ro-31-8220, inhibits mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression, induces c-Jun expression, and activates Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem*, 271, 27018-27024.
- Bengal, E., Ransone, L., Scharfmann, R., Dwarki, V.J., Tapscott, S.J., Weintraub, H. and Verma, I.M. (1992) Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins: a direct physical association. *Cell*, 68, 507-519.
- Bohmann, D., Bos, T.J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P.K. and Tjian, R. (1987) Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science*, 238, 1386-1392.
- Bossy-Wetzell, E., Bakiri, L. and Yaniv, M. (1997) Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *Embo J*, 16, 1695-1709.
- Brown, J.R., Ye, H., Bronson, R.T., Dikkes, P. and Greenberg, M.E. (1996) A defect in nurturing in mice lacking the immediate early gene fosB. *Cell*, 86, 297-309.
- Camps, M., Nichols, A. and Arkininstall, S. (2000) Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *Faseb J*, 14, 6-16.
- Cavigelli, M., Li, W.W., Lin, A., Su, B., Yoshioka, K. and Karin, M. (1996) The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *Embo J*, 15, 6269-6279.
- Chiu R, Angel P, Karin M. (1989) Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. *Cell*. 16 979-86
- Davis, R.J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 103, 239-252.
- De Smaele, E., Zazzeroni, F., Papa, S., Nguyen, D.U., Jin, R., Jones, J., Cong, R. and Franzoso, G. (2001) Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates proapoptotic JNK signalling. *Nature*, 414, 308-313.
- Dong, C., Yang, D.D., Tournier, C., Whitmarsh, A.J., Xu, J., Davis, R.J. and Flavell, R.A. (2000) JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. *Nature*, 405, 91-94.

- Dorfman, K., Carrasco, D., Gruda, M., Ryan, C., Lira, S.A. and Bravo, R. (1996) Disruption of the *erp/mkp-1* gene does not affect mouse development: normal MAP kinase activity in ERP/MKP-1-deficient fibroblasts. *Oncogene*, 13, 925-931.
- Dragovich, T., Rudin, C.M. and Thompson, C.B. (1998) Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene*, 17, 3207-3213.
- Duke R.C., Ojcius D.M., und Young D.J. (1997) Die Apoptose-regeln und Fehler beim Zellselbstmord *Spektrum der Wissenschaft* Feb. 26-35
- Eberlein J. Untersuchungen zur Rolle des Glucocorticoidrezeptors und c-Fos im Immunsystem (2000) Diplomarbeit an der Universität Oldenburg
- Eferl, R., Sibilica, M., Hilberg, F., Fuchsbichler, A., Kufferath, I., Guertl, B., Zenz, R., Wagner, E.F. and Zatloukal, K. (1999) Functions of c-Jun in liver and heart development. *J Cell Biol*, 145, 1049-1061.
- Eichhorst, S.T., Muller, M., Li-Weber, M., Schulze-Bergkamen, H., Angel, P. and Krammer, P.H. (2000) A novel AP-1 element in the CD95 ligand promoter is required for induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells upon treatment with anticancer drugs. *Mol Cell Biol*, 20, 7826-7837.
- Estus, S., Zaks, W.J., Freeman, R.S., Gruda, M., Bravo, R. and Johnson, E.M., Jr. (1994) Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. *J Cell Biol*, 127, 1717-1727.
- Fernandez, J.J., Candenas, M.L., Souto, M.L., Trujillo, M.M. and Norte, M. (2002) Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes. *Curr Med Chem*, 9, 229-262.
- Fleischmann A, Hafezi F, Elliott C, Reme CE, Ruther U, Wagner EF (2000) Fra-1 replaces c-Fos-dependent functions in mice. *Genes Dev*. 14; 21 2695-700
- Franklin, C.C., Srikanth, S. and Kraft, A.S. (1998) Conditional expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, MKP-1, is cytoprotective against UV-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 3014-3019.
- Gabai, V.L., Mabuchi, K., Mosser, D.D. and Sherman, M.Y. (2002) Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 22, 3415-3424.
- Gajate, C., Alonso, M.T., Schimmang, T. and Mollinedo, F. (1996) C-Fos is not essential for apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 218, 267-272.

- Gentz, R., Rauscher, F.J., 3rd, Abate, C. and Curran, T. (1989) Parallel association of Fos and Jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domains. *Science*, 243, 1695-1699.
- Green, D.R. and Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312.
- Greenstein, S., Ghias, K., Krett, N.L. and Rosen, S.T. (2002) Mechanisms of Glucocorticoid-mediated Apoptosis in Hematological Malignancies. *Clin Cancer Res*, 8, 1681-1694.
- Grigoriadis, A.E., Wang, Z.Q., Cecchini, M.G., Hofstetter, W., Felix, R., Fleisch, H.A. and Wagner, E.F. (1994) c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science*, 266, 443-448.
- Gross, A., McDonnell, J.M. and Korsmeyer, S.J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 13, 1899-1911.
- Hafezi, F., Steinbach, J.P., Marti, A., Munz, K., Wang, Z.Q., Wagner, E.F., Aguzzi, A. and Reme, C.E. (1997) The absence of c-fos prevents light-induced apoptotic cell death of photoreceptors in retinal degeneration in vivo. *Nat Med*, 3, 346-349.
- Harwood FG, Kasibhatla S, Petak I, Vernes R, Green DR, Houghton JA. (2000) Regulation of FasL by NF-kappaB and AP-1 in Fas-dependent thymineless death of human colon carcinoma cells. *J Biol Chem*. 275 (14):10023-9.
- Hai, T. and Curran, T. (1991) Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 3720-3724.
- Ham, J., Babij, C., Whitfield, J., Pfarr, C.M., Lallemand, D., Yaniv, M. and Rubin, L.L. (1995) A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron*, 14, 927-939.
- Herr, I., van Dam, H. and Angel, P. (1994) Binding of promoter-associated AP-1 is not altered during induction and subsequent repression of the c-jun promoter by TPA and UV irradiation. *Carcinogenesis*, 15, 1105-1113.
- Hilberg, F., Aguzzi, A., Howells, N. and Wagner, E.F. (1993) c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature*, 365, 179-181.

- Hunig, T. and Mitnacht, R. (1991) T cell receptor-mediated selection of functional rat CD8 T cells from defined immature thymocyte precursors in short-term suspension culture. *J Exp Med*, 173, 561-568.
- Ivanov, V.N. and Nikolic-Zugic, J. (1997) Transcription factor activation during signal-induced apoptosis of immature CD4(+)CD8(+) thymocytes. A protective role of c-Fos. *J Biol Chem*, 272, 8558-8566.
- Jain, J., Nalefski, E.A., McCaffrey, P.G., Johnson, R.S., Spiegelman, B.M., Papaioannou, V. and Rao, A. (1994) Normal peripheral T-cell function in c-Fos-deficient mice. *Mol Cell Biol*, 14, 1566-1574.
- Janeway, C.A., Jr. and Bottomly, K. (1994) Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell*, 76, 275-285.
- Janssens V, Goris J (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*. 353 417-39
- Jochum, W., Passegue, E. and Wagner, E.F. (2001) AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene*, 20, 2401-2412.
- Johnson, R.S., van Lingen, B., Papaioannou, V.E. and Spiegelman, B.M. (1993) A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes Dev*, 7, 1309-1317.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H.J., Park, K.K., Cato, A.C., Gebel, S., Ponta, H. and Herrlich, P. (1990) Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell*, 62, 1189-1204.
- Karin, M. (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, 270, 16483-16486.
- Karin, M. and Hunter, T. (1995) Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol*, 5, 747-757.
- Karin, M., Liu, Z. and Zandi, E. (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 240-246.
- Karin, M. and Smeal, T. (1992) Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end. *Trends Biochem Sci*, 17, 418-422.

- Kassel, O., Sancono, A., Kratzschmar, J., Kreft, B., Stassen, M. and Cato, A.C. (2001) Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *Embo J*, 20, 7108-7116.
- Keyse, S.M. (1998) Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity. *Semin Cell Dev Biol*, 9, 143-152.
- Kolbus, A., Herr, I., Schreiber, M., Debatin, K.M., Wagner, E.F. and Angel, P. (2000) c-Jun-dependent CD95-L expression is a rate-limiting step in the induction of apoptosis by alkylating agents. *Mol Cell Biol*, 20, 575-582.
- Kouzarides, T. and Ziff, E. (1988) The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature*, 336, 646-651.
- Krammer, P.H. (1999) CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol*, 71, 163-210.
- Kyriakis, J.M. and Avruch, J. (1996) Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem*, 271, 24313-24316.
- LaCasse, E.C., Baird, S., Korneluk, R.G. and MacKenzie, A.E. (1998) The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*, 17, 3247-3259.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F. and McKnight, S.L. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 240, 1759-1764.
- Lasham, A., Lindridge, E., Rudert, F., Onrust, R. and Watson, J. (2000) Regulation of the human fas promoter by YB-1, Puralpha and AP-1 transcription factors. *Gene*, 252, 1-13.
- Loeffler, M. and Kroemer, G. (2000) The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res*, 256, 19-26.
- Li L, Liu L, Rao JN, Esmaili A, Strauch ED, Bass BL, Wang JY (2002) JunD stabilization results in inhibition of normal intestinal epithelial cell growth through P21 after polyamine depletin. *Gastroenterology*. 123, 764-79
- Maas-Szabowski, N., Szabowski, A., Stark, H.J., Andrecht, S., Kolbus, A., Schorpp-Kistner, M., Angel, P. and Fusenig, N.E. (2001) Organotypic cocultures with genetically modified mouse fibroblasts as a tool to dissect molecular mechanisms regulating keratinocyte growth and differentiation. *J Invest Dermatol*, 116, 816-820.

- Maekawa, T., Bernier, F., Sato, M., Nomura, S., Singh, M., Inoue, Y., Tokunaga, T., Imai, H., Yokoyama, M., Reimold, A., Glimcher, L.H. and Ishii, S. (1999) Mouse ATF-2 null mutants display features of a severe type of meconium aspiration syndrome. *J Biol Chem*, 274, 17813-17819.
- Marshall, C.J. (1995) Opportunities for pharmacological intervention in the ras pathway. *Ann Oncol*, 6 Suppl 1, 63-67.
- Minden, A. and Karin, M. (1997) Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim Biophys Acta*, 1333, F85-104.
- Miner, J.N. and Yamamoto, K.R. (1992) The basic region of AP-1 specifies glucocorticoid receptor activity at a composite response element. *Genes Dev*, 6, 2491-2501.
- Munsch, D., Watanabe-Fukunaga, R., Bourdon, J.C., Nagata, S., May, E., Yonish-Rouach, E. and Reisdorf, P. (2000) Human and mouse Fas (APO-1/CD95) death receptor genes each contain a p53-responsive element that is activated by p53 mutants unable to induce apoptosis. *J Biol Chem*, 275, 3867-3872.
- Nadeau, J.H. (2001) Modifier genes in mice and humans. *Nat Rev Genet*, 2, 165-174.
- Neuberg, M., Adamkiewicz, J., Hunter, J.B. and Muller, R. (1989) A Fos protein containing the Jun leucine zipper forms a homodimer which binds to the AP1 binding site. *Nature*, 341, 243-245.
- 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.
- Nishizawa, M., Kataoka, K., Goto, N., Fujiwara, K.T. and Kawai, S. (1989) v-maf, a viral oncogene that encodes a "leucine zipper" motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 7711-7715.
- Nossal, G.J. (1994) Negative selection of lymphocytes. *Cell*, 76, 229-239.
- Passequé, E., Jochum, W., Schorpp-Kistner, M., Mohle-Steinlein, U. and Wagner, E.F. (2001) Chronic myeloid leukemia with increased granulocyte progenitors in mice lacking junB expression in the myeloid lineage. *Cell*, 104, 21-32.
- Passequé, E. and Wagner, E.F. (2000) JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16 (INK4a) expression. *Embo J*, 19, 2969-2979.
- Paterson, D.J. and Williams, A.F. (1987) An intermediate cell in thymocyte differentiation that expresses CD8 but not CD4 antigen. *J Exp Med*, 166, 1603-1608.

- Pruschy, M., Shi, Y.Q., Crompton, N.E., Steinbach, J., Aguzzi, A., Glanzmann, C. and Bodis, S. (1997) The proto-oncogene c-fos mediates apoptosis in murine T-lymphocytes induced by ionizing radiation and dexamethasone. *Biochem Biophys Res Commun*, 241, 519-524.
- Raff, M. (1998) Cell suicide for beginners. *Nature*, 396, 119-122.
- Reichardt, H.M. and Schutz, G. (1998) Glucocorticoid signalling—multiple variations of a common theme. *Mol Cell Endocrinol*, 146, 1-6.
- Reimold, A.M., Grusby, M.J., Kosaras, B., Fries, J.W., Mori, R., Maniwa, S., Clauss, I.M., Collins, T., Sidman, R.L., Glimcher, M.J. and Glimcher, L.H. (1996) Chondrodysplasia and neurological abnormalities in ATF-2-deficient mice. *Nature*, 379, 262-265.
- Sanchez-Perez I, Martinez-Gomariz M, Williams D, Keyse SM, Perona R (2000) CL100/ MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene* 26;19(45) 5142-52
- Sassone-Corsi, P., Lamph, W.W., Kamps, M. and Verma, I.M. (1988a) fos-associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP-1. *Cell*, 54, 553-560.
- Sassone-Corsi, P., Lamph, W.W. and Verma, I.M. (1988b) Regulation of proto-oncogene fos: a paradigm for early response genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 53 Pt 2, 749-760.
- Sassone-Corsi, P., Ransone, L.J., Lamph, W.W. and Verma, I.M. (1988c) Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the 'leucine zipper' domain. *Nature*, 336, 692-695.
- Sassone-Corsi, P., Sisson, J.C. and Verma, I.M. (1988d) Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. *Nature*, 334, 314-319.
- Sassone-Corsi, P., Visvader, J., Ferland, L., Mellon, P.L. and Verma, I.M. (1988e) Induction of proto-oncogene fos transcription through the adenylate cyclase pathway: characterization of a cAMP-responsive element. *Genes Dev*, 2, 1529-1538.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Kramer, P.H. and Peter, M.E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J*, 17, 1675-1687.
- Schorpp-Kistner, M., Wang, Z.Q., Angel, P. and Wagner, E.F. (1999) JunB is essential for mammalian placentation. *Embo J*, 18, 934-948.

- Schorpp-Kistner, M., Herrlich, P., and Angel P. (2001) The AP-1 family of transcription factors: Structure, regulation and functional analysis in mice *Human Press Inc.* Targets for Cancer Chemotherapie Transcription factors and other Nuclear Proteins 29-52
- Schreiber, M., Baumann, B., Cotten, M., Angel, P. and Wagner, E.F. (1995) Fos is an essential component of the mammalian UV response. *Embo J*, 14, 5338-5349.
- Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Mohle-Steinlein, U., Tian, J., Karin, M., Angel, P. and Wagner, E.F. (1999) Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev*, 13, 607-619.
- Schule, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L.J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I.M. and Evans, R.M. (1990) Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell*, 62, 1217-1226.
- 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.
- Schütte J, Viallet J, Nau M, Segal S, Fedorko J, Minna J. (1989) Jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun *Cell* 6, 987-97.
- Sharpless, N.E. and DePinho, R.A. (2002) p53: good cop/bad cop. *Cell*, 110, 9-12.
- Shaulian, E. and Karin, M. (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 20, 2390-2400.
- Slack, D.N., Seternes, O.M., Gabrielsen, M. and Keyse, S.M. (2001) Distinct binding determinants for ERK2/p38alpha and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1. *J Biol Chem*, 276, 16491-16500.
- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D., Grover-Bardwick, A., Heidecker, G., Rapp, U.R. and Karin, M. (1992) Oncoprotein-mediated signalling cascade stimulates c-Jun activity by phosphorylation of serines 63 and 73. *Mol Cell Biol*, 12, 3507-3513.
- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D.A., Birrer, M. and Karin, M. (1991) Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature*, 354, 494-496.
- Sommer, A, Burkhart H, Keyse SM, Luscher B. (2000)
Synergistic activation of the mkp-1 gene by protein kinase A signaling and USF, but not c-Myc *FEBS Lett* Jun 2; 474 (2-3) 146-50

- Su, H.Y., Bos, T.J., Monteclaro, F.S. and Vogt, P.K. (1991) Jun inhibits myogenic differentiation. *Oncogene*, 6, 1759-1766.
- Swaroop, A., Xu, J.Z., Pawar, H., Jackson, A., Skolnick, C. and Agarwal, N. (1992) A conserved retina-specific gene encodes a basic motif/leucine zipper domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 266-270.
- Szabowski, A., Maas-Szabowski, N., Andrecht, S., Kolbus, A., Schorpp-Kistner, M., Fusenig, N.E. and Angel, P. (2000) c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell*, 103, 745-755.
- Tang, G., Minemoto, Y., Dibling, B., Purcell, N.H., Li, Z., Karin, M. and Lin, A. (2001) Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature*, 414, 313-317.
- Teurich, S. and Angel, P. (1995) The glucocorticoid receptor synergizes with Jun homodimers to activate AP-1-regulated promoters lacking GR binding sites. *Chem Senses*, 20, 251-255.
- Thepot, D., Weitzman, J.B., Barra, J., Segretain, D., Stinnakre, M.G., Babinet, C. and Yaniv, M. (2000) Targeted disruption of the murine junD gene results in multiple defects in male reproductive function. *Development*, 127, 143-153.
- Tournier, C., Hess, P., Yang, D.D., Xu, J., Turner, T.K., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S.N., Flavell, R.A. and Davis, R.J. (2000) Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*, 288, 870-874.
- Treier, M., Staszewski, L.M. and Bohmann, D. (1994) Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell*, 78, 787-798.
- Tuckermann, J.P., Reichardt, H.M., Arribas, R., Richter, K.H., Schutz, G. and Angel, P. (1999) The DNA binding-independent function of the glucocorticoid receptor mediates repression of AP-1-dependent genes in skin. *J Cell Biol*, 147, 1365-1370.
- van Dam, H., Huguier, S., Kooistra, K., Baguet, J., Vial, E., van der Eb, A.J., Herrlich, P., Angel, P. and Castellazzi, M. (1998) Autocrine growth and anchorage independence: two complementing Jun-controlled genetic programs of cellular transformation. *Genes Dev*, 12, 1227-1239.

- Vogt P. Fortuitous convergences: the beginnings of JUN (2002) *Nature Review* 2 465-468
- von Boehmer, H. (1994) Positive selection of lymphocytes. *Cell*, 76, 219-228.
- Wang, X. (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 15, 2922-2933.
- Wang, Z.Q., Ovitt, C., Grigoriadis, A.E., Mohle-Steinlein, U., Ruther, U. and Wagner, E.F. (1992) Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature*, 360, 741-745.
- Weitzman, J.B., Fiette, L., Matsuo, K. and Yaniv, M. (2000) JunD protects cells from p53-dependent senescence and apoptosis. *Mol Cell*, 6, 1109-1119.
- Wenzel A, Iseli HP, Fleischmann A, Hafezi F, Grimm C, Wagner EF, Reme CE (2002) Fra-1 substitutes for c-Fos in AP-1-mediated signal transduction in retinal apoptosis. *J Neurochem.* 6; 1089-94
- Wenzel, A., Grimm, C., Marti, A., Kueng-Hitz, N., Hafezi, F., Niemeyer, G. and Reme, C.E. (2000) c-fos controls the “private pathway” of light-induced apoptosis of retinal photoreceptors. *J Neurosci*, 20, 81-88.
- Whitmarsh, A.J. and Davis, R.J. (1996) Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med*, 74, 589-607.
- Wilhelm, D., van Dam, H., Herr, I., Baumann, B., Herrlich, P. and Angel, P. (1995) Both ATF-2 and c-Jun are phosphorylated by stress-activated protein kinases in response to UV irradiation. *Immunobiology*, 193, 143-148.
- Wisdom, R. (1999) AP-1: one switch for many signals. *Exp Cell Res*, 253, 180-185.
- Wisdom, R., Johnson, R.S. and Moore, C. (1999) c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *Embo J*, 18, 188-197.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J. and Greenberg, M.E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 270, 1326-1331.
- Yang-Yen, H.F., Chambard, J.C., Sun, Y.L., Smeal, T., Schmidt, T.J., Drouin, J. and Karin, M. (1990) Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell*, 62, 1205-1215.

Danksagung

Ich möchte mich bedanken bei Prof. Dr. Scheidtmann, für die Übernahme des Referats, seine langjährige Betreuung und für sein Interesse, die Fortschritte meiner Promotion zu verfolgen. Bei Prof. Dr. Herrlich möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Co-Referats bedanken.

Für die Aufnahme in seine Abteilung und die Möglichkeit zur Promotion bedanke ich mich bei Dr. Peter Angel, insbesondere für seine direkte Betreuung im ersten Projektteil der Arbeit und für seine ständige Bereitschaft, über die gesamte Promotionszeit hinweg, Ergebnisse und Probleme aller Art zu diskutieren.

Bei Dr. Marina Schorpp-Kistner möchte ich mich für die uneingeplante Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe als Doktorandin bedanken. Ihre unermüdliche Bereitschaft zu diskutieren und ihr ständiges Interesse an den Ergebnissen und Problemen im zweiten Teil der Arbeit, haben wesentlich zum letztendlichen Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Sven Baumann bin ich sehr dankbar für die Hilfe und Ratschläge bei den Arbeiten mit den T-Zellen. Ebenso möchte ich mich bei PD. Ingrid Herr bedanken, die mir zu Beginn meiner Promotion mit methodischen und fachliche Ratschlägen sehr geholfen hat.

Melanie danke ich für die tatkräftige Unterstützung in den letzten Wochen meiner Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an Jochen, der mir mit seiner ständigen Gesprächsbereitschaft meine Ergebnisse und Probleme zu diskutieren viele wichtige Denkanstöße gegeben hat.

Meinem Laborbanknachbarn Bernd danke ich für seine Geduld mit mir. Für die gute Atmosphäre untereinander, insbesondere in der letzten Zeit, bin ich allen aus der Abteilung B0800, insbesondere den Doktoranden, dankbar. Darüber hinaus danke ich allen aus Labor 501b insbesondere Sibylle und Tina für die nette Zeit im Labor. Nicht zuletzt danke ich Jochen und Bernd für das fleissige Korrekturlesen der Arbeit und Axel für die Softwareeinführung/beratung.

Mein besonderer Dank gilt meinem Freund Axel für den nötigen Rückhalt und Ausgleich zum täglichen Laboralltag in den letzten Jahren, einen relativ stabilen Computer und das viele Korrekturlesen.

Für die langjährige Unterstützung und Ermutigung bedanke ich mich herzlich bei meinem Vater, meiner Stiefmutter Bernadette und bei meinen Schwestern Vera, Kathrin und Laura.