

**Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie
und Hygiene**

der Technischen Universität München

**Regulation des mitochondrialen Signalweges im Zelltod
aktivierter T-Zellen**

Anette Julia Bauer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende(r): Univ.-Prof. Dr. Dirk Haller

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Michael Schemann
2. Univ.-Prof. Dr. Georg A. Häcker
3. Univ.-Prof. Dr. Andreas Villunger, Med. Univ. Innsbruck/ Österreich

Die Dissertation wurde am 23.1.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 5.5.2007 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>I</u>
----------------------------------	-----------------

<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>V</u>
-------------------------------------	-----------------

<u>Abbildungsverzeichnis</u>	<u>IX</u>
-------------------------------------	------------------

<u>1 Einleitung</u>	<u>1</u>
----------------------------	-----------------

1.1 Apoptose	1
---------------------------	----------

1.1.1 Bedeutung der Apoptose	1
------------------------------------	---

1.1.2 Morphologie der Apoptose	1
--------------------------------------	---

1.1.3 Die apoptotischen Signaltransduktionswege	2
---	---

1.1.3.1 Der rezeptorvermittelte Signalweg	4
---	---

1.1.3.2 Der mitochondriale Signalweg	4
--	---

1.1.3.3 Die Bcl-2 Proteinfamilie	5
--	---

1.1.3.4 Die Gruppe der BH3-Proteine	12
---	----

1.1.3.4.1 Bim	13
---------------------	----

1.1.3.4.2 Noxa und Puma	15
-------------------------------	----

1.2 Das Immunsystem	16
----------------------------------	-----------

1.2.1 Die Rolle der Apoptose im erworbenen Immunsystem	18
--	----

1.2.2 Bcl-3 als Mitglied der Familie der I κ B Proteine	21
--	----

1.2.2.1 Struktur, Lokalisation und Interaktionspartner von Bcl-3	22
--	----

1.2.2.2 Transkriptionelle und posttranslationale Regulation von Bcl-3	23
---	----

1.2.2.3 Bcl-3 in der Tumorigenese	24
---	----

1.2.2.4 Phänotyp der Bcl-3 transgenen und Bcl-3-defizienten Maus	25
--	----

1.3 Zielsetzung der Arbeit	27
---	-----------

<u>2 Material und Methoden</u>	<u>28</u>
---------------------------------------	------------------

2.1 Material	28
---------------------------	-----------

2.1.1 Geräte	28
--------------------	----

2.1.2	Chemikalien	29
2.1.3	Molekulargewichtsmarker	31
2.1.4	Western Blot	32
2.1.5	Antikörper	32
2.1.5.1	Antikörper für Western Blot	32
2.1.5.2	Fluoreszenzmarkierte Antikörper.....	33
2.1.6	Plasmide	34
2.1.7	Bakterien und Bakterienmedium	34
2.1.8	Synthetische Oligonukleotide (Metabion, Martinsried)	35
2.1.9	Säuger-Zelllinien	36
2.1.10	Zellkulturmedien	36
2.1.11	Mauszucht	37
2.2	Methoden	37
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	37
2.2.1.1	Transformation von kompetenten Bakterien.....	37
2.2.1.2	Plasmid-Isolierung.....	38
2.2.1.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	38
2.2.1.4	DNA-Elution aus Agarose.....	38
2.2.1.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	39
2.2.1.6	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	39
2.2.1.7	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	39
2.2.1.8	Ligation von DNA.....	40
2.2.1.9	Herstellung des Plasmids MigRI-EBF3	40
2.2.1.10	Isolierung von DNA aus Mäuseschwänzen	40
2.2.1.11	Isolierung von RNA aus Zellen	41
2.2.1.12	Reverse Transkription von mRNA.....	42
2.2.1.13	GeneChip® - Technologie	42
2.2.2	PCR (Polymerasekettenreaktion)	43
2.2.3	Quantitative Echtzeit-PCR (RT-PCR) nach TaqMan®	44
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	45
2.2.4.1	Gesamtzell-Proteinextrakte	45
2.2.4.2	Proteinbestimmung in Extrakten.....	45

2.2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
2.2.4.4	Proteintransfer auf Nitrocellulose und Immundetektion	47
2.2.4.5	Entfernen gebundener Antikörper von Nitrocellulosemembranen	48
2.2.4.6	Nachweis der Freisetzung von Bim vom Cytoskelett	48
2.2.5	Zellbiologische Methoden	49
2.2.5.1	Kryokonservierung von Zellen	49
2.2.5.2	Generierung von primären dendritischen Zellen	49
2.2.5.3	Stimulierung der primären dendritischen Zellen mit Adjuvantien	50
2.2.5.4	Kopplung von Zellkulturplatten mit Antikörpern	50
2.2.5.5	Generierung von Einzelzellsuspensionen aus der Milz	51
2.2.5.6	Prinzip der immunmagnetischen Zellseparation	51
2.2.5.7	Stimulierung von T-Zellen aus der Milz	52
2.2.5.8	Stimulierung von T-Zellen <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i>	53
2.2.5.9	Überleben ruhender T-Zellen	54
2.2.5.10	Analyse der CFSE-gefärbten T-Zellen nach Stimulierung	54
2.2.5.11	Vorbereitung der Zellen für die Durchflusscytometrie	55
2.2.5.11.1	Färben der Zellen mit EMA (Ethidiummonoazidbromid)	55
2.2.5.11.2	Färben der Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern	55
2.2.5.11.3	Färben der Zellen mit CFSE	55
2.2.5.12	Durchflusscytometrie	56
2.2.5.13	Produktion von Retroviren	57
2.2.5.14	Retrovirale Infektion von T-Zellen	58
3	<u>Ergebnisse</u>	59
3.1	Adjuvans-induziertes Überleben aktivierter T-Zellen	59
3.1.1	Überleben durch einen löslichen, DC-generierten Faktor	59
3.1.2	Erhöhte Induktion von <i>bcl-3</i> mRNA und Bcl-3 Protein	63
3.1.3	Die Rolle von Bcl-3 im adjuvans-induzierten Überleben	65
3.2	Die antiapoptotische Funktion von Bcl-3	67
3.2.1	Bcl-3 im Überleben aktivierter T-Zellen	67
3.2.2	Blockade der Aktivierung von Bim durch Bcl-3	71
3.2.3	Bcl-3-regulierte Gene	74
3.2.3.1	Vergleichende Microarrayanalyse (WT und Bcl-3 ^{-/-})	74
3.2.3.2	Rolle von NF-κB1 und NF-κB2 im Zelltod aktivierter T-Zellen	77

3.3	Die Existenz Bim-unabhängiger Apoptosewege	78
3.3.1	Puma und der Zelltod aktivierter T-Zellen	80
3.3.2	Noxa und der Zelltod aktivierter T-Zellen	82
3.4	Identifizierung adjuvans-induzierter Faktoren aus DCs.....	83
3.5	Proliferation aktivierter T-Zellen nach Adjuvansgabe.....	85
3.6	Hochregulation von Bim in Gegenwart antiapoptotisch wirkender adjuvans-induzierter Faktoren	86
<u>4</u>	<u>Diskussion</u>	<u>89</u>
4.1	Adjuvans-induziertes Überleben von T-Zellen.....	89
4.1.1	Identifikation von apoptoseinhibierenden Cytokinen	91
4.1.2	Rolle von Bcl-3 im adjuvans-induzierten Überleben von T-Zellen	93
4.2	Mediatoren im Zelltod aktivierter T-Zellen.....	94
4.2.1	Bim-abhängiger Zelltod.....	95
4.2.1.1	Zusammenspiel von Bcl-3 und Bim	96
4.2.1.2	Mögliche Bcl-3 regulierte Zielgene	97
4.2.1.3	Beteiligung von NF- κ B1 und NF- κ B2.....	98
4.2.2	Weitere Regulationsmechanismen im Bim-abhängigen Zelltod.....	100
4.2.3	Bim-unabhängiger Zelltod	102
4.2.3.1	Rolle des BH3-Proteins Puma.....	102
4.2.3.2	Rolle des BH3-Proteins Noxa.....	103
4.2.4	Inhibition der Apoptose trotz erhöhter Bim Expression	103
4.3	Regulationsmechanismen im Zelltod aktivierter T-Zellen	106
<u>5</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>114</u>
<u>6</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>116</u>
<u>7</u>	<u>Anhang</u>	<u>130</u>

Abkürzungsverzeichnis

AICD	Aktivierungs-induzierter Zelltod
Apaf-1	“Apoptotic protease-activating factor“
APC	Antigen präsentierende Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
AP-1	“Activation protein-1“
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
Bad	“Bcl-2-antagonist of cell death“
Bak	“Bcl-2-antagonist/killer“
Bax	“Bcl-2 associated X protein“
Bcl-2	“B-cell leukemia/lymphoma 2“
Bcl-3	“B-cell leukemia/lymphoma 3“
BH	Bcl-2-Homologie-Domäne
Bid	“BH3-interacting-domain death agonist“
Bik	“Bcl-2 interacting killer“
Bim	“Bcl-2 interacting mediator of cell death“
BSA	Rinderserumalbumin (“bovine serum albumin“)
BMDDC	Aus dem Knochenmark gereifte dendritische Zellen
BMF	“Bcl-2-modifying factor“
CARD	Caspasenrekrutierungsdomäne
cDNA	Komplementäre DNA (“complementary DNA“)
CDK5	Cyclin-abhängige Kinase 5
c-FLIP	“Cellular FLICE/caspase-8 inhibitory protein“
CFSE	Carboxy-fluoresceindiacetat succinimidyl ester)
ConA	Concanavalin A
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
Cy3	Wasserlöslicher Cyanin-Farbstoff
Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle (“dendritic cell“)
DD	Todesdomäne (“death domain“)
DED	Todeseffektordomäne (“death effector domain“)

Abkürzungsverzeichnis

DEPC	Diethylpyrocarbonat
DISC	“Death inducing complex”
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynucleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EBF3	Mikrotubuli-assoziiertes Protein der RP/EB Familie, Mitglied 3
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	Ethidiummonoazid-bromid
Erk1/2	“Extracellular signal-regulated kinase”
EtOH	Ethanol
FACS	“Fluorescence-activated cell sorter”
FCS	Fetales Kälberserum (“fetal calf serum”)
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FOXO3a	“Forkhead transcription factor” (FKHRL1)
GSK	Glycogen-Synthase-Kinase
GTP	Guanosin 5'-triphosphat
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HDAC	Histondeacetylase
HRK	Harakiri
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IFN	Interferon
IκB	Inhibitor von NF-κB
IL	Interleukin
JNK	C-Jun NH ₂ -terminale Kinase
KIF21B	“Kinesin family member 21B”
KOH	Kaliumhydroxid
kb	Kilobasenpaar
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar, (Mol/l)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase

Abkürzungsverzeichnis

MARK4	“MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4”
MEFs	“Mouse embryonal fibroblasts”
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
Mio	Million(en)
mol	1 Mol enthält $6,022 \times 10^{23}$ Moleküle
MyD88	Myeloider Differenzierungsmarker 88 („Myeloid differentiation factor 88“)
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
O.D.	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (“polymerase chain reaction”)
PEG	Polyethylenglycol
Pin1	Prolylisomerase 1
PI3	Phosphatidylinositol 3
PFA	Paraformaldehyd
pH	Maß für den Säuregrad
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
PMA	Phorbol ester 12-myristate 13-acetate
PRR	“Pattern Recognition Rezeptor”
PUMA	“p53-upregulated modulator of apoptosis”
p70S6K	“70 kDa ribosomal protein S6 kinase”
RT	Raumtemperatur
RXR	“Retinoid X receptor”
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunden
tBid	Verkürztes Bid
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (“tris-buffered saline“)
TCA	Trichloressigsäure
TCR	T-Zell Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin

Abkürzungsverzeichnis

TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris (hydroxy-methyl)-aminomethan
u, U	Einheiten ("units")
ÜS	Überstand
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen ("volume per volume")
w/v	Gewicht pro Volumen ("weight per volume")
WT	Wildtyp
x g	x-fache Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/sec}^2$)

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Rezeptorvermittelter und mitochondrialer Signalweg	3
Abb. 2: Domänenstruktur und Funktion der Bcl-2 Proteinfamilie	6
Abb. 3: Verknüpfung der Mitglieder der Bcl-2 Familie untereinander	11
Abb. 4: BH3-Proteine aktiviert durch unterschiedliche Stresssignale	12
Abb. 5: Proliferation und Elimination reaktiver T-Zellen im Verlauf einer Immunantwort	18
Abb. 6: <i>In vivo</i> : Überleben SEB-aktivierter TCR $\nu\beta 8^+$ Zellen nach Adjuvansgabe	60
Abb. 7: <i>Ex vivo/in vitro</i> : Überleben aktivierter T-Zellen in Gegenwart von LPS	61
Abb. 8: Überleben CD3/CD28 aktivierter T-Zellen	62
Abb. 9: Überleben gereinigter T-Zellen in Gegenwart von DC-gereiften Faktoren	62
Abb. 10: Hochregulation der <i>bcl-3</i> mRNA nach Coinjektion von Adjuvans	64
Abb. 11: Hochregulation von Bcl-3 nach LPS-Stimulation	65
Abb. 12: <i>In vitro/vivo</i> : Überleben Bcl-3-defizienter T-Zellen in Gegenwart von LPS	66
Abb. 13: Überleben Bcl-3-defizienter T-Zellen mit DC-gereiften Faktoren	67
Abb. 14: Überlebensnachteil aktivierter Bcl-3-defizienter T-Zellen	68
Abb. 15: Austausch der Überstände zwischen WT und <i>bcl-3^{-/-}</i> Mäusen	69
Abb. 16: Empfindlichkeit gegenüber Apoptose-auslösenden Substanzen	70
Abb. 17: Überleben aktivierter T-Zellen nach retroviraler Bcl-3 Expression	71
Abb. 18: Minimale Erhöhung der Bim Expression in Bcl-3-defizienten T-Zellen	72
Abb. 19: Erhöhte Freisetzung von Bim in aktivierten T-Zellen von <i>bcl-3^{-/-}</i> Mäusen	73
Abb. 20: Retrovirale Bcl-3 Expression in aktivierten <i>bim^{-/-}</i> T-Zellen	74
Abb. 21: Überleben aktivierter T-Zellen von <i>nf-κB1^{-/-}</i> , <i>nf-κB2^{-/-}</i> und WT Mäusen	78
Abb. 22: Bestätigung Bim-unabhängiger Wege im Zelltod aktivierter T-Zellen	79
Abb. 23: Die Rolle von Puma in aktivierten T-Zellen	81
Abb. 24: Untergeordnete Rolle von Noxa im Tod aktivierter T-Zellen	83
Abb. 25: IL-1, IL-7 und IL-15 verbessern das Überleben von aktivierten T-Zellen	84
Abb. 26: Proliferation der SEB/LPS-stimulierten transferierten TCR $\nu\beta 8^+$ T-Zellen	86
Abb. 27: Proteinexpression nach Zugabe DC-gereifter Faktoren	88
Abb. 28: Regulationsmechanismen im Zelltod aktivierter T-Zellen	109

1 Einleitung

1.1 Apoptose

1.1.1 Bedeutung der Apoptose

Die reguliert ablaufende Form des Zelltods in einem mehrzelligen Organismus wird durch den Begriff der Apoptose definiert. Vor mehr als 150 Jahren beschrieb zum ersten Mal C. Vogt diese Art des Zelltodes bei seiner Entdeckung, dass Knorpelzellen während der Entwicklung der Geburtshelferkröte verschwinden (Vogt, 1842). In vielen weiteren Studien wurden die morphologischen Veränderungen und das Verschwinden von Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beobachtet (Clarke & Clarke, 1996). Es folgten elektronenmikroskopische Untersuchungen von Kerr et al., welcher diese Art des Zelltods mit seiner besonderen Morphologie zum ersten Mal als Apoptose definierte und sie von Nekrose unterschied (Kerr et al., 1972).

Der physiologische Zelltod wird sowohl durch intrazelluläre als auch extrazelluläre Einflüsse initiiert, während die weitere genetisch kontrollierte Signalkaskade zellautonom abläuft. Apoptose spielt während der Organentwicklung, bei der Beseitigung infizierter Zellen und der Regulation der Zellzahl in proliferierenden Geweben eine Rolle (Danial & Korsmeyer, 2004; Vaux & Strasser, 1996). Sowohl die Reifung der Lymphocyten, die Apoptose von Granulocyten als auch die Rückführung der Lymphocytenzahl am Ende einer spezifischen Immunantwort seien hier als Beispiele genannt (Hildeman et al., 2002; Surh & Sprent, 1994; Villunger et al., 2000). Es wird vermutet, dass Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems dem ständigen Einfluss von apoptose-induzierenden Signalen ausgesetzt sind. Die Neubildung und Teilung von Immunzellen muss in ständigem Gleichgewicht zur Apoptose dieser Zellpopulation stehen. Ein Ungleichgewicht kann zu schwerwiegenden Störungen wie Autoimmunkrankheiten oder Tumorbildung beitragen (Trevani et al., 1996).

1.1.2 Morphologie der Apoptose

Die Aktivierung des konservierten Signaltransduktionsweges der Apoptose, der die regulierte Selbstzerstörung einer Zelle bestimmt, kann durch verschiedene

extrazelluläre und intrazelluläre Signale ausgelöst werden. So zahlreich diese Auslöser sein können, sie alle münden in die besondere Morphologie der apoptotischen Zelle, durch die sie sich von der nekrotischen Zelle unterscheidet. Apoptotische Zellen separieren sich vom Zellverband und schrumpfen. Eine Kondensation des Chromatins und eine Fragmentierung der DNA finden statt. Generell bleiben Organellen intakt, obwohl eine Ausdehnung des endoplasmatischen Retikulums und eine Freisetzung und Aggregation von Ribosomen beobachtet worden ist. Cytoplasmatische Vakuolen können genauso in Erscheinung treten wie ein Verlust der Mikrovilli. Es kommt zur Zellfragmentbildung, und es bilden sich membranumschlossene Vesikel, apoptotische Körperchen, die zahlreiche Zellbestandteile inkorporieren (Hacker, 2000). Phosphatidylserin wird an der äußeren Plasmamembran exponiert (Fadok et al., 1992), und Zucker, die auf der Zelloberfläche an Lipide und Proteine binden, verändern sich (Savill & Fadok, 2000). Letztendlich werden die apoptotischen Körperchen von phagozytierenden Zellen erkannt, aufgenommen und lysiert (Savill & Fadok, 2000). Um inflammatorische Reaktionen zu vermeiden, bleibt hier im Gegensatz zur Nekrose die Membranintegrität erhalten, wodurch die Freisetzung von intrazellulären Bestandteilen verhindert wird (Savill et al., 2002).

1.1.3 Die apoptotischen Signaltransduktionswege

Im Ablauf der streng regulierten Apoptose sind zwei Signaltransduktionswege bekannt: der extrinsische und der intrinsische Weg (Abb. 1). Beide werden durch unterschiedliche nur teilweise bekannte Stimuli ausgelöst, aber beide führen zur Apoptose. Lediglich die letzten Schritte sind durch das Vorliegen von aktivierten Caspasen, den Aspartat-spezifischen Cysteinproteasen, den beiden Wegen gemeinsam.

Caspasen weisen sich durch ihre Sequenzhomologie, ihre Struktur und ihre Substratspezifität aus und liegen im Cytoplasma als inaktive Zymogene vor. Initiatorcaspasen (Caspase-8, -9, -10) werden nach Interaktion mit spezifischen Adaptormolekülen aktiviert, während Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) durch die proteolytische Aktivität der Initiatorcaspasen aktiviert werden (Denault & Salvesen, 2002). Die Aktivierung der Moleküle ist gekennzeichnet durch eine Abspaltung ihrer Prodomäne und der Bildung zweier Heterodimere mit einer kleinen

und einer großen Untereinheit der jeweiligen Caspase (Earnshaw et al., 1999). Aktive Effektorcaspasen spalten daraufhin Proteine, die an der Regulation der Apoptose, am Aufbau des Cytoskeletts, des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates, der Zelladhäsion, an DNA-Reparaturmechanismen, am Zellzyklus und an der RNA- und Proteinsynthese beteiligt sind (Fischer et al., 2003). Im Rahmen dieser Spaltung kommt es zum apoptotischen Zelltod und der Aufnahme der Zelle durch Phagozyten.

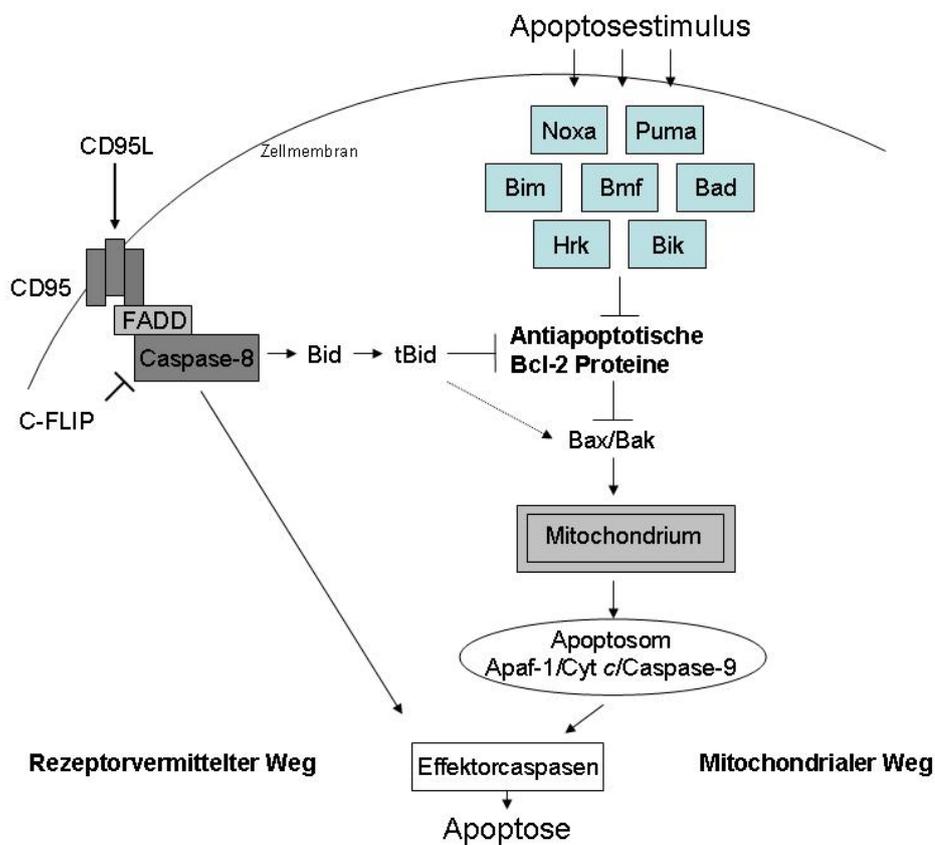


Abb. 1: Rezeptorvermittelter und mitochondrialer Signalweg modifiziert nach Bouillet & Strasser, 2002

In der Apoptose führen beide Signalwege zur Aktivierung der Effektorcaspasen. Der rezeptorvermittelte Signalweg führt nach Bindung des entsprechenden Liganden über eine Trimerisierung des CD95 Rezeptors zur Ausbildung des DISC ('death inducing complex'). Der mitochondriale Signalweg kann durch verschiedene Auslöser aktiviert werden und mündet in die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und der Ausbildung des Apoptosoms.

1.1.3.1 Der rezeptorvermittelte Signalweg

Am extrinsischen, rezeptorvermittelten Signalweg sind Membranrezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie beteiligt, zu denen Rezeptoren wie CD95 (Fas/Apo-1) gehören (Ashkenazi & Dixit, 1998). Die Bindung der entsprechenden Liganden, wie zum Beispiel CD95L (Fas/APO-1) findet über deren extrazelluläre Domäne statt, und daraufhin kommt es zu einer Oligomerisierung der Rezeptoren. Die cytoplasmatisch lokalisierte Todesdomäne (DD) interagiert dann mit Adaptormolekülen (Muzio et al., 1996). Das Adaptormolekül FADD bindet zusätzlich über seine Todeseffektordomäne (DED) an die Initiatorcaspase-8 (Muzio et al., 1998). In diesem Komplex, auch DISC genannt (Kischkel et al., 1995), wird die Prodomäne der Initiatorcaspase-8 autokatalytisch abgespalten. Daraufhin können die kleine und große Untereinheit der Initiatorcaspase-8 heterodimerisieren und bilden das katalytisch aktive Zentrum (Boatright et al., 2003; Donepudi et al., 2003). Der kompetitive Inhibitor c-Flip kann die Aktivierung der Caspase-8 hemmen (Krueger et al., 2001). Für den Fas-vermittelten Signalweg sind zwei verschiedene Zelltypen bekannt, die sich dadurch unterscheiden, dass Effektorcaspasen durch unterschiedliche Mediatoren aktiviert werden. In Typ-I Zellen führt die Aktivierung der Caspase-8 direkt zur weiteren Aktivierung der Effektorcaspasen, während in Typ-II Zellen erst eine Spaltung des Proteins Bid unter Beteiligung des mitochondrialen Signalweges zur Kaskade der Effektorcaspasen führt (Li et al., 1998; Scaffidi et al., 1998).

1.1.3.2 Der mitochondriale Signalweg

Der intrinsische, mitochondriale Signalweg kann durch verschiedene Apoptosestimuli aktiviert werden, zu denen Stresssignale wie der Entzug von Wachstumsfaktoren, DNA-Schäden und cytotoxische Therapeutika, aber auch verschiedene Entwicklungsprozesse der Zelle gehören (Cory et al., 2003; Danial & Korsmeyer, 2004). An dem Signalweg sind verschiedene Mitglieder der Bcl-2 Familie beteiligt: die proapoptotischen BH3-Proteine, die proapoptotischen Proteine der Bax/Bak-Gruppe und die antiapoptotischen Bcl-2-artigen Proteine. Die apoptoseauslösenden Signale führen zu einer Aktivierung der BH3-Proteine, die dann mit den anderen Mitgliedern der Bcl-2 Familie interagieren. Deren Zusammenspiel führt zur Freisetzung von Cytochrom c und anderer apoptogener Proteine (z.B. Diablo/Smac) aus dem Mitochondrium ins Cytosol der Zelle (Ekert & Vaux, 2005; Newmeyer &

Ferguson-Miller, 2003), das vermutlich durch eine erhöhte Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran ausgelöst wird (Cory & Adams, 2002; Wang, 2001) Die Bindung von Cytochrom c an das cytosolische Protein Apaf-1 ruft dessen Konformationsänderung hervor (Hu et al., 1998) und die Bindung von dATP oder ATP an die N-terminale CARD Domäne von Apaf-1. Ein Komplex, Apoptosom genannt (Zou et al., 1999), wird gebildet und rekrutiert und aktiviert Caspase-9 (Li et al., 1997). Diese Aktivierung findet aufgrund der unmittelbaren Nähe der Caspasen zueinander über Autoaktivierung statt (Acehan et al., 2002). Die Effektorcaspasen werden in der Folge von Caspase-9 aktiviert (Nicholson & Thornberry, 1997). Die Tatsache, dass Marsden et al. im haematopoetischen System zeigen konnten, dass die Deletion von Apaf-1 oder Caspase-9 keinen Effekt auf dessen Zellzahl hat und die Präsenz verschiedener Apoptosestimuli eine Sterberate wie in Wildtyp Zellen verursacht, führte zur Behauptung, dass diesem Komplex in manchen Zellen eine größere Bedeutung zukommt als in anderen (Marsden et al., 2002). Eine Beteiligung von Bcl-2, einem noch nicht identifizierten Protein und den Caspasen-1, -7, -11 und -12 wurde im Signalweg der haematopoetischen Zellen vermutet (Adams & Cory, 2002).

In den meisten apoptoseauslösenden Situationen ist der mitochondriale Signalweg involviert und so sollen im Folgenden die daran beteiligten Proteine vorgestellt werden. Abb. 2 gibt einen kurzen Überblick.

1.1.3.3 Die Bcl-2 Proteinfamilie

Die am mitochondrialen Signalweg beteiligten Proteine der Bcl-2 Familie besitzen zwischen einer und vier Homologiedomänen, die als BH-Domänen (1 bis 4) bezeichnet werden. Die antiapoptotischen Bcl-2 Mitglieder (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, A1) verfügen mindestens über die BH1- und BH2-Domäne. Die apoptotischen Proteine der Bax/Bak Gruppe (Bax, Bak und Bok) weisen die BH-Domänen 1 bis 3 auf. Die Gruppe der BH3-Proteine ist durch die ledigliche Präsenz der BH3-Domäne gekennzeichnet (Adams & Cory, 1998). Diese sorgen für das initiale Signal zur Apoptoseinduktion und umfassen die Proteine Bad, Bid, Bmf, Hrk, Bik, Bim, Puma und Noxa. Strukturanalysen zeigten, dass die hydrophobe Seite der amphipatischen α -Helix, die durch die BH3-Domäne gebildet wird, genau in die hydrophobe Mulde passt, die von den BH-Domänen 1, 2 und 3 der antiapoptotischen Bcl-2 Mitglieder

gebildet werden (Fesik, 2000; Huang & Strasser, 2000; Liu et al., 2003; Petros et al., 2000; Sattler et al., 1997).

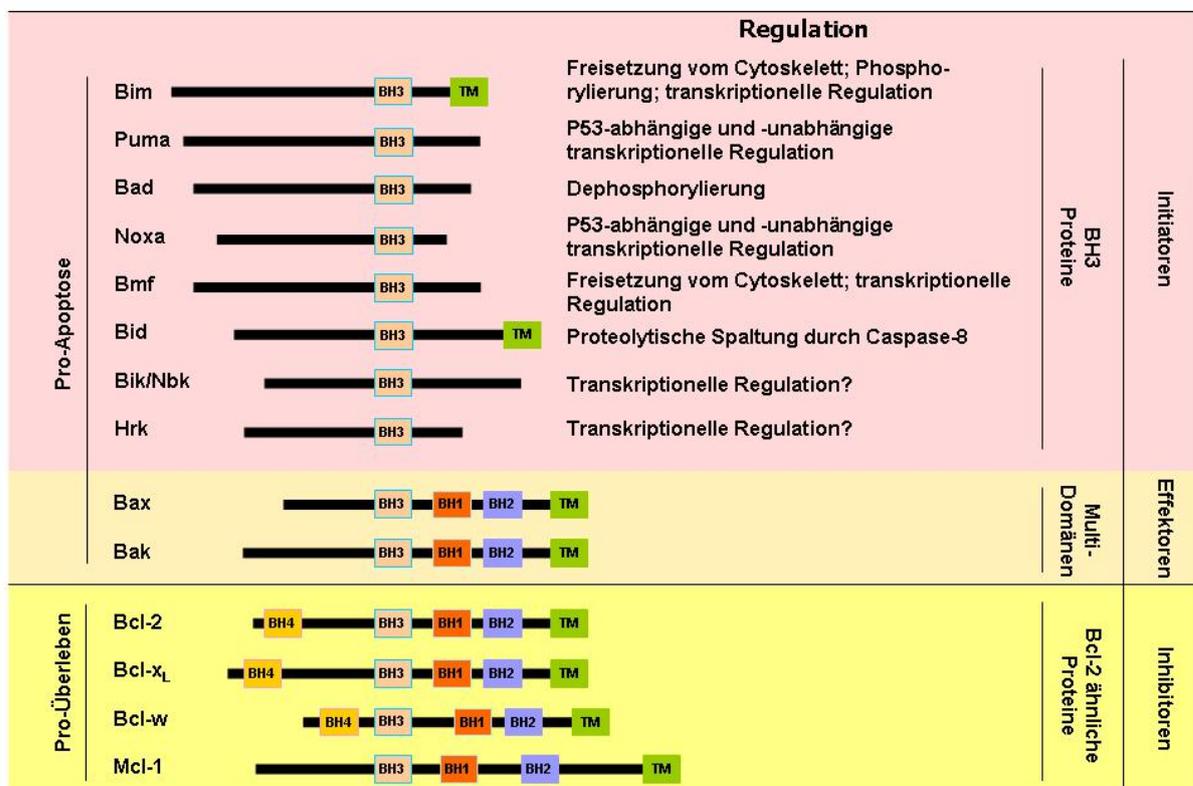


Abb. 2: Domänenstruktur und Funktion der Bcl-2 Proteinfamilie modifiziert nach Ying et al., 2006

Bcl-2 Proteine werden aufgrund ihrer Struktur und ihrer Funktion in drei Gruppen eingeteilt. Die antiapoptotischen Proteine enthalten alle vier BH-Domänen. Proapoptotisches Bax und Bak besitzen die BH3-Domäne 1 bis 3 und sind für die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien verantwortlich. Die auslösenden Signale werden an die BH3-Proteine weitergeleitet, die eine Homologie in der BH3-Domäne besitzen. Bisher bekannte Mechanismen wie die BH3-Proteine aktiviert werden, ist angezeigt.

Chen et al. zeigten eine Selektivität einzelner BH3-Peptide für die verschiedenen Mitglieder der Bcl-2 Familie (Abb. 3) (Chen et al., 2005). Auch Immunpräzipitationen konnten diese Interaktionen bestätigen. Tauscht man nur eine oder zwei Aminosäuren in der BH3-Domäne bei Bad oder Noxa aus, können diese auch an andere Bcl-2 Mitglieder binden (Chen et al., 2005; Day et al., 2005). Wie Abb. 3 verdeutlicht, zeigen die einzelnen Bcl-2 Mitglieder auch eine Spezifität gegenüber den Proteinen Bax und Bak (Willis et al., 2005), die für die Auslösung der Apoptose notwendig sind (Cheng et al., 2001; Zong et al., 2001). Allerdings ist die Interaktion von Bax mit Bcl-2 nur in „yeast-two-hybrid“ Experimenten (Oltvai et al., 1993) und

Immunpräzipitationen in der Gegenwart von Detergenz gezeigt worden (Hsu & Youle, 1997; Suzuki et al., 2000), sodass auch hier eine Unsicherheit über die tatsächliche Bindung *in vivo* besteht.

Ob die BH3-Proteine direkt Bax und Bak aktivieren (Cartron et al., 2004; Kuwana et al., 2005; Letai et al., 2002) oder ob dies indirekt durch die Inaktivierung der antiapoptotischen Bcl-2 Mitglieder geschieht (Willis et al., 2005) ist unklar und wird kontrovers diskutiert (Willis & Adams, 2005). Um hier argumentieren zu können, muss man sich als erstes die zelluläre Lokalisation der einzelnen Mitglieder der Apoptose vor Augen führen.

Bcl-2 ist an der cytoplasmatischen Seite der äußeren Mitochondrienmembran und dem endoplasmatischen Retikulum lokalisiert; die anderen Bcl-2 Mitglieder (Bcl-X_L und Bcl-w) sind dagegen sowohl im Cytosol als auch an mitochondrialen Membranen vorzufinden (Hsu et al., 1997; Kaufmann et al., 2003; Schinzel et al., 2004; Wang, 2001). Bax ist entweder lose mit den Mitochondrien verbunden oder es liegt cytoplasmatisch vor (Hsu et al., 1997). Seine Membraninsertionssequenz und die BH3-Domäne liegen strukturell im Inneren des Proteins verborgen (Suzuki et al., 2000). Ein Apoptosestimulus führt zu einer Konformationsänderung von Bax und es kann dann in die Mitochondrienmembran integrieren und dort oligomerisieren (Antonsson et al., 2001; Nechushtan et al., 2001). Bak ist bereits in der Mitochondrienmembran inseriert und ein Apoptosestimulus führt zur Bildung trimerer Komplexe (Griffiths et al., 1999; Nechushtan et al., 2001). Sind Bax und Bak einmal aktiviert und bilden Homooligomere, führt dies zu einer Permeabilisierung und Porenbildung in der Membran und damit zur Ausschüttung apoptogener Proteine wie Cytochrom c oder Diablo/Smac (Du et al., 2000; Green & Kroemer, 2004; Mikhailov et al., 2003; Verhagen & Vaux, 2002).

Derzeit werden zwei verschiedene Modelle der Aktivierung von Bax/Bak favorisiert.

Das „direct binding“ Modell beschreibt eine Situation, in der bestimmte BH3-Proteine (Bim, tBid, möglicherweise auch Puma) direkt Bax/Bak aktivieren und dessen Membraninsertionssequenz freilegen (Cartron et al., 2004; Kim et al., 2006; Kuwana et al., 2005; Letai et al., 2002). Im inaktiven Zustand sind diese an antiapoptotische Bcl-2 Proteine gebunden und können keine Apoptose auslösen. Erst ein Apoptosestimulus führt dazu, dass die BH3-Aktivatoren aus ihrer Bindung mit den antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen verdrängt werden. Dies wird durch die

sogenannten "Sensitizer" bewerkstelligt, zu denen die BH3-Proteine Bad, Noxa, Bmf, Hrk und Bik gehören (Certo et al., 2006; Letai et al., 2002).

Zunächst wurde die Möglichkeit der Interaktionen der BH3-Proteinen mit Bax/Bak und den antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen angenommen, weil eine Strukturähnlichkeit zwischen Bax und dem antiapoptotischen Bcl-X_L besteht (Liu et al., 2003; Muchmore et al., 1996; Suzuki et al., 2000). Zudem leitet sich das Modell von der Beobachtung ab, dass die Zugabe der BH3-Peptide Bim und Bid eine Freisetzung von Cytochrom c aus isolierten Mitochondrien auslöste (Letai et al., 2002). Da isolierte Mitochondrien über eine nicht definierte Proteinzusammensetzung aus Bax/Bak und antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen verfügen, wurden weitere Versuche mit künstlichen Liposomen ohne die Anwesenheit von anti-apoptotischen Bcl-2-ähnlichen Proteinen durchgeführt. Die Zugabe der BH3-Peptide Bim und Bid konnten erneut eine Insertion von Bax in die Membran und dessen Permeabilisierung auslösen (Kuwana et al., 2005; Kuwana et al., 2002). Ob Puma hier in die Gruppe der aktivierenden BH3-Proteine eingestuft werden kann oder nicht, war unsicher, denn zum einen wurde zwar eine Bindung des Puma-BH3 Peptides an Bax gezeigt (Cartron et al., 2004), zum anderen führte die Zugabe des BH3 Peptids zu keiner Freisetzung von Cytochrom c (Kuwana et al., 2005; Letai et al., 2002). Zusätzlich blieb in diesem Fall unklar, ob die Verwendung von Peptiden die tatsächliche Situation mit Proteinen widerspiegelte. Schließlich zeigten Kim et al., dass die Zugabe der Proteine Bim, tBid und auch Puma zu einer erhöhten Freisetzung von Cytochrom c aus isolierten Mitochondrien führte (Kim et al., 2006). Puma schien damit auch zu der Gruppe der Aktivatoren zu gehören. Der Nachweis einer direkten Bindung der drei Aktivatoren an Bax/Bak ist schwierig. Es ist bekannt, dass Bax seine Konformation in Gegenwart von Detergenzien ändert (Hsu & Youle, 1997). So ist nicht auszuschliessen, dass die detektierten Bindungen zwischen Bim und Bax (Liu et al., 2003; Marani et al., 2002) während der Zellyse nur durch eine artifizielle Konformation von Bax entstanden sind. Zusätzlich konnte die Bindung von Bid an Bax/Bak nur in Überexpressionsstudien nachgewiesen werden (Wang et al., 1996; Wei et al., 2000). Abschliessend kann man sagen, dass in oligomeren Komplexen von Bax/Bak bisher keine BH3-Proteine nachgewiesen werden konnten. Und so postulierten Wei et al. einen schwer nachweisbaren „hit and run“ Mechanismus (Wei et al., 2000), in dem tBid nicht länger an Bak bindet, nachdem es dessen Konformationsänderung ausgelöst hat. Doch die direkte Aktivierung von Bax/Bak

durch die Aktivatoren der BH3-Proteine blieb auf diese Art und Weise unwahrscheinlich. Ein solcher Mechanismus würde einen überlappenden Phänotyp der Deletionsmutanten für Bax/Bak und den Deletionsmutanten der einzelnen Aktivator-BH3-Proteine vorhersagen, der nicht gegeben ist.

Das andere Modell der Aktivierung von Bax/Bak wird als Displacement Modell bezeichnet. Es wurde postuliert, dass Bax/Bak in gesunden Zellen durch Interaktion mit den antiapoptotischen Bcl-2 ähnlichen Proteinen inaktiv gehalten werden. Apoptosestimuli führen zur Oligomerisierung und Aktivierung von Bax/Bak: nach Bindung der BH3-Proteine an die antiapoptotischen Bcl-2 ähnlichen Proteinen werden Bax und Bak aus dem Komplex verdrängt werden (Willis & Adams, 2005). Da Bim, tBid und Puma an alle antiapoptotischen Bcl-2 ähnlichen Proteine binden können, wären diese am wirksamsten in ihrer apoptoseauslösenden Wirkung.

In gesunden Zellen ist Bak in der äußeren Mitochondrienmembran und dem endoplasmatischen Retikulum inseriert, und seine apoptotische Aktivität scheint durch die Interaktion mit den Proteinen Mcl-1 und Bcl-X_L kontrolliert zu werden (Willis et al., 2005). Diese inhibierende Interaktion kann erst gebrochen werden, wenn BH3-Proteine an Mcl-1 und Bcl-X_L binden. Apoptose wird ausgelöst.

Obwohl eine überlappende Funktion für Bax und Bak postuliert wird (Lindsten et al., 2000), kann man aufgrund ihrer unterschiedlichen Lokalisation in gesunden Zellen auch Abweichungen in ihrer Regulation erwarten. Bax ist in gesunden Zellen als lösliches monomeres Protein vorhanden (Hsu & Youle, 1997), dessen Membraninsertionssequenz und BH3-Domäne im Proteininneren verborgen sind (Suzuki et al., 2000). Da die Konformationsänderung und Translokation an die Mitochondrien erst nach Auslösung der Apoptose stattfinden, scheint dessen Inhibition durch Bindung an antiapoptotische Bcl-2 ähnliche Proteine eher unwahrscheinlich. Die gleichzeitige Überexpression von Bcl-2 und Bax führte zu keiner veränderten Verteilung der Proteine in der Zelle (Wolter et al., 1997). Der Interaktionsnachweis zwischen Bax und Bcl-2 ähnlichen Proteinen könnte auch hier nur durch die Präsenz bestimmter Detergenzien während der Zellyse ausgelöst worden sein (Hsu & Youle, 1997). Zudem wird auch der wohl wichtigste Schritt, die Insertion von Bax in die Mitochondrienmembran mit diesem Modell nicht erklärt.

Schließlich stehen sich zurzeit zwei Modelle der Aktivierung von Bax/Bak gegenüber, deren zentralen Vorhersagen durch eine erst im November 2006 veröffentlichte

Studie nicht bestätigt werden (Kim et al., 2006). Im Displacement Modell wurde die inhibierende Bindung von Bcl-2 ähnlichen Proteinen an Bax/Bak in Frage gestellt. Es wurde eine Mutante von Bak oder Bax konstruiert, die beide nicht mehr fähig waren, an Bcl-X_L oder Mcl-1 zu binden. Schließlich wurden Bax/Bak-defiziente embryonale Fibroblasten aus Mäusen mit dieser Mutante transfiziert. Erwartet man, dass die apoptotische Wirkung von Bax/Bak nur durch Interaktion mit Mcl-1 und Bcl-X_L verhindert wird, sollte die Präsenz der Mutante schon Apoptose auslösen. Dies war jedoch nicht der Fall. Zudem konnte die gleichzeitige Überexpression von Bcl-X_L, Mcl-1 und Bcl-2 zusätzlich Apoptose verhindern, obwohl keine Bindung mit Bax oder Bak zustande kam. Dies widerspricht dem Displacement-Modell.

Doch auch das „direct binding“ Modell wurde durch die Daten nicht bestätigt. Puma-defiziente embryonale Fibroblasten aus Mäusen, die stabil shRNA gegen Bim exprimieren wurden mit Retrovirus transduziert, das stabil Bad und Noxa exprimiert (Kim et al., 2006). Die Bedingungen in diesem System schliessen eine Aktivierung von Bid durch Spaltung aus (keine Aktivierung des rezeptorvermittelten Signalweges), sodass man davon ausgehen kann, dass in den Zellen keine Aktivatoren (Bim, tBid, Puma) vorhanden sind. Stimmt das „direct binding“ Modell, dass die Aktivierung von Bax/Bak ausschließlich über die Aktivatoren reguliert ist, so würde man erwarten, dass die alleinige Expression der Sensitizer (Bad, Noxa) keine Apoptose auslöst. Die Daten zeigen aber eine erhöhte Apoptoserate der Zellen nach Transfektion, sodass auch das „direct binding“ Modell nicht die genaue Situation in vivo widerspiegeln kann.

Weitere Versuche sind auf notwendig, um die genauen Reaktionsabläufe der Aktivierung von Bax/Bak verstehen zu können. Und so lässt auch die Lokalisation der BH3-Proteine auf einen weiteren möglichen Regulationsmechanismus schliessen. Die BH3-Proteine Bik, Hrk und Bim verfügen über mögliche Transmembrandomänen und die Überexpression von Bim führte zu seiner Lokalisation an intrazelluläre Membranen (O'Connor et al., 1998). Auch aktiviertes Bid kann in mitochondriale Membranen inserieren (Grinberg et al., 2002) und dort mit Cardiolipin interagieren (Gonzalvez et al., 2005). Die Bindung von tBid-BH3-Peptid an die äußere Mitochondrienmembran kann zudem eine Aktivierung von Bax auslösen (Oh et al., 2006). Häcker und Weber (eingereicht) haben gezeigt, dass Bim in die äußere Mitochondrienmembran inserieren kann, und dass Sequenzanalysen von Puma eine ebenfalls mitochondriale Insertion vermuten lassen. Damit wird von

Häcker und Weber postuliert, dass einige BH3-Proteine über eine mitochondriale Assoziation dazu beitragen, dass Bax in die äußere Mitochondrienmembran inserieren kann und aktiviert wird. Abschließende Untersuchungen zu den vorgestellten Modellen stehen aus.

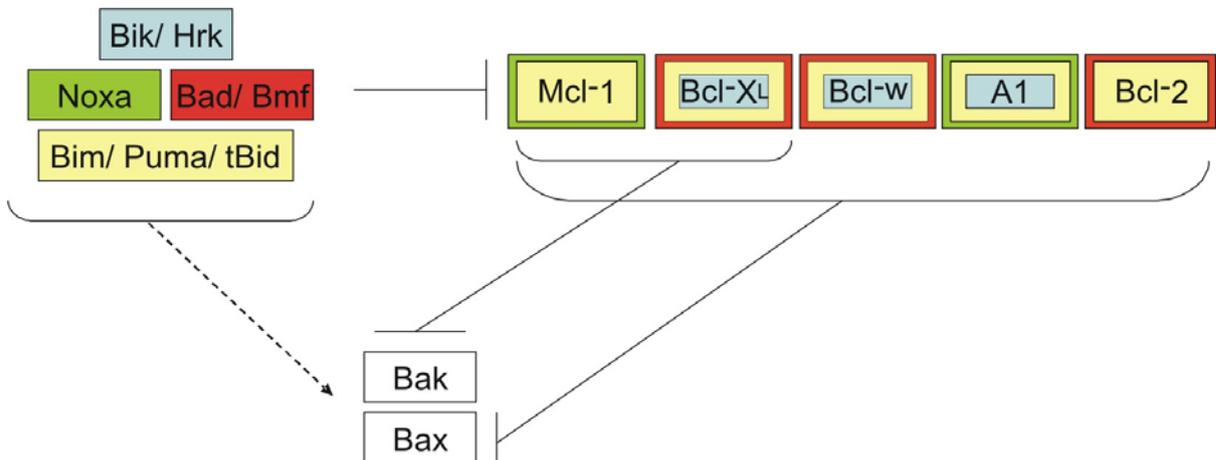


Abb. 3: Verknüpfung der Mitglieder der Bcl-2 Familie untereinander modifiziert nach Adams, 2003; Chen et al., 2005; Willis & Adams, 2005

Die BH3-Proteine antagonisieren die ihrer Farbe entsprechenden Bcl-2-artigen Proteine, was deren Bindungsselektivität widerspiegelt. Diese wiederum können spezifisch die Aktivierung von Bax und/oder Bak blockieren, was einer Inhibition der Apoptose entspricht. Eine direkte Interaktion der BH3-Proteine mit Bax/Bak wird kontrovers diskutiert.

Deletionsmutanten und Überexpressionsmutanten im Tiermodell unterstützen ein Modell der Beteiligung der oben genannten Proteine an der Apoptose. Zellen von Bax/Bak-defizienten Mäusen sind gegen alle untersuchten intrinsischen Apoptoseauslöser geschützt (Cheng et al., 2001; Rathmell et al., 2002; Scorrano et al., 2003; Zong et al., 2001). Deletionsmutanten der antiapoptotischen Bcl-2 Proteine führen zu schwerwiegenden Entwicklungsstörungen und teilweise zur embryonalen Lethalität (Ranger et al., 2003). Deren Überexpression kann zur Tumorbildung (Linette et al., 1995; Zhou et al., 2001), Autoimmunkrankheiten und Resistenz gegenüber cytotoxischer Signale, wie UV-Strahlung, Cytokinentzug und cytotoxischer Medikamente führen (Chao & Korsmeyer, 1998; Cory et al., 1994; Huang, 2000; Strasser et al., 1997).

1.1.3.4 Die Gruppe der BH3-Proteine

Die Aktivierung der Gruppe der BH3-Proteine kann, wie in Abb. 4 gezeigt, durch unterschiedliche Signale ausgelöst werden. Einzelne Apoptoseauslöser können dabei auf mehrere BH3-Proteine gleichzeitig wirken.

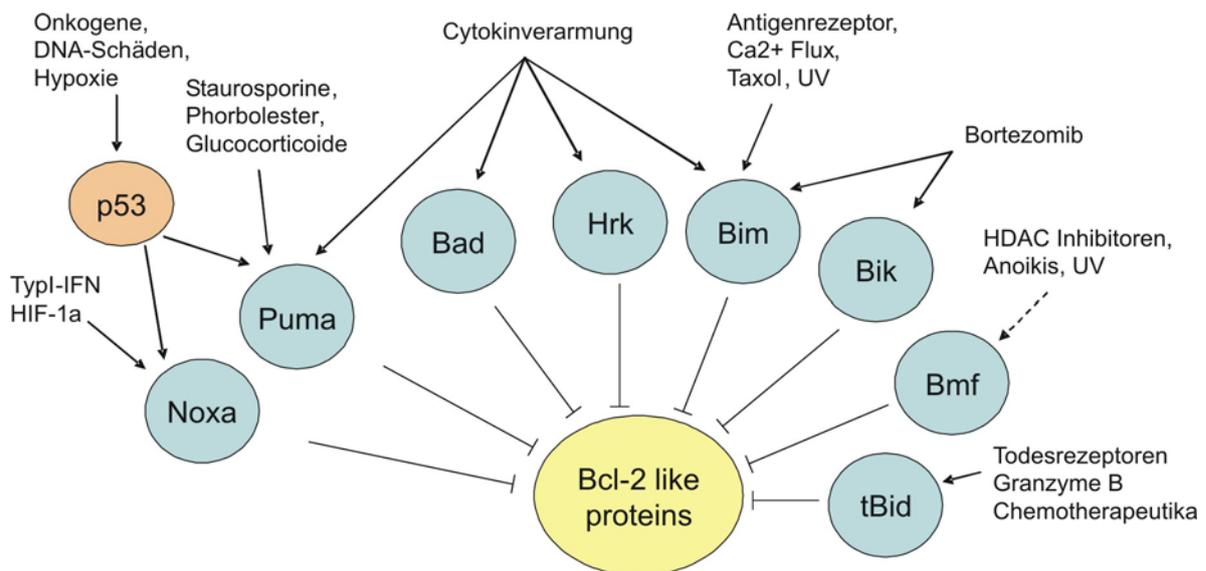


Abb. 4: BH3-Proteine aktiviert durch unterschiedliche Stresssignale modifiziert nach Willis & Adams, 2005

In normal wachsenden Zellen liegen die BH3-Proteine entweder im nichtaktiven Zustand vor, werden nur in sehr niedrigen Dosen exprimiert oder ihre apoptotische Funktion wird zunächst blockiert. Erst apoptoseauslösende Stimuli führen zu deren Aktivierung, verursacht durch posttranslationale Modifikation oder transkriptionelle Induktion, wobei ein Stimulus mehrere BH3-Proteine regulieren kann.

Zu den BH3-Proteinen zählt man acht Mitglieder: Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid, Hrk, Bmf und Bik. Deren einzige Sequenzhomologie von nur 16 Aminosäuren in der BH3-Domäne reicht aus, um an die Mitglieder der Bcl-2 Familie zu binden. Mutationen in der BH3-Domäne können sowohl zum Verlust ihrer Bindungseigenschaften als auch ihrer proapoptotischen Aktivität führen. In gesunden Zellen werden die meisten BH3-Proteine schwach exprimiert oder liegen im inaktiven Zustand vor. Durch transkriptionelle und posttranslationale Regulationen werden sie aktiviert (Abb. 2) (Huang & Strasser, 2000; Puthalakath & Strasser, 2002). Ungleiche Apoptoseeffizienz ist wohl zum Teil durch ihre selektive Bindung an die unterschiedlichen Bcl-2 Proteine bestimmt. Noxa kann beispielsweise nur an Mcl-1 und A1 binden und als deren apoptotischer Gegenspieler fungieren. Puma dagegen

ist Bindungspartner aller Bcl-2 Proteine und wirkt damit allen Bcl-2 Proteinen entgegen. Außerdem scheinen bestimmte BH3-Proteine gewebespezifische Rollen in der Apoptose zu übernehmen (Bouillet et al., 1999), erkennbar an Abnormalitäten bestimmter Organe und Zellen in Deletionsmutanten und deren Apoptoseresistenz gegenüber bestimmter Stimuli nur in bestimmten Zelltypen. Auf einzelne BH3-Proteine soll im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden.

1.1.3.4.1 Bim

Mindestens drei Isoformen von Bim sind bekannt, die durch alternatives Splicen entstehen: Bim_{EL}, Bim_L und Bim_S (O'Connor et al., 1998). In gesunden Zellen sind Bim_{EL} und Bim_L an den Mikrotubuli-assoziierten Dyneinmotorkomplex gebunden, in dem sie mit der leichten Kette 8 von Dynein interagieren und dadurch unfähig sind, Apoptose auszulösen (Puthalakath et al., 1999). Bim_S liegt cytosolisch vor und dies könnte erklären, warum es der potenteste Apoptoseauslöser ist. Es ist unklar, wie Bim nach Apoptoseinduktion vom Mikrotubuli-Cytoskelett dissoziiert, es scheint aber durch seine Bindung an das Cytoskelett dieses zu überwachen und dessen Veränderungen mit dem Prozess der Apoptose zu verbinden. Eine von Zhu et al. veröffentlichte Studie beschreibt in T-Zellen jedoch eine Lokalisation von Bim bereits an der Mitochondrienmembran, an der es unter strenger Kontrolle der antiapoptotischen Bcl-2 Proteine zu stehen scheint (Zhu et al., 2004).

Bim interagiert mit allen Mitgliedern der antiapoptotischen Bcl-2 Familie; der Beweis einer direkten Bindung an Bax/Bak konnte bisher nicht geliefert werden, wird aber vermutet (Bouillet et al., 2002; Letai et al., 2002). In artifiziellen Systemen, in denen Mitochondrien zusammen mit syntetischen Peptiden der BH3-Domäne von Bim inkubiert wurden, konnte eine Freisetzung von Cytochrom c und zudem eine Oligomerisierung sowohl von Bak als auch Bax nachgewiesen werden. Da die Menge an oligomerisiertem Bax größer war als die von Bak, führte dieses Ergebnis zu der Annahme, dass Bim bevorzugt mit Bax interagiert (Letai et al., 2002). Auf transkriptioneller Ebene wird Bim durch den forkhead transcription factor FOXO3A (Dijkers et al., 2000), den c-Jun NH₂ terminalen Signalweg JNK (Putcha et al., 2003; Whitfield et al., 2001), den Erk1/2 Signalweg (Weston et al., 2003), den MAPK Signalweg, die PI3-Kinase (Shinjyo et al., 2001) und vermutlich indirekt durch das Onkogen *myc* (Egle et al., 2004) reguliert. Posttranslationale Phosphorylierung wird

in Abhängigkeit von JNK oder ERK diskutiert (Biswas & Greene, 2002; Luciano et al., 2003; Shinjyo et al., 2001). In der Literatur werden die Folgen der Phosphorylierung von Bim kontrovers diskutiert. Abhängig vom Zelltyp werden sowohl pro- als auch antiapoptotische Wirkungen beschrieben (Biswas & Greene, 2002; Lei & Davis, 2003; Putcha et al., 2003).

Bim wird in vielen hämatopoetischen Zellen (Granulocyten, Makrophagen, reife B- und T-Zellen) wie auch Epithelzellen, neuronalen und Keimzellen exprimiert (O'Connor et al., 1998; O'Reilly et al., 2000). So führt der Entzug von Wachstumsfaktoren zu einer erhöhten Bim-Expression in Neuronen (Putcha et al., 2001), Osteoklasten (Akiyama et al., 2003), Mastzellen (Alfredsson et al., 2005) und Lymphocyten (Bouillet et al., 1999). Lymphocyten von *bim*^{-/-} Mäusen sind gegenüber Cytokinentzug, Behandlung mit Dexamethason, Taxol oder Etoposid und UV-Strahlung im Vergleich zu Wildtyp Mäusen geschützt (Bouillet et al., 1999). Auch Granulocyten von *bim*^{-/-} Mäusen sind gegen Entzug von Wachstumsfaktoren und Behandlung mit Taxol, Etoposide oder Ionomycin resistenter im Überleben (Villunger et al., 2003). Bouillet et al. konnten zeigen, dass Bim an der negativen Selektion von autoreaktiven T-Zellen während ihrer Entwicklung im Thymus beteiligt ist (Bouillet et al., 2002).

Die Deletion von Bim in Mäusen beeinflusst stark das Gleichgewicht von hämatopoetischen Zellen (Bouillet et al., 1999). So ist die Beseitigung unreifer B-Zellen in Bim-defizienten Mäusen gestört (Enders et al., 2003). Bim scheint damit in der Prävention von Autoimmunkrankheiten eine Rolle zu spielen (Bouillet et al., 1999). Die Embryonalentwicklung ist zudem gestört (Bouillet et al., 1999). Die Elimination von antigenaktivierten T-Zellen am Ende einer Immunantwort ist ebenfalls von Bim reguliert (Hildeman et al., 2002; Pellegrini et al., 2003), genauso wie die Phagocytose-induzierte Apoptose in Makrophagen (Kirschnek et al., 2005). Bim wirkt vermutlich ebenfalls im Zusammenspiel mit anderen BH3-Proteinen, da der Schutz vor Apoptose in den deletierten Zellen nicht so ausgeprägt ist wie bei der Überexpression von Bcl-2 oder dem kombinierten Verlust von Bax und Bak (Bouillet et al., 1999; Erlacher et al., 2005; Hutcheson et al., 2005).

1.1.3.4.2 Noxa und Puma

Sowohl Noxa als auch Puma wurden auf der Suche nach transkriptionellen Zielgenen von p53 entdeckt (Nakano & Vousden, 2001; Oda et al., 2000; Yu et al., 2001). Die Transkription von Noxa und Puma wird direkt durch p53 induziert, was für deren Beteiligung an p53 vermittelter Apoptose spricht. Posttranslationale Modifikationen beider Proteine sind soweit nicht bekannt. Es gibt auch p53-unabhängige Regulationsmechanismen: Puma wird durch Cytokinentzug und Dexamethason-Behandlung (Han et al., 2001) induziert während Noxa von HIF-1 α (hypoxia-inducible factor) und Typ-I Interferon direkt beeinflusst wird (Kim et al., 2004; Oda et al., 2000). Außerdem scheint die Puma-vermittelte Apoptose von Thymocyten nach PMA-Behandlung oder Cytokinentzug p52-unabhängig zu sein (Jeffers et al., 2003; Villunger et al., 2003).

Der Verlust von Noxa oder Puma führt zu keinen gravierenden Veränderungen in Mäusen (Villunger et al., 2003). In embryonalen Fibroblasten aus der Maus konnte allerdings gezeigt werden, dass beide Proteine in einer p53-abhängigen Art und Weise eine Rolle in der Apoptose spielen. Puma ist weiterhin wichtig in der Apoptose von Thymocyten (Jeffers et al., 2003; Shibue et al., 2003; Villunger et al., 2003) und in der Suppression Myc-induzierter Lymphomentwicklung (Hemann et al., 2004). Überexpression von Puma führt in Fibroblasten direkt zu Apoptose (Chen et al., 2005). Noxa spielt bei der Apoptose von Epithelzellen nach Bestrahlung eine Rolle (Shibue et al., 2003).

Während Noxa lediglich mit Mcl-1 und A1 interagiert, assoziiert Puma mit allen fünf antiapoptotischen Proteinen (Chen et al., 2005). Diese Befunde sprechen dafür, dass Puma und Noxa auf unterschiedliche Art und Weise gewebespezifisch in der p53-induzierten Apoptose involviert sind. Puma scheint an Situationen beteiligt zu sein, in denen eine absolute Elimination von Zellen notwendig ist, wie es bei der Elimination von ungewollten Thymocyten der Fall ist. Noxa dagegen vereinfacht den Ablauf der UV-induzierten Apoptose, indem es mit Mcl-1 interagiert, oder wie von Willis et al. gezeigt, es die Degradation von Mcl-1 induziert (Willis et al., 2005). Ob dieser Schritt dann zur Apoptose führt, scheint vom Zelltyp und weiteren zellulären Faktoren abhängig zu sein, denn der Verlust der Mcl-1 Expression führt nicht notwendigerweise zur Apoptose (Nijhawan et al., 2003; Opferman et al., 2005; Rinkenberger et al., 2000). Eine Interaktion von Noxa mit Bax/Bak konnte aufgrund fehlender Freisetzung von Cytochrom c nicht gefunden werden (Letai et al., 2002).

Es wurde weiter gezeigt, dass Noxa zusammen mit Bad effektiv Apoptose auslösen kann und sich beide in ihrer Funktion ergänzen (Shibue et al., 2003). Somit sind Puma und Noxa zwei Proteine, die zwar beide durch p53 induziert werden können, sich aber in ihrer Regulation und Funktion stark unterscheiden.

1.2 Das Immunsystem

In Vertebraten hat sich ein effektives Immunabwehrsystem entwickelt, an dem die angeborene und die erworbene Immunität beteiligt sind. Zunächst führt eine Infektion zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Makrophagen, Monocyten, dendritische Zellen, Neutrophile, Mastzellen und natürliche Killerzellen (NK) reagieren auf eine Infektion, indem sie Pathogene entweder phagozytieren, antimikrobielle Peptide, Cytokine und Chemokine sekretieren oder das Komplementsystem aktivieren (Janeway & Medzhitov, 2002). Die Sekretion inflammatorischer Mediatoren lockt dann sowohl weitere Immunzellen des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems an. Die Erkennung der Pathogene im angeborenen Immunsystem erfolgt Pathogen-unspezifisch und ist abhängig von konservierten Strukturmustern ganzer Gruppen von Pathogenen, so genannten PAMPS (Pathogen-assoziierte molekulare Muster). Rezeptoren, die solche Muster erkennen, auch PRRs (pattern-recognition-receptors) genannt, können an der Phagozytose nach Opsonierung von Bakterien und Viren beteiligt sein. Zusätzlich sind sie an der Aktivierung des Lektinsignalweges zur Aktivierung des Komplementsystems, an der Aufnahme von Pathogenen durch Phagozyten und dendritische Zellen beteiligt. Zudem spielen sie bei der transkriptionellen Regulation von Genen eine Rolle, die für die Induktion von antimikrobiellen Peptiden und inflammatorischen Cytokinen verantwortlich sind (Medzhitov & Janeway, 2000). Zu diesen Rezeptoren zählt man unter anderem die Toll-like Rezeptoren (TLRs), deren Liganden ihre Signale über einen MyD88-abhängigen und/oder einen MyD88-unabhängigen Weg weiterleiten können. Die TLRs sind hauptsächlich auf dendritischen Zellen, Phagozyten (Makrophagen und neutrophilen Zellen) und B-Zellen zu finden. Die Aktivierung der TLRs auf der Oberfläche dieser Zellen führt zur Expression kostimulatorischer Moleküle und zur Sekretion von inflammatorischen Cytokinen und Chemokinen (Janeway & Medzhitov, 2002; Takeda et al., 2003). Diese inflammatorischen Mediatoren lösen eine Rekrutierung weiterer neutrophiler

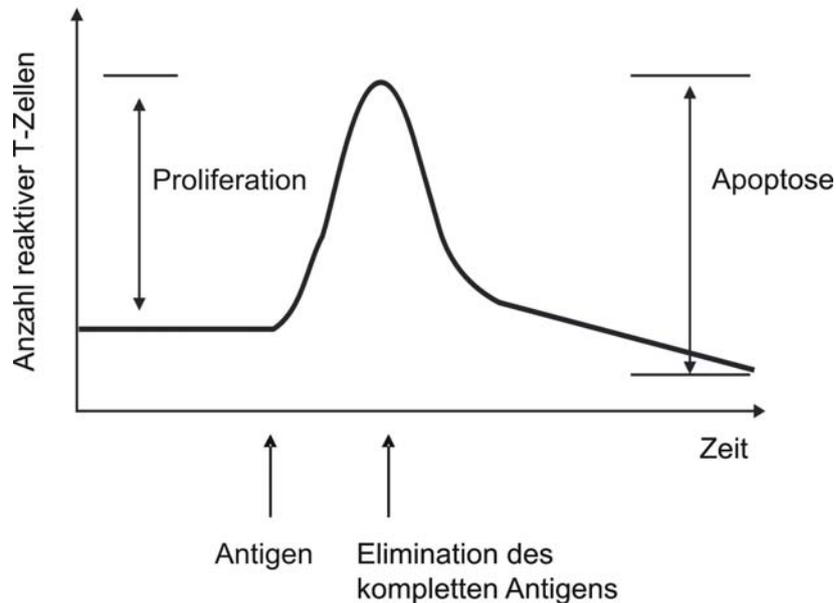
Zellen und Makrophagen aus, die durch Phagozytose zur direkten Tötung der Erreger beitragen (Takeda et al., 2003). Des Weiteren bilden die antigenpräsentierenden Zellen, zu denen Makrophagen, DCs und B-Zellen gezählt werden, die Verbindung zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem. Die erworbene Immunität tritt erst ab dem dritten oder vierten Tag nach der Infektion auf und wird durch B- und T-Lymphocyten getragen.

Nach Erkennung von Antigen durch den B-Zellrezeptor auf B-Zellen wandern diese in sekundäre periphere lymphatische Organe wie die Milz, wo sie in Keimzentren zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen differenzieren. Lösliche Antikörper können spezifisch Antigen binden und sind für die Neutralisierung von bakteriellen Toxinen, für die Opsonierung von Pathogenen und für die Komplementaktivierung notwendig (Janeway et al., 2002).

Die stärksten Aktivatoren naiver T-Zellen sind reife dendritische Zellen (DCs). Im peripheren Gewebe kontrollieren naive DCs ihre Umgebung auf die Präsenz von infektiösen Erregern und deren Antigene. Naive DCs exprimieren nur sehr geringe kostimulatorische Moleküle und MHC-Rezeptoren und sind unfähig, T-Zellen primär zu stimulieren. Erst die Präsenz eines Erregers und dessen PAMPs führen zur Aktivierung von PRRs auf DCs. Schließlich kommt es zur Aufnahme des Erregers durch Makropinocytose oder rezeptorvermittelte Phagozytose, der Hochregulation von mit Pathogen-Peptid-beladenen MHC-Molekülen, der Expression von kostimulatorischen Molekülen und der Cytokin- und Chemokinproduktion. Die aktivierten DCs wandern zum nächstgelegenen Lymphknoten, wo sie nur in Verbindung mit kostimulatorischen Signalen fähig sind, pathogen-spezifische T-Zellen über die TCR/MHC/Peptid Interaktion primär zu stimulieren.

T-Zellen werden in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen unterschieden, und normalerweise ist die Zellzahl der antigen-spezifischen T-Zellen in nur geringer Anzahl vorhanden. Nach Antigenerkennung differenzieren naive $CD8^+$ T-Zellen in cytotoxische T-Zellen und lysieren infizierte Zellen. $CD4^+$ T-Zellen können zu T_H1 - oder T_H2 -Zellen differenzieren, abhängig dann welche Cytokine sezerniert werden, welche Kostimulatoren benutzt werden und wie der Peptid:MHC-Ligand aussieht (Morel & Oriss, 1998; Rogers et al., 1998; Romagnani, 1992). Intrazelluläre Erreger werden durch Aktivierung von Makrophagen mittels T_H1 -Zellen eliminiert. T_H2 -Zellen aktivieren B-Zellen, wonach diese Antikörper sezernieren und extrazelluläre Erreger eliminieren können. Die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen führt zu einer

großen Zellpopulation an reaktiven Effektorzellen. Die Elimination dieser Effektorzellen am Ende der spezifischen Immunantwort ist für die Homeostase der Zellen wichtig (Abb. 5) (Hildeman et al., 2002).



**Abb. 5: Proliferation und Elimination reaktiver T-Zellen im Verlauf einer Immunantwort
modifiziert nach Marsden et al., 2006**

Antigenerkennung in T-Zellen führt zur starken Proliferation antigenspezifischer T-Zellen. Die Elimination des kompletten Antigens führt zur Rückführung der Zellzahl durch Apoptose.

1.2.1 Die Rolle der Apoptose im erworbenen Immunsystem

Apoptose ist ein entscheidender Mechanismus in proliferierenden Geweben, um ein Gleichgewicht zwischen der Anzahl wachsender und sterbender Zellen zu gewährleisten. Wie Abb. 5 zeigt, spielt Apoptose im erworbenen Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Rückführung der Lymphocytenzahl am Ende einer spezifischen Immunantwort (Hildeman et al., 2002; Surh & Sprent, 1994; Villunger et al., 2000). Im Verlauf einer erworbenen Immunantwort werden T-Zellen, die ihr spezifisches Antigen erkennen, aktiviert und fangen an sich zu teilen. Reaktive Klone entstehen. Nach Elimination des Antigens stirbt die überwiegende Zahl dieser Zellen durch Apoptose. Der Prozess dieser Eliminierung der Zellen ist besonders wichtig, um ungewollte Gewebeerstörung und Autoimmunkrankheiten zu vermeiden (Trevani et al., 1996). Das Gleichgewicht der T-Zellen bleibt erhalten und die

metabolische Energie, die zur Aufrechterhaltung der großen Anzahl der Zellen notwendig wäre, wird minimiert.

Wie diese Form der Apoptose auf molekularer Ebene reguliert wird, wurde bisher in zahlreichen Untersuchungen erforscht. Von manchen Autoren wird diese Form der Apoptose als Aktivierungs-induzierter Zelltod (AICD) bezeichnet, in dem zum einen auf der Oberfläche der T-Zellen die Hochregulation des Todesrezeptoren Fas/APO-1/CD95 und zum anderen des Liganden FasL beteiligt sind (Alderson et al., 1995; Brunner et al., 1995; Dhein et al., 1995; Ju et al., 1995; Russell et al., 1993). Mäuse, denen der funktionelle Todesrezeptor Fas oder der Rezeptor-Ligand Fas fehlt (*lpr* und *gld* Mäuse) haben lymphoproliferative Störungen (Takahashi et al., 1994; Watanabe-Fukunaga et al., 1992). Die Anreicherung an Lymphocyten in den lymphoiden Organen wurde auf einen Defekt im Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) zurückgeführt, der durch das Fehlen von Fas oder FasL in Erscheinung tritt. Bisher wurden viele Diskussionen über eine Beteiligung von Fas/FasL am Zelltod aktivierter T-Zellen geführt (Marrack & Kappler, 2004). Obwohl es Hinweise gab, dass diese Form des Zelltods durch Todesrezeptorsignale ausgelöst wird, sprechen die heute verfügbaren Daten nicht mehr dafür.

Während der Lymphoproliferation reichern *lpr* oder *gld* Mäuse allerdings keine CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen an. Es ist auch keine erhöhte Zahl an Gedächtniszellen zu finden, die CD4 oder CD8 exprimieren. Vielmehr sind CD4⁻ CD8⁻ B220⁺ T-Zellen zu finden, deren Zahl zudem in verschiedenen Mausstämmen stark variiert. Während *lpr/gld* Mäuse auf dem MRL Hintergrund viele dieser Zellen akkumulieren (Fisher et al., 1995; Groghan et al., 1989), sind auf dem C57BL/6 Hintergrund weniger zu finden (Kakkanaiah et al., 1990). Es wurde vermutet, dass sich diese Zellen aus autoreaktiven CD4 oder CD8 T-Zellen entwickelt haben, die aufgrund des fehlenden Todesrezeptors nicht eliminiert werden konnten (Sainis & Datta, 1988; Singer & Theofilopoulos, 1990). Diese Schlußfolgerung ist aber nicht gesichert, und die Anreicherung dieser CD4⁻ CD8⁻ B220⁺ T-Zellen kann in Fas-defizienten Mäusen auch andere Hintergründe haben (Giese & Davidson, 1995; Herron et al., 1993; Pestano et al., 1999). Ein anderes Argument gegen eine Beteiligung von Fas ist, dass in Mäusen (dreifach mutante Maus) ohne Todesrezeptoren Fas, TNFR1 und TNFR2 kein Defekt in der Reduktion der Anzahl der T-Zellen am Ende der Immunantwort auf Superantigen gefunden werden konnte (Hildeman et al., 2002). Des Weiteren zeigen Mäuse, bei denen mittels cre-Rekombination spezifisch in den T-Zellen Fas

inaktiviert wurde, keine Lymphoproliferation mehr (Hao et al., 2004), was als Hinweis darauf zählt, dass Lymphoproliferation in *lpr* Mäusen kein T-Zell-autonomer Prozess ist. Zumindest für den Phänotyp der *lpr* Maus sind weitere Zelltypen, vielleicht APCs notwendig.

Das derzeitige Modell der Auslösung der Apoptose am Ende einer Immunantwort wird durch den mitochondrialen Signalweg beschrieben.

Das Vorliegen von antiapoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern ist für das Überleben von T-Zellen notwendig. Die Folgen eines solchen Verlustes kann in T-Zellen von Mäusen beobachtet werden, denen Bcl-2 oder Mcl-1 fehlen (Opferman et al., 2003; Veis et al., 1993). Die Deletion von Mcl-1 führt während der Entwicklung der Lymphocyten zu deren erhöhten Zelltod und der Akkumulation doppelt negativer CD4⁻/CD8⁻ T-Zellen. Die induzierte Deletion von Mcl-1 in peripheren T-Zell-Populationen führte zu einem starken Verlust dieser Zellen. Die Deletion von Bcl-2 zeigte eine erst normale Entwicklung der Lymphocyten in den Mäusen, führte aber dann zu einer starken Rückbildung von Thymus und Milz infolge der Apoptose der Lymphocyten. Die experimentelle Überexpression von Bcl-2 blockiert den Zelltod aktivierter T-Zellen genauso wie der gleichzeitige Verlust von Bak und Bax (Rathmell et al., 2002; Strasser et al., 1991). Und so führte die Tatsache, dass Bcl-2 die apoptotische Wirkung der BH3-Proteine blockieren kann, zu der Annahme, dass der Zelltod der aktivierten T-Zellen durch aktive BH3-Proteine ausgelöst wird.

Das derzeitige Modell des Zelltods von aktivierten T-Zellen sieht eine Beteiligung des BH3-Proteins Bim vor, welches am Ende der Immunantwort aktiviert wird und dann zur Aktivierung von Bax und Bak führt (Zhu et al., 2006). Dieses Modell beruht hauptsächlich auf der Beobachtung, dass der Verlust von Bim den Zelltod von aktivierten T-Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* verzögert (Bouillet et al., 1999; Hildeman et al., 2002), und dass die erhöhte Expression des Gegenspielers von Bim, dem antiapoptotischen Protein Bcl-2, den Tod von aktivierten T-Zellen inhibieren kann (Strasser et al., 1991).

Eine Beobachtung, die bisher in keiner Verbindung mit diesen Reaktionswegen stand, ist der Befund, dass der NF- κ B-Regulator Bcl-3 bei der Inhibition des Zelltods aktivierter T-Zellen eine Rolle spielt. Die Zugabe von Adjuvantien, wie LPS, zusätzlich zum TCR-Stimulus, führt *in vivo* in aktivierten T-Zellen zu einer

Hochregulation der *bcl-3* mRNA und besserem Überleben. Es wurde bereits die Vermutung geäußert, dass der Adjuvanteneffekt nicht direkt auf die T-Zelle wirkt, sondern in Zusammenhang mit einer Aktivierung von DCs steht. Zusätzlich führt aber auch die retrovirale Transduktion mit einem Vektor, der die Produktion von Bcl-3 erhöht, direkt zu einem besseren Überleben der T-Zellen. Eine Präsenz von Adjuvantien war dafür nicht notwendig (Mitchell et al., 2001). Aus diesem Grund scheint auch Bcl-3 auf noch ungeklärte Art und Weise eine inhibierende Rolle bei der Apoptose von aktivierten T-Zellen zu spielen.

1.2.2 Bcl-3 als Mitglied der Familie der I κ B Proteine

Die genaue Funktion von Bcl-3 ist bisher nicht vollständig geklärt worden. Bcl-3 ist ein Mitglied der Familie der I κ B-Proteine, zu denen auch I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ sowie die NF- κ B Vorläufer p105 und p100 gehören. I κ B-Proteine regulieren den Signalweg des Transkriptionsfaktors NF- κ B, indem sie dessen Kernlokalisierungssignal maskieren und es damit im Cytoplasma zurückhalten. Nach Stimulation der Zellen werden die I κ B-Proteine durch den I κ B-Kinase (IKK)-Komplex phosphoryliert, ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut. NF- κ B transloziert in den Kern, wo es die Transkription aktiviert (Baeuerle & Henkel, 1994). Die Zielgene von NF- κ B sind sehr zahlreich und gehören verschiedenen Proteinfamilien an (Pahl, 1999). Es sind Gene dabei, die im Zellwachstum, in der Apoptose, in Entzündungsreaktionen und schließlich auch in angeborenen und erworbenen Immunantworten eine Rolle spielen (Barkett & Gilmore, 1999; Ghosh et al., 1998; Joyce et al., 2001; Silverman & Maniatis, 2001).

Die Transkriptionsfaktorfamilie NF- κ B umfasst fünf Mitglieder, RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50) und NF- κ B2 (p52). Sie alle können untereinander verschiedene Homo- und Heterodimere bilden. Die Untereinheiten NF- κ B1 und NF- κ B2 besitzen im Gegensatz zu p65, RelB und c-Rel, keine eigene Transaktivierungsdomäne. Sie gehen durch Prozessierung aus den entsprechenden Vorläuferproteinen NF- κ B1 (p105) und NF- κ B2 (p100) hervor, die vor Prozessierung auch als I κ B Moleküle fungieren können (Baeuerle & Henkel, 1994).

1.2.2.1 Struktur, Lokalisation und Interaktionspartner von Bcl-3

Bcl-3 nimmt unter den I κ B Proteinen eine Sonderrolle ein, weil es im Gegensatz zu den übrigen I κ B-Proteinen keine azide Domäne nach der sechsten Ankyrin-Wiederholungsdomäne besitzt, sondern stattdessen eine verkürzte siebte Domäne (Michel et al., 2001). Die Flanken der Ankyrinwiederholungsdomäne bestehen aus einer aminoterminalen prolinreichen und einer carboxyterminalen prolin- und serinreichen Region, die dem Protein die Eigenschaft als Transaktivator verleihen (Lenardo & Siebenlist, 1994). Nach Zellstimulierung wird es nicht wie die anderen I κ B-Proteine degradiert (Bours et al., 1993). Die Ankyrinwiederholungsdomäne ermöglicht Interaktionen mit den Dimerisierungsdomänen von NF- κ B1 oder NF- κ B2 Homodimeren (Naumann et al., 1993).

Bcl-3 ist hauptsächlich im Kern lokalisiert (Bours et al., 1993; Wulczyn et al., 1996; Wulczyn et al., 1992) und interagiert bevorzugt mit NF- κ B1 und NF- κ B2 Homodimeren (Fujita et al., 1993). Die Regulation der NF- κ B Aktivität durch Bcl-3 kann zum einen indirekt stattfinden, indem es die inhibitorischen NF- κ B1 und NF- κ B2 Homodimere von der DNA dissoziieren lässt (Franzoso et al., 1992; Pan & McEver, 1995). Zum anderen kann es an diese binden und als transkriptioneller Koaktivator fungieren (Bours et al., 1993; Fujita et al., 1993; Lenardo & Siebenlist, 1994). Lenardo und Siebenlist veröffentlichten ein Modell, in dem Bcl-3 in Bezug auf NF- κ B1-Homodimere als I κ B Molekül wirkt, während es an NF- κ B2-Homodimere gebunden die Koaktivator-Funktion übernimmt (Lenardo & Siebenlist, 1994). Eine vom Bcl-3 Protein konzentrationsabhängige Hemmung der DNA-Bindung und der Transkription von NF- κ B1/p65-Heterodimeren wurde ebenfalls postuliert (Franzoso et al., 1992; Kerr et al., 1992). Dagegen zeigte die Überexpression von Bcl-3 eine Anreicherung und verstärkte DNA-Bindung von NF- κ B1-Homodimeren im Zellkern, was sowohl in stabil-transfizierten pro-B-Zelllinien als auch in Thymuszellen von T-Zell-spezifischen transgenen Mäusen gezeigt werden konnte (Caamano et al., 1996; Watanabe et al., 1997; Zhang et al., 1994). In humanen Hepatocyten führte die Expression von Bcl-3 zum Export von NF- κ B1-Homodimeren aus dem Kern ins Cytoplasma (Brasier et al., 2001). Damit spielt Bcl-3 nicht nur eine Rolle in der unterschiedlichen Regulation der Bindung von NF- κ B-Dimeren an die DNA sondern auch bei der subzellulären Lokalisation von NF- κ B1-Homodimeren.

1.2.2.2 Transkriptionelle und posttranslationale Regulation von Bcl-3

Zusätzlich tragen auch posttranslationale Veränderungen von Bcl-3 zur Regulation bei. Massoumi et al. postulieren, dass Bcl-3 durch Ubiquitinierung besser in den Zellkern transloziert wird, was durch die Deubiquitinase Cyld inhibiert werden kann (Massoumi et al., 2006). *In vivo* ist Bcl-3 konstitutiv phosphoryliert und dies hat vermutlich auch Auswirkungen auf die Aktivität von Bcl-3 (Bundy & McKeithan, 1997; Fujita et al., 1993; Nolan et al., 1993). Die Phosphorylierung von Bcl-3 in seiner Transaktivierungsdomäne durch die Proteinkinase GSK3 und die anschließende Ubiquitinierung wird von Viatour et al. mit einer Aktivierung der Transkription aber auch proteasomalem Abbau von Bcl-3 in Zusammenhang gebracht (Viatour et al., 2004). Weitere Kinasen scheinen an der Phosphorylierung beteiligt zu sein. (Zhao et al., 2005). Der Phosphorylierungsprozess moduliert auch die Interaktion von Bcl-3 mit den Histondeacetylase (HDAC) -1, -3 und -6 (Viatour et al., 2004). Andere Gruppen setzen die Phosphorylierung von Bcl-3 mit einer verminderten Bindung der inhibierend wirkenden NF- κ B1- und NF- κ B2- Homodimere an die κ B-Bindestellen in Verbindung (Franzoso et al., 1993; Nolan et al., 1993; Wulczyn et al., 1992). CD30 Stimulierung in anaplastischen Lymphomen führt zu einer *de novo* Synthese des Vorläufers NF- κ B2/p100, zum anderen zur Prozessierung zu NF- κ B2 und zu einer Zunahme des Komplexes zwischen dem NF- κ B2-Homodimer und phosphoryliertem Bcl-3 (Nishikori et al., 2005).

Die Interaktion sowohl mit Koaktivatoren als auch Repressoren erklärt wohl seine doppelte Funktion als Transkriptionsaktivator und –repressor. Bcl-3 kann mit den Transkriptionsaktivatoren RXR (Na et al., 1998), AP-1 (Na et al., 1999), JAB1, Bard1 und der Histonacetyltransferase Tip60 (Dechend et al., 1999) interagieren. Na et al. postulieren eine Interaktion von Bcl-3 mit den Transkriptionsfaktoren TFIIIB und TFIIA, dem TATA-Bindeprotein TBP und den Transkriptionsinitiatoren SRC-1 und CBP/p300 (Na et al., 1998). Dagegen führte die Bindung von Bcl-3 an den Repressor HDAC-1 zur Inhibition der LPS-induzierten inflammatorischen Antwort in Makrophagen (Wessells et al., 2004). Nach Infektion mit dem RS-Virus führt die verstärkte Expression von Bcl-3 zu seiner verstärkten Bindung an HDAC-1 und Interaktion mit dem NF- κ B- und STAT/IRF-Signalweg, was dann die Promotoraktivität und die virus-induzierte Chemokintranskription inhibiert (Jamaluddin et al., 2005). Im Gegensatz dazu existieren Arbeiten, die zeigen, dass die Bindung von Bcl-3 an

Histondeacetylasen zu deren Freisetzung vom Promotor und zur Transkription führt (Viatour et al., 2004). Eine weitere Studie beschreibt, dass nach Stimulierung mit TNF α das Protein Bcl-3 als sein eigener Koaktivator agieren kann und es dann zur Expression zahlreicher NF- κ B regulierter Gene kommt (Leung et al., 2004). Übereinstimmend mit seiner Rolle in der Proliferation wird Bcl-3 durch viele Interleukine und Wachstumsfaktoren reguliert (Brasier et al., 2001; Brocke-Heidrich et al., 2006; Elliott et al., 2002; Kuwata et al., 2003; Rebollo et al., 2000; Richard et al., 1999; Riemann et al., 2005; Zhang et al., 1998). Eine Beteiligung der Enhancer HS3 und HS4 wurde erst kürzlich beschrieben. Die IL-6-induzierte Bcl-3 Expression wird durch Bindung von Stat3 an den intronischen Enhancer HS4 bewerkstelligt (Brocke-Heidrich et al., 2006). Die Bindung von NF- κ B an den HS3 Enhancer führt nach TCR-Stimulation zur verstärkten Expression von Bcl-3 in T-Lymphocyten (Ge et al., 2003). In humanen Hepatocyten weisen zwei κ B-abhängige Promotoren darauf hin, dass die Expression von Bcl-3 durch NF- κ B selbst reguliert sein kann (Brasier et al., 2001). Das Hepatitis Bx Protein (HBx) kann die Aktivität von Bcl-3 ebenfalls erhöhen, indem es zum einen die Expression erhöht und zum anderen die nukleäre Lokalisation von Bcl-3 erleichtert (Park et al., 2006).

1.2.2.3 Bcl-3 in der Tumorigenese

Ursprünglich wurde Bcl-3 durch Klonierung der Chromosomenbruchstelle einer t(14;19) Translokation identifiziert, die wiederholt bei chronisch lymphatischer B-Zell-Leukämie vorkommt (Ohno et al., 1990). Diese Translokation, die zu einer vermehrten Expression des unveränderten Proteins führt, ist auch in Mammakarzinomen (Cogswell et al., 2000) sowie großzelligen anaplastischen Lymphomen (ALCLs) (Nishikori et al., 2003) nachgewiesen worden. Bisher wurden nur wenige Zielgene von Bcl-3 identifiziert (Elliott et al., 2002; Viatour et al., 2004; Westerheide et al., 2001), von denen die meisten eine Rolle in der Tumorentstehung, Proliferation und Differenzierung spielen (Ohno et al., 1990). Einige davon sind als NF- κ B regulierte Gene bekannt, wie *p-Selektin*, ein Gen das einen Adhäsionsrezeptor auf Endothelzellen kodiert (Pan & McEver, 1995). Erst kürzlich wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* das onkogene Potential von Bcl-3 demonstriert: Bcl-3 exprimierende NIH3T3 Zellen werden transformiert und bilden Tumore, wenn sie in Mäuse injiziert werden (Viatour et al., 2004). Eine mögliche Beteiligung von

Bcl-3 an der Tumorentstehung könnte die starke Induzierbarkeit des CyclinD1-Promotors durch das Zusammenspiel von Bcl-3 und NF- κ B2 sein (Westerheide et al., 2001). Ein anderes Zielgen ist *SLPI*, von dem bekannt ist, dass es das onkogene Potential von Tumorzellen unterstützt (Devoogdt et al., 2003). Außerdem kann die Bcl-3-induzierte Aktivierung von Hdm2 (E3 Ubiquitinligase) die Aktivierung des Tumorsuppressor p53 supprimieren, was ebenfalls für das onkogene Potential von Bcl-3 spricht (Kashatus et al., 2006). Eine Expressionsminderung von Bcl-3 durch den Tumorsuppressor p53 selbst wurde von Rocha et al. postuliert (Rocha et al., 2003). Weiterhin wird Bcl-3 mit der Regulation von Muskelzelldifferenzierung in Zusammenhang gebracht (Shiio et al., 1996).

1.2.2.4 Phänotyp der Bcl-3 transgenen und Bcl-3-defizienten Maus

In Übereinstimmung mit der Beteiligung von Bcl-3 an der Tumorentstehung, Proliferation und Differenzierung führt die B-Zell spezifische Überexpression von Bcl-3 in transgenen Mäusen zu Splenomegalie, Plasmazytose sowie follikulären Hyperplasien in Lymphknoten (Ong et al., 1998). Die Produktion von Immunglobulinen ist erhöht.

Die Deletion von *bcl-3* in Mäusen verdeutlicht dessen Beteiligung bei der Ausbildung einer antigenspezifischen T-Zell- und B-Zell-Antikörperantwort (Franzoso et al., 1997; Schwarz et al., 1997): In Bcl-3-defizienten Mäusen liegen Abnormalitäten in der Milzarchitektur, wie die defekte Ausbildung von Netzwerken aus follikulären dendritischen Zellen (FDCs) oder das Fehlen von Makrophagen in der Marginalzone vor (Franzoso et al., 1997; Schwarz et al., 1997). Die stark verminderte Zahl an Keimzentren in den B-Zell-Follikeln, in denen antigen-spezifische B-Zellen somatischen Hypermutationen, Isotyp-Wechseln und starker Proliferation ausgesetzt sind, steht in Zusammenhang mit der verminderten Antikörperproduktion nach Infektion mit dem Influenzavirus (Franzoso et al., 1997). Die erwähnten Defekte können außerdem zu einer schlechteren antigen-induzierten Interaktion der Zellen miteinander führen, was den fortlaufenden Verlust von B-Zellen in den *bcl-3*^{-/-} Tieren erklären könnte (Franzoso et al., 1997). Zudem zeigen sich die Mäuse sensitiver gegenüber einer Infektion mit dem intrazellulären Protozoon *Toxoplasma gondii* (Franzoso et al., 1997), mit dem Bakterium *Streptococcus pneumoniae* und dem intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* (Riemann et al., 2005; Schwarz et

al., 1997). Die erhöhte Empfindlichkeit der *bcl-3*^{-/-} Mäuse gegenüber *L. monocytogenes* wurde von Riemann et al. mit einer erhöhten Transkription von IL-10 und damit einer geschwächten inflammatorischen Antwort, gemessen an der Produktion von IL-12 und IFN- γ durch Makrophagen, in Zusammenhang gebracht. (Riemann et al., 2005). Ungeklärt bleibt die gegenteilige Beobachtung von Wessells et al., bei der nach LPS-Stimulation eine Reduktion von antiinflammatorisch wirkendem IL-10 in Makrophagen von *bcl-3*^{-/-} Mäusen gemessen werden konnte (Wessells et al., 2004). Corn et al. führen die Sensitivität der Tiere gegen *T. gondii* auf die defekte Milzarchitektur zurück und nicht auf eine defekte T_H1-Entwicklung der CD4-T-Zellen in *bcl-3*^{-/-} Mäusen (Corn et al., 2005). Sie konnten zeigen, dass Bcl-3 zumindest teilweise durch Transaktivierung mit NF- κ B1, die T_H2 Entwicklung der CD4-Zellen beeinflusst, indem es die Expression von GATA-3 reguliert. Weiterhin auffällig in den Tieren war sowohl die reduzierte Anzahl als auch Größe der Peyerschen Plaques (Paxian et al., 2002).

Bezüglich der T-Zell-abhängigen Antikörperantwort, der zellulären Immunität als auch der Milzmikroarchitektur und der Entwicklung der Peyerschen Plaques zeigen *nf- κ B2*^{-/-} Mäuse und *bcl-3*^{-/-} Mäuse ähnliche Defekte (Caamano et al., 2000; Franzoso et al., 1998; Paxian et al., 2002; Poljak et al., 1999). Der überlappende Phänotyp zwischen *nf- κ B2*^{-/-} Mäusen und *bcl-3*^{-/-} Mäusen deutet darauf hin, dass die beiden Proteine einen funktionellen und physiologisch relevanten Transkriptionskomplex bilden und gemeinsam die Expression vieler gemeinsamer Gene regulieren, die an der Organogenese von lymphoiden Organen und der erworbenen Immunantwort beteiligt sind.

Seit der Identifizierung von Bcl-3 (Ohno et al., 1990) wurden viele sowohl transkriptionelle als auch posttranslationale Aktivierungsmechanismen von Bcl-3 beschrieben. Unterschiedliche Gene, die an der Tumorentstehung, Proliferation und Differenzierung beteiligt sind, wurden als Zielgene identifiziert. Eine Beteiligung am Zelltod aktivierter T-Zellen gilt als wahrscheinlich. Bisher ist jedoch kein Zielgen bekannt, das *in vivo* von Bcl-3 reguliert wird und dessen veränderte Expression den beobachteten Phänotyp von *bcl-3*^{-/-} Mäusen erklären kann.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, molekulare Mechanismen des Zelltods aktivierter T-Zellen aufzuklären, beteiligte Proteine zu identifizieren und deren Funktion zu spezifizieren.

Das derzeitige Modell des Zelltods aktivierter T-Zellen wird durch den mitochondrialen Signalweg beschrieben, an dem eine Beteiligung des BH3-Proteins Bim gesichert ist. Dessen Aktivierung am Ende der Immunantwort führt zur Oligomerisierung der Proteine Bax und Bak, zur Freisetzung von Cytochrom c, zur Caspasenaktivierung und schließlich zum Tod der aktivierten T-Zelle. Dieses Modell beruht hauptsächlich auf der Beobachtung, dass der Verlust von Bim den Zelltod von aktivierten T-Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* hemmen kann. Zudem kann die Expression des Gegenspielers von Bim, das antiapoptotische Protein Bcl-2, den Tod von aktivierten T-Zellen inhibieren.

Der NF- κ B-Regulator Bcl-3 scheint ein weiterer Kandidat zu sein, der in den Prozess der Apoptose der aktivierten T-Zellen eingebettet ist. *In vivo* führt die Zugabe von Adjuvantien zusätzlich zum TCR-Stimulus sowohl zu einer Hochregulation der *bcl-3* mRNA als auch einem verbesserten Überleben der aktivierten T-Zellen. Die retrovirale Transduktion mit einem Vektor, der die Produktion von Bcl-3 erhöht, führt außerdem zu einem Überlebensvorteil. Die Präsenz von Adjuvantien ist dafür nicht notwendig. Aus diesem Grund scheint auch Bcl-3 auf noch unbekannte Art und Weise eine inhibierende Rolle bei der Apoptose von aktivierten T-Zellen zu spielen.

Zu Beginn dieser Arbeit schienen damit drei Beteiligte am Zelltod aktivierter T-Zellen identifiziert worden sein: Bim, Bcl-3 und adjuvants-induzierte Faktoren.

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob weitere Proteine am Zelltod der aktivierten T-Zellen beteiligt sind und wie die beiden bekannten Proteine Bim und Bcl-3 den Zelltod auslösen und ob möglicherweise eine Interaktion der beiden Proteine miteinander nachgewiesen werden kann. Zudem sollte untersucht werden, wie die Aktivierung dendritischer Zellen durch Adjuvantsstimulierung zum besseren Überleben der T-Zellen beiträgt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Brutschränke:		
Bakterien	- WB300	Mytron, Heiligenstadt
Zellen	- Hera Cell 240	Heraeus, Hanau
Durchflusscytometriegerät	- FACS Calibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
	- CyAN TM ADP Flow Cytometry Analyzer	Dako, Glostrup, Dänemark
Echtzeit-PCR-Gerät	- ABI PRISM [®] 7700 detection system	PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Entwicklungsmaschine für Western Blots	- Curix 60	Agfa-Gaevert, Köln
FACS Sorter	- MoFlow	Dako, Glostrup, Dänemark
Sterilwerkbank	- HERAsafe HSP 18	Heraeus, Hanau
Western-Blotting:		
Blotkammer	- Mini Trans-Blot Cell	Biorad, Hercules, CA, USA
Elektrophoresekammer	- Mighty Small SE260 Mini-Vertical Unit	Hoefer, San Francisco, CA, USA
Spannungsquelle	- EPS 1001	Amersham Pharmacia, Biotech, Uppsala, Schweden
Zentrifugen		
Tischzentrifugen	- Centrifuge 5415C (RT)	Eppendorf, Hamburg
	- Biofuge 15 R (4°C)	Heraeus, Hanau

Material und Methoden

	- Biofuge fresco (4°C)	Heraeus, Hanau
	- Omnifuge 2.ORS (RT)	Heraeus, Hanau
Großzentrifugen	- Megafuge 1.0 R (4°C)	
	- Sorvall RC 26 Plus (4°C)	Heraeus, Hanau
	Ultrazentrifuge	Du Pont, Newton, CT, USA
Photometer	- 4054 Ultrospec Plus	Amersham Pharmacia, Biotech, Uppsala, Schweden
UV-Transluminator	- Eagle Eye™ II-Still Video System	Statagene, La Jolla, CA, USA
Lichtmikroskop	- ID203, Axiovert 100	Zeiss, Jena
PCR-Gerät	- TRIO-Thermoblock	Biometra
pH-Meter	- MultiCal pH526	WTW, Weilheim

2.1.2 Chemikalien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	Bio-Rad, München
Agarose	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Apyrase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bio Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
CFSE (Carboxy-fluorescein- diacetat, succinimidyl ester)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim
Concanavalin A (ConA)	Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA
Deoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Boehringer/Roche, Mannheim

Material und Methoden

Deoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) für reverse Transkription von mRNA	Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA
Dexamethason	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
DNase I Amplification Grade	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (96 %)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung (1 %)	Roth, Karlsruhe
Ethidiummonoazidbromid (EMA)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Etoposide	Sigma-Aldrich, Steinheim
First Strand Buffer (5x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Formaldehyd (37 %)	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
HEPES	Fluca, Ulm
Interferon- α (murin)	Hycult Biotechnology, Uden, Niederlande
Interleukin 12 (murin)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Interleukine (rekombinante menschliche) IL-6, IL-10, IL-15, IL-1 α , IL-16, IL-7	Peptotech Inc., New Jersey, USA
Ionomycin	Calbiochem/Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Lipopolysaccharid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Fluka, Neu-Ulm
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol (99 %)	Merck, Darmstadt

Material und Methoden

Mineralöl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	F. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Nonidet P-40 (NP-40) (=IGEPAL CA630)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Oligo(dT) ¹²⁻¹⁸ primer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
peqGOLD TriFast™	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PIPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polybrene	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteaseinhibitoren Complete EDTA-frei	Boehringer/Roche, Mannheim
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
Random primer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega, Madison, WI, USA
Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Staphylococcus Enterotoxin B (SEB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Steinheim
SuperScript™II RNase H ⁻	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Sybr®Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Taxol (Paclitaxel)	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
TNFα	R&D Systems, Minneapolis, USA
Triton X-100	Bio-Rad, München
Tween 20 (Polyethylensorbitan Monolaureat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
z-VAD-fmk	Bachem, Bubendorf, Schweiz

2.1.3 Molekulargewichtsmarker

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
a) SDS-PAGE	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Seebblue Pre-Stained Standard	

Anti-Bak	Kaninchen, polyklonales Antiserum	30 kDa	Upstate biotech, NY, USA
Anti-Bcl-X _L	Kaninchen, polyklonales Antiserum	30 kDa	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-Cytochrom c	Maus, monoklonales Antiserum	15 kDa	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Anti-Bcl-2	Hamster, monoklonales Antiserum	26 kDa	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA

2.1.5.2 Fluoreszenzmarkierte Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Klon</i>	<i>Firma</i>
Alexa-Fluor 405 konjugierter Ratte-anti-Maus CD8a	5H10	Caltag Laboratories GmbH, Hamburg, Germany
APC-konjugierter Hamster-anti-Maus CD3 ε	145-2C11	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
APC-konjugierter Ratte-anti-Maus CD4	RM4-5	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Biotin-konjugierter Maus-anti-Maus Vβ8 TCR	F23.1	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
FITC-konjugierter Maus-anti-Maus NK1.1	PK136	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
FITC-konjugierter Ratte-anti-Maus I-A/I-E	2G9	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
FITC-konjugierter Ratte-anti-Maus CD45R/B220	RA3-6B2	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
FITC-konjugierter Maus-anti-Ratte C90 (Thy-1)/ Maus CD90.1 (Thy1.1)	OX-7	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
FITC-konjugierte Maus-anti-Maus Vβ 8 T Zell Rezeptor	F23.1	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
R-PE konjugierte Ratte-anti-Maus CD8a	53-6.7	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
R-PE konjugierter Ratte-anti-Maus CD4	CK1.5	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA

Material und Methoden

Streptavidin-PE-Cy7 Konjugat (SAv-PE-Cy7)	-	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
PE-Cy7 konjugierter Anti-Maus CD62 L	MEL-14	eBioscience, San Diego, CA, USA

2.1.6 Plasmide

<i>Bezeichnung</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Herkunft</i>
Klon IRAKp961H05123Q	PCR von <i>ebf3</i> (Klonierung in Mig)	RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Heidelberg
MiT	Transfektion und retrovirale Infektion	Dr. Philippa Marrack, Denver
MiT-bcl-3	Transfektion und retrovirale Infektion	Dr. Philippa Marrack, Denver
MigRI	Transfektion und retrovirale Infektion	Juli Miller/Pear lab (215-573-6016)
MigRI-EBF3	Transfektion und retrovirale Infektion	eigene Herstellung
pCL-eco	Transfektion und retrovirale Infektion	(Naviaux et al., 1996)

2.1.7 Bakterien und Bakterienmedium

Die Plasmide wurden in den Bakterienstamm DH5 α (hergestellt von Life Technologies) transformiert. Sein Genotyp wird wie folgt beschrieben: *E. coli* F^cO-recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺), Δ (lacZYA-argF) U169F80d lacZDM15 *supE44 thi-1 gyrA96 relA1*.

LB-Medium (Luria-Bertani):

- 1 % (w/v) Bacto-Trypton
- 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
- 1 % (w/v) NaCl
- pH 7,2
- autoklaviert

LB-Platten enthalten zusätzlich 2 % Agar. Nach einer Transformation wurde zur Selektion plasmidtragender *E. coli*-Stämme Ampicillin in der Endkonzentration 100 µg/ml eingesetzt. Die Bakterien wurden bei 37°C entweder als Flüssigkultur unter ständigem Schütteln oder auf Platten kultiviert.

2.1.8 Synthetische Oligonukleotide (Metabion, Martinsried)

Name	Sequenz
EBF3-Sall-sense3' Verwendung:	5'-TAC GCG TCG ACT CTG GGG TAT GGC TGT C-3' Klonierung von <i>ebf3</i> in MigRI
EBF3-EcoRI- antisense5' Verwendung:	5'-CCG GAA TTC TCA GTA CTC GTC CTG GTC-3' Klonierung von <i>ebf3</i> in MigRI
WT <i>bcl-3</i> MRINT3 s Verwendung:	5'-CCA CAG AGC AAC CTG GAA GCA-3' Genotypisierung der <i>bcl-3</i> ^{-/-} , <i>bcl-3</i> ^{+/-} und <i>bcl-3</i> ^{+/+} Mäuse
WT <i>bcl-3</i> EX32 as Verwendung:	5'-GGC TCC CAA GCT TGA AAA GGC-3' Genotypisierung der <i>bcl-3</i> ^{-/-} , <i>bcl-3</i> ^{+/-} und <i>bcl-3</i> ^{+/+} Mäuse
mut <i>bcl-3</i> MRNEO as Verwendung:	5'-GCA TCG CCT TCT ATC GCC TTC-3' Genotypisierung der <i>bcl-3</i> ^{-/-} , <i>bcl-3</i> ^{+/-} und <i>bcl-3</i> ^{+/+} Mäuse
β-actin-sense Verwendung:	5'-ATG GAT GAC GAT ATC GCT-3' Überprüfung der cDNA
β-actin-antisense Verwendung:	5'-ATG AGG TAG TCT GTC AGG T-3' Überprüfung der cDNA
Bcl-3-2F Verwendung:	5'-GGA GCC GCG AAG TAG ACG T-3' Quantifizierung der <i>bcl-3</i> mRNA in einer Echtzeit-PCR
Bcl-3-2R Verwendung:	5'-TGT GGT GAT GAC AGC CAG GT-3' Quantifizierung der <i>bcl-3</i> mRNA in einer Echtzeit-PCR
F-Cyclophilin/m Verwendung:	5'-ATG GTC AAC CCC CAC CGTGT-3' Quantifizierung der mRNA in einer Echtzeit-PCR
R-Cyclophilin/m Verwendung:	5'-TTC TGC TGT CTT TGG AAC TTT GTC-3' Quantifizierung der mRNA in einer Echtzeit-PCR
mNoxa 5'/3' RT-PCR Verwendung:	5'-GCA GAG CTA CCA CCT GAG TTC-3' Quantifizierung der <i>nox</i> a mRNA in einer Echtzeit-PCR
mNoxa 3'/-5' RT-PCR Verwendung:	5'-ATC TGC GCC AGA ACC ACA G-3' Quantifizierung der <i>nox</i> a mRNA in einer Echtzeit-PCR
EBF3-Sall-sense3' Verwendung:	5'-TAC GCG TCG ACT CTG GGG TAT GGC TGT C-3' Klonierung des Plasmids Mig-EBF3
EBF3-EcoRI- antisense5' Verwendung:	5'-CCG GAA TTC TCA GTA CTC GTC CTG GTC-3' Klonierung des Plasmids Mig-EBF3

2.1.9 Säuger-Zelllinien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Bezugsquelle</i>	<i>Kultivierung</i>
Jurkat Eco-Zellen	menschliche periphere T-Zellen, akute lymphoblastische Leukämie, zusätzlicher Rezeptor um mit ecotrophem Retrovirus infiziert zu werden	Nolan Lab	Petrischale
WEHI 231	IL-3 produzierende Lymphomzelllinie aus Balb/c Mäusethymus	ATCC CRL 1702	Petrischale
Phönix	293 T Zelllinie, die zur Produktion von helferfreien ecotropen und amphotropen Retroviren befähigt ist	Nolan Lab	Kulturschale

Die genannten Zelllinien wurden in Brutschränken bei 37°C, 5 % CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. DMEM wurde als Kulturmedium für adhärente Phönix Zellen und die Suspensionszellen WEHI verwendet, RPMI für die Suspensionszellen Jurkat. Bei adhärenen Zellen fand die Zellpassage statt, sobald die Zellschicht annähernd 80 % Konfluenz erreichte. Die Zellen wurden mit Trypsin von der Zellkulturschale gelöst, mit Medium gewaschen und auf neue Zellkulturplatten verteilt. Die Suspensionszellen wurden bei einer Verfärbung des pH-Indikators im Medium nach orange verdünnt.

2.1.10 Zellkulturmedien

DMEM: DMEM-Trockenmedium (Biochrom, Berlin), 1 Beutel auf 10 l
37 g NaHCO₃, pH 7,2
sterilfiltriert
2 mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin)
10 % FCS (Biochrom, Berlin)
100 IU/ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin)

Click-RPMI: Instamed Click-RPMI (Biochrom, Berlin), 1 Beutel auf 10 l
23,83 g HEPES
11,75 g NaHCO₃, pH 7,2

2 mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin)

10 % FCS (Biochrom, Berlin)

100 IU/ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin)

Fetales Kälberserum (FCS) wurde zur Inaktivierung der Komplementfaktoren vor Gebrauch für eine Stunde bei 56°C erhitzt.

2.1.11 Mauszucht

Die Kontrollmäuse C57Bl/6 wurden von Harlan-Winkelmann (Borchen) erhalten. Die Zucht der Mausstämme *vav-bcl-2*, *bcl-3^{-/-}* und *bim^{-/-}* wurde im Mausstall im Institut für Mikrobiologie in München durchgeführt, die für den Mausstamm *puma^{-/-}* im Institut für Pathologie in Innsbruck. Die *vav-bcl-2* und *puma^{-/-}* Mäuse wurden auf einem C57Bl/6 Hintergrund generiert. Die *bcl-3^{-/-}* und die *bim^{-/-}* Mäuse wurden auf einem gemischten C57Bl/6 und 129SV Hintergrund generiert und anschließend 12 (*bcl-3^{-/-}*) oder 14 (*bim^{-/-}*) Mal auf einen C57Bl/6 Hintergrund zurückgekreuzt. Die Haltung der Mäuse erfolgte unter SPF (specific pathogen free) –Bedingungen, und die Genotypisierung erfolgte mittels PCR.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Transformation von kompetenten Bakterien

Der kompetente Bakterienstamm DH5 α wurde auf Eis aufgetaut. Ein 100 μ l Ansatz bestehend aus 1 X KCM Puffer und 1 μ l DNA wurde vorbereitet und ebenfalls auf Eis gehalten. Zu dem Ansatz wurden dann 100 μ l der Bakteriensuspension vorsichtig zugegeben und 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz kurz auf 42°C erwärmt und dann auf Eis abgekühlt. Schließlich wurde 0,5 ml LB-Medium hinzugefügt und die Zell-Puffersuspension bei 37°C im Überkopfschüttler bewegt. Nach 45 min wurden 50 bis 250 μ l der Bakteriensuspension auf vorgewärmte LB-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5 x KCM Puffer: 2 M KCl
 1 M CaCl₂
 1 M MgCl₂

2.2.1.2 Plasmid-Isolierung

Die Plasmidisolierung erfolgte entweder im analytischen Maßstab mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) oder im präparativen Maßstab mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben.

2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse von DNA Proben erfolgte mittels Auftrennung in Agarosegelen. Dazu wurden Gele mit 1 bis 2 % Agarose in 1 x TAE mit 0,8 g/ml Ethidiumbromid vorbereitet, die Proben aufgetragen und bei einer Spannung von 120 V in 1 x TAE entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Als Längenmarker diente GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas).

50 x TAE Puffer: 242 g Tris base
 57,1 ml Essigsäure
 50 mM EDTA
 ad 1 l Aqua dest.

6 x Ladepuffer: 40 % (w/v) Saccharose
 0,25 % (w/v) Bromphenolblau

2.2.1.4 DNA-Elution aus Agarose

Die DNA-Fragmente mit gewünschter Größe wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem QIAEXII Agarose Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden).

2.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäure-Konzentration wurde spektralphotometrisch als Absorption bei 260 nm bestimmt. Die Berechnung erfolgte nach den Formeln in µg/ml:

$$\text{Konzentration RNA} = A_{260 \text{ nm}} \times \text{Faktor 40}$$

$$\text{Konzentration DNA} = A_{260 \text{ nm}} \times \text{Faktor 50}$$

2.2.1.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Um einen neuen Plasmidvektor zu erzeugen oder um dieses bereits in DH5α als amplifiziertes Plasmid-Konstrukt zu verifizieren, wurde die entsprechende DNA in folgendem Ansatz mit Restriktionsendonukleasen geschnitten:

1 µg DNA

1 µl Restriktionsenzym (oder Doppelverdau mit 2 x 1 µl Enzym)

4 µl 10 x Puffer

Der Restriktionsansatz wurde bei 37°C über Nacht inkubiert. Abhängig vom Restriktionsenzym konnte der Ansatz zur Inaktivierung der Enzyme 20 min bei 65°C erhitzt werden.

2.2.1.7 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Die 5'-Enden von linearisierten Plasmiden wurden nach dem Verdau des Plasmids dephosphoryliert. Das verringerte die Religationsrate des restringierten Vektors.

17 µl Vektor-DNA

1 µl alkalische Phosphatase (Boehringer, Roche, Mannheim)

2 µl 10 x Puffer

Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert.

2.2.1.8 Ligation von DNA

Um DNA-Fragmente mit komplementären Überhängen zu ligieren, wurde als erstes 2-3 µl der DNA von Vektor und Insert auf ein Agarosegel aufgetragen, um den DNA-Gehalt abzuschätzen. Anschließend wurde das Verhältnis auf 1:3 eingestellt und die Ligation mit dem DNA Ligation Kit (Takara Bio, Berkeley, CA, USA) durchgeführt. Im Kontrollansatz wurde die Insert-DNA mit Aqua dest. ersetzt. Zu den Proben wurde 5 µl Takara Lösung I gegeben und diese für 30 min bei 16°C inkubiert. Die darauffolgende Transformation in den kompetenten Bakterienstamm DH5α fand mit 5 µl des Ligationsansatzes statt.

2.2.1.9 Herstellung des Plasmids MigRI-EBF3

Zunächst wurde der Klon IRAKp961H05123Q (RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Heidelberg) bestellt, der zur Sequenzierung vom Gen *ebf3* verwendet worden war. Das Gen *ebf3* wurde mittels PCR und den Oligonukleotiden EBF3-Sall-sense3' und EBF3-EcoRI-antisense5' amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über ein 1 % Agarosegel aufgereinigt und isoliert. Nach Schneiden des PCR-Produktes mit *Sal* I und *EcoR* I und des Plasmids MigRI mit *EcoR* I und *Xho* I, Inaktivierung der Restriktionsenzyme, Behandlung des Vektors mit alkalischer Phosphatase und Aufreinigung der geschnittenen Vektor- und Insert-DNA im 2 % Agarosegel, wurde ein Ligationsansatz mit dem DNA Ligation Kit (Takara Bio, Berkeley, CA, USA) angesetzt. Nach Transformation in DH5α wurde ein Testverdau mit *Bgl* II (MBI Fermentas, Wilna, Litauen) durchgeführt. Das neu konstruierte Plasmid MigRI-EBF3 wurde durch Sequenzierung bei der Firma Metabion (Martinsried) überprüft.

2.2.1.10 Isolierung von DNA aus Mäuseschwänzen

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde ein Stück Schwanzspitze entfernt und über Nacht in 500 µl TNE Puffer mit 1 % SDS und 15 mg/ml Proteinase K bei 37°C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000 Upm in der Kühlzentrifuge wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß mit Isopropanol überführt, die ausfallende DNA in 250 µl TE-Puffer aufgenommen und entweder bei 4°C über Nacht, bei 37°C für 1 bis 2 h oder bei 55°C für 5 min gelöst.

TNE-Puffer:	10 mM Tris pH 8,0
	100 mM NaCl
	1 mM EDTA
TE-Puffer:	10 mM Tris pH 8,0
	1 mM EDTA

2.2.1.11 Isolierung von RNA aus Zellen

RNA wurde nach dem Standardprotokoll der Firma Peqlab mittels peqGOLD TriFast™ durchgeführt, eine optimierte Guanidinisocyanat/Phenolmethode für die gleichzeitige Extraktion von RNA, DNA und Proteinen. Je $5-10 \times 10^6$ Zellen wurden in 1 ml peqGOLD TriFast™ resuspendiert. Die Proben wurden anschließend für 5 min bei RT stehen gelassen, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Je eingesetztem ml peqGOLD TriFast™ wurden 0,2 ml Chloroform zugegeben und die Proben für 15 sec kräftig geschüttelt. Danach wurden sie für 10 min bei RT stehen gelassen. Eine anschließende Zentrifugation für 5 min bei 12000 g führte zur Trennung der Probe in drei Phasen: eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischenliegende Interphase. Die RNA ist ausschließlich in der wässrigen Phase angereichert, während sich die DNA und die Proteine in der Interphase und der Phenolphase befinden. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Präzipitation erfolgte mit 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztem ml peqGOLD TriFast™. Die Probe wurde gemischt und für 15 min bei RT gelagert. Im Anschluss wurde die Probe bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Das RNA Präzipitat sollte von galertartiger Konsistenz sein und an der unteren Seite des Röhrchens liegen. Anschließend wurde der Isopropanolüberstand vorsichtig abgezogen und das Pellet zweimal mit 1 ml 75 %igem Ethanol durch Vortexen und anschließender Zentrifugation für 10 min (12000 g, 4°C) gewaschen. Das RNA Pellet wurde kurz an der Luft getrocknet und anschließend in 30 µl DEPC Wasser aufgenommen und zur Verbesserung der Löslichkeit bei 55°C für 5 min erhitzt. Die Menge der isolierten RNA wurde im Photometer bei 260/280 nm gemessen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

2.2.1.12 Reverse Transkription von mRNA

Die reverse Transkription von mRNA erzeugt in der Gegenwart eines poly-dT primers einzelsträngige cDNA, die beginnend an der 3'-poly-dA Sequenz und komplementär zur RNA synthetisiert wird. Um die RNA in cDNA umwandeln zu können, musste als erstes restliche genomische DNA entfernt werden: 2 µg RNA (in 6 µl) wurden mit 2 U DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA) versetzt und 10 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase I wurde der Ansatz dann 10 min bei 75°C erhitzt. Die cDNA Synthese begann mit der Zugabe von 1 µl Oligo dT (0,5 µg/µl) primer und 1 µl random primer (3 µg/µl) sowie der Zugabe von 2 µl dNTP (10 mM). Der Ansatz wurde für 5 min auf 65°C erhitzt, 15 sec auf Eis abgekühlt und dann kurz zentrifugiert, um das Kondenswasser wieder abzusetzen. Nach Zugabe von 4 µl 5 x First Stand Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 0,5 µl RNAsin[®] wurden die Proben für 10 min erst auf 25°C erhitzt und dann für 2 min auf 42°C. Nach der Zugabe von 1 U SuperScript II[™] Enzym wurden die Probe für 50 min auf 42°C und im letzten Schritt auf 70°C für 15 min erwärmt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C. Die anschließende Überprüfung der cDNA erfolgte mittels PCR mit β-Actinprimern wie unter 2.2.2 beschrieben.

2.2.1.13 GeneChip[®] - Technologie

Die GeneChip[®] - Technologie (Affymetrix, Santa Clara, USA) ermöglicht Genexpressionsstudien. Gleichzeitig können mehrere tausend Gene analysiert werden. Dabei macht man sich die komplementäre Basenpaarung von Nukleotidsequenzen zu nutze. Auf der Oberfläche der Affymetrix-Microarrays sind bis zu 300.000 cDNA-Proben aufgebracht. Diese werden mit der zu testenden markierten Nukleinsäure versetzt, inkubiert und gewaschen. mRNA von exprimierten Genen bindet an die komplementäre Sonde. Ein Laser kann die Expression der Gene nachweisen, weil die RNA fluorenzenzmarkiert vorliegt.

Im Versuch wird als erstes die RNA der zu untersuchenden Probe in cDNA mittels reverser Transkription umgeschrieben. Anschließend wird eine Transkription der cDNA in cRNA unter Einbau markierter Nukleotide durchgeführt. Es erfolgt eine Fragmentierung der markierten Probe und diese hybridisiert dann mit der Probe auf dem Microarray. Nach Waschen wird der Microarray gescannt und die Daten liegen

zur weiteren Analyse vor. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software 5.0 (GeneChip Expression Analysis) (Affymetrix, Santa Clara, USA).

Das in diesem Abschnitt beschriebene Experiment wurde in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von R. Lang (TU München) durchgeführt. RNA wurden für die vergleichende Analyse der Proben aus WT und *bcl-3*^{-/-} Mäusen für die weitere Behandlung an die Arbeitsgruppe weitergeleitet. Wie die Proben zuvor behandelt wurden, ist in Abschnitt 2.2.5.7 zu lesen. In der Analyse wurden je 10 µg RNA benötigt.

2.2.2 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Die PCR wurde mit einer *Taq* Polymerase, die aus *E. coli* im Institut für Immunologie, Mikrobiologie und Hygiene (TU München) hergestellt worden ist oder mit *Pwo*-Polymerase (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen) durchgeführt.

typischer PCR-Ansatz: 1-2 µl DNA-Matrize (oder cDNA)
 0,5-1 µl Oligonukleotid, 100 µM (5' nach 3')
 0,5-1 µl Oligonukleotid, 100 µM (3' nach 5')
 10 µl dNTP Mix (je 1 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
 5 µl 10 x PCR-Puffer
 31-33 µl Aqua dest.
 2 Tropfen Mineralöl

20 mM PCR-Puffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8,3
 500 mM KCl
 20 mM MgCl₂
 0,1 % (v/v) BSA

PCR Bedingungen für *Taq* Polymerase (zur Genotypisierung der Mäuse oder Überprüfen der cDNA):

1. Schritt: 94°C 10 min
2. Schritt: 80°C Pause und Zugabe von 1 µl *Taq* Polymerase
3. Denaturierung: 94°C 1 min
4. Anlagerung: 60°C 1 min

- 5. Synthese: 72°C 2 min
- 6. Schritt: 4°C Pause

Die Reaktionsschleife von Schritt 3 bis 5 wurde 30 Mal wiederholt.

PCR Bedingungen für *Pwo* Polymerase(zum Klonieren des Plasmids MigRI-EBF3):

- 1. Schritt: 94°C 4 min
- 2. Schritt: 80°C Pause und Zugabe von 1 µl 0,5µl *Pwo*-Polymerase
- 3. Denaturierung: 94°C 30 sec
- 4. Anlagerung: 55°C 1 min
- 5. Synthese: 72°C 2 min
- 6. Schritt: 4°C Pause

Die Reaktionsschleife von Schritt 3 bis 5 wurde 35 Mal wiederholt.

2.2.3 Quantitative Echtzeit-PCR (RT-PCR) nach TaqMan[®]

Die Echtzeit-PCR bietet die Möglichkeit einer relativen Quantifizierung einer spezifischen mRNA. Dabei wird cDNA mittels eines Echtzeit-PCR-Gerätes amplifiziert, quantitativ detektiert und auf die parallel amplifizierte Menge an Cyclophilin-cDNA abgeglichen. Die Menge des PCR Produktes kann durch Messung der Fluoreszenz bestimmt werden, die zunimmt, wenn der Fluoreszenzfarbstoff Sybr Green (PE Applied Biosystems) mit der ansteigenden Menge der doppelsträngiger DNA interagiert.

Zur genauen Auswertung der Ergebnisse wurden von jedem 25 µl Ansatz zwei Parallelproben von jedem Primerpaar angesetzt. Während die stufenweise reduzierte cDNA Menge (200 ng, 20 ng, 2 ng, 0,2 ng, 0,02 ng) einer Kontrollprobe der Auswertung diente, war der Nullwert mit Wasser die Kontrolle, um Kontaminationen auszuschließen. Vom Untersuchungsmaterial wurde jeweils 100 ng cDNA eingesetzt.

- typischer PCR-Ansatz:
- 8 µl cDNA (für Proben 100 ng)
 - 12,5 µl SybrGreen (PE Applied Biosystems)
 - 1,5 µl primer 1
 - 1,5 µl primer 2
 - 1,5 µl DEPC Wasser

Die Endkonzentration der Cyclophilinprimer betrug 300 nM, die von Bcl-3 und Noxa betrug 0,3 pmol/ μ l.

PCR-Bedingungen:

<i>Cyclen</i>	<i>Bcl-3</i>	<i>Noxa</i>
1. Schritt:	95°C, 10 min	95°C, 15 min
2. Schritt:	95°C, 15 sec	95°C, 15 sec
3. Schritt:	60°C, 1 min	60°C, 30 sec
4. Schritt:	---	72°C, 30 sec
Zykluswiederholung	45	40

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Gesamtzell-Proteinextrakte

Gesamtzell-Proteinextrakte wurden aus T-Zellen oder Einzelzellsuspensionen von Milzzellen erhalten. Dabei wurden 1×10^6 Zellen in 25 μ l Homogenisatpuffer aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach 3 min Zentrifugation bei 4°C und 16060 g in der Kühlzentrifuge wurde das Sediment verworfen, der Proteinextrakt für eine Analyse im Western-Blot vorbereitet.

Homogenatpuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 8,8
 10 mM NaCl
 1 mM EDTA
 0,5 % NP-40
 0,1 % SDS
 Proteaseinhibitor (nach Herstellerangaben)

2.2.4.2 Proteinbestimmung in Extrakten

Der Proteingehalt der Proteingemische wurde nach Bradford (mit BSA als Standard) ermittelt (Bradford, 1976).

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen fand nach der von Laemmli beschriebenen Methode statt (Laemmli, 1970). Denaturierte Proteine werden dabei mit Hilfe der Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die Acrylamidkonzentration richtet sich dabei nach der Größe des gesuchten Proteins. Für das 65 kDa große Protein Bcl-3 wurden zum Nachweis 10 %ige Gele gewählt, während die Detektion der anderen kleineren Proteine alle mit Hilfe von 12,5 %igen Gelen erfolgte. Zur Ermittlung der Molekulargewichte wurde der Proteingrößenstandard Seebblue Pre-Stained Standard von Invitrogen verwendet.

Die Mengenangaben für die Gele beziehen sich auf 5 Minigele.

Stammlösung	Trenngel		Sammelgel
	10 %	12,5 %	
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	9,9 ml	12,6 ml	2,4 ml
LGB	7,5 ml	7,5 ml	----
UGB	----	----	3,75 ml
Aqua dest.	12,6 ml	9,9 ml	13,8 ml
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl
10 % APS	180 µl	180 µl	70 µl

Die Gelelektrophorese wurde mit 130 V und maximal 400 mA durchgeführt.

LGB („lower gel buffer“): 182 g/l Tris/HCl, pH 8,8
4 g/l SDS

UGB („upper gel buffer“): 60 g/l Tris/HCl, pH 6,8
4 g/l SDS

5x Laufpuffer: 30 g/l Tris
144 g/l Glycin
5 g/l SDS

4x Laemmli Puffer: 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8
20 mg/ml SDS
50 % (v/v) Glycerin
2 mM EDTA
1 mg/ml Bromphenolblau

2.2.4.4 Proteintransfer auf Nitrocellulose und Immundetektion

Das Polyacrylamidgel mit den aufgetrennten Proteinen wurde auf eine mit Blotpuffer vorgefeuchtete Nitrocellulosemembran gelegt und zwischen zwei Lagen Filterpapier in die Wetblot-Apparatur (Mini Trans-Blot Cell) gefüllt mit Transferpuffer eingespannt. Im Kühlraum wurde anschließend der irreversible Transfer der Proteine auf die Membran für 90 min bei 100 V und ca. 200 mA durchgeführt. Durch kurzes Schwenken in Ponceau-S konnte der Transfer auf die Membran überprüft werden. Nach zweimaligem Waschen der Membran mit Aqua dest. für 5 min wurde die Immunodetektion durchgeführt: dazu wird die Nitrocellulosemembran für 2 h bei RT mit 5 % MMP in TBS-T blockiert, um unspezifische Wechselwirkungen zwischen Membran und Antikörper zu verhindern. Dann wurde der jeweilige Antikörper nach den oben erwähnten Angaben in 5 % MMP verdünnt und für mindestens 1 h mit der Membran inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für jeweils 10 min wurde der Peroxidase-konjugierte Antikörper in 5 % MMP ebenfalls für mindestens 1 h inkubiert und danach erneut wie oben gewaschen. Nach weitere Inkubation der Membran mit Luminol wurde diese in Klarsichtfolie verpackt in eine Röntgenkassette gelegt, mit einem Röntgenfilm bedeckt und nach der entsprechenden Belichtungszeit in der Entwicklungsmaschine entwickelt.

10 x Tris/Glycin:	250 mM Tris, pH Wert nicht einstellen 1,92 M Glycin
Transferpuffer:	1 x Tris/Glycin 20 % (v/v) MeOH
Ponceau-S:	2 mg/ml Ponceau-S 0,3 % Perchlorsäure 10 % Essigsäure
10 x TBS:	200 mM Tris/HCl, pH 7,6 1,37 M NaCl
1 x TBS-T	20 mM Tris/HCl, pH 7,6 137 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween 20
5 % MMP	5 % (w/v) Magermilchpulver in 1 x TBS-T

2.2.4.5 Entfernen gebundener Antikörper von Nitrocellulosemembranen

Um Membranen nach einmaliger Detektion eines spezifischen Proteins erneut mit einem anderen Antikörper inkubieren zu können, wurden zuvor detektierte Antikörperinteraktionen entfernt. Dazu wurde die Membran erst 5 min in Aqua dest. gewaschen und dann für 20 min in 0,2 M NaOH geschwenkt, gefolgt von einem weiteren Waschschritt mit Aqua dest.. Die Immunodetektion begann wieder mit dem Schritt der Absättigung mit 5 % MMP.

2.2.4.6 Nachweis der Freisetzung von Bim vom Cytoskelett

Der Nachweis der Freisetzung von Bim vom Cytoskelett fand nach der von Kirschnek et al. beschriebenen Methode statt (Kirschnek et al., 2005). Dabei werden die Proben so aufbereitet, dass man mit Hilfe einer Ultrazentrifugation zwischen freiem ungebundenen und am Cytoskelett verankertem Bim-Protein unterscheiden kann.

25×10^6 gereinigte T-Zellen wurden in 1,25 ml Extraktionspuffer aufgenommen und lysiert: 30 min wurden die Zellen auf Eis inkubiert und dann für 10 min bei 2000 g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand, der cytosolische Extrakt wurde behalten, während rohe Zellbestandteile im Sediment übrig blieben. Die Proteinkonzentrationen der cytosolischen Extrakte der zu vergleichenden Proben wurden nach der unter 2.2.4.2 beschriebenen Methode normalisiert. Eine Polymerisierung und damit Stabilisierung des Mikrotubulikomplexes wurde durch Zugabe von Taxol (80 μ M) und Apyrase (10 U/ ml) gewährleistet. Die Proben wurden für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Lysate wurden dann auf ein 10 % Sucrosekissen (10 % Sucrose in Extraktionspuffer ohne Triton X-100) geladen und bei 40 000 rpm in einem SW41TI Rotor in einer Beckman Ultrazentrifuge für 16 h bei 4°C zentrifugiert. Sedimente, welche die Mikrotubulifractionen mit gebundenem Bim-Protein enthielten, wurden in 30 μ l 2 x Laemmli Puffer aufgenommen und 5 min bei 95°C erhitzt. Überstände, die freies Bim-Protein enthielten, wurden einer Acetonfällung unterzogen. Der Überstand wurde in doppeltem Volumen Aceton (vorgekühlt auf -20°C) aufgenommen und bei -20°C für 30 min aufbewahrt. Für 15 min bei 4°C wurde das Gemisch bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Sediment wurde 1 ml 70 %iger Ethanol zugegeben und nach 15 min Zentrifugation bei 4000 rpm und 4°C der Überstand erneut verworfen. Das Pellet wurde bei 37°C getrocknet und anschließend wurden 30 μ l 2 x Laemmli Puffer zugegeben und für 5 min bei

95°C erhitzt. Der Gehalt an freiem ungebundenem Bim-Protein und am Cytoskelett gebundenem Bim-Protein konnte in einer nachfolgenden Western Blot Analyse bestimmt werden.

Extraktionspuffer: 1 % Triton X-100
50 mM PIPES
50 mM HEPES
2 mM MgCl₂
1 mM EDTA
plus: 1 mM DTT
Proteaseinhibitor (nach Herstellerangaben)

2.2.5 Zellbiologische Methoden

2.2.5.1 Kryokonservierung von Zellen

Von den verwendeten Zellen (WEHI, Phönix, Jurkat) wurden Kryokonservierungen angelegt. Hierzu wurden 5×10^6 Zellen nach dem Sedimentieren vorsichtig in 90 % FCS, 10 % DMSO (für Jurkat) oder 40 % FCS, 50 % Medium und 10 % DMSO (für WEHI und Phönix) resuspendiert. Anschließend wurden sie in Einfriergefäße aliquotiert und in einem speziellen mit Isopropanol gefüllten Gefäß erst bei -80°C eingefroren. Die Lagerung erfolgte in Tanks mit flüssigem Stickstoff.

Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Kryokonservierungen kurz auf 37°C erwärmt und dann sofort zu 9 ml Medium gegeben. Die Zellen wurden für 5 min bei 500 g sedimentiert und in 10 ml neuem Medium aufgenommen; die Zellsuspension dann auf Platten verteilt und inkubiert.

2.2.5.2 Generierung von primären dendritischen Zellen

Um primäre dendritische Zellen zu generieren, musste als erstes das Knochenmark aus den jeweiligen Mäusen gewonnen werden. Die weitere Reifung der Zellen dauerte unter Verwendung der Wachstumsfaktors GM-CSF weitere 10 Tage. GM-CSF stammt aus dem Überstand von Ag8653 Myelomzellen, die mit muriner GM-CSF cDNA transfiziert wurden.

Als erstes mussten Femora und Tibiae der Mäuse frei von Haaren, Muskel- und Bindegewebe präpariert werden. Nach kurzem Einlegen der Knochen in 70 %igem Ethanol wurden diese in RPMI Medium überführt. Nach Abschneiden der Röhrenknochen an den Epiphysen konnte das Knochenmark mit einer 10 ml Spritze und einer 27 G Kanüle durch Spülen freigelegt werden. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert und zweimal mit RPMI Medium gewaschen. Anschließend wurden 5×10^6 Zellen/10 ml in eine Kulturschale gegeben und mit GM-CSF (4 ng/ml) versetzt. Am Tag 3 wurde erneut 10 ml RPMI Medium mit 4 ng/ml GM-CSF zugegeben. Am sechsten Tag wurden die Zellen in Kulturschalen umgesetzt: 10 ml wurden zuerst abzentrifugiert, in frisches RPMI Medium mit 4 ng/ml GM-CSF aufgenommen und dann transferiert, die anderen 10 ml wurden direkt von der Kulturschale in die Petrischale transferiert. Am Tag 8 wurden nochmals 10 ml der Zellsuspension abzentrifugiert, und in 10 ml RPMI Medium mit 2 ng/ml GM-CSF aufgenommen und wieder zurückgeführt. Die nichtadhärenten primären dendritischen Zellen konnten am Tag 10 geerntet und ohne weitere GM-CSF Zugabe für Versuche verwendet werden.

2.2.5.3 Stimulierung der primären dendritischen Zellen mit Adjuvantien

Die ausgereiften primären dendritischen Zellen wurden mit 1×10^6 Zellen/ml in Petrischalen überführt und anschließend entweder unbehandelt gelassen oder mit LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) oder CpG1668 (1 μM) stimuliert. Nach Inkubation der Zellen für weitere 2 Tage wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand behalten. Dieser wurde entweder sofort für weitere Versuche eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.2.5.4 Kopplung von Zellkulturplatten mit Antikörpern

Zur Kopplung von Antikörpern auf 6-Wellplatten wurde je Well 1 ml PBS mit der entsprechenden Menge an Antikörper (nur $\alpha\text{-CD3}$: 5 $\mu\text{g/ml}$; beide zusammen: $\alpha\text{-CD3}$: 2 $\mu\text{g/ml}$, $\alpha\text{-CD28}$: 10 $\mu\text{g/ml}$) versetzt und die Platten über Nacht bei 4°C inkubiert. Vor Gebrauch wurden die Platten einmal mit PBS gewaschen.

2.2.5.5 Generierung von Einzelzellsuspensionen aus der Milz

Nach Entnahme der Milz aus den Mäusen wurden diese in 10 ml Clicks Medium überführt. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension konnten sie weiter auf ein Sieb gelegt werden, durch das sie mit Hilfe eines Stempels gedrückt wurden. Nach ausführlichem Spülen der Siebe fand eine Sedimentation der Zellsuspension bei 500 g statt. Die Aufnahme in 2 ml Ammoniumchloridpuffer je Milz diente zur Erythrocytenlyse. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden an den Röhrchenboden 2 ml FCS pipettiert und das Gemisch erneut für 5 min bei 500 g sedimentiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit Medium gewaschen und standen dann zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

Ammoniumchloridpuffer (10 x): 1,5 M NH₄Cl
100 mM NaCO₃
10 mM EDTA
pH 7,4

2.2.5.6 Prinzip der immunmagnetischen Zellseparation

Bei der immunmagnetischen Zellseparation werden bestimmte Zellen aus Zellgemischen mit Hilfe von Magnetpartikeln, die mit spezifischen Antikörpern behaftet sind, separiert und verworfen. Dafür werden Subpopulationen bezüglich eines bestimmten Markers isoliert und immobilisiert. Es werden Antikörper gegen spezifische Epitope von Oberflächenmarkern zugegeben, welche dann direkt an magnetische Kleinstpartikel, auch Microbeads genannt, gebunden werden. Nach Inkubation der Antikörper und Auswaschen der ungebundenen Antikörper aus der Probe trägt man die Zellsuspension auf eine mit Stahlwolle gefüllte Säule auf. Die Magnetisierung der Stahlwolle findet mit Hilfe eines sie umgebenden Dauermagneten statt. Zellen, die mit Microbeads beladen sind, bleiben an der Säule hängen, während unbeladene Zellen aus der Säule durch mehrmaliges Spülen mit Pufferlösung herausgewaschen und aufgefangen werden.

T-Zellen wurden mit Hilfe dieses negativen Auswahlverfahrens über MACS Säulen (Miltenyi Biotec) selektioniert. Diese Methode dient dazu, T-Zellen unmarkiert und damit im nicht aktivierten Zustand aus einer Zellsuspension zu isolieren. Dagegen werden ungewollte Zellen wie NK1.1-, MHCII- oder B220- exprimierende Zellen mit

FITC gekoppelten Antikörpern markiert und über Bindung an MACS beads später auf der Säule zurückgehalten. Das Zellsediment je einer Milz aus einer C57Bl/6 Maus wurde in 1 ml PBS/BSA (0,5 % BSA) gelöst und es wurden je 48 µl anti-B220-FITC, 12 µl anti-NK 1.1-FITC und 24 µl anti I-A/I-E-FITC Antikörper zugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation wurde die Zellen zweimal mit kaltem PBS/BSA (0,5 % BSA) gewaschen und das Sediment anschließend in 250 µl des Puffers aufgenommen. Es folgte die Zugabe von 130 µl MACS-beads die 20 min mit den Zellen inkubierten. Dann wurden die Zellen 7 min bei 1100 rpm abzentrifugiert und in 3 ml PBS/BSA (0,5 % BSA) aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Schließlich wurden die negativ selektionierten T- Zellen in 15 ml Röhrchen aufgefangen und standen nach einmaligem Waschen mit Medium für weitere Versuche zur Verfügung. Bei Verwendung einer Milz von einer *bim*^{-/-} Maus musste die doppelte Menge an Antikörpern, Beads und Säulen verwendet werden.

2.2.5.7 Stimulierung von T-Zellen aus der Milz

Die gereinigten T-Zellen wurden in 6-Wellplatten (1 x 10⁶ Zellen/ml) mit Supplementen inkubiert. In manchen Experimenten wurden sie in Gegenwart von ConA (2 µg/ml) zusätzlich mit Cytokinen (IL-1, 1 ng/ml; IL-6, 10 ng/ml; IL-7, 10 ng/ml; IL-10, 10 ng/ml; IL-12, 20 U/ml; IL-15, 10 ng/ml; IL-16, 10 ng/ml; TNF, 100 µg/ml; β-Interferon, 3.3 U/ml) stimuliert. Oder aber die Cytokine wurden durch die Zugabe von Überständen (50 % v/v) der stimulierten dendritischen Zellen (siehe 2.2.5.3) ersetzt. Die Stimulierung der T-Zellen wurde in manchen Experimenten mit anti-CD3 oder anti-CD3/CD28 gekoppelten Zellkulturplatten durchgeführt (siehe 2.2.5.4).

Die jeweilige Stimulierung der T-Zellen mit ConA in Gegenwart der jeweiligen Cytokine erfolgte für 3 Tage. Ein Teil der Zellen wurde dann am dritten Tag als erstes mit Anti-CD3-APC Antikörper gefärbt (siehe 2.2.5.11.2) und in der Durchflusscytometrie auf ihren Reinheitsgrad analysiert. Der andere Teil wurde mit Medium gewaschen. 3 x 10⁵ T-Zellen wurden in 200 µl Medium in Flachbodenschalen transferiert und für die angegebene Zeit bis zur Färbung mit Anti-CD3-Antikörper und der weiteren Analyse in der Durchflusscytometrie inkubiert. Teilweise wurden am Tag 3 und später Proben für die Western Blot Analyse entnommen.

In anderen Experimenten wurde die vollständige Zellsuspension (2×10^6 Zellen/ml) der Milz in Zellkulturflaschen mit ConA ($2 \mu\text{g/ml}$) oder zusätzlicher Präsenz von LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) stimuliert. Nach 1, 2 oder auch 3 Tagen wurde eine negative Selektion der T-Zellen mit Hilfe der immunomagnetischen Zellseparation durchgeführt, wie es im oberen Absatz beschrieben ist (siehe 2.2.5.6). In einigen Experimenten wurden die Zellen nach Waschen entweder für die Western Blot Analyse vorbereitet oder in 96-Wellflachbodenschalen transferiert und ihr Überleben zu den angegebenen Zeitpunkten getestet. Um die Bim-Aktivierung (siehe 2.2.4.6) zu untersuchen, wurden die T-Zellen nach der Selektion (1×10^6 Zellen/ml) in 6-Wellplatten in Gegenwart von z-VAD-fmk ($25 \mu\text{M}$) für 18 h oder 20 h inkubiert. Die aufgereinigten T-Zellen für den Microarray wurden am Tag 3 aus der ConA-stimulierten Zellsuspension isoliert.

2.2.5.8 Stimulierung von T-Zellen *in vivo* und *ex vivo*

$40 \mu\text{g}$ SEB wurde pro Maus i.p. injiziert. Am nächsten Tag wurde LPS ($50 \mu\text{g}$) oder CpG1668 (10 nMol) als Adjuvans i.p. injiziert.

In manchen *in vivo* Experimenten wurde den Mäusen zu den angegebenen Zeitpunkten Blut aus der Schwanzvene entnommen. Die Erythrocytenlyse wurde wie unter 2.2.5.5 beschrieben mit 10 ml des Ammoniumchloridpuffers durchgeführt. Die Zellen wurden dann zur Analyse in der Durchflusscytometrie mit anti-CD3-APC und Anti-V β 8-FITC Antikörper gefärbt.

In anderen *in vivo* Experimenten wurden die Mäuse zu den angegebenen Zeitpunkten für die Milzentnahme geopfert. Nach der Erythrocytenlyse wurden die Zellen für die Isolierung der TCRv β 8⁺ T-Zellen im High-Speed-Cell-Sorter MoFlow[®] vorbereitet (siehe 2.2.5.12): die Milzzellsuspension wurde in PBS/BSA (0,5 % BSA) aufgenommen und mit Anti-CD3-Cy5 Antikörper und Anti-FITC-V β 8 Antikörper gefärbt. Nach zweimaligem Waschen wurden 1×10^8 Zellen/ml in PBS/BSA (0,5 % BSA) aufgenommen und die TCRv β 8⁺ T-Zellen im High-Speed-Cell-Sorter MoFlow[®] isoliert. Diese wurden dann für die Echtzeit-PCR (siehe 2.2.3) aufbereitet.

In den *ex vivo* Experimenten wurden die Mäuse am Tag 2 nach der ersten Injektion geopfert, um die Milz zu entfernen. Nach der Erythrocytenlyse wurde ein Teil der Zellen mit Anti-CD3-APC Antikörper, Anti-V β 8-FITC Antikörper und Anti-CD4-PE oder Anti-CD8-PE Antikörper gefärbt (siehe 2.2.5.11) und in der Durchflusscytometrie analysiert. Der andere Teil wurde mit 3×10^5 Zellen/200 μl in 96-

Wellflachbodenschalen gegeben und bis zur Färbung mit den oben genannten Antikörpern für 20 h inkubiert.

2.2.5.9 Überleben ruhender T-Zellen

Es erfolgte eine Milzentnahme aus unbehandelten WT und Bcl-3-defiziente Mäusen. Die anschließende Isolation der T-Zellen erfolgte wie in Abschnitt 2.2.5.6 beschrieben. Die weitere Inkubation der nichtaktivierten T-Zellen fand für 24 oder 72 h statt, bevor das Überleben der Anti-CD3-APC gefärbten Zellen in der FACS-Analyse gemessen wurde.

2.2.5.10 Analyse der CFSE-gefärbten T-Zellen nach Stimulierung

Wie bereits unter 2.2.5.6 beschrieben, wurden T-Zellen aus der Milz von drei WT Mäusen und einer *bim*^{-/-} Maus isoliert. Die anschließende Färbung der Zellen ist unter 2.2.5.11.3 erläutert. Dann wurden 8×10^6 gefärbte T-Zellen (entweder *bim*^{-/-} oder WT) in die Schwanzvenen der Mäuse injiziert. Während jeweils eine Maus keine weitere Behandlung erhielt, wurde jeweils einer Maus SEB (d1, 50 µg, i.p.) und einer weiteren SEB und LPS (d2, 40 µg, i.p.) injiziert. Am fünften Tag erfolgte dann die Analyse und Detektion der CFSE-gefärbten T-Zellen in der Maus. Dafür wurde eine Einzelzellsuspension aus der Milz hergestellt, und 2×10^7 T-Zellen in 96-Wellspitzbodenplatten zum Färben überführt. Wie unter 2.2.5.11.1 beschrieben wurden die Zellen als erstes mit EMA gefärbt. Nach zweimaligem Waschen erfolgte die Färbung der Proben mit Anti-CD8-Alexa405, Anti-CD8-APC und Anti-Vβ8 TCR-biotinylierter Antikörpern. Als Kontrolle wurde zusätzlich der Antikörper Anti-CD62L-PeCy7 verwendet. Nach 20 min Inkubation bei 4°C wurden die Zellen mit PBS/BSA (0,5 % BSA) gewaschen und dann der Sekundärantikörper Anti-Streptavidin-PeCy7 zugegeben. Nach 20 min erfolgte nach zweimaligem Waschen der Zellen die Fixierung in 4 % Paraformaldehyd. Dieses wurde sofort durch erneutes zweimaliges Waschen mit PBS/BSA (0,5 % BSA) entfernt. Anschließend wurden die Zellen im CyAN TM ADP Flow Cytometry Analyzer analysiert.

2.2.5.11 Vorbereitung der Zellen für die Durchflusszytometrie

2.2.5.11.1 Färben der Zellen mit EMA (Ethidiummonoazidbromid)

EMA ist ein fluoreszierender Farbstoff, der die Eigenschaft besitzt tote Zellen selektiv zu detektieren. Er bindet kovalent an die DNA toter Zellen, während er undurchlässig für die Zellwand lebender Zellen ist. Die EMA Färbung wird vor der mAb Färbung durchgeführt: hierbei werden die 3×10^5 Zellen/200 μ l in 96-Wellplatten mit 2 μ g/ml EMA in PBS für 20 min auf Eis unter Lichtexposition (40 W Lampe, ca. 15 cm Abstand) inkubiert. Ungebundener Farbstoff wurde anschließend durch zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS/BSA (0,5 % BSA) entfernt, und die Zellen konnten mit fluoreszierenden Antikörpern angefärbt werden.

2.2.5.11.2 Färben der Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern

Die Färbung der Zellen fand in 96-Wellplatten mit 3×10^5 Zellen je Well statt. Die Zellen wurden mit den jeweiligen fluoreszierenden Antikörpern in PBS/BSA (0,5 % BSA) für 20 min bei 4°C inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden dann durch zweimaliges Waschen mit PBS/BSA (0,5 % BSA) entfernt. Darauf folgte entweder die direkte Analyse in der Durchflusszytometrie oder aber die Aufnahme in 4 % Paraformaldehyd zur Fixierung des Farbstoffes auf den Zellen. Die Fixierlösung blieb 20 min (im Dunkeln und bei RT) im Ansatz und wurde dann zur Lagerung der Zellen durch PBS/BSA (0,5 % BSA) ersetzt.

2.2.5.11.3 Färben der Zellen mit CFSE

Der Fluoreszenzfarbstoff CFSE besteht aus Fluorescein, das als funktionelle Gruppe einen Succimidyl-Ester und zwei Acetatgruppen trägt. Der Farbstoff dringt in Zellen ein, wird dort durch intrazelluläre Esterasen gespalten und reagiert mit freien Aminogruppen von Proteinen. Die Zellen entwickeln eine intensive gelbliche Färbung. Bei Zellteilung wird das CFSE zu gleichem Anteil in die Tochterzellen übertragen was zu einem reduzierten CFSE Signal führt. Die Verminderung des Signals findet mit jeder Teilung statt. Vor Zugabe des Farbstoffes CFSE wurden die Zellen zweimal mit PBS bei RT gewaschen. Dann erfolgte die Färbung von höchstens 5×10^7 Zellen/1000 μ l mit 7 μ M CFSE Lösung in PBS. Die Zellen wurden

dannfür 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Medium (Clicks) und der Inkubation für 5 min auf Eis gestoppt. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS bei RT gewaschen. Die weitere Verwendung der Zellen ist unter 2.2.5.10 beschrieben.

2.2.5.12 Durchflusscytometrie

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Die Methode basiert auf der Erkennung von Antigenen mittels Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern. In dieser Arbeit wurden die Zellen entweder im FACSCalibur (Becton Dickinson) oder im CyAN™ ADP Flow Cytometry Analyzer (DakoCytomation) charakterisiert. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydronamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Die Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl führen diese auf ein höheres Energieniveau. Verlassen die Elektronen dieses Energieniveau nach dem Laserpuls und gehen auf ihr Ursprungsniveau zurück, wird Energie in Form von Photonen freigesetzt. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern je Zelle. Die Lichtbeugung und -streuung lässt Rückschlüsse auf die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Cytoplasmas, Größe des Zellkerns) zu.

Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, die unterschiedliche Oberflächenantigene der Zelle markieren ist möglich. Die Wellenlänge mit der die eingesetzten Farbstoffe angeregt werden ist gleich, sie verfügen aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren. Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzen gelingt nicht vollständig, da sich die Emissionsspektren teilweise überlappen können. Diese Überschneidung muss durch so genannte Kompensation korrigiert werden. Aufgrund der Fluoreszenzanregung des Farbstoffes emittiert jede Zelle ein Lichtsignal proportional zur stöchiometrisch gebundenen Fluorchrommenge. Dieses kann in einem Lichtdetektor verstärkt werden und in ein elektrisches Signal umgewandelt werden. In Histogrammen und Zweiparameterdarstellungen können die gewonnenen

Daten visualisiert werden. Die weitere Auswertung der Daten erfolgte mit dem Softwareprogramm Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

Eine andere Anwendung der Durchflusscytometrie ist die Separation von Zellen mit gewünschten Kriterien, die mit dem High-Speed-Cell-Sorter MoFlow[®] (Modular FlowCytometer) durchgeführt werden kann. Nach der hydronamischen Fokussierung wird jede Zelle mit Licht angeregt. Die Granularität und die Größe der Zelle werden mit weiteren gewünschten Kriterien verglichen. Wenn die Zelle diesen entspricht, wird der Flüssigkeitsstrom beim Verlassen der Kanüle elektrostatisch aufgeladen. Der Tropfen, der die gewünschte Zelle enthält, trennt sich vom Flüssigkeitsstrom. Die Tropfen passieren dann ein starkes elektrostatisches Feld und werden aufgrund ihrer Ladung nach links oder nach rechts abgelenkt. Sie werden dann in das Auffangröhrchen für die entsprechende Fraktion befördert. Mit dieser Methode können simultan distinkte Subfraktionen sortiert werden. Die Bedienung des Sortgerätes erfolgte durch M. Schiemann (TU München).

2.2.5.13 Produktion von Retroviren

Für die Generierung von Retroviren wurde die Zelllinie Phönix, die zur Verpackung von Retroviren befähigt ist, transfiziert. Diese helferfreie Produktionszelllinie kann alle für die Verpackung, Prozessierung, reverse Transkription und Integration notwendigen Proteine (gag, pol und env) produzieren. Das hier verwendete ecotrophe Verpackungssystem ist nur darauf spezialisiert, teilende Zellen von der Maus oder der Ratte zu infizieren.

Als erstes wurde der Reaktionsansatz in 15 ml Spitzbodenröhrchen vorbereitet:

Reaktionsansatz: 15 µg Plasmid
10 µg pCL-eco
106,3 µl CaCl₂
ad. 850 µl Aqua dest.

Nach 15 minütiger Inkubation des Ansatzes bei RT wurde 850 µl 2 x HBS-Puffer langsam und unter ständigem Schütteln zugegeben. Die Zellen in den Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser sollten zu einer Konfluenz von etwa 80 % angewachsen sein. Auf diese wurde das Plasmid-Puffer-Gemisch gleichmäßig

verteilt und die Zellen für 8 h inkubiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde dieser durch 6 ml Medium ersetzt. Nach weiteren 16 h Inkubation erfolgte die Abnahme des Überstandes und dessen Filtrierung durch 0,45 µm große Poren. Nach erneuter Mediumzugabe zu den Zellen wurde der Überstand nach 24 h behalten. Die Überstände konnten bis zur Verwendung eine Woche bei 4°C gelagert werden.

2 x HBS Puffer: 280 mM NaCl
 1,5 M Na₂HPO₄ x 7 H₂O
 50 mM HEPES

2.2.5.14 Retrovirale Infektion von T-Zellen

Ecotrophe Viren können lediglich sich teilende Zellen infizieren. Um diese zu erhalten, wurden nach der Generierung von Einzelzellsuspensionen aus der Milz (8×10^6 Zellen/ml) die Zellen in 50 ml Kulturflaschen für 2 Tage mit ConA (2 µg/ml) stimuliert. 1×10^6 Zellen/ml konnten dann in Virusüberstand mit Polybrene (4 µg/ml) in 6-Wellplatten für 90 min bei 32°C und 1200 g zentrifugiert werden, gefolgt von einer Inkubation bis zum nächsten Tag. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und in 96-Wellflachbodenschalen transferiert (3×10^5 Zellen/200 µl), in denen sie bis zur Färbung und Analysierung in der Durchflusscytometrie inkubierten. Die Zelllinie WEHI, die sich sehr gut retroviral infizieren lässt, wurde unter den gleichen Bedingungen als Kontrolle mitgeführt. In anderen Versuchen wurden unter gleichen Bedingungen Jurkat E (ecotroph) Zellen mit Retroviren infiziert.

3 Ergebnisse

Ein Standardmodell für die Untersuchung der Apoptose aktivierter T-Zellen ist die Injektion von Superantigenen in Mäuse. Im Gegensatz zu anderen Proteinantigenen werden Superantigene, wie das Staphylokokken Enterotoxin B (SEB), von T-Zellen direkt erkannt und müssen nicht als Peptide präsentiert werden. Ihre biologische Aktivität beruht darauf, dass sie an MHCII-Moleküle und an T-Zell-Rezeptoren binden. An den T-Zell-Rezeptor binden sie weit entfernt von komplementaritätsbestimmenden Regionen an die V β -Domäne. Die Anlagerung an das MHCII-Molekül erfolgt weit entfernt von der peptidbindenden Furche an dessen Außenseite. Jedes Superantigen ist spezifisch für eines oder einige wenige der verschiedenen Produkte des V β -Gensegmentes. *In vivo* ist diese Aktivierung als klonale Expansion der T-Zellen erkennbar, die nach Eliminierung des Superantigens die Eliminierung der T-Zellen zur Folge hat (White et al., 1989). Die T-Zell-Population wird auf den Ausgangswert zurückgeführt. Trotzdem scheint dieses Modell einer T-Zellinduzierten Immunantwort nur ein unvollständiges Bild von den tatsächlichen Vorgängen einer Infektion im Organismus wiederzuspiegeln: Während einer Infektion spielen auch noch von aktivierten DCs bereitgestellte sowohl lösliche (z.B. Cytokine) als auch membrangebundene Oberflächenmoleküle (z.B. Glycoproteine B7.1/CD80 und B7.2/CD86) eine Rolle. Diese können nach Zugabe von Adjuvantien wie LPS oder CpG-DNA über Bindung an TLR hochreguliert werden.

3.1 Adjuvans-induziertes Überleben aktivierter T-Zellen

3.1.1 Überleben durch einen löslichen, DC-generierten Faktor

Ein Modell, das einer Infektion näher kommt, ist die gleichzeitige Injektion von SEB und einem Adjuvans wie LPS oder CpG-DNA, das DCs stimuliert. Sowohl Vella et al. als auch Mitchell et al. konnten bereits zeigen, dass die Injektion von LPS das Leben der SEB-stimulierten T-Zellen *in vivo* verlängert (Mitchell et al., 2001; Vella et al., 1995). Sowohl *in vivo* Versuche (Abb. 6) als auch *ex vivo* (Abb. 7) und *in vitro* (Abb. 7) Versuche konnten diesen Überlebenseffekt in der Gegenwart von Adjuvans bestätigen (Bauer et al., 2006). In den *in vivo* Experimenten wurden die Mäuse mit SEB oder SEB in der Gegenwart von LPS stimuliert und nach 6 Tagen die Anzahl

der TCR $\nu\beta 8^+$ Zellen in der Milz mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Für *ex vivo* Experimente wurde den SEB/LPS behandelten Mäuse die Milz nach 2 Tagen entnommen, dessen Einzelzellsuspension für 20 h in Kultur gesetzt, und dann wurde das Überleben der TCR $\nu\beta 8^+$ Zellen in der Durchflusszytometrie bestimmt. *In vitro* wurden Zellsuspensionen der Milz für drei Tage mit dem Mitogen ConA oder ConA und LPS stimuliert. Während SEB spezifisch TCR $\nu\beta 8^+$ Zellen stimuliert, bietet ConA *in vitro* die Möglichkeit unspezifisch alle T-Zellen zu stimulieren. Am dritten Tag wurden diese ConA/LPS-stimulierten T-Zellen aufgereinigt, gewaschen und nach 20 h auf Überleben getestet. Das Waschen der Zellen dient dem Entzug von Wachstumsfaktoren nach Stimulierung. Direkt nach dem Waschen war in allen Versuchen das Überleben der T-Zellen gleich hoch. Das Überleben wurde auch in den weiteren Versuchen mit Hilfe der Scatter Kriterien (Granularität und Größe) oder der Färbung mit dem Farbstoff EMA bestimmt.

Die gleichzeitige Präsenz von LPS zusätzlich zu SEB in den ersten drei Tagen führte in der Milz zu einer erhöhten Anzahl lebendiger T-Zellen am Tag 6 nach Erstinjektion (Abb. 6). *In vivo* führt neben LPS auch die Präsenz von CpG1668 zu verbessertem Überleben. Der Effekt ist aber im Vergleich zu LPS geringer.

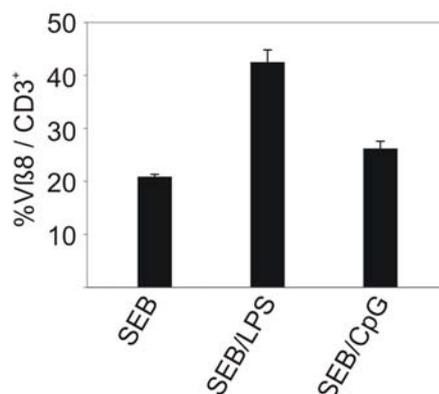


Abb. 6: *In vivo*: Überleben SEB-aktivierter TCR $\nu\beta 8^+$ Zellen nach Adjuvansgabe

C57BL/6 Mäuse wurden entweder mit SEB allein oder mit SEB und Adjuvans (LPS oder CpG-DNA: 24 h später) injiziert. 6 Tage nach der Injektion von SEB wurde die relative Anzahl der TCR $\nu\beta 8^+$ T-Zellen in der Milz bestimmt. Dafür wurden die Zellen mit FITC-konjugiertem TCR $\nu\beta 8^+$ und APC-konjugiertem CD3 Antikörper gefärbt und in der Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung von zwei Mäusen aus einem Experiment. Der Überlebenseffekt wurde in 2 weiteren Experimenten gemessen.

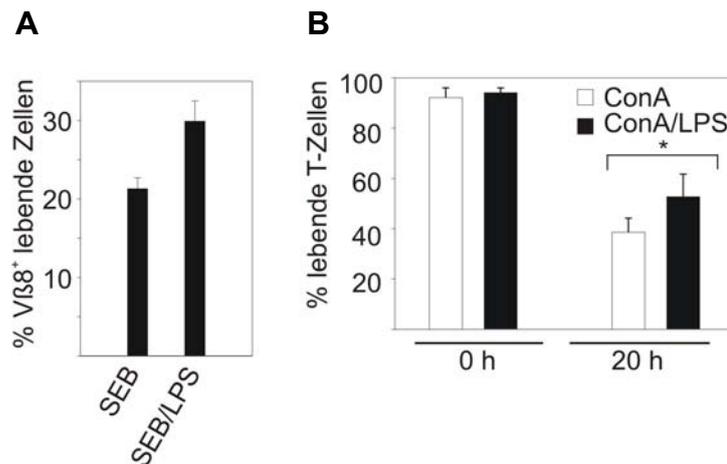


Abb. 7: Ex vivo/in vitro: Überleben aktivierter T-Zellen in Gegenwart von LPS

A: *ex vivo*: Am Tag 2 nach Injektion von SEB oder SEB und LPS wurde den Mäusen die Milz entnommen, und deren Zellsuspensionen wurden für 20 h in 96-Wellflachbodenplatten inkubiert ($3 \times 10^5/200 \mu\text{l}$). Die Zellen wurden dann mit Antikörpern gegen CD3 und TCRvβ8 gefärbt, und ihre relative Anzahl wurde in der Durchflusszytometrie bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung von vier Mäusen in zwei unabhängigen Experimenten. Ähnliche Ergebnisse konnten mit insgesamt acht Mäusen für jede Bedingung erzielt werden.

B: *in vitro*: Milzzellen wurden für 3 Tage mit ConA allein oder in der Gegenwart von LPS stimuliert. Am dritten Tag wurden die T-Zellen erst aufgereinigt, dann gewaschen und schließlich in Medium ohne Wachstumsfaktoren aufgenommen und in 96-Wellflachbodenplatten transferiert. Die Zellen wurden mit APC-markiertem CD3 Antikörper gefärbt und ihr Überleben in der Durchflusszytometrie gemessen. Die Werte repräsentieren Mittelwert und Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten (*, $p < 0,001$).

Zusätzlich konnte der Überlebenseffekt durch Aktivierung von gereinigten T-Zellen mit CD3 Antikörpern oder CD3 plus CD28 Antikörper nachgeahmt werden (Abb. 8) (Bauer et al., 2006). Anti-CD3-Antikörper erkennen die CD3ε-Kette des CD3-TCR-Komplexes als Antigen und erreichen durch Quervernetzung eine mitogen-ähnliche Proliferation. Die gleichzeitige Präsenz des CD28 Antikörpers entspricht einer Costimulation, die normalerweise durch Bindung der DC-präsentierenden Glycoproteine B7.1/CD80 und B7.2/CD86 an den CD28-Corezeptor erreicht wird. Aus diesem Grund führt die gleichzeitige Präsenz von CD3- und CD28-Antikörpern zu besserem Überleben. Außerdem konnte ein zusätzlicher Überlebenseffekt durch die gleichzeitige Gabe von Überstand LPS-aktivierter BMDDCs erzielt werden. Die Präsenz dieser aus DCs gereiften Faktoren führte auch in zuvor aufgereinigten ConA stimulierten Zellen zu besserem Überleben (Abb. 9) (Bauer et al., 2006). Dabei zeigte sich, dass die Gabe von LPS einen deutlicheren Effekt auslöst als die Gabe von CpG1668. Da die Präsenz dieser aus DCs gereiften Faktoren den direkten Zellkontakt zwischen aktivierter DC und aktivierter T-Zelle nicht benötigt, um zu

einem Überlebens-effekt zu führen, kann man zumindest *in vitro* von einem Zellkontakt-unabhängigen Effekt sprechen. LPS alleine hat keinen Effekt auf die gereinigten aktivierten T-Zellen (Abb. 9).

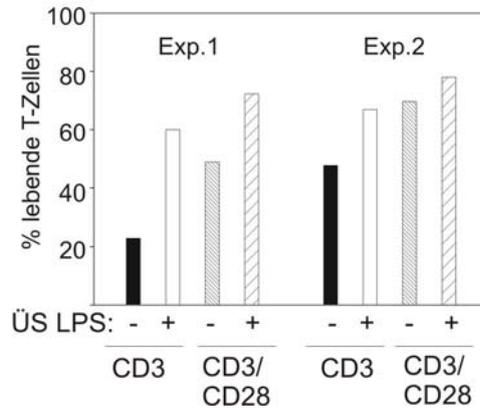


Abb. 8: Überleben CD3/CD28 aktivierter T-Zellen

An den Boden der 12-Wellplatten wurden CD3 Antikörper alleine oder zusammen mit CD28 Antikörpern gebunden. Nach negativer Selektion der T-Zellen aus der Milz wurden diese in die Platten überführt ($10^6/ml$) und dort für 3 Tage inkubiert. In einige der Platten wurde beim Start der Inkubation noch zusätzlich Überstand von LPS-stimulierten BMDDCs (ÜS LPS) (50 % v/v) gegeben. Nach 3 Tagen wurden durch Waschen der Zellen Mitogene und Cytokine entfernt, die Zellen erneut in einfachem Medium ohne Wachstumsfaktoren aufgenommen und in 96-Wellflachbodenschalen transferiert. Nach 20 h in Kultur wurde das Überleben der Zellen bestimmt. Die Ergebnisse von zwei Experimenten sind hier gezeigt.

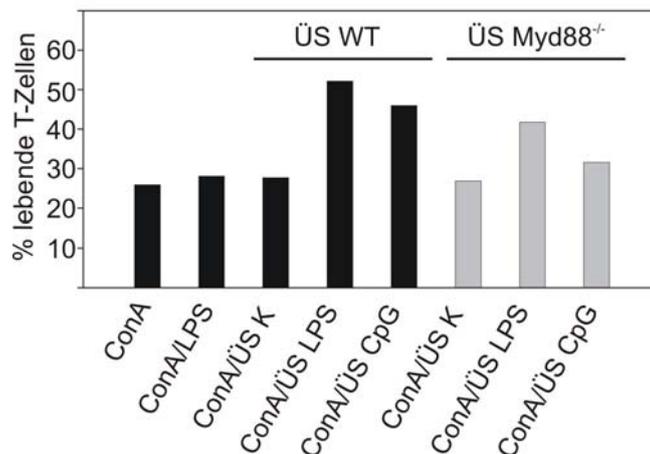


Abb. 9: Überleben gereinigter T-Zellen in Gegenwart von DC-gereiften Faktoren

T-Zellen wurden mittels negativer Selektion aus der Milz von WT Mäusen aufgereinigt und in 6-Wellplatten für 3 Tage mit ConA stimuliert ($10^6/ml$). Zusätzlich wurden einige Zellen in Gegenwart von LPS (1 $\mu g/ml$) oder in Überständen von nicht aktivierten (ÜS K) oder aktivierten (ÜS LPS oder ÜS CpG-DNA) (50 % v/v) BMDDCs aus C57BL/6 Mäusen oder myd88^{-/-} Mäusen stimuliert (50 % v/v). Am Tag 3 wurden die T-Zellen gewaschen und in Medium ohne Wachstumsfaktoren aufgenommen.

Anschließend wurden sie in 96-Wellflachbodenschalen transferiert und für 20 h inkubiert. Der Zelltod der APC-markierten CD3⁺ T-Zellen wurde in der Durchflusszytometrie bestimmt. Die Daten repräsentieren ein Experiment. Zwei weitere Experimente mit ähnlichem Ergebnis wurden durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob die Freisetzung löslicher Cytokine über die TLR-Aktivierung der DCs stattfindet, wurden BMDDCs aus MyD88-defizienten Mäusen generiert. Die Bindung von LPS an TLR4 führt zur Aktivierung eines MyD88-abhängigen als auch – unabhängigen Signalweges, während die Bindung von CpG1668 an den TLR9 ausschließlich in die Aktivierung des MyD88-abhängigen Signalweges mündet. Die Blockade des MyD88-abhängigen Signalweges in *myd88*^{-/-} Mäusen wurde deutlich: der Überstand der LPS-stimulierten MyD88-defizienten BMDDCs führte nach Zugabe zu gereinigten aktivierten T-Zellen im Vergleich zu Überstand aus WT-DCs zu einem geringeren Überlebenseffekt. Nach Aktivierung der MyD88-defizienten BMDDCs mit CpG1668 war der Überlebenseffekt der aktivierten T-Zellen kaum noch zu erkennen. Die Beteiligung der TLR auf der Zelloberfläche der DCs an der Freisetzung löslicher Faktoren, die auf aktivierte T-Zellen antiapoptotisch wirken, ist damit wahrscheinlich.

Hildeman et al. zeigten, dass sich die Expression von Bcl-2 und Bcl-X_L während der T-Zellstimulierung ändert (Hildeman et al., 2002). Deren antiapoptotische Wirkung kann dann Einfluss auf das Überleben der T-Zellen nehmen. Am Tag 3 der Stimulierung der T-Zellen mit ConA und dem jeweiligen Überstand aus gereiften BMDDCs, wurden Proben für die Western Blot Analyse entnommen. Es konnte gezeigt werden (Abb. 27), dass der DC-gereifte Überstand zu keiner erhöhten Proteinexpression von Bcl-2, Bcl-X_L oder Mcl-1 führte. Ähnlich wurde auch keine reduzierte Expression von Bax festgestellt. Somit muss der Überlebenseffekt durch andere Faktoren ausgelöst werden.

3.1.2 Erhöhte Induktion von *bcl-3* mRNA und Bcl-3 Protein

Bcl-3 ist ein Mitglied der Familie der IκB-Proteine, einer Gruppe von Inhibitoren der NF-κB Transkriptionsfaktoren. Es nimmt aber eine besondere Rolle ein, weil es direkt an der Bildung von Transkriptionskomplexen am Promotor beteiligt sein kann (Bates & Miyamoto, 2004) und hier sowohl eine aktivierende als auch inaktivierende Wirkung erzielen kann. Mitchell et al. zeigten, dass beim Versuch, T-Zellen *in vivo* mit Superantigenen zu aktivieren, die gleichzeitige Gabe von Adjuvans, etwa LPS, zu einer

starken Hochregulation von *bcl-3* mRNA führte (Mitchell et al., 2001). In Anlehnung an diesen Versuch konnten die hier gezeigten Versuche diese Hochregulation der *bcl-3* mRNA ebenfalls feststellen (Abb. 10). Dafür wurden SEB oder SEB/Adjuvans behandelten Mäusen 2 Tage nach Erstinjektion die Milz entnommen und dessen TCR $\nu\beta 8^+$ Zellen auf ihren Gehalt an *bcl-3* mRNA geprüft. Da sowohl die *bcl-3* mRNA Induktion als auch der Überlebens-effekt durch CpG-DNA gegenüber LPS geringer ausfiel, wurden die weiteren Versuche nur noch mit dem Adjuvans LPS durchgeführt.

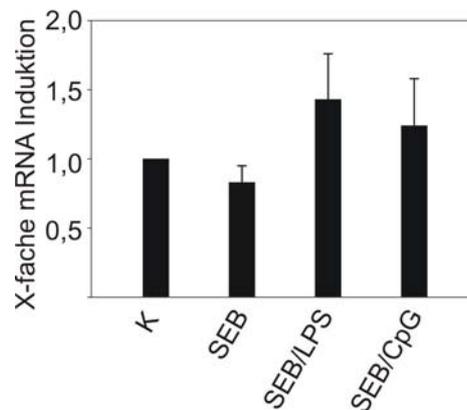


Abb. 10: Hochregulation der *bcl-3* mRNA nach Coinjektion von Adjuvans

C57BL/6 Mäuse wurden entweder mit SEB oder mit SEB und Adjuvans (LPS und CpG-DNA: 24 h später) i.p. injiziert. 2 Tage nach der SEB-Injektion wurden die TCR $\nu\beta 8^+$ T-Zellen aus der Milz im FACS-Sorter selektioniert, deren RNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. In der quantitativen RT-PCR wurde die Induktion der *bcl-3* mRNA im Vergleich zu unbehandelten Mäusen (K) bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

Die Hochregulation der *bcl-3* mRNA in den T-Zellen korreliert auch mit einer starken Expression des Bcl-3 Proteins *in vitro*: dies konnte sowohl in der Gegenwart von LPS als auch bei der Zugabe von Überstand von LPS stimulierten BMDDCs gezeigt werden (Abb. 11) (Bauer et al., 2006). Die Präsenz von LPS in Milzzellsuspensionen von ConA-aktivierten T-Zellen für drei Tage zeigte nach Waschen und Aufreinigung der T-Zellen eine erhöhte Expression von Bcl-3 Protein. Zusätzlich führte die Präsenz von Überstand aus LPS-aktivierten DCs in Zellsuspensionen aufgereinigter aktivierter T-Zellen nach 3 Tagen nicht nur zu besserem Überleben (Abb. 9), sondern auch erhöhter Expression von Bcl-3 (Abb. 11).

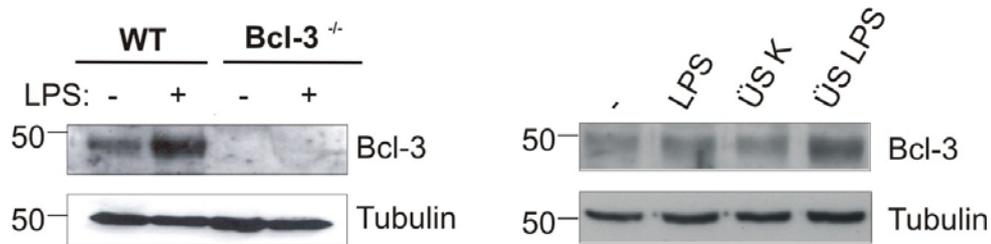


Abb. 11: Hochregulation von Bcl-3 nach LPS-Stimulation

A: Milzzellen von WT oder *bcl-3*^{-/-} Mäusen wurden für 3 Tage entweder in Gegenwart von ConA oder ConA/LPS in Zellkulturflaschen kultiviert. T-Zellen wurden dann mittels negativer Selektion aufgereinigt, in Homogenatpuffer aufgenommen und für die Western Blot Analyse vorbereitet. Ähnliche Ergebnisse wurden mit 3 separaten Experimenten erzielt. Milzzellen von *bcl-3*^{-/-} Mäusen wurden als Kontrolle mitgeführt. Als Ladekontrolle wurde die Proteinmenge von Tubulin detektiert.

B: Aus Milzzellen durch negative Selektion isolierte T-Zellen wurden für 3 Tage mit ConA, ConA plus LPS oder ConA plus Überstand von unstimulierten (ÜS K) oder mit Adjuvans LPS (ÜS LPS) (50 % v/v) stimulierten BMDDCs inkubiert. Nach Waschen der Zellen wurde ein Proteinextrakt für die anschließende Western Blot Analyse hergestellt. Das Ergebnis konnte in 2 Wiederholungen verifiziert werden.

3.1.3 Die Rolle von Bcl-3 im adjuvans-induzierten Überleben

Um die Relevanz der erhöhten Bcl-3 Expression beim verbesserten Überleben der T-Zellen zu überprüfen, wurde die Immunantwort der T-Zellen in *bcl-3*^{-/-} Mäusen analysiert. Interessanterweise führte die Kostimulation mit LPS auch in aktivierten T-Zellen von *bcl-3*^{-/-} Mäusen zu besserem Überleben, wie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden konnte (Abb. 12) (Bauer et al., 2006). *In vitro* wurden Zellsuspensionen der WT oder Bcl-3-defizienten Mäuse in Gegenwart von ConA oder ConA/LPS für 3 Tage stimuliert. Nach Aufreinigung und Waschen der T-Zellen wurde nach 20-stündiger Inkubation das Überleben der T-Zellen in der Durchflusscytometrie bestimmt. *In vivo* wurde den Mäusen SEB oder SEB/LPS injiziert. Der Gehalt an TCRvβ8⁺ Zellen wurde im Blut zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt.

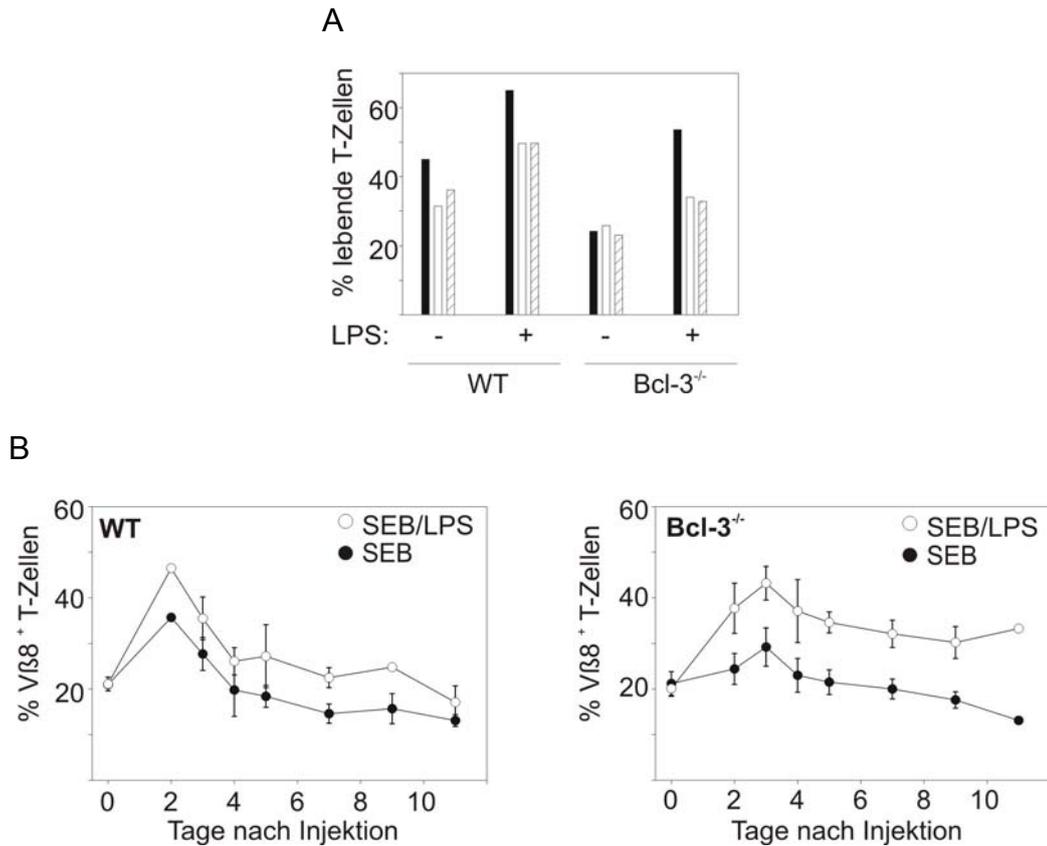


Abb. 12: *In vitro/vivo*: Überleben Bcl-3-defizienter T-Zellen in Gegenwart von LPS

A: Milzzellen von WT oder *bcl-3*^{-/-} Mäusen wurden für 3 Tage entweder in Gegenwart von ConA oder ConA/LPS in Zellkulturflaschen inkubiert. Am dritten Tag wurden T-Zellen aufgereinigt, gewaschen und in 96-Wellflachbodenplatten (3 x 10⁵/200 µl) transferiert. Das Überleben der T-Zellen wurde zum einen direkt nach dem Waschen und zum anderen nach 20 h Inkubation gemessen. Drei unabhängige Experimente sind hier gezeigt.

B: WT (links) oder *bcl-3*^{-/-} Mäuse (rechts) wurden mit SEB injiziert. Nach 24 h erhielten die Hälfte der Mäuse zusätzlich LPS. Zu den hier gezeigten Zeitpunkten wurde den Mäusen Blut entnommen, und die Prozentzahl der TCRVβ8⁺ T-Zellen wurde mittels spezifischer fluoreszierender Antikörper in der Durchflusszytometrie ermittelt. Vier unabhängige Experimente wurden durchgeführt in denen jeweils zwei Mäuse pro Genotyp mit SEB und jeweils zwei mit SEB und LPS injiziert wurden. Da das Blut zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen wurde, konnte der Mittelwert und die Standardabweichung nur aus einer unterschiedlichen Anzahl von Mäusen berechnet werden (WT: Tag 0: sechs Mäuse, Tag 2: zwei Mäuse, Tag 3: vier Mäuse, Tag 4: sechs Mäuse, Tag 5: sechs Mäuse, Tag 7: vier Mäuse, Tag 9: zwei Mäuse, Tag 11: zwei Mäuse. Bcl-3^{-/-}: Tag 0: acht Mäuse, Tag 2: zwei Mäuse, Tag 3: sechs Mäuse, Tag 4: acht Mäuse, Tag 5: acht Mäuse, Tag 7: sechs Mäuse, Tag 9: vier Mäuse und Tag 11: zwei Mäuse).

Auch die Zugabe von adjuvans-induzierten Faktoren zu den aktivierten T-Zellen von Bcl-3-defizienten Mäusen führten zu einem solchen Überlebenseffekt (Abb. 13) (Bauer et al., 2006). Überstand von LPS-aktivierten BMDDCs wurde drei Tage zusammen mit den gereinigten ConA-aktivierten T-Zellen der Bcl-3-defizienten Mäusen inkubiert. Nach Waschen der Zellen erfolgte das Umsetzen in

Flachbodenschalen und die weitere Inkubation der Zellen für 20 h bevor das Überleben in der Durchflusscytometrie bestimmt wurde. Damit kommt es zwar nach Adjuvanzzugabe zu einer Freisetzung von DC-generierten Faktoren, die einerseits zu einer Hochregulation von Bcl-3 führen, andererseits kann diese Überexpression nicht für den von adjuvans-induzierten Überlebenseffekt der T-Zellen verantwortlich gemacht werden.

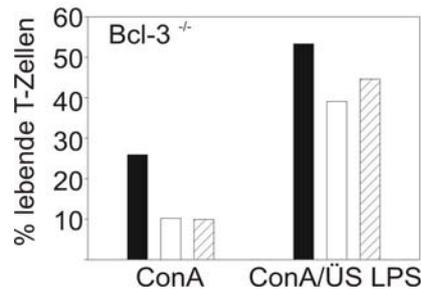


Abb. 13: Überleben Bcl-3-defizienter T-Zellen mit DC-gereiften Faktoren

T-Zellen aus der Milz von *bcl-3^{-/-}* Mäusen wurden durch negative Selektion gereinigt und für 3 Tage mit ConA allein oder zusätzlich mit Überstand von LPS-stimulierten BMDDCs (ÜS LPS) (50 % v/v) inkubiert. Am Tag 3 wurden die Zellen gewaschen und in 96-Wellflachbodenplatten ($3 \times 10^5/200 \mu\text{l}$) transferiert. Das Überleben der T-Zellen wurde nach 20 h Inkubation mittels Durchflusscytometrie gemessen. Drei unabhängige Experimente sind hier gezeigt.

3.2 Die antiapoptotische Funktion von Bcl-3

3.2.1 Bcl-3 im Überleben aktivierter T-Zellen

Obwohl Überstände von mit Adjuvantien behandelten DCs zum besseren Überleben der T-Zellen auch in Abwesenheit von Bcl-3 beitragen konnten, zeigt Abb. 14, dass Bcl-3 trotzdem Einfluss auf das Überleben aktivierter T-Zellen hat (Bauer et al., 2006). Aktivierte T-Zellen von *bcl-3^{-/-}* Mäusen in Kultur sterben schneller als aktivierte T-Zellen von WT Mäusen. *In vitro* wurde dieser Effekt mit ConA aktivierten T-Zellen gemessen: Zellsuspensionen der Milz wurden für 1, 2 oder 3 Tage mit ConA stimuliert, die T-Zellen wurden isoliert und anschließend für 20 h inkubiert. Das Überleben wurde mittels Durchflusscytometrie 20 h später analysiert. Zum Ausgangszeitpunkt war das Überleben der T-Zellen vergleichbar. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Zellkulturen mit ruhenden T-Zellen aus WT und *bcl-3^{-/-}* Mäusen keinen Unterschied im Überleben aufweisen. Dafür wurden gereinigte T-Zellen aus

der Milz unbehandelt in Kultur gegeben, und ihr Überleben wurde zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt.

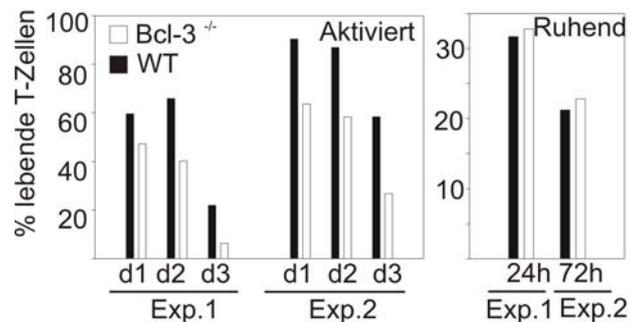


Abb. 14: Überlebensnachteil aktivierter Bcl-3-defizienter T-Zellen

Links: Milzzellen von WT und *bcl-3*^{-/-} Mäusen wurden in Zellkulturflaschen mit ConA stimuliert. Am Tag 1, 2 oder 3 wurden die T-Zellen gereinigt, gewaschen und in 96-Wellflachbodenplatten transferiert. Das Überleben wurde 20 h später gemessen. Zwei unabhängige Experimente sind hier gezeigt. Rechts: Ruhende T-Zellen wurden gereinigt und für 3 Tage in zwei unabhängigen Experimenten für entweder 24 h oder 72 h inkubiert. Ein weiteres Experiment mit einem 24 h Messpunkt zeigte ein ähnliches Ergebnis.

Um zu bestätigen, dass dieser Überlebensnachteil eine T-Zell intrinsische Eigenschaft ist und nicht auf unterschiedlich vorhandene lösliche Faktoren in der Gesamtmilzzellsuspension von WT und *bcl-3*^{-/-} Mäusen zurückzuführen ist, wurden die gereinigten T-Zellen in den Überständen der jeweilig anderen Zellsuspension inkubiert. Nach 3 Tagen Stimulation der WT und Bcl-3-defizienten Zellen aus der Milz mit ConA wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand behalten. Nach Aufreinigung der T-Zellen erfolgte deren Inkubation entweder in ihrem eigenen oder in dem Medium des anderen aus der Milzzellsuspension. Wie Abb. 15 zeigt, hat der Austausch dieser Überstände zwischen WT und *bcl-3*^{-/-} T-Zellen kein verändertes Überleben zur Folge.

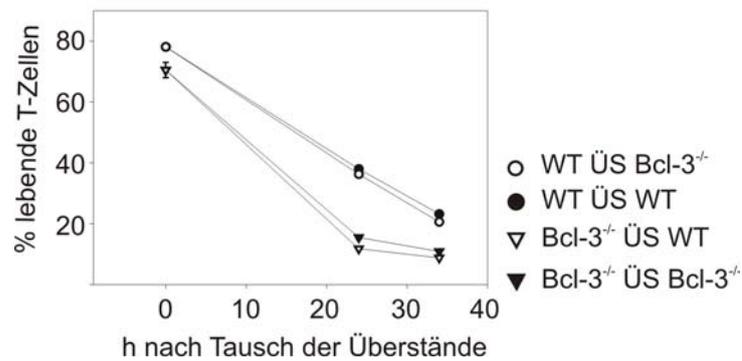


Abb. 15: Austausch der Überstände zwischen WT und *bcl-3*^{-/-} Mäusen

Milzzellen wurden für 3 Tage in Zellkulturflaschen mit ConA inkubiert. Am Tag 3 wurden die T-Zellen gereinigt, gewaschen und in 96-Wellflachbodenplatten transferiert. Das Medium in den Zellkulturflaschen wurde aufbewahrt. Die gereinigten T-Zellen wurden zum einen in ihrem vorigen eigenen Medium (WT ÜS WT, Bcl-3^{-/-} ÜS Bcl-3^{-/-}) oder im Medium der jeweiligen anderen Milzzellsuspension (WT ÜS Bcl-3^{-/-}, Bcl-3^{-/-} ÜS WT) für 20 h inkubiert. Das Überleben der Zellen wurde nach 24 h und 34 h gemessen. Eines von zwei Experimenten ist hier gezeigt.

Es konnte gezeigt werden, dass aktivierte T-Zellen von *bcl-3*^{-/-} Mäusen keine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber den getesteten Apoptosestimuli wie Staurosporin, Etoposide, UV-Bestrahlung, Ionomycin, Taxol und Dexamethason aufweisen (Abb. 16). Für diesen Versuch wurden aktivierte T-Zellen nach 3-tägiger Stimulation mit ConA für 20 h mit den jeweiligen Apoptose-auslösenden Substanzen inkubiert. Anschließend wurde das Überleben der T-Zellen nach 6 h und 20 h in der Durchflusscytometrie getestet. Bcl-3 scheint also spezifisch für den durch Faktorentzug induzierten Zelltod aktivierter T-Zellen verantwortlich zu sein.

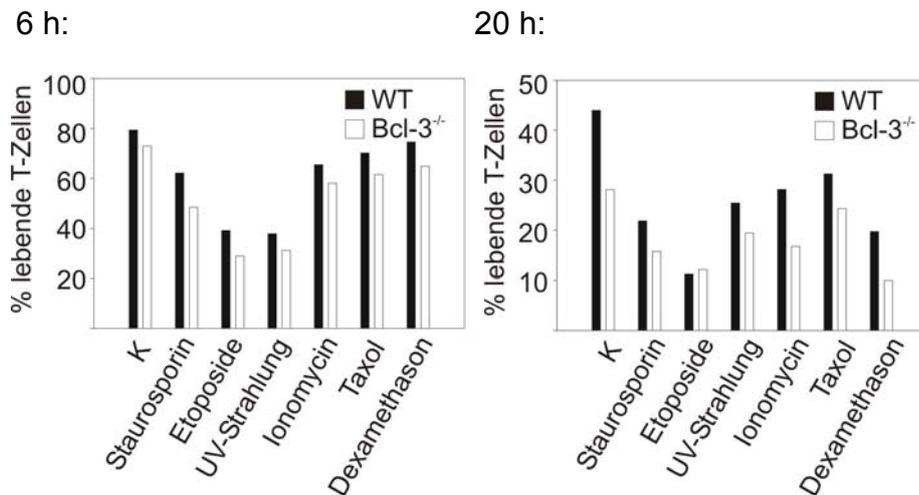


Abb. 16: Empfindlichkeit gegenüber Apoptose-auslösenden Substanzen

Nach drei Tagen Stimulation mit ConA wurden die T-Zellen aus Einzelzellsuspensionen der Milz von WT und *bcl-3*^{-/-} Mäusen isoliert, gewaschen und in 96-Wellflachbodenschalen transferiert. Die Empfindlichkeit gegenüber verschiedener Apoptosestimuli wurde durch deren Zugabe getestet. Keine weitere Zugabe weiterer Stimuli enthielt die Probe K. Das Überleben der Zellen wurde in der Durchflusscytometrie nach 6 h (links) oder nach 20 h (rechts) Inkubation getestet. Ähnliche Ergebnisse wurden in zwei weiteren separaten Versuchen erzielt.

Da der Verlust von Bcl-3 zu einem beschleunigten Zelltod der aktivierten T-Zellen führte, wurde getestet, ob Überexpression von Bcl-3 zu einem verbesserten Überleben beitragen konnte. Wie von Mitchell et al. mit SEB-aktivierten T-Zellen *in vivo* gezeigt worden ist (Mitchell et al., 2001), unterstützt die retrovirale Überexpression von Bcl-3 in aktivierten T-Zellen auch in der Zellkultur ihr Überleben (Abb. 17) (Bauer et al., 2006). Dabei wurden Gesamtzell-Suspensionen für zwei Tage mit ConA stimuliert. Die Infektion der Zellen mit dem Retrovirus, der die Expression von Bcl-3 hochreguliert (MiT-Bcl-3), führte nach Transfer der Zellen in 96-Wellplatten am nächsten Tag im Vergleich zu den Kontroll-infizierten Zellen (MiT) zum besseren Überleben der infizierten T-Zellen. Die infizierten T-Zellen konnten mit Hilfe eines GFP-exprimierenden Markers im Plasmid MiT detektiert werden; das Überleben wurde in der Durchflusscytometrie mittels der Scatter-Kriterien (Granularität und Größe) bestimmt. Bcl-3 hat damit eine Funktion im Schutz vor Apoptose. Die erhöhte Expression von Bcl-3 scheint damit zu einem adjuvans-induzierten Überlebenseffekt beitragen, aber nicht der wichtigste Faktor dafür zu sein.

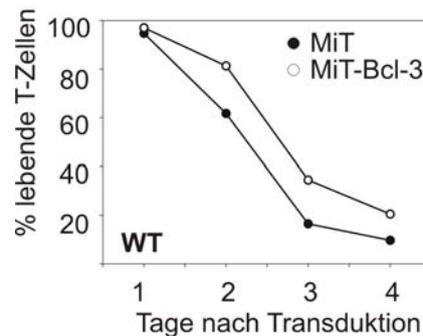


Abb. 17: Überleben aktivierter T-Zellen nach retroviraler Bcl-3 Expression

Einzelzellsuspensionen der Milz aus WT Mäusen wurden für zwei Tage in der Gegenwart von ConA in Zellkulturflaschen inkubiert. Die Zellen wurden dann entweder mit einem Leervektor (MiT) oder einem Retrovirus, das die Expression von Bcl-3 treibt (MiT-Bcl-3), infiziert. Einen Tag später wurden die Zellen in 96-Wellflachbodenschalen transferiert. Das Überleben der transfizierten Zellen, die über die Expression des Markers GFP identifiziert werden konnten, wurde zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Ähnliche Ergebnisse wurden in 3 separaten Experimenten erzielt.

3.2.2 Blockade der Aktivierung von Bim durch Bcl-3

Bcl-3 ist ein Regulator der NF- κ B Aktivität und scheint damit an der Transkription von pro- und/oder antiapoptotischen Genen beteiligt zu sein. Um zu verstehen, wie Bcl-3 die Apoptose hemmt, wurden *bcl-3* regulierte Gene in einer Microarrayanalyse mit der Fragestellung untersucht, wie es zu einem verminderten Überleben der aktivierten T-Zellen aus der *bcl-3*^{-/-} Maus kommt. Die Genexpression aktivierter T-Zellen von WT und *bcl-3*^{-/-} Mäusen wurde miteinander verglichen. Zunächst wurden T-Zellen aus der Milz isoliert, und diese wurden anschließend für 3 Tage mit ConA stimuliert. Nach Waschen erfolgte die sofortige Weiterverarbeitung für die Microarrayanalyse.

Damit Bcl-3 selbst Apoptose verhindern kann, wurde eine erhöhte Genexpression apoptotischer oder eine verminderte Genexpression antiapoptotischer Gene in den Proben von *bcl-3*^{-/-} Mäusen vermutet. Das Ergebnis der Proben zeigte jedoch keinen Unterschied der bekannten Apoptose-regulierenden Gene (Änderungen in der Menge an mRNA von *bcl-2*, *bcl-x_L*, *mcl-1*, *a1*, *bax*, *bak*, *puma*, *bmf*, *hrk*, *bad*, *bik*, *bid*, *nox_a*). Die höhere Empfindlichkeit der aktivierten T-Zellen aus *bcl-3*^{-/-} Mäusen kann somit nicht durch deren veränderte Genexpression erklärt werden. Wie bereits erwähnt, konnte Bim als ein Mediator im Zelltod von aktivierten T-Zellen identifiziert

werden (Hildeman et al., 2002). Aber die Auswertung der Microarraydaten lieferte auch für *bim* mRNA nur eine 1,6 fache Erhöhung der Expression, und in der Western Blot Analyse konnte nur eine minimale Erhöhung der Menge an Bim-Protein in aktivierten *bcl-3^{-/-}* T-Zellen im Vergleich zu WT T-Zellen gefunden werden (Abb. 18) (Bauer et al., 2006). Die mRNA von *puma* war sogar um das 2,6-fache erniedrigt (siehe Anhang).

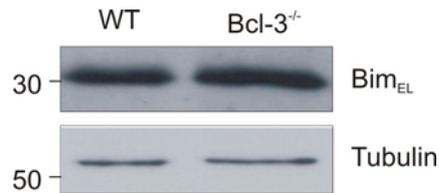


Abb. 18: Minimale Erhöhung der Bim Expression in Bcl-3-defizienten T-Zellen

Gereinigte T-Zellen von WT oder *bcl-3^{-/-}* Mäusen wurden für drei Tage mit ConA stimuliert. Am Tag 3 wurden Proben zur Western Blot Analyse entnommen und auf den Gehalt von Bim und Tubulin überprüft.

Bisher wurde vermutet, dass eine erhöhte Bimexpression Zellen für bestimmte apoptoseauslösende Signale sensibilisiert. Andererseits wurde von Puthalakath et al. gezeigt, dass auch lebendige Zellen leicht detektierbare Mengen an Bim-Protein enthalten können, das an die LC8 und damit an den Dyneinmotorkomplex als Teil der Mikrotubuli gebunden ist (Puthalakath et al., 1999). Spezifische apoptoseauslösende Signale können dieses an das Mikrotubulus verankerte Bim aktivieren, zu seiner Freisetzung vom Mikrotubulus führen, und das aktive freie Bim kann dann seine apoptoseauslösende Wirkung entfalten. Somit kann die Assoziation von Bim mit dem Mikrotubulus als Maß für die Aktivierung von Bim in Betracht gezogen werden. Inaktives Bim kann im Zelllysat zusammen mit tubulin-haltigen Komplexen ausgefällt werden, während aktives Bim freigesetzt und damit im Versuchsansatz im Überstand wiedergefunden wird.

Abb. 19 zeigt Ergebnisse, in denen die Menge an Mikrotubuli-assoziiertem (inaktivem) und freiem (aktivem) Bim in aktivierten T-Zellen verglichen wurden (Bauer et al., 2006). Dafür wurde eine subzelluläre Fraktionierung vorgenommen. Als erstes wurden Einzelzellsuspensionen der Milz aus WT und Bcl-3-defizienten Mäusen mit ConA stimuliert. Nach 3 Tagen Inkubation wurden die T-Zellen aufgereinigt und dann entweder direkt auf ihren Gehalt an freiem und gebundenem Bim getestet oder erst

nach 18 h Inkubation. Caspasenaktivität wurde in diesem Experiment durch die gleichzeitige Gabe von z-VAD-fmk verhindert. Die gereinigten T-Zellen wurden subzellulär fraktioniert: Die Zugabe von Taxol führt zu einer Polymerisierung und Stabilisierung der Mikrotubuli, die gebundenes Bim enthalten. Diese großen Komplexe werden mittels Ultrazentrifugation präzipitiert (P). Die Überstände aus diesem Schritt (ÜS), die freies ungebundenes Bim enthalten, wurden mit Aceton präzipitiert. Beide Proben wurden für die Western Blot Analyse vorbereitet.

Nachdem T-Zellen von WT und von *bcl-3*^{-/-} Mäusen 3 Tage mit ConA stimuliert worden waren, konnte kein freigesetztes aktives Bim in den Überständen (ÜS, 0h) gefunden werden. Die Zellen wurden nach Waschen mit Medium, was zu einem Entzug von Wachstumsfaktoren führt, weiter inkubiert. Unter diesen Bedingungen (Abb. 14) kommt es zu einer erhöhten Apoptose der aktivierten *bcl-3*^{-/-} T-Zellen. Bouillet et al. veröffentlichten zuvor, dass unter diesen Bedingungen *bim*^{-/-} T-Zellen vor Apoptose geschützt sind (Bouillet et al., 1999). Und tatsächlich führte dieser Entzug an Wachstumsfaktoren zu einer geringen Freisetzung von Bim in den T-Zellen von WT Mäusen. Die Menge an freigesetztem Bim in den *bcl-3*^{-/-} Mäusen war klar erhöht (ÜS, 18 h). Dies spricht für eine vermehrte Aktivierung von Bim in der Abwesenheit von Bcl-3.

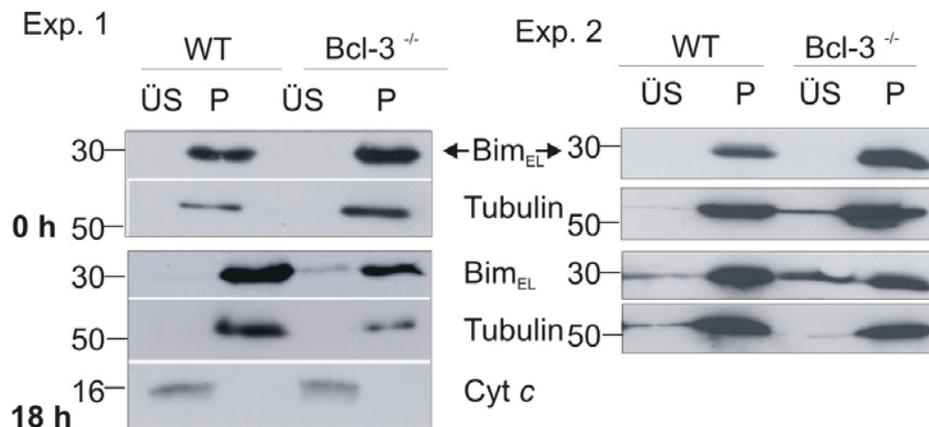


Abb. 19: Erhöhte Freisetzung von Bim in aktivierten T-Zellen von *bcl-3*^{-/-} Mäusen

Einzelzellsuspensionen der Milz von WT oder *bcl-3*^{-/-} Mäusen wurden in Zellkulturflaschen mit ConA stimuliert. Am dritten Tag wurden die T-Zellen gereinigt, gewaschen, und $2,5 \times 10^7$ Zellen wurden zur subzellulären Fraktionierung vorbereitet (0 h, oben). Weitere $2,5 \times 10^7$ Zellen (1×10^6 /ml) wurden in der Gegenwart von z-VAD-fmk in 6-Wellplatten für 18 h inkubiert und dann zur subzellulären Fraktionierung vorbereitet (unten). Große Komplexe, die nach der Taxol-Polymerisation Tubulin enthalten wurden mittels Ultrazentrifugation präzipitiert (P). Die Überstände aus diesem Schritt (ÜS) wurden mit Aceton präzipitiert. In der Western Blot Analyse wurden die Fraktionen auf ihren Gehalt

Ergebnisse

von Bim, Tubulin (markiert die tubulin-haltigen Fraktionen) und Cytochrom c (als Ladekontrolle für die Fraktion im Überstand) getestet. Zwei von insgesamt drei ähnlichen Experimenten sind hier gezeigt.

In Anbetracht dieser Ergebnisse konnte darauf geschlossen werden, dass Bcl-3 eine Rolle bei der Blockade der Aktivierung von Bim in aktivierten T-Zellen spielt. Weitere Versuche bestätigten dies. Es wurde getestet, ob eine retrovirale Expression von Bcl-3 zum verbesserten Überleben in aktivierten *bim*^{-/-} T-Zellen beitragen kann (Bauer et al., 2006). Wie bereits berichtet wurde, überleben *bim*^{-/-} T-Zellen in Kultur besser (Bouillet et al., 1999), sterben aber trotzdem nach einigen Stunden bis Tagen in Kultur. Abb. 20 zeigt, dass bei aktivierten *bim*^{-/-} T-Zellen im Gegensatz zu aktivierten WT T-Zellen (Abb. 17) keine verbesserte Überlebensrate der mit *bcl-3* retroviral infizierten T-Zellen gemessen werden konnte. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass der antiapoptotische Effekt von Bcl-3 hauptsächlich auf der Blockade der Aktivierung von Bim beruht.

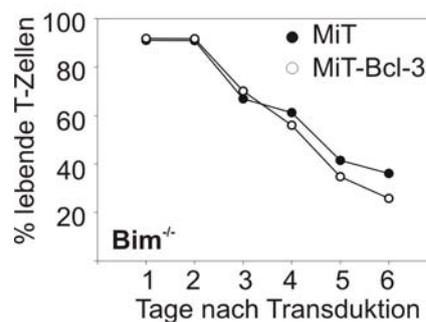


Abb. 20: Retrovirale Bcl-3 Expression in aktivierten *bim*^{-/-} T-Zellen

Einzelzellsuspensionen der Milz aus *bim*^{-/-} Mäusen wurden für zwei Tage in der Gegenwart von ConA in Zellkulturflaschen inkubiert. Die Zellen wurden dann entweder mit einem Leervektor (MiT) oder einem Retrovirus, der die Expression von Bcl-3 treibt (MiT-Bcl-3), infiziert. Einen Tag später wurden die Zellen in 96-Wellflachbodenschalen transferiert. Das Überleben der transfizierten Zellen, die über die Expression des Markers GFP identifiziert werden konnten, wurde zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Ähnliche Ergebnisse wurden in 3 separaten Experimenten erzielt.

3.2.3 Bcl-3-regulierte Gene

3.2.3.1 Vergleichende Microarrayanalyse (WT und Bcl-3^{-/-})

Die Microarrayanalyse, in denen die Genexpression von aktivierten T-Zellen von WT Mäusen mit der von aktivierten T-Zellen von *bcl-3*^{-/-} Mäusen verglichen wurde, war zunächst nur unter dem Aspekt der Genregulation apoptotischer oder

antiapoptotischer Gene betrachtet worden. Keines der an der Apoptose beteiligten Gene war signifikant erhöht oder erniedrigt und die vermehrte Apoptose der aktivierten T-Zellen von *bcl-3*^{-/-} Mäusen konnte damit nicht erklärt werden. Die Beteiligung des BH3-Proteins Bim an der Apoptose von aktivierten T-Zellen war bereits bekannt (Hildeman et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte schließlich gezeigt werden, dass Bcl-3 die Freisetzung von Bim vom Cytoskelett reguliert. Bcl-3 wird der IκB Familie zugeordnet und wirkt damit in erster Linie regulatorisch auf die Genexpression. Der Microarray wurde deswegen auf Gene untersucht, die am Aufbau oder der Regulation des Cytoskeletts beteiligt sind (siehe Anhang). Bei der Auswertung der Daten wurden nur solche Gene als unterschiedlich reguliert betrachtet, deren Expressionsänderung nach der Datenauswertung von Affymetrix (GeneChip Expression Analysis) (Santa Clara, USA) als zunehmend (I) oder abnehmend (D) definiert wurde. Zusätzlich musste dieser Wert als ein Transkript angegeben sein, das auf dem Chip hybridisiert und als detektierbar definiert wurde. Als zusätzliche Einschränkung, um eine signifikante Aussage der unterschiedlichen Genregulation zu treffen, diente die Vereinbarung, dass die Differenz des Maximumwertes (Wert von WT Maus geteilt durch Wert von *bcl-3*^{-/-} Maus) vom Minimumwert (Wert von WT Maus geteilt durch Wert von *bcl-3*^{-/-} Maus) mindestens 50 betragen sollte. Außerdem wurde ein Unterschied erst als signifikant definiert, wenn die Genregulation zwischen dem Wert von WT und Bcl-3 um mindestens den Faktor 2 unterschiedlich reguliert war.

Insgesamt wurden unter diesen Bedingungen nur 258 Gene gefunden, die unterschiedlich reguliert waren. Davon sind 52 in den Bcl-3-defizienten Zellen hoch- und 206 davon herunterreguliert. Insgesamt befinden sich unter den 258 Genen genau 55 Teilsequenzen von Genen mit noch ungeklärter Funktion, den sogenannten „expressed sequence tags“ (ESTs). Die anderen Teilsequenzen, denen bekannte Gene zugeordnet werden konnten, sind im Anhang aufgelistet. Tabelle 1 zeigt daraus 3 Gene, die aufgrund ihrer Lokalisation am Mikrotubulus als mögliche Regulatoren der Bim-Freisetzung in Frage kommen (Hacker et al., 2006).

Natürlich ist aus einem einzigen Microarray kein statistischer Mittelwert zu errechnen. Hat man einen aussichtsreichen Kandidaten erhalten, ist immer eine quantitative PCR wichtig, um falsch positive oder falsch negative Kandidaten auszuschließen.

Tab. 1: Mögliche Gene, die an der Regulation der Bim-Freisetzung beteiligt sind

<i>Unigene</i>	<i>Name</i>	<i>Symbol</i>	<i>x-fache Induktion</i>	<i>bisher angenommene Funktion</i>	<i>bisher bekannte Expression</i>
Mm. 33956	Kinesin family member 21B	Kif21b	-14,1	plus-Ende direktioniertes Mikrotubuli-Motorprotein	Dendriten, Gehirn, Milz
Mm. 22628	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 3	Mapre3	-7,9	plus-Ende-bindendes Protein an Mikrotubuli, beteiligt an deren Aufbau und Stabilität	ubiquitär
Mm. 276198	MAP/ microtubule affinity-regulating kinase 4	Mark4	-5,2	Mitorganisation der Mikrotubuli durch Phosphorylierung von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen	ubiquitär

Ein aussichtsreicher Kandidat war das Mikrotubuli-assoziierte Protein RP/EB family, member 3, auch EBF3 genannt, weil es ubiquitär vorhanden ist (Nakagawa et al., 2000; Su & Qi, 2001) und bei erhöhter Expression mit dem ganzen Mikrotubulus assoziieren kann (Bu & Su, 2001; Juwana et al., 1999; Nakagawa et al., 2000).

Ob die Überexpression von EBF3 am Überleben von T-Zellen beteiligt ist, sollte in einem Überexpressionsexperiment getestet werden. Nach Herstellung des Plasmids MigRI-EBF3 wurden die für zwei Tage mit ConA aktivierten T-Zellen entweder mit dem Leervektor MigRI oder dem EBF3-überexprimierenden Plasmid transfiziert. Zur Selektion der transfizierten Zellen befindet sich in dem Plasmid zusätzlich der Marker für grün-fluoreszierendes Protein (GFP). Anschließend wurde die Überlebensrate der transfizierten, und grün fluoreszierenden T-Zellen bestimmt. Die Transfektionseffizienz war aber bei dem MigRI-EBF3 Vektor zu niedrig und konnte auch durch frühere Messpunkte nach Transfektion nicht erhöht werden. Auch die Verwendung von aktivierten *bcl-3*^{-/-} T-Zellen oder von Vav-Bcl-2 transgenen aktivierten T-Zellen führte zu keiner erhöhten Transfektionseffizienz. Um herauszufinden, ob das Konstrukt MigRI-EBF3 optimal konstruiert wurde und ob es sich um ein T-Zell-spezifisches Problem handelt, wurde sowohl die Lymphomzelllinie

WEHI 231 als auch die menschliche mit ecotrophem Retrovirus transfizierbare T-Zelllymphomlinie, Jurkat E, infiziert.

WEHI 231 Zellen konnten mit dem Überexpressionsvektor eine Transfektionseffizienz von 30 % gegenüber dem Kontrollvektor mit 45 % erreichen. Bei ecotrophen Jurkat Zellen lag die Effizienz des MigRI-EBF3 Vektors bei 18 % gegenüber 26 % bei der Kontrolle. Eine eindeutige Tendenz besseren Überlebens in den mit *ebf-3* transfizierten Zellen konnte nicht gemessen werden. EBF3 scheint in den transfizierten Zellen nicht in der Lage zu sein, eine Aktivierung von Bim zu verhindern.

Trotzdem kann EBF3 damit als möglicher Regulator nicht ausgeschlossen werden. Ein besseres Überleben der transfizierten aktivierten T-Zellen mit EBF3 konnte nicht detektiert werden. KIF21B und MAPK4 sind zwar Mikrotubuli-assoziierte Proteine, aber deren bisher bekannte Funktion oder Lokalisation deuten nicht vorrangig auf eine Beteiligung an der Bim-Freisetzung in T-Zellen hin. Das Protein KIF21B, ein Kinesin-Motorprotein ist hauptsächlich in Dendriten lokalisiert (Marszalek et al., 1999). Dort spielt es als Motorprotein eine Rolle am wachsenden Pol des Mikrotubuli. MARK4 kann Mikrotubuli-assoziierte Proteine phosphorylieren und ist dadurch direkt an der Organisation der Mikrotubuli beteiligt ist. Ihm wird hauptsächlich eine Funktion in neuronalen Zellen zugeschrieben (Drewes et al., 1998; Trinczek et al., 2004).

Zusätzlich können auch im Microarray auftretende aber bisher nicht beschriebene Gene an dieser Regulation beteiligt sein. Eine weitere Eingrenzung möglicher Kandidaten musste durchgeführt werden.

3.2.3.2 Rolle von NF- κ B1 und NF- κ B2 im Zelltod aktivierter T-Zellen

Die ausführliche Analyse der Daten aus dem Microarray konnte keinen eindeutigen Kandidaten eingrenzen, der für die Freisetzung und Aktivierung von Bim verantwortlich ist. Die Tatsache, dass NF- κ B1 und NF- κ B2 bevorzugte Interaktionspartner von Bcl-3 sind, sollte zu einer weiteren Eingrenzung führen. Dazu wurde das Überleben aktivierter T-Zellen von *nf- κ B1*^{-/-} und *nf- κ B2*^{-/-} und WT Mäusen miteinander verglichen. Wie in Abb. 21 gezeigt, ist das Überleben der T-Zellen aus *nf- κ B1*^{-/-} Mäusen gegenüber WT erniedrigt, während ein besseres Überleben der T-Zellen aus *nf- κ B2*^{-/-} Mäusen beobachtet werden kann.

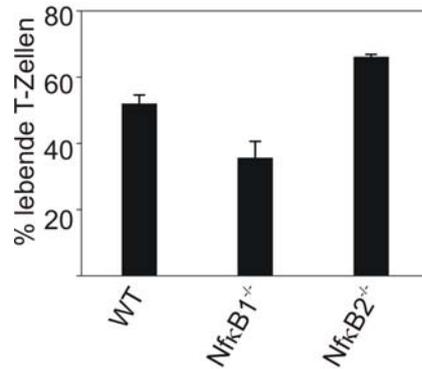


Abb. 21: Überleben aktivierter T-Zellen von *nf-κB1*^{-/-}, *nf-κB2*^{-/-} und WT Mäusen

Milzzellen von WT, *nf-κB1*^{-/-} und *nf-κB2*^{-/-} Mäusen wurden für drei Tage mit ConA in Zellkulturflaschen inkubiert. Nach der anschließenden Aufreinigung der T-Zellen wurden diese gewaschen und in 96-Wellflachbodenschalen überführt. Das Überleben der T-Zellen wurde in der Durchflusszytometrie bestimmt. Die Abbildung repräsentiert für WT Mäuse jeweils drei und für *nf-κB1*^{-/-} und *nf-κB2*^{-/-} Mäuse jeweils zwei Mäuse, gemessen in zwei unabhängigen Experimenten.

Die Tatsache, dass die bevorzugten Interaktionspartner von Bcl-3 Homodimere von NF-κB1 oder NF-κB2 sind, lässt vermuten, dass sie gemeinsam einen Einfluss auf die Apoptose der aktivierten T-Zellen ausüben. Das Zusammenspiel dieser drei Interaktionspartner kann mit Hilfe eines weiteren Microarrays näher untersucht werden. Die vergleichende Microarrayanalyse zwischen aktivierten T-Zellen aus *nf-κB1*^{-/-} Mäusen und *nf-κB2*^{-/-} Mäusen verspricht auf einen Kandidaten zu treffen, der sowohl hier als auch in dem vergleichenden Microarray zwischen aktivierten T-Zellen von WT Mäusen und aktivierten T-Zellen von *bcl-3*^{-/-} Mäusen unterschiedlich reguliert wird. Damit könnte man das Gen finden, das von Bcl-3 reguliert wird und die Freisetzung und Aktivierung von Bim verhindert.

3.3 Die Existenz Bim-unabhängiger Apoptosewege

Bisherige Untersuchungen hatten gezeigt, dass die Überlebensfaktoren, die von Adjuvantien stimulierten DCs produziert werden, scheinbar unabhängig von Bcl-3 wirken. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Bcl-3 trotzdem einen Überlebenseffekt in aktivierten T-Zellen ausübt und dieser von der Aktivierung von Bim abhängig ist. Aus diesem Grund wurde in Erwägung gezogen, dass diese löslichen Faktoren ebenfalls unabhängig von Bim wirken. Es wurde überprüft, ob ein Bim-unabhängiger Weg existiert, der am Zelltod aktivierter T-Zellen beteiligt ist. Um sich dieser Aufgabe zu widmen, wurde als erstes das Überleben aktivierter T-Zellen

von Vav-Bcl-2 transgenen Mäusen mit *bim*^{-/-} Mäusen verglichen (Bauer et al., 2006). Antiapoptotisch wirkendes Bcl-2 ist nicht nur der Gegenspieler von Bim, sondern auch von anderen apoptotisch wirkenden BH3-Proteinen. Aus diesem Grund könnte Bcl-2 beim Tod der aktivierten T-Zellen sowohl Bim-abhängige als auch Bim-unabhängige Wege inhibieren. Nach Stimulation Vav-Bcl-2 transgener und Bim-defizienter T-Zellen für 3 Tage mit ConA, wurden ihnen durch Waschen Wachstumsfaktoren entzogen. Nach 20 h Inkubation wurde ihr Überleben in der Durchflusscytometrie bestimmt. Und tatsächlich zeigten aktivierte T-Zellen Vav-Bcl-2 transgener Mäusen besseres Überleben als aktivierte T-Zellen Bim-defizienter T-Zellen (Abb. 22). Damit müssen auch Bim-unabhängige Wege am Zelltod der aktivierten T-Zellen beteiligt sein.

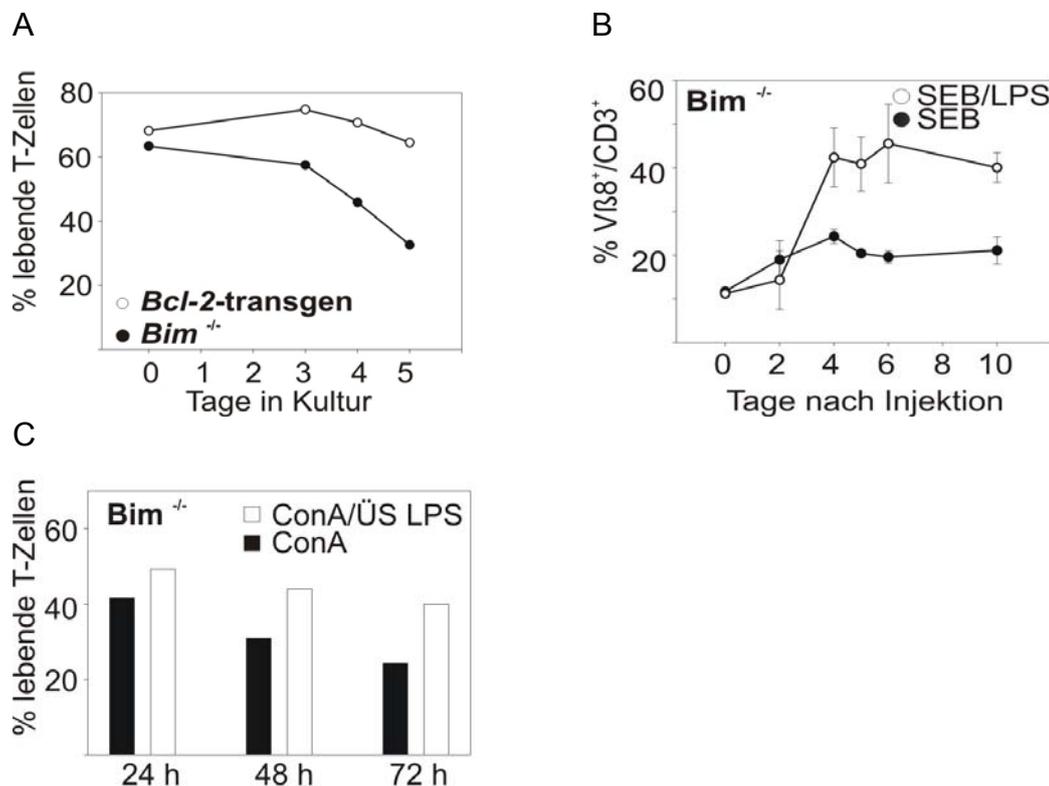


Abb. 22: Bestätigung Bim-unabhängiger Wege im Zelltod aktivierter T-Zellen

A: T-Zellen von *bim*^{-/-} oder Vav-Bcl-2 transgenen Mäusen wurden aus der Milz isoliert und für 3 Tage mit ConA stimuliert. Dann wurden die Zellen gewaschen und in 96-Wellfachbodenschalen für die angegebenen Zeiten inkubiert und das Überleben der Zellen bestimmt. Eines von zwei Experimenten ist gezeigt. Zwei weitere Experimente in denen Einzelzeitpunkte gemessen wurden, zeigen ähnliche Ergebnisse.

B: Sechs *bim*^{-/-} Mäuse wurden mit SEB injiziert. Drei davon erhielten einen Tag später zusätzlich LPS. Der Anteil der TCRvβ8⁺ T-Zellen im peripheren Blut wurde mit Hilfe immunofluoreszierender Antikörper zu den angegebenen Zeitpunkten in der Durchflusscytometrie bestimmt. Die Daten

repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung der drei Mäuse in der jeweiligen Gruppe. Ein weiteres Experiment mit jeweils einer Maus führte zu ähnlichen Ergebnissen.

C: Gereinigte T-Zellen von *bim*^{-/-} Mäusen wurden für drei Tage mit ConA oder in zusätzlicher Gegenwart von Überständen von LPS-stimulierten BMDDC (ÜS LPS) (50 % v/v) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und in 96-Wellflachbodenschalen transferiert. Das Überleben wurde zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Eines von zwei separaten Experimenten ist hier gezeigt.

Des Weiteren konnten Überstände aktivierter DCs auch das Überleben von *bim*^{-/-} T-Zellen verbessern (Abb. 22) (Bauer et al., 2006). Die gleichzeitige Inkubation der gereinigten aktivierten *bim*^{-/-} T-Zellen mit Überständen von LPS-stimulierten DCs führte zu einem besseren Überleben als die Inkubation der T-Zellen allein. Frühere Studien hatte gezeigt, dass Bim für den Zelltod von SEB-aktivierten T-Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* notwendig ist (Hildeman et al., 2002). Die Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden. *Bim*^{-/-} Mäusen wurde entweder SEB allein injiziert, oder aber am nächsten Tag erhielten sie zusätzlich LPS. Die Injektion von SEB in *bim*^{-/-} Mäuse führte im Zeitverlauf von 10 Tagen nur zu einer sehr geringen Abnahme der aktivierten TCRvβ8⁺ Zellen im Blut. Des Weiteren führte die zusätzliche Injektion von LPS zu einer noch stärkeren Expansion und dem Verbleib der aktivierten TCRvβ8⁺ Zellen auf diesem hohen Niveau (Abb. 22) (Bauer et al., 2006).

Diese Ergebnisse zeigen, dass selbst in der Abwesenheit von Bim, die Expansion der T-Zellen durch Apoptose eingeschränkt ist, und dieser Effekt durch LPS-induzierte Faktoren blockiert werden kann. Aus diesem Grund muss ein zusätzlicher zweiter, Bim-unabhängiger Reaktionsweg am Tod der aktivierten T-Zellen beteiligt sein.

3.3.1 Puma und der Zelltod aktivierter T-Zellen

Puma schien hier ein aussichtsreicher Kandidat zu sein, denn Puma-defiziente Thymocyten überleben besser als Thymocyten von WT Mäusen. Besonders deutlich wurde dieser Überlebensvorteil der Thymocyten in der Anwesenheit von Apoptosestimuli wie gamma-Strahlung oder Etoposide (Villunger et al., 2003). Um eine Beteiligung von Puma zu untersuchen, wurden gereinigte T-Zellen für 3 Tage mit ConA und zum Teil mit Überständen von LPS-aktivierten BMDDCs stimuliert. Nach Waschen der Zellen am dritten Tag, wurden sie weiter inkubiert und ihr Überleben gemessen. Wie Abb. 23 zeigt, fällt der Effekt geringer aus als bei den

bim^{-/-} Mäusen (siehe Abb. 22). Dennoch zeigten aktivierte T-Zellen von *puma*^{-/-} Mäusen besseres Überleben als WT T-Zellen.

Zudem konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass der Überlebenseffekt mit Überständen von aktivierten DCs auch in Puma-defizienten T-Zellen gemessen werden kann. Aktivierte *puma*^{-/-} T-Zellen überleben in der Gegenwart von diesen Überständen besser als T-Zellen die nur mit Mitogen stimuliert wurden (Abb. 23).

Eine Kooperation mit dem Labor von A. Villunger (Innsbruck, Österreich) gab uns die Möglichkeit, das Überleben von doppelt defizienten *bim/puma*^{-/-} T-Zellen zu untersuchen. In deren Labor verglich man diese mit T-Zellen aus Bim-defizienten und WT Mäusen (Abb. 23) (You et al., 2006). Die Auswirkungen von fehlendem Puma war besonders auffällig bei Mäusen mit einem *bim*^{-/-} Hintergrund. Das Überleben aktivierter T-Zellen von *bim*^{-/-} Mäusen war signifikant besser als das von WT Mäusen. Die doppelt defizienten *bim/puma*^{-/-} T-Zellen überlebten jedoch signifikant besser als die allein Bim-defizienten T-Zellen. Dieser Überlebensunterschied ist also auf die fehlende apoptotische Wirkung von Puma zurückzuführen.

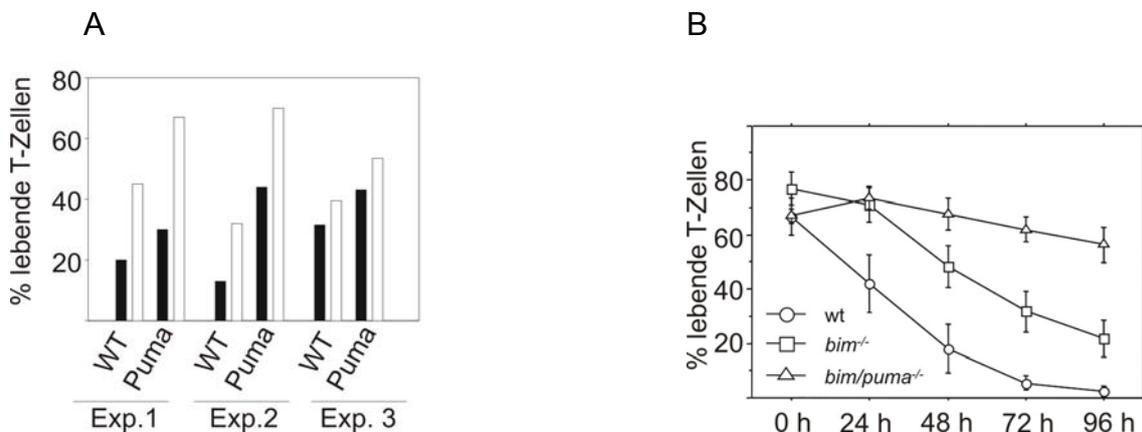


Abb. 23: Die Rolle von Puma in aktivierten T-Zellen

A: Gereinigte T-Zellen von WT oder *puma*^{-/-} Mäusen wurden mit ConA stimuliert (schwarze Balken). Einige Aliquots wurden in der Gegenwart von LPS-aktivierten BMDDC (weiße Balken) stimuliert. Am Tag drei wurden die Zellen gewaschen und in 96-Wellflachbodenschalen ohne weitere Wachstumszusätze transferiert. Das Überleben der T-Zellen wurde nach 20 h gemessen.

B: T-Zellen wurden entweder von WT, *bim*^{-/-} oder *bim/puma*^{-/-} Mäusen isoliert und für drei Tage mit ConA stimuliert. Am Tag 3 wurden die T-Zellen gewaschen und in 96-Wellflachbodenschalen transferiert. Das Überleben der Zellen wurde an den angegebenen Zeitpunkten durchgeführt. Die Zeitpunkte repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung von 3 verschiedenen Mäusen pro Genotyp, die in drei unabhängigen Experimenten analysiert wurden.

So spielt neben Bim auch Puma eine Rolle bei der Auslösung von Apoptose in aktivierten T-Zellen. Die Tatsache, dass der Tumorsuppressor p53 an der transkriptionellen Aktivierung von Puma eine Rolle spielt, ist von mehreren Gruppen bestätigt worden (Han et al., 2001; Nakano & Vousden, 2001; Yu et al., 2001). Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass Puma-defiziente Zellen resistent sind gegenüber p53-abhängigen apoptotischen Stimuli, wie die Behandlung mit Etoposide oder gamma-Bestrahlung (Jeffers et al., 2003; Villunger et al., 2003). Aus diesem Grund wurde in der Arbeitsgruppe von A. Villunger (Innsbruck, Österreich) das Überleben von p53-defizienten aktivierten T-Zellen untersucht. Es konnte jedoch kein verbessertes Überleben gegenüber der WT T-Zellen gemessen werden, was als Beweis dafür dient, dass die Aktivierung von Puma in aktivierten T-Zellen durch einen p53-unabhängigen Mechanismus stattfindet (Bauer et al., 2006)

3.3.2 Noxa und der Zelltod aktivierter T-Zellen

Neben Bim und Puma war auch das BH3-Protein Noxa ein aussichtsreicher Kandidat für die Beteiligung am Tod der aktivierten T-Zellen, denn sowohl Puma als auch Noxa sind für ihre zusätzlich p53-unabhängige transkriptionelle Regulation bekannt. Und tatsächlich stieg die Menge an *noxa* mRNA in T-Zellen bei der Induktion vom Zelltod. Für den Versuch wurden T-Zellen aus WT Mäusen isoliert und Tage mit ConA stimuliert. Am dritten Tag wurden die Zellen gewaschen und entweder bis zur Isolierung der RNA inkubiert (8 h und 16 h) oder aber sofort auf ihren *noxa* mRNA-Gehalt hin überprüft (Abb. 24) (Bauer et al., 2006). Diese Hochregulation von *noxa* mRNA während der Apoptose der T-Zellen konnte noch besser in Bim-defizienten T-Zellen gemessen werden. Die Versuchsbedingungen waren dafür die gleichen. Die höhere Induktion der *noxa* mRNA schien deshalb besser zu funktionieren, weil die Zellen insgesamt länger leben und sie deshalb die Expression der *noxa* mRNA länger stattfinden kann. *Noxa* mRNA wird damit in der apoptoseauslösenden Situation nicht stark exprimiert. Übereinstimmend mit seiner geringen mRNA Expression war auch der Überlebenseffekt von *noxa*^{-/-} T-Zellen im Vergleich zu den WT T-Zellen nur gering (Abb. 24). T-Zellen wurden dafür mit ConA stimuliert, am dritten Tag gewaschen und anschließend ihr Überleben zu bestimmten Zeitpunkten gemessen. Das zuletzt genannte Experiment wurde in einer Kooperation mit dem

Labor von A. Strasser (Melbourne, Australien) von S. F. Fischer durchgeführt (Bauer et al., 2006).

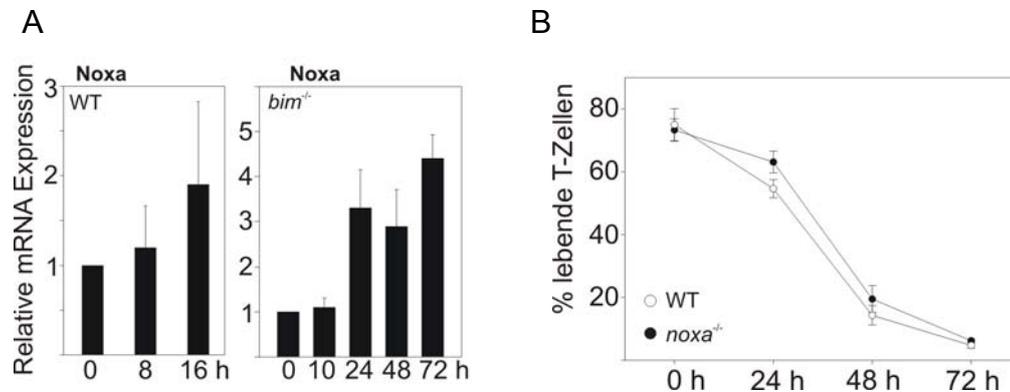


Abb. 24: Untergeordnete Rolle von Noxa im Tod aktivierter T-Zellen

A: T-Zellen von WT oder *bim*^{-/-} Mäusen wurden isoliert und für 3 Tage in Gegenwart von ConA inkubiert. Am Tag 3 wurden die Zellen gewaschen und in 6-Wellplatten transferiert. Nach Inkubation der Zellen für die angegebenen Zeitpunkte wurde die mRNA isoliert und die Menge an Noxa mRNA mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwert und Standardabweichung von 4 WT und 3 *bim*^{-/-} Mäusen.

B: T-Zellen wurden von WT und *noxa*^{-/-} Mäusen isoliert und für 3 Tage mit ConA stimuliert. Am Tag 3 wurden die Zellen gewaschen und in 96-Wellflachbodenschalen transferiert. Das Überleben der Zellen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwert und Standardabweichung von 3 individuellen Mäusen je Genotyp. Die P-Werte für die Signifikanz des Unterschiedes zwischen WT und *Noxa*^{-/-} sind im T-Test: 0 h, 0,668; 24 h, 0,031; 48 h, 0,166; 72 h, 0,069.

3.4 Identifizierung adjuvans-induzierter Faktoren aus DCs

Bisherige Versuche haben gezeigt, dass lösliche adjuvans-induzierte Faktoren aus DCs das Überleben aktivierter T-Zellen verbessern können. Doch aktivierte DCs können zahlreiche Cytokine und Chemokine sekretieren, sodass im weiteren Verlauf der Arbeit getestet werden sollte, welche freigesetzten löslichen Mediatoren dafür verantwortlich gemacht werden können. Von den untersuchten Cytokinen zeigten IL-1, IL-7 und IL-15 einen lebenserhaltenden Effekt in WT T-Zellen, während TNF, IFN α , IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 und IL-16 keinen Schutz vor Apoptose bieten konnten. Wieder wurden gereinigte aktivierte T-Zellen in Gegenwart der Überstände oder eben dieses Mal in Gegenwart der Cytokine inkubiert. Nach 3-tägiger Inkubation wurden die Cytokine ausgewaschen und die Zellen bis zu ihrer Lebend/Tod-Analyse in der Durchflusscytometrie erneut inkubiert. Der lebenserhaltende Effekt von IL-1, IL-7 und

IL-15 zeigte überraschenderweise ähnliche Aktivität in aktivierten T-Zellen von WT, *bcl-3*^{-/-}, *bim*^{-/-} und *puma*^{-/-} Mäusen (Abb. 25) (Bauer et al., 2006). Damit blockiert die Zugabe von Cytokinen die Aktivierung von Bim und Puma. Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass zwischen den beiden Proteinen ein Teil der Regulation gleich ist und dass während des Zelltods von aktivierten T-Zellen ein oder mehrere Reaktionsmechanismen angeschaltet werden, die sowohl Bim als auch Puma aktivieren.

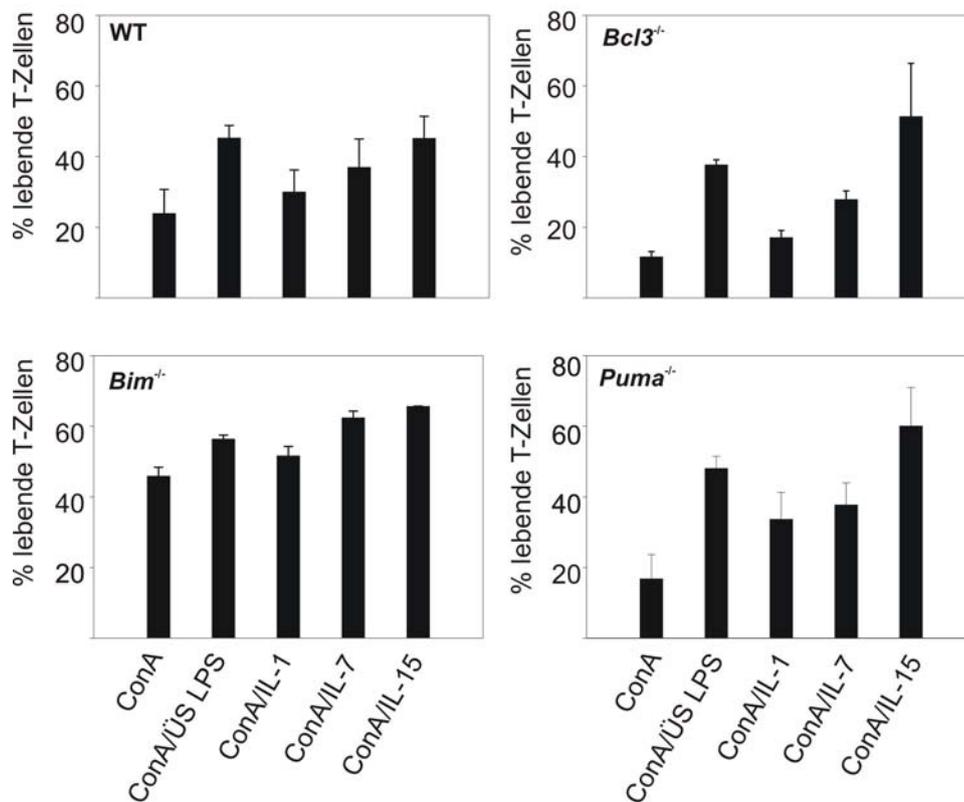


Abb. 25: IL-1, IL-7 und IL-15 verbessern das Überleben von aktivierten T-Zellen

Gereinigte T-Zellen von WT, *bcl-3*^{-/-}, *bim*^{-/-} und *puma*^{-/-} Mäusen wurden entweder nur mit ConA stimuliert oder zusätzlich in Gegenwart von Überständen aus aktivierten BMDDCs (ÜS LPS) (50 % v/v) oder den rekombinanten Cytokinen IL-1, IL-7 oder IL-15 inkubiert. Am Tag 3 wurden die Zellen gewaschen und ohne weitere Wachstumsfaktoren in einfachem Medium aufgenommen. Nach 20 h (48 h für *Bim*-defiziente Zellen) wurde das Überleben der T-Zellen gemessen. Die Daten repräsentieren einen Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

3.5 Proliferation aktivierter T-Zellen nach Adjuvansgabe

Vorige Versuche dieser und anderer Arbeiten hatten gezeigt, dass die Präsenz von Adjuvants das Leben stimulierter T-Zellen verlängern kann (Bauer et al., 2006; Mitchell et al., 2001; Vella et al., 1995). Im Vergleich zu einfach SEB-stimulierten Mäusen führte die weitere Injektion von LPS zu einer erhöhten Anzahl an SEB-stimulierten TCR $\nu\beta$ ⁺ T-Zellen in deren Milz.

Da die erhöhte Anzahl der SEB-stimulierten TCR $\nu\beta$ ⁺ T-Zellen nach LPS-Injektion auch möglicherweise in Zusammenhang mit einer vermehrten Proliferation der Zellen stehen kann, wurde diese in dem gleichen Modell zusätzlich überprüft. Für den Versuch wurden CFSE-gefärbte T-Zellen von WT oder *bim*^{-/-} Mäusen in WT Mäuse injiziert, und diese wurden mit SEB oder SEB und LPS stimuliert. CFSE ist ein Farbstoff, der in Zellen eindringt und dort mit freien Aminogruppen von Proteinen interagiert. Die Zellen entwickeln eine intensive gelbliche Färbung. Bei Zellteilung wird das CFSE zu gleichem Anteil in die Tochterzellen übertragen was zu einem reduzierten CFSE Signal führt. Die Anzahl der Zellteilungen kann anhand der Zahl der Scheitelpunkte ermittelt werden.

Die Proliferation der markierten T-Zellen wurde am Tag 5 nach Transfer bestimmt. Abb. 26 zeigt, dass die unstimulierten CD8⁺ TCR $\nu\beta$ ⁺ Zellen kaum proliferieren, während die SEB und SEB/LPS stimulierten CD8⁺ TCR $\nu\beta$ ⁺ Zellen sich mindestens einmal geteilt haben. Die Proliferationsrate bei den SEB stimulierten Zellen lag etwas niedriger als bei den SEB/LPS stimulierten Zellen. Die Daten für CD4⁺ TCR $\nu\beta$ ⁺ Zellen zeigten ein ähnliches Bild. Die Proliferationsrate der transferierten *bim*^{-/-} T-Zellen ergab keinen Unterschied zu WT transferierten T-Zellen. Damit scheint Bim keine Rolle bei der Proliferation zu spielen. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass die erhöhte Anzahl der TCR $\nu\beta$ ⁺ T-Zellen nach SEB/LPS Stimulation nicht nur auf die verminderte Apoptose sondern auch auf ihre verbesserte Proliferation zurückzuführen ist.

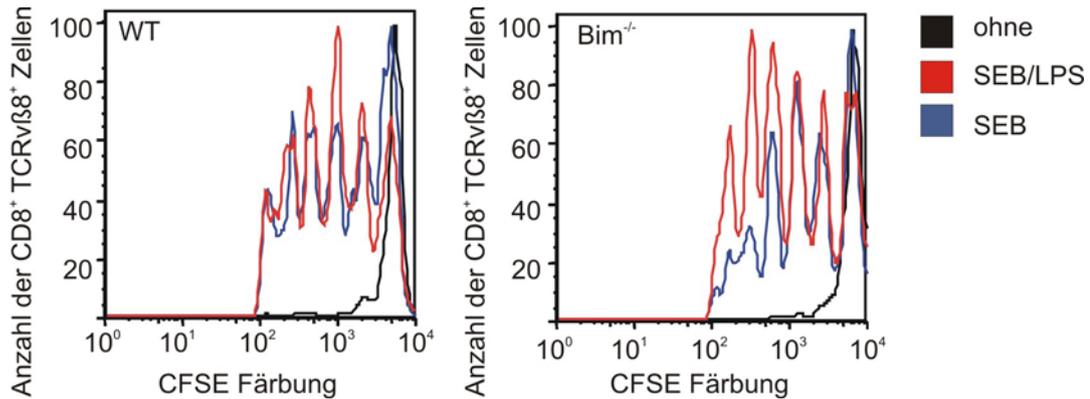


Abb. 26: Proliferation der SEB/LPS-stimulierten transferierten TCRvβ8⁺ T-Zellen

8 x 10⁸ CFSE-markierte T-Zellen von WT und *bim*^{-/-} Mäusen wurden in C57Bl/6 Mäuse transferiert. Am nächsten Tag wurde einem Teil der Mäuse SEB (50 µg) injiziert, dem anderen am folgenden Tag zusätzlich LPS (40 µg). Kontrollmäuse erhielten nur die transferierten T-Zellen. Am Tag 5 nach Zelltransfer wurde den Mäusen die Milz entnommen, und der Anteil der lebenden CFSE-markierten TCRvβ8⁺ Zellen (und damit den SEB reaktiven Zellen) wurde bestimmt. Die Färbung für CD4 oder CD8 positive Zellen diente der weiteren Unterteilung der T-Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden in zwei weiteren Experimenten mit WT-transferierten T-Zellen und in drei weiteren Experimenten für *bim*^{-/-} transferierten T-Zellen erzielt.

3.6 Hochregulation von Bim in Gegenwart antiapoptotisch wirkender adjuvans-induzierter Faktoren

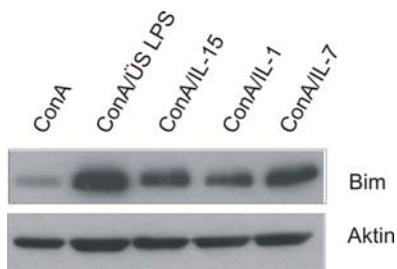
Die proapoptotische Aktivität von BH3-Proteinen steht unter einer strengen Kontrolle, sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranslationaler Ebene (Huang & Strasser, 2000; Puthalakath & Strasser, 2002). Dabei scheint die Expression von Bim von verschiedenen Regulatoren abhängig zu sein. Der Mangel an Wachstumsfaktoren oder Cytokinen führte in unterschiedlichen Zelltypen zu einer Aktivierung der Proteinkinase JNK (Harris & Johnson, 2001; Putcha et al., 2001; Whitfield et al., 2001), des Erk1/2 Signalweges (Weston et al., 2003), des Forkhead-like Transkriptionsfaktor FKHR-L1 (Dijkers et al., 2000) des MAPK Signalweg oder der PI3-Kinase (Shinjyo et al., 2001), die alle zur veränderten Expression von Bim führten. In Western Blot Analysen sollte überprüft werden, auf welche Art und Weise die DC-gereiften Cytokine einen Einfluss auf die Expression von Bim und auf andere pro- und antiapoptotische Proteine haben

In dem hier gezeigten Versuch induziert die Zugabe von Überständen von LPS-aktivierten DCs oder von den Cytokinen IL-1, IL-7 oder IL-15 eine erhöhte

Expression von Bim (Abb. 27) /Bauer et al., eingereicht). Bisher wurde die erhöhte Expression von Bim gleichgestellt mit vermehrter Apoptose. Bereits in vorherigen Experimenten (Abb. 25) konnte gezeigt werden, dass in aktivierten T-Zellen von WT Mäusen die Zugabe von Überständen von LPS-aktivierten DCs oder von den hier aufgeführten Cytokinen zu besserem Überleben führt. Um zu testen, ob die apoptotische Aktivität von Bim durch die Hochregulation von antiapoptotischen Proteinen gemindert wird, wurden Western Blots gegen Bcl-X_L, Mcl-1, Bax und Bcl-2 durchgeführt. Abb. 27 zeigt, dass die Expression von Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-2 und Bax in Gegenwart von Überstand aktivierter DCs unverändert blieb (Kirschnek/Bauer et al., eingereicht). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch Puma in T-Zellen inkubiert mit Überstand von gereiften DCs unverändert blieb. Die Daten nach Zugabe der Interleukine sind nicht konsistent. Der hier abgebildete Western Blot zeigt zwar, dass Bcl-X_L in der Gegenwart der einzelnen Cytokine hochreguliert, Bcl-2 in der Gegenwart von IL-1 und IL-7 herunterreguliert und Mcl-1 in Gegenwart von IL-1 hochreguliert ist und zudem eine leichte Erhöhung von Puma in Gegenwart der Interleukine zu verzeichnen ist, doch andere Western Blots haben dieses Ergebnis nicht bestätigen können. Die Zugabe der Interleukine zeigte in den durchgeführten Western Blot Analysen kein konsistentes Bild.

Nur das Ergebnis mit T-Zellen inkubiert mit Überstand gereifter DCs haben ein einheitliches Bild gezeigt. Die unveränderte Expression der antiapoptotischen Proteine in T-Zellen, die mit Überstand aktivierter DCs inkubiert wurden, deutet darauf hin, dass eine posttranslationale Regulation von Bim wahrscheinlich ist, die hier für die Auslösung des Zelltods benötigt wird. Auf posttranslationaler Ebene wurde postuliert, dass die Aktivierung von Bim durch seine Bindung an das Cytoskelett reguliert wird (Puthalakath et al., 1999). Eine posttranslationale Phosphorylierung wird ebenfalls diskutiert (Biswas & Greene, 2002; Luciano et al., 2003; Shinjyo et al., 2001). Damit scheint die bisherige Schlussfolgerung, dass die Hochregulation von Bim zumindest in aktivierten T-Zellen direkt mit der Auslösung der Apoptose korreliert, nicht zulässig. Posttranslationale Regulationswege, die zur apoptose-auslösenden Wirkung führen, scheinen dazwischen geschaltet zu sein.

A:



B:

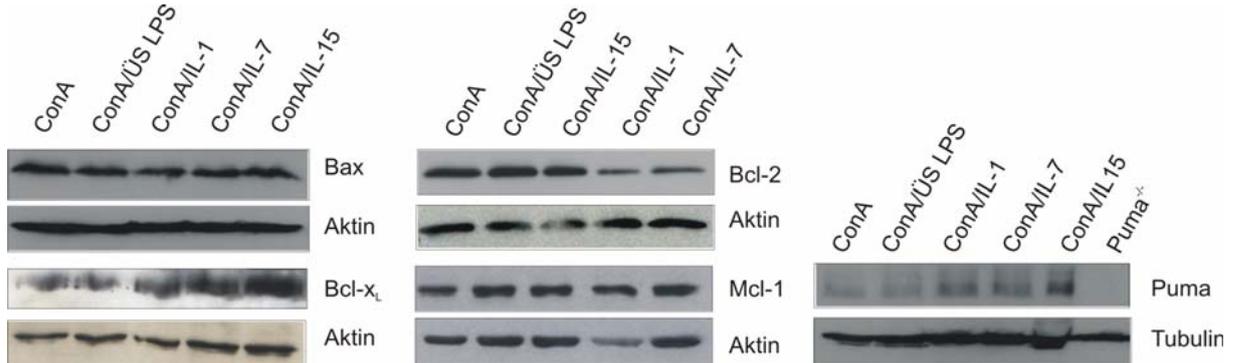


Abb. 27: Proteinexpression nach Zugabe DC-gereifter Faktoren

A:Lösliche DC-gereifte Faktoren führen zu einer Hochregulation des BH3-Proteins Bim

Nach Isolation der T-Zellen aus der Milz von WT Mäusen wurden diese für drei Tage in der Gegenwart von ConA alleine oder zusätzlich mit Überstand von LPS-aktivierten BMDDC (ÜS LPS) (50 % v/v) oder mit IL-1, IL-7 oder IL-15 inkubiert. Als Ladekontrolle diente Aktin. Vier weitere Experimente mit gleichem Ergebnis wurden durchgeführt.

B: Regulation weiterer Proteine der Bcl-2 Familie durch DC-gereiften Überstand

T-Zellen (10^6 / ml) wurden mittels negativer Selektion aus der Milz von WT Mäusen aufgereinigt und in 6-Wellplatten für 3 Tage entweder nur mit ConA oder in der gleichzeitigen Gegenwart von BMDDC-gereiftem LPS-aktivierten Überstand (ÜS LPS) (50 % v/v) oder IL-1, IL-7 oder IL-15 inkubiert. Am Tag 3 wurden die T-Zellen in Homogenisatpuffer aufgenommen, und der Gehalt der Proben wurde auf Bcl-X_L, Bcl-2, Puma, Mcl-1 und Bax getestet. Als Ladekontrolle diente entweder der Antikörper gegen Tubulin oder gegen Aktin. Ein weiteres Experiment wurde für jeden hier dargestellten Antikörper durchgeführt, zeigte aber nur für den ÜS LPS ein einheitliches Ergebnis. Die Expression nach Interleukingabe schien nicht konsistent zu sein.

4 Diskussion

Das Ende einer Immunantwort wird vor allem durch die Reduktion der Population aktivierter T-Zellen gekennzeichnet. Diese Zellen sterben in einem streng regulierten Prozess, der als Apoptose bezeichnet wird. Das derzeitige Modell des Zelltods von aktivierten T-Zellen wird durch ein Zusammenspiel von Bcl-2 Familienmitgliedern beschrieben, in dem das BH3-Protein Bim die beiden proapoptotischen Proteine Bax und Bak aktiviert. Auf der Suche nach weiteren beteiligten Faktoren zeigte sich, dass die Präsenz von Adjuvans den Zelltod der aktivierten T-Zellen reduzieren konnte. Zusätzlich schien auch Bcl-3 eine inhibierende Rolle zu spielen. So waren zu Beginn der Arbeit mindestens drei Faktoren, Bim, Bcl-3 und adjuvans-induzierte Faktoren identifiziert, die einen Einfluss auf den Zelltod aktivierter T-Zellen haben.

4.1 Adjuvans-induziertes Überleben von T-Zellen

Während einer Infektion werden T-Zellen nicht nur durch den TCR aktiviert sondern auch durch APC-abhängige adjuvans-induzierte Faktoren. Die Aktivierung von APCs führt zur Hochregulation von kostimulatorischen Signalen und der Freisetzung von Cytokinen und Chemokinen. Die Vorstellung, dass APCs am besseren Überleben involviert sind, wurde durch die Tatsache unterstrichen, dass die Präsenz von anti-CD40, ein hauptsächlicher DC-Stimulus, die Anzahl der aktivierten T-Zellen nach einer Immunantwort erhöht (Marrack & Kappler, 2004). Und tatsächlich konnte im ersten Teil der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Präsenz von Adjuvans das Überleben der aktivierten T-Zellen *in vivo*, *ex vivo* und *in vitro* verbessert (Bauer et al., 2006). *In vivo* konnte beobachtet werden, dass nach Injektion von SEB die Gegenwart von LPS im Vergleich zu CpG1668 einen weitaus größeren Schutz vor Apoptose bietet. Den schwächeren Überlebenseffekt von CpG1668 kann man mit der Beobachtung von Gao et al. in Zusammenhang bringen, dass die Inkubation einer murinen Makrophagenzelllinie mit Adjuvans in der Microarrayanalyse zeigte, dass CpG1668 regulierte Gene nur einen Teil der LPS-regulierten Gene repräsentieren und diese auch schwächer beeinflussen (Gao et al., 2002). Weitere Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden deshalb anschließend mit LPS durchgeführt und mit den wichtigsten APCs, den hoch spezialisierten DCs.

Schließlich sollte überprüft werden, ob lösliche oder membrangebundene Faktoren der aktivierten DCs Einfluss auf das bessere Überleben der aktivierten T-Zelle nehmen. Es wurde Überstand von LPS-stimulierten DCs generiert. Die Inkubation von aktivierten T-Zellen mit diesem adjuvans-induziertem DC-konditioniertem Überstand führte zu einem Überlebensvorteil, den man sowohl in ConA stimulierten als auch CD3/CD28 stimulierten T-Zellen beobachten konnte. Auch in diesen Untersuchungen führte die Stimulation mit LPS im Vergleich zu CpG-DNA zu einer erhöhten Überlebensrate der aktivierten T-Zellen. Damit scheinen DC-gereifte lösliche Faktoren für das bessere Überleben verantwortlich zu sein und ein direkter Zellkontakt zwischen der APC und der T-Zelle nicht notwendig (Bauer et al., 2006). Man sieht auch hier, dass die Wirkung von LPS im Vergleich zu CpG1668 stärker ist. Zudem hat die alleinige Zugabe von LPS, das durch den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) erkannt wird, keinen direkten Einfluss auf die T-Zelle. Das Überleben entspricht dem der ConA-aktivierten T-Zelle. Es ist zwar klar, dass TLR4 auf regulatorischen CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen und naiven CD4⁺ T-Zellen exprimiert wird, doch in aktivierten CD4⁺ T-Zellen konnte kein TLR4 nachgewiesen werden (Caramalho et al., 2003; Gelman et al., 2004).

Zusätzlich wurde die Bedeutung des MyD88-abhängigen Signalweges in der Cytokin- und Chemokinproduktion der APCs untersucht. In den Signaltransduktionswegen der TLRs sind der MyD88-abhängige und der MyD88-unabhängige Weg bekannt. Der MyD88-abhängige Weg führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB, AP-1 und IRF5, während der MyD88-unabhängige Weg für die Aktivierung von IRF3 und der späteren Aktivierung von NF-κB und MAPK verantwortlich ist (Kaisho & Akira, 2006; West et al., 2006). Die Bindung von LPS an TLR4 führt zur Aktivierung beider Signalwege, während die Bindung von CpG1668 an den TLR9 ausschließlich in die Aktivierung des MyD88-abhängigen Signalweges mündet. Die Bedeutung des MyD88-abhängigen Signalweges ist in MyD88-defizienten Makrophagen gezeigt, deren Cytokinproduktion nach TLR Stimulierung drastisch reduziert ist (West et al., 2006).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass lösliche Faktoren wie Cytokine und Chemokine für das Überleben von aktivierten T-Zellen verantwortlich sind. Und so führt in aktivierten T-Zellen die Verwendung von Überständen von adjuvans-induzierten DCs von MyD88-defizienten Mäusen zu einem schlechteren Überleben als die Verwendung von Überständen aus WT Mäusen. Die höhere antiapoptotische

Restaktivität nach LPS-Stimulation kann auf die Cytokinproduktion, vermittelt durch den MyD88-unabhängigen Signalweg, zurückgeführt werden. Obwohl die Cytokinproduktion nach Zugabe von CpG1668 ausschließlich durch den MyD88-abhängigen Weg vermittelt wird, ist trotzdem noch eine leichte antiapoptotische Wirkung auf die aktivierten T-Zellen festzustellen. Dies kann zum einen durch eine endotoxinhaltige Kontamination des CpG1668 erklärt werden, oder aber mit der Beobachtung von Gelman et al., dass aktivierte CD4⁺ T-Zellen TLR9 exprimieren und durch CpG-DNA-Gabe direkt am Leben gehalten werden können (Gelman et al., 2004).

4.1.1 Identifikation von apoptoseinhibierenden Cytokinen

Eine Fragestellung, die zudem in dieser Arbeit untersucht wurde, war die Beteiligung bestimmter Cytokine oder Chemokine am Überleben der aktivierten T-Zellen. Bisher wurden zahlreiche Cytokine nachgewiesen, die von DCs nach TLR Stimulierung sezerniert werden. Unterschiede in der Expression der Cytokine ergeben sich aus den Subpopulationen der DCs und in der Generierung der DCs mittels GM-CSF oder Flt-3 (Parajuli et al., 2001; Wu & Dakic, 2004). Allgemein akzeptiert ist allerdings die Tatsache, dass es nach TLR-Stimulierung zur Sekretion von Typ-I-Interferonen, (Oshiumi et al., 2003), TNF α , IL-6, IL-8, IL-12 (West et al., 2006), IL-1, IL-7, IL-18 (Morelli et al., 2001) IL-15 (Ma et al., 2006) und IL-4 (Honda & Taniguchi, 2006) kommt. Die Expression von IL-2 als Antwort auf bakterielle Stimuli ist schwach ausgeprägt (Ma et al., 2006). Da am Ende einer Immunantwort die Menge dieser freigesetzten Cytokine reduziert wird, wurde diese Verarmung an Wachstumsfaktoren mit dem Zelltod der aktivierten T-Zellen in Zusammenhang gebracht. *In vivo* gibt es klare Hinweise darauf, dass Cytokine und Chemokine das Leben von aktivierten T-Zellen verlängern können. So haben Mäuse, denen bestimmte Chemokin- oder Cytokinrezeptoren fehlen, Veränderungen in bestimmten T-Zell Populationen (Dooms & Abbas, 2006; Williams et al., 2006). Es wurde beispielsweise gezeigt, dass nach adoptivem Transfer IL-2-defizienter aktivierter T-Zellen keine Gedächtniszellen in der Milz der Empfängermaus nach 6 Wochen vorliegen. Hildeman et al. argumentieren für das Modell der Cytokinverarmung, weil der größte Teil des Superantigens schon nach 24 h aus den Mäusen verschwunden ist, und damit der Level des Superantigens abfällt, bevor die T-Zellen anfangen

abzusterben (Hildeman et al., 2002). Außerdem ist das höchste Niveau der Cytokinproduktion erreicht und fällt schon ab, wenn die ersten T-Zellen sterben (Hildeman et al., 2002). Zudem haben bestimmte Cytokine, insbesondere solche, die durch die gemeinsame gamma-Kette reguliert werden (IL-2, IL-4, IL-7 und IL-15) (Vella et al., 1998) aber auch Typl-Interferone (Marrack et al., 1999) und IL-12 (Valenzuela et al., 2005) einen Überlebensseffekt auf aktivierte T-Zellen gezeigt. In dem hier etablierten *in vitro* System konnte ein antiapoptotischer Effekt nach Zugabe von IL-1, IL-7 und IL-15 hervorgerufen werden (Bauer et al., 2006). IL-15 lieferte das am stärksten ausgeprägte Überlebenssignal. TNF α , IFN α , IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 und IL-16 konnten keinen Schutz vor Apoptose bieten. Zumindest führten sie in dem hier etablierten Versuchsmodell, in dem die Cytokine nur während der primären Stimulierung vorhanden sind und dann ausgewaschen werden, zu keinem Überlebensseffekt. Überlebenssignale können durch Cytokine hervorgerufen werden, die lediglich während der Stimulierung benötigt werden oder aber durch Cytokine, die erst dann in Erscheinung treten, wenn die T-Zellen schon längst aktiviert worden sind. IL-1, IL-7 und IL-15 gehören zu den Faktoren, die lediglich während der Stimulierung notwendig sind und dann selbst nach ihrer Entfernung noch antiapoptotisch wirken können. Ob IL-15 hier tatsächlich das stärkste antiapoptotische Signal darstellt, oder aber die Sensitivität durch die unterschiedlich starke Expression der Rezeptoren oder die Bindungsaffinität an den Rezeptor beeinflusst wird, bleibt ungewiss (Ma et al., 2006), denn Kovanen und Leonard berichten von einer stark überlappenden Genexpression nach Stimulierung von aktivierten T-Zellen mit IL-2, IL-7 und IL-15 (Kovanen & Leonard, 2004). Die Mechanismen und Signalwege, wie diese Faktoren zum Überleben der aktivierten T-Zellen beitragen, sind unklar. Ein Einfluss auf die Expression oder Aktivierung der im mitochondrialen Signalweg angesiedelten Proteine ist wahrscheinlich und wird im späteren Abschnitt diskutiert (4.2.4).

Mittels Transfer von CFSE-markierten T-Zellen wurde zudem überprüft, ob die Proliferation von SEB/LPS behandelten TCR $\nu\beta 8^+$ Zellen gegenüber SEB behandelten TCR $\nu\beta 8^+$ Zellen verändert ist. Tatsächlich erhöht die Gegenwart von LPS die Proliferation der TCR $\nu\beta 8^+$ Zellen. Der Effekt ist gering, sodass die erhöhte Anzahl der TCR $\nu\beta 8^+$ hauptsächlich auf verminderte Apoptose und nicht auf verbesserte Proliferation der Zellen beruht. In den *in vitro* Versuchen kann der Einfluss von erhöhter Proliferation nach Cytokingabe als Grund für die erhöhte

Anzahl lebender T-Zellen ausgeschlossen werden: in den hier gezeigten Experimenten sind die Cytokine nur während der Stimulierung präsent und werden dann ausgewaschen. Nach dem Waschen haben sie keinen direkten Einfluss mehr auf die Proliferation der Zellen. Ein Unterschied in der Proliferation zwischen Bim-defizienten und WT T-Zellen konnte zudem nicht gezeigt werden. Die Präsenz von Bim scheint damit zumindest keinen Einfluss auf die Proliferation von aktivierten T-Zellen zu zeigen.

4.1.2 Rolle von Bcl-3 im adjuvans-induzierten Überleben von T-Zellen

Das adjuvans-induzierte Überleben war bisher auch mit einer Hochregulation von Bcl-3 in Zusammenhang gebracht worden (Mitchell et al., 2001). *In vivo* ergab der Genexpressionsvergleich von SEB mit SEB/LPS stimulierten $V\beta 8^+$ T-Zellen eine 17-fache Induktion der *bcl-3* mRNA in den zusätzlich mit LPS behandelten Mäusen. Die retrovirale Überexpression bestätigte eine Beteiligung von Bcl-3 am Überleben der aktivierten T-Zellen. Über die antiapoptotische Funktion von Bcl-3 war spekuliert worden, dass es die Expression von mitochondrialen Transportern und Kanälen reguliert (Marrack & Kappler, 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte die Hochregulation der *bcl-3* mRNA mit SEB/LPS im Vergleich zu SEB bestätigt werden, obwohl das Ausmaß nicht so ausgeprägt war. Ein Grund dafür könnte in der zusätzlichen Injektion von Anti-CD40 in dem von Mitchell et al. durchgeführten Versuch liegen (Mitchell et al., 2001), welches den adjuvans-induzierten Effekt von LPS potenzieren kann (Vella et al., 1997). In der hier vorgestellten Arbeit konnte die Hochregulation der *bcl-3* mRNA aber auch auf Proteinebene bestätigt werden: die Präsenz des Adjuvans oder des Überstandes von adjuvans-induzierten DCs führte *in vitro* zu einer Hochregulation von Bcl-3 (Bauer et al., 2006).

Schließlich sollte der Überlebenseffekt von Bcl-3 in adjuvans-behandelten aktivierten T-Zellen mit Bcl-3-defizienten Mäusen bestätigt werden. Hier zeigte sich ein unerwartetes Ergebnis: sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führt die Gegenwart von LPS in aktivierten T-Zellen von *bcl-3*^{-/-} Mäusen immer noch zu einem besseren Überleben. Und auch DC-gereifte adjuvans-induzierte Faktoren begünstigen das Überleben der aktivierten T-Zellen von *bcl-3*^{-/-} Mäusen. Die Überlebensfaktoren, zu denen IL-1, IL-7 und IL-15 zählen, und die von adjuvans-induzierten DCs freigesetzt werden,

scheinen damit ihre antiapoptotische Wirkung hauptsächlich durch einen Bcl-3-unabhängigen Weg auszuüben (Bauer et al., 2006).

Dieses Ergebnis weist außerdem daraufhin, dass zusätzliche Bcl-3-unabhängige adjuvans-induzierte Signalwege existieren, die ihren Teil am Überleben der aktivierten T-Zellen beitragen.

4.2 Mediatoren im Zelltod aktivierter T-Zellen

Der Zelltod aktivierter T-Zellen wird aber trotzdem durch die Präsenz von Bcl-3 beeinflusst. Die retrovirale Überexpression von Bcl-3 hatte in aktivierten T-Zellen zu einem besseren Überleben geführt (Mitchell et al., 2001). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass aktivierte T-Zellen von WT Mäusen besser überleben als aktivierte T-Zellen von Bcl-3-defizienten Mäusen (Bauer et al., 2006). Das bessere Überleben ist in ruhenden T-Zellen nicht zu detektieren. Ein weiterer Versuch hat gezeigt, dass der Überlebensvorteil der aktivierten WT T-Zellen gegenüber Bcl-3-defizienten T-Zellen nicht auf unterschiedlich vorhandene lösliche Faktoren in der Gesamtmilz-Zellsuspension zurückzuführen ist. Die Zusammensetzung der löslichen Faktoren in den WT als auch Bcl-3-defizienten Überständen scheint die gleiche zu sein, da deren Austausch zu keinem veränderten Überleben der T-Zellen führt. Der Überlebensdefekt der Bcl-3-defizienten aktivierten T-Zellen ist damit ausschließlich auf den Defekt der T-Zellen zurückzuführen und nicht auf einen Defekt anderer Zellen, wie zum Beispiel von DCs in der Milzszellsuspension.

Der Überlebensvorteil der aktivierten WT T-Zellen gegenüber aktivierten Bcl-3-defizienten T-Zellen kann schon am ersten Tag nach Inkubation detektiert werden. Das Fehlen von Bcl-3 scheint damit schon früh nach Stimulierung einen Effekt auf die aktivierten T-Zellen auszuüben. Die aktivierten T-Zellen der *bcl-3*^{-/-} Mäuse zeigen zudem keine höhere Sensibilität gegenüber spezifischer Apoptosestimuli (Staurosporin, Etoposide, UV-Strahlung, Ionomycin, Taxol und Dexamethason). Aus diesem Grund scheint Bcl-3 spezifisch den Tod von mitogen- oder antigenaktivierten T-Zellen zu verhindern.

Anschließend wurde getestet, ob Überexpression von Bcl-3 zu einem verbesserten Überleben beitragen kann. Wie von Mitchell et al. mit SEB-aktivierten T-Zellen *in vivo* gezeigt worden ist, bestätigt diese Arbeit *in vitro*, dass die retrovirale Überexpression von Bcl-3 in aktivierten T-Zellen zum Überleben führt (Mitchell et al., 2001). Bcl-3

vermittelt damit einen Schutz vor Apoptose in aktivierten T-Zellen. Im adjuvans-induzierten Überleben mag Bcl-3 zwar mitwirken, liefert aber nicht das essentielle Überlebenssignal (Bauer et al., 2006).

4.2.1 Bim-abhängiger Zelltod

Im Vordergrund der weiteren Untersuchung des Zelltods stand die molekulare Aufklärung, wie Bcl-3 den Zelltod der aktivierten T-Zellen verhindert. Bcl-3 ist ein Mitglied der I κ B Familie und eine Möglichkeit wäre, dass es die Expression bestimmter im Signalweg der Apoptose lokalisierten Gene reguliert. Chilton und Mitchell haben gezeigt, dass die Überexpression der anderen I κ B-Moleküle die aktivierten T-Zellen ebenfalls vor Apoptose schützt (Chilton & Mitchell, 2006). Andere korrelieren die Expression von c-Rel mit verstärktem Zelltod (Mitchell et al., 2002). Aus diesem Grund wurde der Schutz vor Apoptose mit einer erhöhten Anzahl an I κ B-Molekülen in Zusammenhang gebracht, die mehr c-Rel binden und damit die Expression apoptotischer Moleküle verhindern (Chilton & Mitchell, 2006). Die Beobachtung von Viatour et al., dass Bcl-3 mit NF- κ B1 oder NF- κ B2 Homodimeren interagiert, um den *bcl-2* Promotor stärker zu transaktivieren (Viatour et al., 2003), führte zur Annahme, dass die antiapoptotische Wirkung von Bcl-3 in den aktivierten T-Zellen möglicherweise durch Hochregulation von Bcl-2 stattfinden könnte.

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten weisen jedoch darauf hin, dass die antiapoptotische Wirkung von Bcl-3 nicht auf diese Art und Weise reguliert wird. Der Vergleich der Genexpression aktivierter T-Zellen von WT und *bcl-3*^{-/-} Mäusen mittels Microarray ergab kein unterschiedlich reguliertes bekanntes Gen, das in der Apoptose eine Rolle spielt. Es waren weder antiapoptotisch wirkende Gene (*bcl-2*, *bcl-x_L*, *mcl-1*, *a1*) hochreguliert, noch apoptotisch wirkende Gene (*bax*, *bak*, *puma*, *bmf*, *hrk*, *bad*, *bik*, *bid*, *noxa*) herunterreguliert. Aus diesem Grund mussten andere Regulationsmöglichkeiten in Betracht gezogen werden.

Die Beteiligung von Bim am Zelltod aktivierter T-Zellen ist gesichert, doch auf welche Art und Weise das Protein reguliert wird, war unklar. Eine erhöhte Bimexpression wird in Zusammenhang mit einer Sensibilisierung gegenüber bestimmten apoptoseauslösenden Signalen gebracht. Die Proteinexpression von Bim ist in vielen Zellen detektierbar. Auch in T-Zellen ist die Expression von Bim nachzuweisen und diese ändert sich mit Aktivierung nicht (Hildeman et al., 2002). Im vergleichenden

Genearray wurde Bim allerdings in den Bcl-3-defizienten T-Zellen lediglich 1,6 fach hochreguliert, und eine Erhöhung gegenüber den WT T-Zellen war in der Western Blot Analyse nur minimal zu erkennen (Bauer et al., 2006). Eine Aussage darüber zu treffen, ob dieser Expressionsunterschied signifikant ist, ist kaum möglich. Puthalakath et al. veröffentlichten 1999 das Modell, dass Bim_{EL} und Bim_L über LC8 (dynein light chain 8) des Dyneins an das Cytoskelett des Mikrotubuli assoziiert sind und sich dadurch in einem inaktiven Zustand befinden (Puthalakath et al., 1999). Allerdings beschreibt eine erst 2004 veröffentlichte Studie die Lokalisation von Bim in T-Zellen bereits an der Mitochondrienmembran, wo es möglicherweise unter der Kontrolle der antiapoptotischen Bcl-2 Proteine steht (Zhu et al., 2004). Die Lokalisation von Bim in T-Zellen wird daher kontrovers diskutiert, und stellen das Modell der Lokalisation von Bim am Cytoskelett in Frage.

4.2.1.1 Zusammenspiel von Bcl-3 und Bim

Trotzdem bestand die Möglichkeit, dass Bcl-3 an der posttranslationalen Regulation von Bim, seiner Freisetzung vom Cytoskelett, beteiligt ist. Ein solcher Test wurde in aktivierten T-Zellen durchgeführt, in denen Apoptose mittels Entzug von Wachstumsfaktoren ausgelöst wurde. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Bcl-3 die Aktivierung und Freisetzung von Bim vom Cytoskelett reguliert (Bauer et al., 2006). Die Menge an freigesetztem Bim in Bcl-3-defizienten T-Zellen war im Vergleich zu WT T-Zellen während der Apoptose erhöht. Eine Bestätigung einer solchen Signalkaskade erfolgte in einem retroviralen Expressionsexperiment. Die Überexpression von Bcl-3 führte nur in aktivierten T-Zellen von WT Mäusen zu verminderter Apoptose. Der Effekt war in Bim-defizienten Mäusen nicht mehr zu sehen. Dies spricht dafür, dass Bcl-3 für seine Funktion Bim benötigt. Sobald Bim fehlt, kommt es zu einer Verzögerung der Auslösung der Apoptose, aber Bcl-3 kann keine zusätzliche Verzögerung herbeiführen. Damit verhindert möglicherweise Bcl-3 die Freisetzung von Bim vom Cytoskelett und damit auch die Auslösung der Apoptose. Die Fragestellung, die anschließend untersucht werden sollte, war die Art und Weise wie Bcl-3 die Freisetzung von Bim vom Cytoskelett bewerkstelligt.

4.2.1.2 Mögliche Bcl-3 regulierte Zielgene

Da Bcl-3 zu der Familie der Transkriptionsfaktoren gehört, besteht die Möglichkeit, dass Bcl-3 zum einen Gene hochreguliert, die zur Aktivierung von Bim notwendig sind oder aber Bim-aktivierende Gene herunterreguliert. Da es sich um Signalkaskaden handelt, die vermutlich am Cytoskelett stattfinden, wurde hauptsächlich nach mikrotubuli-assoziierten Kandidaten gesucht. Unter denen im Microarray gefundenen 258 Kandidaten schienen nur 3 mit dem Mikrotubuli assoziiert zu sein: KIF21B, MARK4 und EBF3 (Hacker et al., 2006).

Das Protein KIF21B, einem bisher einmalig erwähnten Kinesin-Motorprotein (Marszalek et al., 1999) ist hauptsächlich in Dendriten lokalisiert. Es wurde sowohl im Gehirn als auch der Milz wiedergefunden. Dort spielt es als Motorprotein eine Rolle am wachsenden Pol des Mikrotubuli.

MARK4 wird als ein Protein beschrieben, das durch seine Kinaseaktivität Mikrotubuli-assoziierte Proteine phosphoryliert und dadurch direkt an der Organisation der Mikrotubuli beteiligt ist. Ihm wird eine Funktion in neuronalen Zellen bei der Ausbildung der Alzheimer Krankheit zugeschrieben. Es hyperphosphoryliert Tau Protein, das an der Ausbildung der Alzheimer Krankheit beteiligt ist. (Drewes et al., 1998; Trinczek et al., 2004). Erst kürzlich wurde herausgefunden, dass es in der Maus bei fokaler Ischämie stark hochreguliert wird (Schneider et al., 2004).

Ein aussichtsreicher Kandidat war das Mikrotubuli-assoziierte Protein RP/EB family, member 3, auch EBF3 genannt. EBF3 gehört zu der Familie der +TIPs (plus-Endenbindendes Protein). Dort ist es beteiligt am Aufbau und der Stabilität der Mikrotubuli. Es ist ubiquitär vorhanden (Nakagawa et al., 2000; Su & Qi, 2001) und kann bei erhöhter Expression mit dem ganzen Mikrotubulus assoziieren, wo es für vermehrte Acetylierung verantwortlich gemacht wurde (Bu & Su, 2001; Juwana et al., 1999; Nakagawa et al., 2000).

Die Beteiligung von KIF21B, MARK4 oder EBF3 an der Aktivierung und Freisetzung von Bim konnte bei Abschluß der Arbeit nicht ausreichend geklärt werden. Für EBF3 wurde zunächst in einem Transfektionsexperiment getestet, ob seine Überexpression am Überleben von T-Zellen beteiligt ist. Obwohl andere Zelltypen (WEHI, Jurkat E) mit dem Plasmid transfiziert werden konnten, war dies mit aktivierten T-Zellen aus WT Mäusen nicht möglich. Selbst die Verwendung Vav-Bcl-2 transgener T-Zellen konnte die Effizienz nicht erhöhen. Über eine apoptotische Wirkung des

überexprimierten EBF3 und der sofortigen Apoptose transfizierter T-Zellen kann nur spekuliert werden. WEHI und Jurkat E Zellen zeigten nach Transfektion mit *ebf3* kein verändertes Überleben im Vergleich zu den mit Kontrollvirus infizierten Zellen.

Möglicherweise führt eine weitere Genexpressionsanalyse von aktivierten T-Zellen von *nf-κB1*- und *nf-κB2*-Deletionsmutanten zu dem richtigen Bcl-3 regulierten Kandidaten, der die Freisetzung von Bim verhindert. Von Puthalakath und Strasser wurde zum Beispiel die Cyclin-abhängige Kinase CDK5 als ein möglicher Regulator betrachtet, der die Funktion des Dyneinmotorkomplexes und die Freisetzung von Bim beeinflusst (Puthalakath & Strasser, 2002). Es ist bekannt, dass MARK4 und CDK5 gemeinsam die Destabilisierung und die Transporteigenschaften des Mikrotubulus beeinflussen. Die Phosphorylierung von Tau durch MARK katalysiert seine weitere Hyperphosphorylierung durch CDK5 und GSK-3, was die Freisetzung von Tau und die Destabilisierung des Mikrotubulus herbeiführt (Drewes, 2004).

4.2.1.3 Beteiligung von NF-κB1 und NF-κB2

Es ist bekannt, dass die Proteine der Transkriptionsfaktorfamilie NF-κB/Rel und IκB unter anderem die Empfindlichkeit von Immunzellen gegenüber Apoptose-induzierenden Stimuli regulieren (Karin & Lin, 2002). In verschiedenen Zellsystemen übernimmt NF-κB/Rel eine Rolle als antiapoptotischer Faktor ein. Die Bedeutung der einzelnen NF-κB/Rel Untereinheiten und IκBs und ihre molekulare Wirkungsweise in der Resistenz gegenüber Apoptose ist aber bisher noch nicht vollständig geklärt. Die bisher verfügbaren Daten beziehen sich meist auf Überexpressionssysteme und einer phänotypischen Hemmung der Apoptose durch NF-κB/Rel Aktivierung (Karin & Lin, 2002). Zweifellos spielt NF-κB/Rel eine Rolle in der Apoptose. Dies konnte mit Mäusen belegt werden, denen Komponenten aus dem klassischen NF-κB-Signalweg fehlen, denn diese sterben aufgrund massiver TNF-induzierter Leberapoptose (Beg et al., 1995; Li et al., 1999; Makris et al., 2000). Für den NF-κB/Rel vermittelten Schutz vor Apoptose ist die Induktion von Genen notwendig (Liu et al., 1996), zu denen Kandidaten wie Bcl-X_L, A1, Mitglieder der Familie der IAPs (Inhibitors of Apoptosis) und c-Flip gehören (Karin & Lin, 2002). Meist wurde in diesen Experimenten aber nur eine Korrelation zwischen Genexpression und Schutz vor Apoptose gezeigt (Karin & Lin, 2002). Die exakte molekulare Rolle von NF-κB/Rel bei der Induktion einer zellulären Resistenz gegen Apoptose muss erst noch in

Deletionsmutanten oder Knock-down-Experimenten geklärt werden (Hacker et al., 2006).

Bisherige Untersuchungen von Bcl-3 haben seine bevorzugte Interaktion mit NF- κ B1 und NF- κ B2 Homodimeren postuliert (Fujita et al., 1993) und die Regulation der NF- κ B Aktivität durch Bcl-3 mit verschiedenen aktivierenden und inhibierenden Mechanismen in Zusammenhang gebracht. Die überlappenden Phänotypen zwischen *bcl-3*^{-/-}, *nf- κ B1*^{-/-} und *nf- κ B2*^{-/-} Mäusen sprechen ebenfalls für einen gemeinsam regulierten Signalweg zwischen Bcl-3 und den beiden anderen Untereinheiten. Der Defekt der *bcl-3*^{-/-} Mäuse in der lymphoiden Organogenese ähnelt dem Defekt in *nf- κ B2*^{-/-} Mäusen. Zudem sind sowohl Bcl-3 als auch NF- κ B1 in der Homeostase von Muskelgewebe beteiligt (Gerondakis et al., 2006).

Das Zusammenspiel von Bcl-3 mit NF- κ B1 und NF- κ B2 Homodimeren machte eine Beteiligung dieser Interaktionen auch im Zelltod aktivierter T-Zellen wahrscheinlich. Die Untersuchung ergab, dass aktivierte T-Zellen von *nf- κ B1*^{-/-} Mäusen schlechter, aktivierte T-Zellen von *nf- κ B2*^{-/-} Mäusen dagegen besser überleben als die von WT Mäusen. Damit scheint NF- κ B1 durch Interaktion mit Bcl-3 eine antiapoptotische Funktion auszuüben, während NF- κ B2 zusammen mit Bcl-3 proapoptotische Eigenschaften besitzt. Zudem wäre auch die Möglichkeit denkbar, dass der Komplex aus Bcl-3 und NF- κ B1 ein antiapoptotisches Gen hochreguliert, dessen Expression von NF- κ B2 supprimiert wird. Aber auch die Gegenregulation eines herunterregulierten proapoptotischen Gens wäre möglich.

Bisher konnte gezeigt werden, dass sowohl der N- als auch der C-Terminus von Bcl-3 für die Bindung mit NF- κ B2 verantwortlich ist (Bours et al., 1993). Deletionsmutanten von Bcl-3, denen sowohl der N- als auch der C-Terminus fehlen, unterstützen nach retroviraler Überexpression immer noch das Überleben der aktivierten T-Zellen, sodass der Komplex aus NF- κ B2-Homodimeren und Bcl-3 zumindest nicht wichtig für das Überleben der Zellen sein kann (Mitchell et al., 2002). Das Überleben der aktivierten T-Zellen war nach Überexpression der Deletionsmutante sogar leicht erhöht, was der apoptotischen Wirkung des nichtmutierten NF- κ B2 im Komplex mit Bcl-3 entsprechen könnte. Ein ähnliches Ergebnis wurde von Nishikori et al. bei ihrer Untersuchung von großzelligen anaplastischen Lymphomen (ALCL) präsentiert (Nishikori et al., 2005). In ruhenden ALCL Zellen ist Bcl-3 mit NF- κ B1 Homodimeren assoziiert und der Komplex scheint am Überleben der Zellen beteiligt zu sein. In aktivierten ALCL Zellen führt

phosphoryliertes Bcl-3 zu einer Assoziation mit NF- κ B2 Homodimeren und dieser Komplex scheint an der Auslösung des Zelltods beteiligt zu sein.

Da eine vergleichende Untersuchung von Material von aktivierten T-Zellen von *nf- κ B1*^{-/-}, *nf- κ B2*^{-/-} und WT Mäusen in einem Microarray noch nicht vorliegt, kann bisher nur spekuliert werden, wie diese Faktoren zur Apoptose führen. Dieses Ergebnis muss abgewartet werden, um es mit dem Microarray der aktivierten T-Zellen von *bcl-3*^{-/-} und WT Mäusen zu vergleichen. Die Voraussetzungen, die ein solcher Kandidat mitbringen sollte, können vielseitig sein: Möglicherweise weist die Lokalisation am Mikrotubuli auf den richtigen Kandidaten. Es kann zum Beispiel die Fähigkeit sein, Bim auf eine bisher unbekannt posttranslational regulierte Weise zusätzlich inaktiv zu halten. Hinweise auf Phosphorylierung oder Ubiquitinierung gibt es in den hier durchgeführten Versuchen nicht. Doch die Freisetzung vom Cytoskelett bezieht sich nur auf die beiden Isoformen Bim_L und Bim_{EL}, nicht aber Bim_S, sodass auch andere bisher nicht bekannte Regulationsmechanismen für Bim_S und die anderen Isoformen in Betracht gezogen werden können (Marani et al., 2002). Zusätzlich stellen neuere Ergebnisse die Lokalisation von Bim am Cytoskelett in Frage und sehen es in T-Zellen lokalisiert an der Mitochondrienmembran (Zhu et al., 2004), sodass weitere Regulationsmechanismen in Frage kommen und diese im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

4.2.2 Weitere Regulationsmechanismen im Bim-abhängigen Zelltod

Bisher war die Lokalisation von Bim am Mikrotubuli und seine Freisetzung ins Cytosol eines der Modelle für die Bim-vermittelte Apoptose. Eine erst 2004 veröffentlichte Studie von Zhu et al. beschreibt in T-Zellen jedoch eine Lokalisation von Bim bereits an der Mitochondrienmembran, an der es unter strenger Kontrolle der antiapoptotischen Bcl-2 Proteine steht (Zhu et al., 2004). Unter diesen Bedingungen scheint Bim dann entweder auf transkriptioneller Ebene reguliert oder aber durch einen ungeklärten Mechanismus an den Mitochondrien aktiviert zu werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IL-2 Verarmung in CTLL-2 Zellen zur Deaktivierung des Akt Signalweges führt, damit zur Aktivierung des FOXO3a Transkriptionsfaktors und dann zur transkriptionellen Induktion von Bim (Stahl et al., 2002). Eine ähnliche Aktivierung des Transkriptionsfaktors FOXO3a war in aktivierten T-Zellen nach IL-2 Verarmung zu sehen (You et al., 2006). Des Weiteren führte die

Injektion von Superantigen zu einer verminderten Expression von Bcl-2 und Bcl-X_L in reaktiven T-Zellen (Hildeman et al., 2002). Damit besteht nach IL-2 Verarmung die Möglichkeit, dass die Verschiebung des Verhältnisses antiapoptotischer zu apoptotischen Proteinen eine Freisetzung von Cytochrom c in aktivierten T-Zellen auslöst. Die vergleichende Genexpressionsanalyse von aktivierten WT T-Zellen mit aktivierten *bcl-3*^{-/-} T-Zellen machen in diesem Fall eine direkte Beteiligung von Bcl-3 unwahrscheinlich. Hier war keine verminderte Induktion der mRNA für alle antiapoptotischen und proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie festgestellt worden. Es besteht jedoch weiterhin die Möglichkeit, dass Bcl-3 auch Gene reguliert, die an der posttranslationalen Regulation der Mitglieder der Bcl-2 Familie beteiligt sind und so ihre Aktivität steuert.

Damit stehen sich zwei Modelle gegenüber, die möglicherweise beide am Bim-abhängigen Zelltod aktivierter T-Zellen beteiligt sind. Eine Fehlermöglichkeit bei den Interaktionsstudien, die eine Freisetzung von Bim postulieren, ist, dass Interaktionen erst bei der Präparation zustande kommen und *in vivo* nicht existieren. Allerdings konnte in dieser Arbeit die retrovirale Überexpression von Bcl-3 in Bim-defizienten Mäusen diese Abhängigkeit voneinander bestätigen. Darüber, ob die Hochregulation von Bim durch Bcl-3 signifikant ist, kann nur spekuliert werden und deshalb wurde die posttranslationale Regulation von Bim in aktivierten T-Zellen eher in Betracht gezogen. Die Lokalisation von Bim an der Mitochondrienmembran in den relativ kleinen T-Zellen in der konfokalen Mikroskopie, wie sie von Zhu et al. gezeigt wurde (Zhu et al., 2004), ist schwierig zu beurteilen. Sicher ist, dass IL-2 Verarmung zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors FOXO3a und damit zur erhöhten Expression von Bim führt. In dieser Arbeit führten die verwendeten Versuchsbedingungen zu keiner erhöhten Expression von Bim beim Vergleich von Ausgangswert und 18-stündiger Kultur. Damit bleiben die Art und die Anzahl der Signale bei der Apoptoseinduktion durch das BH3-Protein Bim immer noch unklar. Sowohl die Bcl-3-abhängige posttranslationale Regulation wie die Freisetzung vom Cytoskelett als auch die transkriptionelle Regulation gesteuert über den FOXO3a Transkriptionsfaktor sind jedoch wahrscheinlich.

4.2.3 Bim-unabhängiger Zelltod

Bisherige Untersuchungen hatten gezeigt, dass die Überlebensfaktoren, die von mit Adjuvantien stimulierten DCs produziert werden, scheinbar unabhängig von Bcl-3 wirken. Der Überlebenseffekt von Bcl-3 scheint dagegen von Bim abhängig zu sein. Aus diesem Grund wurde in Erwägung gezogen, dass die freigesetzten Interleukine ihre Wirkung ebenfalls unabhängig von Bim entfalten können.

Die Existenz eines Bim-unabhängigen Signalweges konnte mit Hilfe Vav-Bcl-2 transgener Mäuse bestätigt werden. Als Gegenspieler apoptotischer BH3-Proteine kann Bcl-2 nicht nur die Auslösung der Apoptose durch Bim verhindern. Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass weitere BH3-Proteine an der Auslösung der Apoptose der aktivierten T-Zellen beteiligt sind, denn aktivierte T-Zellen der Vav-Bcl-2 transgenen Mäuse überleben besser als die der Bim-defizienten Mäuse. Zusätzlich verbesserten die DC-konditionierten Überstände das Überleben Bim-defizienter T-Zellen. *In vivo* führte die Injektion von SEB oder SEB/LPS in *bim*^{-/-} Mäusen zu einer stärkeren Expansion der TCR $\nu\beta$ 8⁺ Zellen und zu ihrer verlangsamten Abnahme im Vergleich zu den WT Mäusen. Aus diesen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass Apoptose selbst dann noch stattfindet, wenn Bim fehlt und dass diese Apoptose durch LPS-induzierte Faktoren blockiert werden kann. Damit muss ein zweiter Bim-unabhängiger Reaktionsweg den Zelltod der aktivierten T-Zellen zusätzlich regulieren.

4.2.3.1 Rolle des BH3-Proteins Puma

Die Tatsache, dass verschiedene BH3-Proteine sich in ihrer Funktion und ihrem Expressionsmuster überlappen, ist gesichert (Huang & Strasser, 2000). Aus diesem Grund wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass neben Bim auch noch andere BH3-Proteine am Zelltod aktivierter T-Zellen beteiligt sind. Da Puma-defiziente Thymocyten besser überleben als WT Thymocyten (Villunger et al., 2003) wurde die Beteiligung von Puma am Zelltod aktivierter T-Zellen getestet. Puma nimmt an der Regulation des Zelltods teil: Puma-defiziente T-Zellen haben einen Überlebensvorteil gegenüber WT T-Zellen. Da der Überlebenseffekt von Puma-defizienten T-Zellen aber geringer ausfällt als bei Bim-defizienten T-Zellen, übernimmt anscheinend Bim die größere Rolle. Die Verwendung von doppelt defizienten *bim/puma*^{-/-} T-Zellen macht die Beteiligung von Puma besonders deutlich.

Hier ist ein klarer Überlebensvorteil gegenüber Bim-defizienten Mäusen zu sehen, der auf die Beteiligung von Puma zurückgeführt werden kann.

Puma wird unter anderem transkriptionell durch den Tumorsuppressor p53 reguliert (Han et al., 2001; Nakano & Vousden, 2001; Yu et al., 2001), und Puma-defiziente Zellen sind gegenüber Stimuli wie gamma-Bestrahlung und Behandlung mit Etoposide resistent (Jeffers et al., 2003; Villunger et al., 2003). Aus diesem Grund wurde das Überleben von p53-defizienten aktivierten T-Zellen verglichen mit dem von WT T-Zellen. Es zeigte sich jedoch kein Überlebensvorteil. Es ist bekannt, dass Puma auch durch p53-unabhängige Stimuli, wie den Entzug von Wachstumsfaktoren oder Behandlung mit Glucocorticoiden, aktiviert werden kann (Han et al., 2001). Die p53-unabhängige Regulation scheint auch bei der Puma-abhängigen Apoptose der aktivierten T-Zellen eine Rolle zu spielen.

4.2.3.2 Rolle des BH3-Proteins Noxa

Das BH3-Protein Noxa erwies sich als weiterer Kandidat, dessen Rolle aber eher untergeordnet sein dürfte. Auch Noxa wird durch den Tumorsuppressor p53 reguliert, wobei aber auch p53-unabhängige Stimuli wie HIF-1 α (hypoxia-inducible factor) und Typ-I Interferon bekannt sind (Qin et al., 2005; Sun & Leaman, 2005). In WT T-Zellen war die *noxa* mRNA unter verarmenden Wachstumsbedingungen nur minimal induziert. In Bim-defizienten T-Zellen war die Induktion stärker zu messen (Bauer et al., 2006). Eine Erklärung dafür liegt wohl in der Tatsache, dass diese Zellen durch den Verlust von Bim besser überleben und damit auch die Möglichkeit haben, noch länger mRNA von *noxa* zu produzieren. Es war kein großer Überlebensvorteil der aktivierten T-Zellen von *noxa*^{-/-} Mäusen gegenüber von WT Mäusen zu messen. Es ist bereits gezeigt worden, dass Noxa allein nur ein schwacher Auslöser der Apoptose ist (Willis et al., 2005). Eine erst kürzlich erschienene Veröffentlichung legte allerdings eine Funktion von Noxa in der Apoptoseinduktion nach Glukoseverarmung dar. Noxa scheint damit in manchen Situationen in Lymphocyten schon eine Rolle zu spielen (Alves et al., 2006).

4.2.4 Inhibition der Apoptose trotz erhöhter Bim Expression

Damit schienen schließlich drei BH3-Proteine identifiziert worden zu sein, die alle auf den Zelltod der aktivierten T-Zellen Einfluss nehmen können: Bim, Puma und unter

bestimmten Bedingungen auch Noxa. Bei der weiteren Aufklärung der Signalwege der Apoptose, sollte dann die antiapoptotische Rolle der adjuvans-induzierten Faktoren wie die Cytokine IL-1, IL-7 und IL-15 näher untersucht werden.

Da IL-2 Verarmung zur Deaktivierung des Akt Signalweges und dies wiederum zur Aktivierung des FOXO3a Transkriptionsfaktors und zur transkriptionellen Induktion von Bim und Puma führt (You et al., 2006), sollte ein solcher Zusammenhang mit dem Effekt der Cytokine IL-1, IL-7 und IL-15 überprüft werden. Die Präsenz dieser Interleukine oder der Überstand von adjuvans-aktivierten BMDDC führt zu einem besseren Überleben der aktivierten T-Zellen. Da Bim und Puma hauptsächlich den Zelltod der aktivierten T-Zellen regulieren, sollte deren Expression nach Cytokingabe bestimmt werden. Es wurde vermutet, dass die Expression von Bim nach Zugabe der Cytokine herunterreguliert wird, und dass dadurch der Zelltod verhindert wird. Die Präsenz der adjuvans-induzierten Faktoren und auch der Interleukine führten zu keiner Runterregulation von Puma. Erstaunlicherweise führte deren Präsenz sogar zu einer klaren Hochregulation von Bim, über die in diesem Abschnitt diskutiert werden soll.

Zunächst soll nur die Situation bei Präsenz der einzelnen Interleukine IL-1, IL-7 und IL-15 beschrieben werden: Bim wird hochreguliert und Apoptose wird verhindert. Der hier gezeigte Western Blot zeigt zwar, dass in diesem Fall die antiapoptotischen Bcl-2 Mitglieder wie Bcl-X_L und Mcl-1 stärker exprimiert werden, doch diese Hochregulation konnte in anderen Western Blot Analysen nicht bestätigt werden und liefert daher kein einheitliches Bild der Regulation in Gegenwart der Interleukine.

Anders sieht es in der Situation mit aktivierten T-Zellen in Gegenwart von Überstand adjuvans-gereifter DCs aus. Eine Blockade der apoptotischen Wirkung von Bim mittels erhöhter Expression antiapoptotischer Proteine konnte in mehreren Western Blot Analysen ausgeschlossen werden (Kirschnek/Bauer et al., eingereicht). Die Expression antiapoptotischer Proteine blieb unverändert. Die Daten beschreiben eine Situation, in der die Hochregulation von Bim keine Apoptose auslöst. Die aktivierten T-Zellen überleben. Die apoptotische Wirkung von Bim scheint in dieser Situation nicht durch antiapoptotische Proteine abgefangen zu werden, so dass nur noch eine posttranslationale Regulation von Bim in Frage kommt. Welche Faktoren hier eine Rolle spielen ist unklar.

Die Frage der Bim-Aktivierung ist nicht geklärt. Zum einen kann die Überexpression von Bim Apoptose induzieren (O'Connor et al., 1998). Zum anderen können auch gesunde Zellen detektierbare Mengen an Bim exprimieren.

Die Vermutung der Expression unterschiedlich aktiver Bim-Proteine wurde bereits aus den Ergebnissen anderer Experimente vermutet:

Thymocyten von Bim-defizienten Mäusen haben einen Defekt in der negativen Selektion und sind resistenter gegenüber TCR-Signalen als WT Zellen (Bouillet et al., 2002). In diesen Zellen kann sowohl PMA als auch Ionomycin zu einer Hochregulation von Bim Protein führen (Cante-Barrett et al., 2006). Allerdings sind die Zellen mit Ionomycin-Behandlung resistent gegenüber Apoptose, während PMA diese auslöst (Bouillet et al., 1999). Auch die Apoptose von Granulocyten ist von Bim reguliert (Villunger et al., 2003) und kann nach TLR-Stimulierung mit LPS verhindert werden (Kirschnek/Bauer et al., eingereicht). Gleichzeitig führte LPS-Gabe in murinen Granulocyten zu einer klaren Hochregulation von Bim (Kirschnek/Bauer et al., eingereicht). Möglicherweise wird diese Hochregulation in Granulocyten deshalb toleriert, weil unter den antiapoptotischen Proteinen hochreguliertes Mcl-1 als Gegenspieler von Bim fungieren kann (Kirschnek/Bauer et al., eingereicht).

Der Reaktionsmechanismus, der zum Überleben der aktivierten T-Zellen trotz Hochregulation von Bim führt, ist nicht geklärt. Auch gibt es keine Erklärung dafür, warum Bim in diesem Fall nicht aktiv ist. Und da hier die Menge an antiapoptotischen Proteinen unverändert bleibt, müssen posttranslationale Veränderungen von Bim eine Ursache sein. Die Folgen einer Phosphorylierung und/ oder Ubiquitinierung von Bim werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Western Blot Analyse in dieser Arbeit detektiert aber auch kein modifiziertes Bim-Protein, welches man im Molekulargewicht verändert durch Phosphorylierung oder Ubiquitinierung, erwarten würde. Die Freisetzung von Bim vom Cytoskelett nach Apoptoseinduktion setzt eine aktive Form des Proteins frei und mag einen möglichen Regulationsmechanismus der Aktivierung darstellen (Puthalakath et al., 1999). In murinen primären T-Zellen wurde Bim allerdings im inaktiven Zustand schon an den Mitochondrien lokalisiert gefunden (Zhu et al., 2004). Aus diesem Grund können weitere bisher unbekannte posttranslationale Regulationsmechanismen für Bim in Betracht gezogen werden. Es besteht zudem die Möglichkeit, dass verschiedene Bim Moleküle existieren, die aktiv oder inaktiv vorliegen (Marani et al., 2002). So ist beispielsweise in neuronalen Zellen bekannt, dass die Prolylisomerase Pin1 mit Ser65-phosphoryliertem Bim_{EL}

interagieren kann und damit Bim_{EL} und seine apoptotische Wirkung stabilisiert (Becker & Bonni, 2006). Dabei wird Pin1, das als Komplex mit dem JNK scaffold protein JIP3 am Mitochondrium lokalisiert ist, nach JNK Aktivierung freigesetzt und kann dann an das phosphorylierte Bim_{EL} binden und dieses stabilisieren. Die Eventualität, eine solche indirekte Regulation von Bim vorzufinden, ist in den T-Zellen ebenfalls möglich, wobei die vorgestellte Stabilisierung aufgrund fehlender Phosphorylierung von Bim hier unwahrscheinlich ist.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass T-Zellen Bim aufgrund veränderter Bedingungen in dem sie umgebenden Milieu erhöhen. Es ist wahrscheinlich, dass es sich um nicht aktives Bim handelt, das erst durch posttranslationale Modifikation Apoptose auslösen kann.

4.3 Regulationsmechanismen im Zelltod aktivierter T-Zellen

Im letzten Abschnitt soll erörtert werden, wie die Regulation des aktivierten Zelltods stattfindet und ein mögliches Modell erarbeitet werden. Es ist wichtig, herauszufinden, wie die hauptsächlichen Mediatoren Bim und Puma aber auch Noxa den Zelltod der aktivierten T-Zellen regulieren (Bauer et al., 2006; Hacker et al., 2006).

Die Beteiligung von Bim am Zelltod der aktivierten T-Zellen wurde bereits gezeigt und ausführlich diskutiert. Zum einen spielt die posttranslationale Freisetzung von Bim vom Cytoskelett durch einen Bcl-3-abhängigen Mechanismus eine Rolle. Zum anderen wurde die Existenz einer Bcl-3-unabhängigen erhöhten Expression von Bim nach Aktivierung des FOXO3a Transkriptionsfaktors als weiterer Regulationsmechanismus in Betracht gezogen (You et al., 2006).

Puma ist ebenfalls am Zelltod der aktivierten T-Zellen beteiligt. Und damit scheinen sowohl Bim als auch Puma in der gleichen Situation aktiviert zu werden.

Eine mögliche Verbindung zwischen Bim und Puma liegt in der erst kürzlichen Entdeckung, dass sowohl Bim als auch Puma durch den Transkriptionsfaktor FOXO3a hochreguliert werden können. IL-2 Verarmung führt in aktivierten T-Zellen zur Deaktivierung des Akt Signalweges, damit zur Aktivierung des FOXO3a Transkriptionsfaktors und dann zur transkriptionellen Induktion von Bim und Puma (You et al., 2006). Zudem wird in murinen prä-B-Lymphocyten Bcl-2 vermehrt

exprimiert, wenn der Signalweg AKT angeschaltet ist (Ahmed et al., 1997). Das Ausschalten von Akt lässt dann eine Expressionsreduktion vermuten. Außerdem wurde gezeigt, dass die Injektion von Superantigen zu einer verminderten Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X_L führt (Hildeman et al., 2002). Deshalb ist es gut möglich, dass ein Überwiegen von Bim und Puma im Vergleich zu antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen die Freisetzung von Cytochrom c in den aktivierten IL-2 verarmten T-Zellen initiiert.

Eine andere mögliche Verbindung zwischen Bim und Puma liegt in der Existenz eines noch unbekanntes gemeinsam regulierten Signalweges. Diese Vermutung wird durch mehrere Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt: Bim als auch Puma sind am Zelltod aktivierter T-Zellen beteiligt. Besonders deutlich wird diese Tatsache bei Verwendung doppelt defizienten *bim/puma*^{-/-} T-Zellen. Zudem wurde gezeigt, dass die Zugabe von Adjuvans zu aktivierten T-Zellen zum deren besseren Überleben führt und sowohl Bim als auch Puma daran beteiligt sind. Es wurden adjuvans-induzierte Faktoren identifiziert (IL-1, IL-7, IL-15), die sowohl in Bim- als auch Puma-defizienten T-Zellen zu einem besseren Überleben führen. Diese Beobachtung schließt auf die Existenz eines gemeinsam regulierten Signalweges, der durch die Präsenz von Adjuvans inhibiert werden kann.

Im vorigen Abschnitt wurde bereits über eine mögliche posttranslationale Regulation von Bim spekuliert. Zudem hat die vorliegende Arbeit gezeigt, dass die Expression von Puma nach Zugabe der adjuvans-induzierten Faktoren nicht herunterreguliert wird. Die Vermutung, dass zumindest *in vitro* ein gemeinsamer Signalweg für Bim und Puma existiert, der durch die Präsenz von Adjuvans inhibiert werden kann, gab den Anlass, die Interleukinzugabe nochmals genauer zu erläutern und mit Daten, die von anderen Gruppen generiert wurden, zu vergleichen.

Unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen üben die genannten Cytokine einen antiapoptotischen Effekt auf T-Zellen aus. Ihre Präsenz ist für das Überleben nicht fortwährend notwendig. Die Zugabe während der Stimulation führt selbst dann noch zum Überleben, wenn die Cytokine längst ausgewaschen sind. Im Unterschied dazu haben Versuche unter IL-2 verarmenden Bedingungen gezeigt, dass diese kontinuierlich vorhanden sein müssen, um einen Überlebensvorteil zu bieten und sowohl Bim als auch Puma herunterzuregulieren (You et al., 2006). Von IL-15 war eine Regulation der Kinase Akt gezeigt worden (Budagian et al., 2005). Damit wäre

eine IL-15 vermittelte Expressionsreduktion von Bim oder Puma ein möglicher Mechanismus, die Apoptose auch unter den hier genannten Versuchsbedingungen zu verhindern. Andere Experimente hatten gezeigt, dass Versuche, in denen die gamma-Kette aktivierenden Cytokine während der ganzen Stimulation vorhanden waren, vermutlich durch den Jak3-Stat5 Signalweg zur Überexpression von Bcl-X_L und Bcl-2 und damit zu besserem Überleben führten (Strasser & Pellegrini, 2004). Opferman et al. zeigten, dass die Präsenz von IL-7 zur Induktion von Mcl-1 führt und so Lymphocyten am Leben erhält (Opferman et al., 2003). Dies scheint unter den hier verwendeten Bedingungen von IL-1, IL-7 und IL-15 nicht der Fall zu sein. Obwohl die Interleukingabe kein einheitliches Ergebnis für die Expression der antiapoptotischen Proteine liefert, zeigt die Zugabe von DC-gereiften adjuvans-induzierten Faktoren, dass keine Hochregulation von Mcl-1, Bcl-2 und Bcl-X_L stattfindet. Auch antiapoptotisches Bax wird nicht herunterreguliert.

Damit müssen wohl andere Mechanismen beteiligt sein, die in der Gegenwart von Adjuvans die Aktivierung von Bim und Puma blockieren. Da eine transkriptionelle Regulation unwahrscheinlich ist, müssen posttranslationale Veränderungen der Grund für das Überleben sein. Und diese sollten über einen gemeinsamen Signalweg die Aktivierung von Bim und Puma verhindern. Posttranslationale Veränderungen für Puma sind nicht bekannt. Für Bim wiederum sind Phosphorylierung und Ubiquitinierung bekannte Mechanismen, die aber nach Adjuvanszugabe nicht detektiert werden können. Die reduzierte Freisetzung von Bim vom Cytoskelett nach Adjuvansgabe wurde in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht. Allerdings postulieren Puthalakath et al. eine weitere posttranslationale Regulation von Bim, weil zwar Bim_L und Bim_{EL} beide am Cytoskelett gebunden sind, aber Bim_{EL} die Apoptose in viel geringerem Maße auslöst (Puthalakath et al., 1999). Unaufgeklärte Mechanismen können eine Rolle spielen, an denen zum Beispiel IAN5, beteiligt sein könnte. Eine Deletion dieses Mitglieds der IAN Familie ("immune-associated nucleotide-binding protein"), das in der Entwicklung von T-Zellen wichtig ist (Dion et al., 2005), führt nach IL-2 Verarmung zu einer verstärkten Apoptose, die durch Überexpression von Bcl-X_L verhindert werden konnte. Seine Interaktion mit Bax und Bcl-X_L (Nitta et al., 2006) haben es zu einem weiteren Kandidaten gemacht, der den Zelltod von sich entwickelnden T-Zellen beeinflusst und möglicherweise auch Einfluss auf die Aktivierung und apoptotische Wirkung von Bim und Puma hat. Um herauszufinden, welche gemeinsamen Signalwege tatsächlich an der Aktivierung

von Bim und Puma beteiligt sind, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

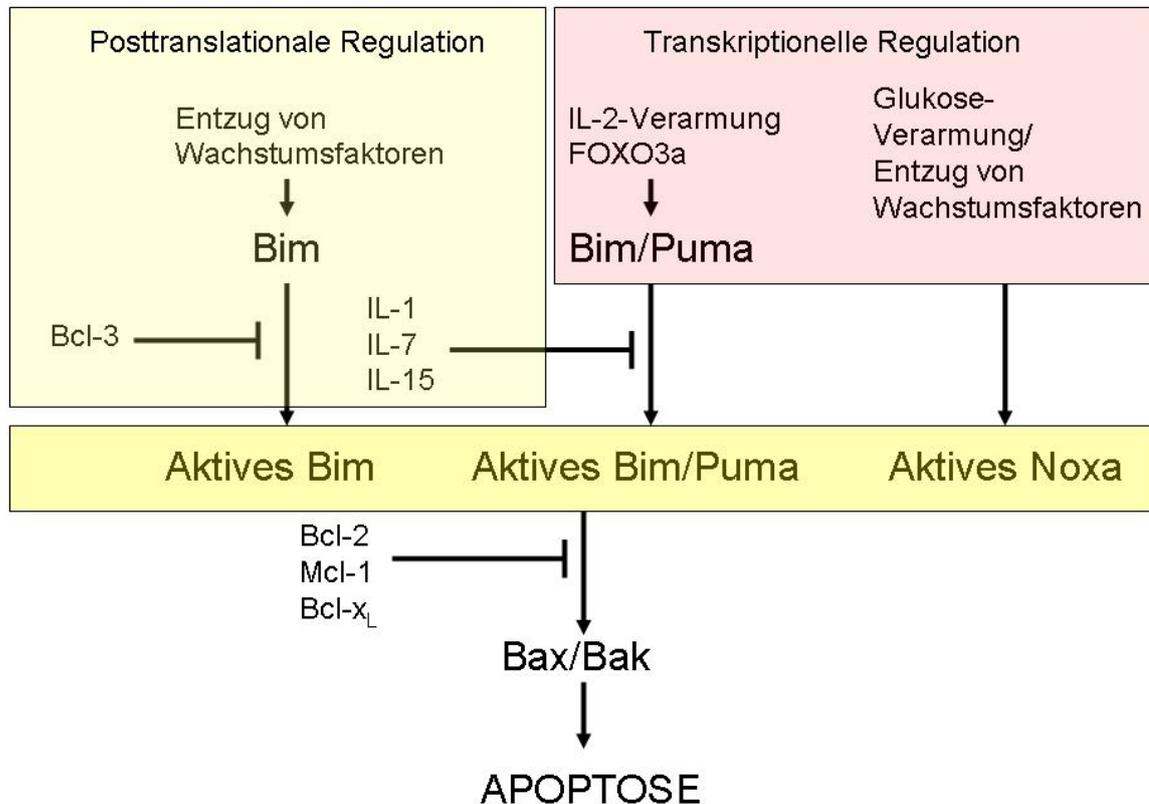


Abb. 28: Regulationsmechanismen im Zelltod aktivierter T-Zellen

Posttranslationale und transkriptionelle Regulationswege führen zur Aktivierung der BH3-Proteine Bim/Puma/Noxa. Nach Entzug von Wachstumsfaktoren ist eine Freisetzung von Bim gezeigt worden, die unter Beteiligung des NF- κ B/Bcl-3 Signalweges inhibiert werden kann. Die Verarmung von IL-2 kann die gemeinsame Transkription von Bim und Puma mittels des Transkriptionsfaktors FOXO3a beeinflussen. IL-1, IL-7 und IL-15 können über einen vermutlich gemeinsamen Mechanismus die Aktivierung von Bim und Puma verhindern. Glukoseverarmung führt zu Expressionsveränderungen von Noxa. Alle Wege führen zu den aktiven Formen der drei BH3-Proteine Bim*/Puma*/Noxa*, die daraufhin Bax/Bak aktivieren und Apoptose auslösen. Als zusätzliche Gegenspieler der aktivierten BH3-Proteine sind die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X_L) bekannt, die der Auslösung des Zelltods zusätzlich entgegen wirken können.

Zusätzlich sollte man die neu gewonnenen Erkenntnisse auch im Hinblick auf die Aktivierungsmodelle von Bax und Bak betrachten. Das „direct binding“ Modell beschreibt eine Aktivierung von Bax/Bak durch Interaktion mit den Aktivatoren der BH3-Proteine (Bim, tBid und Puma), die in gesunden Zellen durch Interaktion mit antiapoptotischen Bcl-2 ähnlichen Proteinen inaktiv gehalten werden. Deren

Freisetzung wird durch sogenannte Sensitizer der BH3-Proteine (Bad, Noxa) normalerweise verhindert. Erst ein Apoptosestimulus führt mit Hilfe der Sensitizer zur Verdrängung der Aktivatoren aus ihrer Bindung mit Bcl-2 ähnlichen Proteinen und einer Aktivierung der Bax/Bak Proteine (Kim et al., 2006; Kuwana et al., 2005; Letai et al., 2002). Das Displacement Modell beschreibt dagegen eine Situation, in der Bax/Bak zunächst durch Interaktion mit Bcl-2 ähnlichen Proteinen inaktiv gehalten werden. Apoptosestimuli führen zu einer Verdrängung der Bax/Bak Proteine aus ihrer Bindung, indem BH3-Proteine jetzt an die Bcl-2 ähnlichen Proteine binden. Apoptose wird ausgelöst (Willis & Adams, 2005).

Hier scheint am ehesten das Displacement Modell auf die Apoptose der aktivierten T-Zellen nach Verarmung an Wachstumsfaktoren zuzutreffen. Zum einen ist die Apoptose der doppelt defizienten *bim/puma*^{-/-} T-Zellen soweit blockiert, dass tBid vermutlich nicht als weiterer Aktivator der Bax/Bak-Aktivierung fungieren kann. Zum anderen müsste man deshalb in dem anderen Modell auf alle Fälle Puma als Aktivator einstufen. Vorige Versuche hatten aber gezeigt, dass das BH3-Peptid von Puma im Gegensatz zu denen von tBid und Bim *in vitro* alleine keine Freisetzung von Cytochrom *c* auslösen kann (Kuwana et al., 2005; Letai et al., 2002). Aus diesem Grund wird hier das Displacement-Modell favorisiert: Unter limitierten Wachstumsfaktor-Bedingungen werden die BH3-Proteine Bim/Puma/Noxa aktiviert und/oder transkriptionell hochreguliert werden und führen zur Sättigung der Bcl-2-artigen antiapoptotischen Proteine (Alves et al., 2006; Willis & Adams, 2005). Daraufhin können Bax und Bak aus ihrer Bindung mit den antiapoptotischen Bcl-2-artigen Proteinen gelöst werden und die Freisetzung von Cytochrom *c* findet statt.

Betrachtet man jedoch alle bisherigen Ergebnisse, die zur Aufklärung der Aktivierung der Proteine Bax/Bak beitragen, hat besonders die letzte Veröffentlichung von Kim et al. zur Ansicht beigetragen, dass beide Modellsysteme so nicht stimmen können (Kim et al., 2006). Das Displacement-Modell wurde hauptsächlich durch den Befund in Frage gestellt, dass Bax/Bak nicht durch die Bindung an Bcl-X_L, Bcl-2 oder Mcl-1 inaktiv gehalten werden. Das „direct binding“ Modell konnte experimentell nicht bestätigt werden, weil trotz Fehlen der Aktivatoren (tBid, Bim, Puma) eine retrovirale Transfektion mit Bad und Noxa Apoptose auslösen kann. Von Häcker und Weber (eingereicht) wird ein weiterer Regulationsmechanismus postuliert, bei dem die Insertion einiger BH3-Proteine in die äußere Mitochondrienmembran dazu führt, dass Bax inserieren kann und aktiviert wird. Ein solcher Aktivierungsmechanismus wäre

auch im Hinblick auf die Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeit möglich. Die genauen Abläufe der Aktivierung von Bax/Bak sind damit immernoch nicht vollständig geklärt und weitere Versuche müssen zur Klärung beitragen.

Abschließend kann man sagen, dass zahlreiche extrinsische Signale Einfluss auf den Zelltod von aktivierten T-Zellen haben: sowohl verschiedene Cytokine als auch Interaktionen mit weiteren Zellmembranrezeptoren wie CD28 können den Zelltod verhindern. Der Verlust essentieller Überlebensfaktoren wie zum Beispiel Glukose können wiederum den Zelltod über Noxa induzieren (Alves et al., 2006). Vermutlich sind aber während einer Infektion noch zahlreiche andere Einflüsse am Zelltod der aktivierten T-Zellen beteiligt. Die meisten Signale scheinen aber über Bim/Puma/Noxa reguliert zu sein, die wiederum von Bcl-2-ähnlichen Proteinen im Gleichgewicht gehalten werden (Abb. 28). Es ist immer noch unklar welche und wieviele Signale auf Bim und Puma wirken. Transkription mag eine Rolle spielen, scheint aber nicht der Hauptinitiator zu sein. FOXO3a kann sowohl Bim als auch Puma regulieren, aber vermutlich scheinen noch weitere Transkriptionsfaktoren von Bedeutung zu sein. Auf dem Level der Signalwege ist sicherlich AKT und NF- κ B/Bcl-3 wichtig, aber auch andere Wege sind involviert. Die unterdrückte Freisetzung von Bim, reguliert durch NF- κ B/Bcl-3, ist sicherlich auch von Bedeutung.

Bei der Aufklärung der verschiedenen Signalwege darf man auch nicht außer Acht lassen, dass es in der Entwicklung der T-Zellen verschiedene Subgruppen gibt. Diese können sich auch wiederum darin unterscheiden, dass sie auf unterschiedliche Signale anders reagieren. Zudem existieren zum Beispiel Gedächtniszellen in unterschiedlichen Teilen des Körpers, und so können Faktoren, die das Überleben in lymphoiden Organen bestimmen, sich von denen unterscheiden, die Einfluss außerhalb davon haben (Marrack & Kappler, 2004). Zudem unterscheidet sich das inflammatorische Milieu in Abhängigkeit von der Art der Infektion durch das Pathogen, sodass auch die unterschiedliche Expression inflammatorischer und antiinflammatorischer Cytokine einen Einfluss auf den Zelltod von aktivierten T-Zellen haben (Haring et al., 2006).

In Zukunft wird die Aufklärung der Apoptose aktivierter T-Zellen vielleicht auch das Verständnis der Entstehung von Gedächtniszellen verbessern. Dieses immunologische Gedächtnis zeichnet sich durch eine langlebige Population an spezialisierten Zellen aus, die unabhängig davon ist, ob das ursprüngliche,

auslösende Antigen vorhanden ist. Die effektivste Gedächtniszelle ist die, die überlebt, schützt, nach Antikörperkontakt stark proliferiert und nach schnell wiederholter Immunisierung eine hohe Anzahl an Nachkommen bildet. Es gibt zwei Modellvorstellungen wie Gedächtniszellen entstehen. Das sogenannte progressive Modell vertritt die Ansicht, dass sich Gedächtniszellen direkt aus naiven Zellen entwickeln können und dem linearen Modell liegt die Annahme zugrunde, dass Gedächtniszellen die Nachkommen von Effektorzellen sind, die dem Zelltod entkommen sind. Stimmt das lineare Modell, dann beeinflusst der Verlauf der Apoptose am Ende einer T-Zellantwort die Entstehung von Gedächtniszellen. Die Möglichkeit, Einfluss zu nehmen auf die Entstehung einer solchen idealen Gedächtniszelle durch Modulation des Zelltods aktivierter T-Zellen kann zu Fortschritten in der Entwicklung von Immunisierungen führen.

Um die genaue Regulation des Zelltods aktivierter T-Zellen aufzuklären sind weitere Experimente nötig.

Zum einen müssen die Ergebnisse der Microarraydaten der NF- κ B1- und NF- κ B2-defizienten Mäuse auf mögliche Bcl-3-regulierte Kandidaten kontrolliert werden. Dafür kommen posttranslationale Bim-abhängige und -unabhängige Mechanismen in Frage. Zudem könnten für diese Analyse weitere Zeitpunkte der Entnahme gewählt werden, von denen bekannt ist, dass bereits Apoptose stattgefunden hat. Die Expression der im Microarray unveränderten pro- als auch antiapoptotischer Gene könnte zusätzlich in den Bcl-3-defizienten T-Zellen auf Proteinebene kontrolliert werden.

Im adjuvans-induzierten Überleben kann die Verwendung spezifischer Inhibitoren zudem Signalwege aufklären, wie die DC-gereiften Faktoren zum einen Bim hochregulieren können, zum anderen das Überleben der Zellen regulieren. Da die Interleukine IL-7 und IL-15 über eine Aktivierung der gemeinsamen gamma-Kette der Cytokinrezeptoren reguliert werden, könnte man den Signalweg mit Hilfe Inhibitoren des JAK/STAT-, des PI3-Kinase oder des MAPK-Signalweges untersuchen.

Bisher hat die Zugabe von SEB und Adjuvans zu einer starken Expansion von Zellen geführt. Man weiß, dass die überlebenden Zellen morphologisch lebendigen Zellen entsprechen, kann aber nichts über deren Aktivität aussagen. Vav-Bcl-2 transgene T-Zellen können aufgrund ihres Überlebensvorteils am besten für diese Untersuchung verwendet werden. Aus diesem Grund könnte man die T-Zellen dieser Tiere in

Infektionsexperimenten mit Listerien expandieren lassen und die überlebenden T-Zellen am Tag 35 nach Infektion auf deren Aktivität testen. Dafür könnten intrazelluläre Färbungen für Cytokine (IL-2, TNF- α , IFN- α) durchgeführt werden.

Bisherige Daten dieser Arbeit haben gezeigt, dass *in vivo* die Injektion von SEB/LPS zu einem Überlebenseffekt von reaktiven T-Zellen in Bim-defizienten Mäusen führt und dieser Effekt im Vergleich zu WT Mäusen erhöht ist. Daten, die *in vitro* aus Zellkulturen mit isolierten T-Zellen gewonnen wurden, weisen zunächst darauf hin, dass der Überlebenseffekt T-Zell autonom ist. Um zu überprüfen, ob auch *in vivo* das Überleben tatsächlich nur aufgrund der Bim-Defizienz der T-Zellen zurückzuführen ist, oder aber die Bim-Defizienz anderer Zellen (z.B. DCs, Makrophagen) in der Umgebung ebenfalls eine Rolle spielt, könnte ein adoptiver Transfer von Zellen zur Klärung beitragen. Man könnte CFSE-markierte T-Zellen aus *bim*^{-/-} Mäusen in eine WT Maus transferieren und deren Überleben verfolgen.

Um die Mechanismen der Aktivierung von Bim und Puma zu verstehen, sollte zunächst auf einfachere Zellsysteme ausgewichen werden, in denen die Möglichkeit besteht, gezielt deren Expression zu regulieren und dann mit Hilfe verschiedener biochemischer Verfahren (z.B. Coimmunopräzipitation, konfokale Mikroskopie) Interaktionspartner und die Mechanismen einer posttranslationalen Modifikation dieser Proteine zu erforschen.

Abschließend könnte die Tatsache, dass Bcl-3 einen Defekt im Überleben der aktivierten T-Zellen hat, einen Hinweis darauf geben, dass Bcl-3 möglicherweise auch bei der Generierung von Gedächtniszellen eine Rolle spielt. Für eine solche Untersuchung kann man sich Antigene zu Nutze machen, die man mit Hilfe von spezifischen Antikörpern oder den Nachweis antigen-spezifischer T-Zellen mittels Tetramer-Technologie verfolgen kann. Die Isolierung, Detektion und Identifikation solcher antigenspezifischer T-Zellen lässt dann Rückschlüsse auf die Generierung von bestimmten Gedächtniszellpopulationen zu.

5 Zusammenfassung

Im erworbenen Immunsystem spielt Apoptose eine wichtige Rolle bei der Rückführung der Lymphocytenzahl am Ende einer spezifischen Immunantwort. Im Verlauf einer erworbenen Immunantwort werden T-Zellen, die ihr spezifisches Antigen erkennen, aktiviert und proliferieren. Es entstehen reaktive Klone. Nach Elimination des Antigens stirbt die überwiegende Anzahl dieser Zellen durch Apoptose. Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass Bcl-2-artige Proteine daran beteiligt sind, und dass die Aktivierung des BH3-Proteins Bim über den mitochondrialen Signalweg zur Apoptose führt. Zusätzlich schien Bcl-3 eine Rolle im adjuvans-induzierten Zelltod zu übernehmen.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Adjuvans tatsächlich zu einem besseren Überleben der aktivierten T-Zellen führte und gleichzeitig eine Hochregulation von *bcl-3* mRNA und Bcl-3 Protein stattfanden. Zu diesem Zweck wurde ein leicht verwendbares *in vitro* Modell entwickelt, in dem die Zellen mit ConA in Gegenwart von Adjuvans stimuliert werden. Die Verwendung Bcl-3-defizienter T-Zellen führte allerdings zu keinem Überlebensvorteil. Somit schied Bcl-3 als Hauptmediator im adjuvans-induzierten Überleben aus.

Bcl-3 war dennoch am Zelltod aktivierter T-Zellen beteiligt: Zum einen führte die retrovirale Überexpression von Bcl-3 zu einem besseren Überleben aktivierter T-Zellen, andererseits überlebten aktivierte T-Zellen von Wildtyp Mäusen besser als die Bcl-3-defizienter Mäuse. Vergleichende Microarraydaten machten eine unterschiedliche Genregulation der bekannten in der Apoptose involvierten Gene als Auslöser für den Effekt unwahrscheinlich. Freisetzungsstudien zeigten schließlich, dass vermehrte Freisetzung von Bim in aktivierten T-Zellen von Bcl-3-defizienten Mäusen auftrat. Bcl-3 blockiert, möglicherweise in Interaktion mit NF- κ B1 oder NF- κ B2, die Freisetzung von Bim vom Cytoskelett und unterdrückt damit seine apoptotische Wirkung.

Neben dem Bim-abhängigen Weg zeigten weitere Studien mit Vav-Bcl-2 transgenen Mäusen, dass weitere BH3-Proteine an der Apoptose aktivierter T-Zellen beteiligt sein müssen. Puma konnte als ein solcher Kandidat identifiziert werden, was ganz besonders bei der Verwendung aktivierter T-Zellen von doppelt defizienten

bim/puma^{-/-} Mäusen deutlich wurde. Noxa schien hingegen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen.

Des Weiteren konnte das adjuvans-induzierte Überleben mit Hilfe von Überstand aus adjuvans-stimulierten DCs nachgeahmt werden. Es erfolgte die Identifizierung von IL-1, IL-7 und IL-15 als Mediatoren. Diese Interleukine konnten das Überleben der Zellen auch in Abwesenheit von Bim oder Puma verbessern. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass am Zelltod aktivierter T-Zellen ein gemeinsamer Signalweg zur Aktivierung von Bim und Puma führt, der durch Adjuvansgabe blockiert werden kann. Nach Adjuvansgabe scheint die transkriptionelle Runterregulation von Bim und Puma im Überleben der aktivierten T-Zellen keine Rolle zu spielen. Eine transkriptionelle Induktion antiapoptotischer Proteine scheint daran ebenfalls nicht beteiligt zu sein. Die Interleukingabe (IL-1, IL-7 und IL-15) führte sogar zu einer Hochregulation des BH3-Proteins Bim. Da trotzdem keine Apoptose ausgelöst wird, sind unbekannte posttranslationale Modifikationen von Bim wahrscheinlich, durch die es inaktiv gehalten wird. Vermehrte Expression von Bim ist damit kein gleichzeitiger Indikator, dass es sich um aktives Protein handelt, dass Apoptose auslöst.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zahlreiche Signale Einfluss auf den Zelltod aktivierter T-Zellen haben, der in erster Linie durch Bim/Puma und zu geringerem Anteil auch durch Noxa reguliert wird.

6 Literaturverzeichnis

- Acehan, D., et al.** (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*, **9**, 423-432.
- Adams, J.M.** (2003) Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev*, **17**, 2481-2495.
- Adams, J.M. and Cory, S.** (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, **281**, 1322-1326.
- Adams, J.M. and Cory, S.** (2002) Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 715-720.
- Ahmed, N.N., et al.** (1997) Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3627-3632.
- Akiyama, T., et al.** (2003) Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim. *Embo J*, **22**, 6653-6664.
- Alderson, M.R., et al.** (1995) Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med*, **181**, 71-77.
- Alfredsson, J., et al.** (2005) Proapoptotic Bcl-2 family member Bim is involved in the control of mast cell survival and is induced together with Bcl-XL upon IgE-receptor activation. *Cell Death Differ*, **12**, 136-144.
- Alves, N.L., et al.** (2006) The Noxa/Mcl-1 axis regulates susceptibility to apoptosis under glucose limitation in dividing T cells. *Immunity*, **24**, 703-716.
- Alves, N.L., van Lier, R.A. and Eldering, E.** (2006) Withdrawal symptoms on display: Bcl-2 members under investigation. *Trends Immunol*.
- Antonsson, B., et al.** (2001) Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem*, **276**, 11615-11623.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M.** (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, **281**, 1305-1308.
- Baeuerle, P.A. and Henkel, T.** (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*, **12**, 141-179.
- Barkett, M. and Gilmore, T.D.** (1999) Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, **18**, 6910-6924.
- Bates, P.W. and Miyamoto, S.** (2004) Expanded nuclear roles for IkappaBs. *Sci STKE*, **2004**, pe48.
- Bauer, A., et al.** (2006) The NF-kappaB regulator Bcl-3 and the BH3-only proteins Bim and Puma control the death of activated T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 10979-10984.
- Becker, E.B. and Bonni, A.** (2006) Pin1 mediates neural-specific activation of the mitochondrial apoptotic machinery. *Neuron*, **49**, 655-662.
- Beg, A.A., et al.** (1995) Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature*, **376**, 167-170.
- Biswas, S.C. and Greene, L.A.** (2002) Nerve growth factor (NGF) down-regulates the Bcl-2 homology 3 (BH3) domain-only protein Bim and suppresses its proapoptotic activity by phosphorylation. *J Biol Chem*, **277**, 49511-49516.
- Boatright, K.M., et al.** (2003) A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell*, **11**, 529-541.

- Bouillet, P., et al.** (1999) Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science*, **286**, 1735-1738.
- Bouillet, P., et al.** (2002) BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature*, **415**, 922-926.
- Bouillet, P. and Strasser, A.** (2002) BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci*, **115**, 1567-1574.
- Bours, V., et al.** (1993) The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell*, **72**, 729-739.
- Bradford, M.M.** (1976) *Analyt. Biochem*, **72**, 248-254.
- Brasier, A.R., et al.** (2001) NF-kappa B-inducible BCL-3 expression is an autoregulatory loop controlling nuclear p50/NF-kappa B1 residence. *J Biol Chem*, **276**, 32080-32093.
- Brocke-Heidrich, K., et al.** (2006) BCL3 is induced by IL-6 via Stat3 binding to intronic enhancer HS4 and represses its own transcription. *Oncogene*.
- Brunner, T., et al.** (1995) Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature*, **373**, 441-444.
- Bu, W. and Su, L.K.** (2001) Regulation of microtubule assembly by human EB1 family proteins. *Oncogene*, **20**, 3185-3192.
- Budagian, V., et al.** (2005) A promiscuous liaison between IL-15 receptor and Axl receptor tyrosine kinase in cell death control. *Embo J*, **24**, 4260-4270.
- Bundy, D.L. and McKeithan, T.W.** (1997) Diverse effects of BCL3 phosphorylation on its modulation of NF-kappaB p52 homodimer binding to DNA. *J Biol Chem*, **272**, 33132-33139.
- Caamano, J., et al.** (2000) Identification of a role for NF-kappa B2 in the regulation of apoptosis and in maintenance of T cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*, **165**, 5720-5728.
- Caamano, J.H., et al.** (1996) Constitutive expression of Bcl-3 in thymocytes increases the DNA binding of NF-kappaB1 (p50) homodimers in vivo. *Mol Cell Biol*, **16**, 1342-1348.
- Cante-Barrett, K., et al.** (2006) Thymocyte negative selection is mediated by protein kinase C- and Ca²⁺-dependent transcriptional induction of bim [corrected]. *J Immunol*, **176**, 2299-2306.
- Caramalho, I., et al.** (2003) Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med*, **197**, 403-411.
- Cartron, P.F., et al.** (2004) The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol Cell*, **16**, 807-818.
- Certo, M., et al.** (2006) Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell*, **9**, 351-365.
- Chao, D.T. and Korsmeyer, S.J.** (1998) BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*, **16**, 395-419.
- Chen, L., et al.** (2005) Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*, **17**, 393-403.

- Cheng, E.H., et al.** (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, **8**, 705-711.
- Chilton, P.M. and Mitchell, T.C.** (2006) CD8 T cells require Bcl-3 for maximal gamma interferon production upon secondary exposure to antigen. *Infect Immun*, **74**, 4180-4189.
- Clarke, P.G. and Clarke, S.** (1996) Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Annat Embryol*, **193**, 81-99.
- Cogswell, P.C., et al.** (2000) Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene*, **19**, 1123-1131.
- Corn, R.A., et al.** (2005) Opposing roles for RelB and Bcl-3 in regulation of T-box expressed in T cells, GATA-3, and Th effector differentiation. *J Immunol*, **175**, 2102-2110.
- Cory, S. and Adams, J.M.** (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, **2**, 647-656.
- Cory, S., Harris, A.W. and Strasser, A.** (1994) Insights from transgenic mice regarding the role of bcl-2 in normal and neoplastic lymphoid cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **345**, 289-295.
- Cory, S., Huang, D.C. and Adams, J.M.** (2003) The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, **22**, 8590-8607.
- Danial, N.N. and Korsmeyer, S.J.** (2004) Cell death: critical control points. *Cell*, **116**, 205-219.
- Day, C.L., et al.** (2005) Solution structure of prosurvival Mcl-1 and characterization of its binding by proapoptotic BH3-only ligands. *J Biol Chem*, **280**, 4738-4744.
- Dechend, R., et al.** (1999) The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF-kappaB/Rel and nuclear co-regulators. *Oncogene*, **18**, 3316-3323.
- Denault, J.B. and Salvesen, G.S.** (2002) Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev*, **102**, 4489-4500.
- Devoogdt, N., et al.** (2003) Secretory leukocyte protease inhibitor promotes the tumorigenic and metastatic potential of cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5778-5782.
- Dhein, J., et al.** (1995) Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature*, **373**, 438-441.
- Dijkers, P.F., et al.** (2000) Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol*, **10**, 1201-1204.
- Dion, C., et al.** (2005) Expression of the Iam family of putative GTPases during T cell development and description of an Iam with three sets of GTP/GDP-binding motifs. *Int Immunol*, **17**, 1257-1268.
- Donepudi, M., et al.** (2003) Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell*, **11**, 543-549.
- Dooms, H. and Abbas, A.K.** (2006) Control of CD4+ T-cell memory by cytokines and costimulators. *Immunol Rev*, **211**, 23-38.
- Drewes, G.** (2004) MARKing tau for tangles and toxicity. *Trends Biochem Sci*, **29**, 548-555.
- Drewes, G., Ebneith, A. and Mandelkow, E.M.** (1998) MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem Sci*, **23**, 307-311.
- Du, C., et al.** (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, **102**, 33-42.

- Earnshaw, W.C., Martins, L.M. and Kaufmann, S.H.** (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, **68**, 383-424.
- Egle, A., et al.** (2004) Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 6164-6169.
- Ekert, P.G. and Vaux, D.L.** (2005) The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 626-630.
- Elliott, S.F., et al.** (2002) Bcl-3 is an interleukin-1-responsive gene in chondrocytes and synovial fibroblasts that activates transcription of the matrix metalloproteinase 1 gene. *Arthritis Rheum*, **46**, 3230-3239.
- Enders, A., et al.** (2003) Loss of the pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim inhibits BCR stimulation-induced apoptosis and deletion of autoreactive B cells. *J Exp Med*, **198**, 1119-1126.
- Erlacher, M., et al.** (2005) BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood*, **106**, 4131-4138.
- Fadok, V.A., et al.** (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, **148**, 2207-2216.
- Fesik, S.W.** (2000) Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell*, **103**, 273-282.
- Fischer, U., Janicke, R.U. and Schulze-Osthoff, K.** (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*, **10**, 76-100.
- Fisher, G.H., et al.** (1995) Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell*, **81**, 935-946.
- Franzoso, G., et al.** (1993) The oncoprotein Bcl-3 can facilitate NF-kappa B-mediated transactivation by removing inhibiting p50 homodimers from select kappa B sites. *Embo J*, **12**, 3893-3901.
- Franzoso, G., et al.** (1992) The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF-kappa B-mediated inhibition. *Nature*, **359**, 339-342.
- Franzoso, G., et al.** (1998) Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture. *J Exp Med*, **187**, 147-159.
- Franzoso, G., et al.** (1997) Critical roles for the Bcl-3 oncoprotein in T cell-mediated immunity, splenic microarchitecture, and germinal center reactions. *Immunity*, **6**, 479-490.
- Fujita, T., et al.** (1993) The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes Dev*, **7**, 1354-1363.
- Gao, J.J., et al.** (2002) Regulation of gene expression in mouse macrophages stimulated with bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol*, **72**, 1234-1245.
- Ge, B., et al.** (2003) NF-kappa B regulates BCL3 transcription in T lymphocytes through an intronic enhancer. *J Immunol*, **171**, 4210-4218.
- Gelman, A.E., et al.** (2004) Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival. *J Immunol*, **172**, 6065-6073.
- Gerondakis, S., et al.** (2006) Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene*, **25**, 6781-6799.

- Ghosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B.** (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, **16**, 225-260.
- Giese, T. and Davidson, W.F.** (1995) In CD8+ T cell-deficient lpr/lpr mice, CD4+B220+ and CD4+B220- T cells replace B220+ double-negative T cells as the predominant populations in enlarged lymph nodes. *J Immunol*, **154**, 4986-4995.
- Gonzalvez, F., et al.** (2005) tBid interaction with cardiolipin primarily orchestrates mitochondrial dysfunctions and subsequently activates Bax and Bak. *Cell Death Differ*, **12**, 614-626.
- Green, D.R. and Kroemer, G.** (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, **305**, 626-629.
- Griffiths, G.J., et al.** (1999) Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol*, **144**, 903-914.
- Grinberg, M., et al.** (2002) tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *J Biol Chem*, **277**, 12237-12245.
- Groghan, T.W., et al.** (1989) Diminished expression of the T cell receptor on the expanded lymphocyte population in MRL/Mp-lpr/lpr mice. *Autoimmunity*, **2**, 97-111.
- Hacker, G.** (2000) The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*, **301**, 5-17.
- Hacker, G., Bauer, A. and Villunger, A.** (2006) Apoptosis in Activated T Cells: What Are the Triggers, and What the Signal Transducers? *Cell Cycle*, **5**.
- Hacker, G., Kirschnek, S. and Fischer, S.F.** (2006) Apoptosis in infectious disease: how bacteria interfere with the apoptotic apparatus. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, **195**, 11-19.
- Han, J., et al.** (2001) Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 11318-11323.
- Hao, Z., et al.** (2004) T cell-specific ablation of Fas leads to Fas ligand-mediated lymphocyte depletion and inflammatory pulmonary fibrosis. *J Exp Med*, **199**, 1355-1365.
- Haring, J.S., Badovinac, V.P. and Harty, J.T.** (2006) Inflaming the CD8+ T cell response. *Immunity*, **25**, 19-29.
- Harris, C.A. and Johnson, E.M., Jr.** (2001) BH3-only Bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require Bax to induce apoptosis in neurons. *J Biol Chem*, **276**, 37754-37760.
- Hemann, M.T., et al.** (2004) Suppression of tumorigenesis by the p53 target PUMA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9333-9338.
- Herron, L.R., et al.** (1993) Selection of the T cell receptor repertoire in Lpr mice. *J Immunol*, **151**, 3450-3459.
- Hildeman, D.A., et al.** (2002) Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity*, **16**, 759-767.
- Hildeman, D.A., et al.** (2002) Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr Opin Immunol*, **14**, 354-359.
- Honda, K. and Taniguchi, T.** (2006) IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol*, **6**, 644-658.

- Hsu, Y.T., Wolter, K.G. and Youle, R.J.** (1997) Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3668-3672.
- Hsu, Y.T. and Youle, R.J.** (1997) Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem*, **272**, 13829-13834.
- Hu, Y., et al.** (1998) WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem*, **273**, 33489-33494.
- Huang, D.C. and Strasser, A.** (2000) BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*, **103**, 839-842.
- Huang, Z.** (2000) Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design. *Oncogene*, **19**, 6627-6631.
- Hutcheson, J., et al.** (2005) Combined loss of proapoptotic genes Bak or Bax with Bim synergizes to cause defects in hematopoiesis and in thymocyte apoptosis. *J Exp Med*, **201**, 1949-1960.
- Jamaluddin, M., et al.** (2005) Respiratory syncytial virus-inducible BCL-3 expression antagonizes the STAT/IRF and NF-kappaB signaling pathways by inducing histone deacetylase 1 recruitment to the interleukin-8 promoter. *J Virol*, **79**, 15302-15313.
- Janeway, C.A., Jr. and Medzhitov, R.** (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, **20**, 197-216.
- Janeway, C.A., et al.** (2002) Immunologie.
- Jeffers, J.R., et al.** (2003) Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell*, **4**, 321-328.
- Joyce, D., et al.** (2001) NF-kappaB and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine Growth Factor Rev*, **12**, 73-90.
- Ju, S.T., et al.** (1995) Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature*, **373**, 444-448.
- Juwana, J.P., et al.** (1999) EB/RP gene family encodes tubulin binding proteins. *Int J Cancer*, **81**, 275-284.
- Kaisho, T. and Akira, S.** (2006) Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*, **117**, 979-987; quiz 988.
- Kakkanaiah, V.N., et al.** (1990) Evidence for major alterations in the thymocyte subpopulations in murine models of autoimmune diseases. *J Autoimmun*, **3**, 271-288.
- Karin, M. and Lin, A.** (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*, **3**, 221-227.
- Kashatus, D., Cogswell, P. and Baldwin, A.S.** (2006) Expression of the Bcl-3 proto-oncogene suppresses p53 activation. *Genes Dev*, **20**, 225-235.
- Kaufmann, T., et al.** (2003) Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol*, **160**, 53-64.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R.** (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**, 239-257.
- Kerr, L.D., et al.** (1992) The proto-oncogene bcl-3 encodes an I kappa B protein. *Genes Dev*, **6**, 2352-2363.
- Kim, H., et al.** (2006) Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol*, **8**, 1348-1358.
- Kim, J.Y., et al.** (2004) BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Exp Med*, **199**, 113-124.

- Kirschnek, S., et al.** (2005) Phagocytosis-induced apoptosis in macrophages is mediated by up-regulation and activation of the Bcl-2 homology domain 3-only protein Bim. *J Immunol*, **174**, 671-679.
- Kischkel, F.C., et al.** (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J*, **14**, 5579-5588.
- Kovanen, P.E. and Leonard, W.J.** (2004) Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol Rev*, **202**, 67-83.
- Krueger, A., et al.** (2001) FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol*, **21**, 8247-8254.
- Kuwana, T., et al.** (2005) BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell*, **17**, 525-535.
- Kuwana, T., et al.** (2002) Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, **111**, 331-342.
- Kuwata, H., et al.** (2003) IL-10-inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF-alpha production in macrophages. *Blood*, **102**, 4123-4129.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lei, K. and Davis, R.J.** (2003) JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2432-2437.
- Lenardo, M. and Siebenlist, U.** (1994) Bcl-3-mediated nuclear regulation of the NF-kappa B trans-activating factor. *Immunol Today*, **15**, 145-147.
- Letai, A., et al.** (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, **2**, 183-192.
- Leung, T.H., Hoffmann, A. and Baltimore, D.** (2004) One nucleotide in a kappaB site can determine cofactor specificity for NF-kappaB dimers. *Cell*, **118**, 453-464.
- Li, H., et al.** (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, **94**, 491-501.
- Li, P., et al.** (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479-489.
- Li, Q., et al.** (1999) Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. *Science*, **284**, 321-325.
- Lindsten, T., et al.** (2000) The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell*, **6**, 1389-1399.
- Linette, G.P., et al.** (1995) Peripheral T-cell lymphoma in lckpr-bcl-2 transgenic mice. *Blood*, **86**, 1255-1260.
- Liu, X., et al.** (2003) The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunity*, **19**, 341-352.
- Liu, Z.G., et al.** (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*, **87**, 565-576.
- Luciano, F., et al.** (2003) Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene*, **22**, 6785-6793.

- Ma, A., Koka, R. and Burkett, P.** (2006) Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol*, **24**, 657-679.
- Makris, C., et al.** (2000) Female mice heterozygous for IKK gamma/NEMO deficiencies develop a dermatopathy similar to the human X-linked disorder incontinentia pigmenti. *Mol Cell*, **5**, 969-979.
- Marani, M., et al.** (2002) Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. *Mol Cell Biol*, **22**, 3577-3589.
- Marrack, P. and Kappler, J.** (2004) Control of T cell viability. *Annu Rev Immunol*, **22**, 765-787.
- Marrack, P., Kappler, J. and Mitchell, T.** (1999) Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med*, **189**, 521-530.
- Marsden, V.S., Kappler, J.W. and Marrack, P.C.** (2006) Homeostasis of the memory T cell pool. *Int Arch Allergy Immunol*, **139**, 63-74.
- Marsden, V.S., et al.** (2002) Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature*, **419**, 634-637.
- Marszalek, J.R., et al.** (1999) Novel dendritic kinesin sorting identified by different process targeting of two related kinesins: KIF21A and KIF21B. *J Cell Biol*, **145**, 469-479.
- Massoumi, R., et al.** (2006) Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling. *Cell*, **125**, 665-677.
- Medzhitov, R. and Janeway, C., Jr.** (2000) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*, **173**, 89-97.
- Michel, F., et al.** (2001) Crystal structure of the ankyrin repeat domain of Bcl-3: a unique member of the I kappa B protein family. *Embo J*, **20**, 6180-6190.
- Mikhailov, V., et al.** (2003) Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release. *J Biol Chem*, **278**, 5367-5376.
- Mitchell, T.C., et al.** (2001) Immunological adjuvants promote activated T cell survival via induction of Bcl-3. *Nat Immunol*, **2**, 397-402.
- Mitchell, T.C., et al.** (2002) A short domain within Bcl-3 is responsible for its lymphocyte survival activity. *Ann N Y Acad Sci*, **975**, 132-147.
- Morel, P.A. and Oriss, T.B.** (1998) Crossregulation between Th1 and Th2 cells. *Crit Rev Immunol*, **18**, 275-303.
- Morelli, A.E., et al.** (2001) Cytokine production by mouse myeloid dendritic cells in relation to differentiation and terminal maturation induced by lipopolysaccharide or CD40 ligation. *Blood*, **98**, 1512-1523.
- Muchmore, S.W., et al.** (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*, **381**, 335-341.
- Muzio, M., et al.** (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*, **85**, 817-827.
- Muzio, M., et al.** (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem*, **273**, 2926-2930.
- Na, S.Y., et al.** (1998) Bcl3, an I kappa B protein, as a novel transcription coactivator of the retinoid X receptor. *J Biol Chem*, **273**, 30933-30938.
- Na, S.Y., et al.** (1999) Bcl3, an I kappa B protein, stimulates activating protein-1 transactivation and cellular proliferation. *J Biol Chem*, **274**, 28491-28496.

- Nakagawa, H., et al.** (2000) EB3, a novel member of the EB1 family preferentially expressed in the central nervous system, binds to a CNS-specific APC homologue. *Oncogene*, **19**, 210-216.
- Nakano, K. and Vousden, K.H.** (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, **7**, 683-694.
- Naumann, M., Wulczyn, F.G. and Scheidereit, C.** (1993) The NF-kappa B precursor p105 and the proto-oncogene product Bcl-3 are I kappa B molecules and control nuclear translocation of NF-kappa B. *Embo J*, **12**, 213-222.
- Naviaux, R.K., et al.** (1996) The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J Virol*, **70**, 5701-5705.
- Nechushtan, A., et al.** (2001) Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol*, **153**, 1265-1276.
- Newmeyer, D.D. and Ferguson-Miller, S.** (2003) Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*, **112**, 481-490.
- Nicholson, D.W. and Thornberry, N.A.** (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*, **22**, 299-306.
- Nijhawan, D., et al.** (2003) Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev*, **17**, 1475-1486.
- Nishikori, M., et al.** (2003) High-level expression of BCL3 differentiates t(2;5)(p23;q35)-positive anaplastic large cell lymphoma from Hodgkin disease. *Blood*, **101**, 2789-2796.
- Nishikori, M., et al.** (2005) Stimulation of CD30 in anaplastic large cell lymphoma leads to production of nuclear factor-kappaB p52, which is associated with hyperphosphorylated Bcl-3. *Cancer Sci*, **96**, 487-497.
- Nitta, T., et al.** (2006) IAN family critically regulates survival and development of T lymphocytes. *PLoS Biol*, **4**, e103.
- Nolan, G.P., et al.** (1993) The bcl-3 proto-oncogene encodes a nuclear I kappa B-like molecule that preferentially interacts with NF-kappa B p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner. *Mol Cell Biol*, **13**, 3557-3566.
- O'Connor, L., et al.** (1998) Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *Embo J*, **17**, 384-395.
- O'Reilly, L.A., et al.** (2000) The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells. *Am J Pathol*, **157**, 449-461.
- Oda, E., et al.** (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, **288**, 1053-1058.
- Oh, K.J., et al.** (2006) A membrane-targeted BID BCL-2 homology 3 peptide is sufficient for high potency activation of BAX in vitro. *J Biol Chem*, **281**, 36999-37008.
- Ohno, H., Takimoto, G. and McKeithan, T.W.** (1990) The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell*, **60**, 991-997.
- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L. and Korsmeyer, S.J.** (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, **74**, 609-619.
- Ong, S.T., et al.** (1998) Lymphadenopathy, splenomegaly, and altered immunoglobulin production in BCL3 transgenic mice. *Oncogene*, **16**, 2333-2343.

- Opferman, J.T., et al.** (2005) Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science*, **307**, 1101-1104.
- Opferman, J.T., et al.** (2003) Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature*, **426**, 671-676.
- Oshiumi, H., et al.** (2003) TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol*, **4**, 161-167.
- Pahl, H.L.** (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, **18**, 6853-6866.
- Pan, J. and McEver, R.P.** (1995) Regulation of the human P-selectin promoter by Bcl-3 and specific homodimeric members of the NF-kappa B/Rel family. *J Biol Chem*, **270**, 23077-23083.
- Parajuli, P., et al.** (2001) Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor preferentially expand and stimulate different dendritic and T-cell subsets. *Exp Hematol*, **29**, 1185-1193.
- Park, S.G., et al.** (2006) Up-regulation of cyclin D1 by HBx is mediated by NF-kappaB2/BCL3 complex through kappaB site of cyclin D1 promoter. *J Biol Chem*, **281**, 31770-31777.
- Paxian, S., et al.** (2002) Abnormal organogenesis of Peyer's patches in mice deficient for NF-kappaB1, NF-kappaB2, and Bcl-3. *Gastroenterology*, **122**, 1853-1868.
- Pellegrini, M., et al.** (2003) Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 14175-14180.
- Pestano, G.A., et al.** (1999) Inactivation of misselected CD8 T cells by CD8 gene methylation and cell death. *Science*, **284**, 1187-1191.
- Petros, A.M., et al.** (2000) Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. *Protein Sci*, **9**, 2528-2534.
- Poljak, L., et al.** (1999) Distinct activities of p52/NF-kappa B required for proper secondary lymphoid organ microarchitecture: functions enhanced by Bcl-3. *J Immunol*, **163**, 6581-6588.
- Putcha, G.V., et al.** (2003) JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron*, **38**, 899-914.
- Putcha, G.V., et al.** (2001) Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron*, **29**, 615-628.
- Puthalakath, H., et al.** (1999) The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell*, **3**, 287-296.
- Puthalakath, H. and Strasser, A.** (2002) Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ*, **9**, 505-512.
- Qin, J.Z., et al.** (2005) Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res*, **65**, 6282-6293.
- Ranger, A.M., et al.** (2003) Bad-deficient mice develop diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 9324-9329.
- Rathmell, J.C., et al.** (2002) Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat Immunol*, **3**, 932-939.
- Rebollo, A., et al.** (2000) Bcl-3 expression promotes cell survival following interleukin-4 deprivation and is controlled by AP1 and AP1-like transcription factors. *Mol Cell Biol*, **20**, 3407-3416.

- Richard, M., et al.** (1999) Interleukin-9 regulates NF-kappaB activity through BCL3 gene induction. *Blood*, **93**, 4318-4327.
- Riemann, M., et al.** (2005) The IkappaB protein Bcl-3 negatively regulates transcription of the IL-10 gene in macrophages. *J Immunol*, **175**, 3560-3568.
- Rinkenberger, J.L., et al.** (2000) Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev*, **14**, 23-27.
- Rocha, S., et al.** (2003) p53 represses cyclin D1 transcription through down regulation of Bcl-3 and inducing increased association of the p52 NF-kappaB subunit with histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol*, **23**, 4713-4727.
- Rogers, P.R., Huston, G. and Swain, S.L.** (1998) High antigen density and IL-2 are required for generation of CD4 effectors secreting Th1 rather than Th0 cytokines. *J Immunol*, **161**, 3844-3852.
- Romagnani, S.** (1992) Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunol Today*, **13**, 379-381.
- Russell, J.H., et al.** (1993) Mature T cells of autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigen-stimulated suicide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 4409-4413.
- Sainis, K. and Datta, S.K.** (1988) CD4+ T cell lines with selective patterns of autoreactivity as well as CD4- CD8- T helper cell lines augment the production of idiotypes shared by pathogenic anti-DNA autoantibodies in the NZB x SWR model of lupus nephritis. *J Immunol*, **140**, 2215-2224.
- Sattler, M., et al.** (1997) Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, **275**, 983-986.
- Savill, J., et al.** (2002) A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol*, **2**, 965-975.
- Savill, J. and Fadok, V.** (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, **407**, 784-788.
- Scaffidi, C., et al.** (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J*, **17**, 1675-1687.
- Schinzl, A., Kaufmann, T. and Borner, C.** (2004) Bcl-2 family members: integrators of survival and death signals in physiology and pathology [corrected]. *Biochim Biophys Acta*, **1644**, 95-105.
- Schneider, A., et al.** (2004) Identification of regulated genes during permanent focal cerebral ischaemia: characterization of the protein kinase 9b5/MARKL1/MARK4. *J Neurochem*, **88**, 1114-1126.
- Schwarz, E.M., et al.** (1997) Immunological defects in mice with a targeted disruption in Bcl-3. *Genes Dev*, **11**, 187-197.
- Scorrano, L., et al.** (2003) BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca2+: a control point for apoptosis. *Science*, **300**, 135-139.
- Shibue, T., et al.** (2003) Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev*, **17**, 2233-2238.
- Shiio, Y., et al.** (1996) Activation of the retinoblastoma gene expression by Bcl-3: implication for muscle cell differentiation. *Oncogene*, **12**, 1837-1845.
- Shinjyo, T., et al.** (2001) Downregulation of Bim, a proapoptotic relative of Bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors. *Mol Cell Biol*, **21**, 854-864.
- Silverman, N. and Maniatis, T.** (2001) NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev*, **15**, 2321-2342.
- Singer, P.A. and Theofilopoulos, A.N.** (1990) Novel origin of lpr and gld cells and possible implications in autoimmunity. *J Autoimmun*, **3**, 123-135.

- Stahl, M., et al.** (2002) The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J Immunol*, **168**, 5024-5031.
- Strasser, A., Harris, A.W. and Cory, S.** (1991) bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell*, **67**, 889-899.
- Strasser, A., Huang, D.C. and Vaux, D.L.** (1997) The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumourigenesis and resistance to chemotherapy. *Biochim Biophys Acta*, **1333**, F151-178.
- Strasser, A. and Pellegrini, M.** (2004) T-lymphocyte death during shutdown of an immune response. *Trends Immunol*, **25**, 610-615.
- Su, L.K. and Qi, Y.** (2001) Characterization of human MAPRE genes and their proteins. *Genomics*, **71**, 142-149.
- Sun, Y. and Leaman, D.W.** (2005) Involvement of Noxa in cellular apoptotic responses to interferon, double-stranded RNA, and virus infection. *J Biol Chem*, **280**, 15561-15568.
- Surh, C.D. and Sprent, J.** (1994) T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature*, **372**, 100-103.
- Suzuki, M., Youle, R.J. and Tjandra, N.** (2000) Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*, **103**, 645-654.
- Takahashi, T., et al.** (1994) Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell*, **76**, 969-976.
- Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S.** (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, **21**, 335-376.
- Trevani, A.S., et al.** (1996) Neutrophil apoptosis induced by proteolytic enzymes. *Lab Invest*, **74**, 711-721.
- Trinczek, B., et al.** (2004) MARK4 is a novel microtubule-associated proteins/microtubule affinity-regulating kinase that binds to the cellular microtubule network and to centrosomes. *J Biol Chem*, **279**, 5915-5923.
- Valenzuela, J.O., Hammerbeck, C.D. and Mescher, M.F.** (2005) Cutting edge: Bcl-3 up-regulation by signal 3 cytokine (IL-12) prolongs survival of antigen-activated CD8 T cells. *J Immunol*, **174**, 600-604.
- Vaux, D.L. and Strasser, A.** (1996) The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2239-2244.
- Veis, D.J., et al.** (1993) Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*, **75**, 229-240.
- Vella, A.T., et al.** (1998) Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3810-3815.
- Vella, A.T., et al.** (1995) Lipopolysaccharide interferes with the induction of peripheral T cell death. *Immunity*, **2**, 261-270.
- Vella, A.T., et al.** (1997) CD28 engagement and proinflammatory cytokines contribute to T cell expansion and long-term survival in vivo. *J Immunol*, **158**, 4714-4720.
- Verhagen, A.M. and Vaux, D.L.** (2002) Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis*, **7**, 163-166.
- Viatour, P., et al.** (2003) NF- κ B/p100 induces Bcl-2 expression. *Leukemia*, **17**, 1349-1356.
- Viatour, P., et al.** (2004) GSK3-mediated BCL-3 phosphorylation modulates its degradation and its oncogenicity. *Mol Cell*, **16**, 35-45.
- Villunger, A., et al.** (2003) p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science*, **302**, 1036-1038.

- Villunger, A., et al.** (2000) Fas ligand, Bcl-2, granulocyte colony-stimulating factor, and p38 mitogen-activated protein kinase: Regulators of distinct cell death and survival pathways in granulocytes. *J Exp Med*, **192**, 647-658.
- Villunger, A., et al.** (2003) Essential role for the BH3-only protein Bim but redundant roles for Bax, Bcl-2, and Bcl-w in the control of granulocyte survival. *Blood*, **101**, 2393-2400.
- Vogt, C.** (1842) Untersuchungen über die Entwicklungsbiologie der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). *Jent und Gassmann*.
- Wang, K., et al.** (1996) BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev*, **10**, 2859-2869.
- Wang, X.** (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, **15**, 2922-2933.
- Watanabe-Fukunaga, R., et al.** (1992) Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, **356**, 314-317.
- Watanabe, N., et al.** (1997) Regulation of NFkB1 proteins by the candidate oncoprotein BCL-3: generation of NF-kappaB homodimers from the cytoplasmic pool of p50-p105 and nuclear translocation. *Embo J*, **16**, 3609-3620.
- Wei, M.C., et al.** (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev*, **14**, 2060-2071.
- Wessells, J., et al.** (2004) BCL-3 and NF-kappaB p50 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in macrophages. *J Biol Chem*, **279**, 49995-50003.
- West, A.P., Koblansky, A.A. and Ghosh, S.** (2006) Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **22**, 409-437.
- Westerheide, S.D., et al.** (2001) The putative oncoprotein Bcl-3 induces cyclin D1 to stimulate G(1) transition. *Mol Cell Biol*, **21**, 8428-8436.
- Weston, C.R., et al.** (2003) Activation of ERK1/2 by deltaRaf-1:ER* represses Bim expression independently of the JNK or PI3K pathways. *Oncogene*, **22**, 1281-1293.
- White, J., et al.** (1989) The V beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell*, **56**, 27-35.
- Whitfield, J., et al.** (2001) Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron*, **29**, 629-643.
- Williams, M.A., et al.** (2006) Developing and maintaining protective CD8+ memory T cells. *Immunol Rev*, **211**, 146-153.
- Willis, S.N. and Adams, J.M.** (2005) Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 617-625.
- Willis, S.N., et al.** (2005) Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev*, **19**, 1294-1305.
- Wolter, K.G., et al.** (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*, **139**, 1281-1292.
- Wu, L. and Dakic, A.** (2004) Development of dendritic cell system. *Cell Mol Immunol*, **1**, 112-118.
- Wulczyn, F.G., Krappmann, D. and Scheidereit, C.** (1996) The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J Mol Med*, **74**, 749-769.

- Wulczyn, F.G., Naumann, M. and Scheidereit, C.** (1992) Candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a subunit-specific inhibitor of transcription factor NF-kappa B. *Nature*, **358**, 597-599.
- Ying, S., et al.** (2006) Characterization of host cell death induced by Chlamydia trachomatis. *Infect Immun*, **74**, 6057-6066.
- You, H., et al.** (2006) FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *J Exp Med*, **203**, 1657-1663.
- Yu, J., et al.** (2001) PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell*, **7**, 673-682.
- Zhang, M.Y., et al.** (1998) Bcl-3 expression and nuclear translocation are induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and erythropoietin in proliferating human erythroid precursors. *Blood*, **92**, 1225-1234.
- Zhang, Q., et al.** (1994) BCL3 encodes a nuclear protein which can alter the subcellular location of NF-kappa B proteins. *Mol Cell Biol*, **14**, 3915-3926.
- Zhao, Y., et al.** (2005) Regulation of Bcl-3 through interaction with the Lck tyrosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, **335**, 865-873.
- Zhou, P., et al.** (2001) MCL1 transgenic mice exhibit a high incidence of B-cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes. *Blood*, **97**, 3902-3909.
- Zhu, Y., et al.** (2006) Bax does not have to adopt its final form to drive T cell death. *J Exp Med*, **203**, 1147-1152.
- Zhu, Y., et al.** (2004) Constitutive association of the proapoptotic protein Bim with Bcl-2-related proteins on mitochondria in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 7681-7686.
- Zong, W.X., et al.** (2001) BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev*, **15**, 1481-1486.
- Zou, H., et al.** (1999) An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*, **274**, 11549-11556.

7 Anhang

Microarraydaten der bekannten Gene

Unigene	Name	Symbol	x-fache Induktion
Mm.130929	Ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 1	Ubr1	32,4
Mm.33811	immunity-related GTPase family, cinema 1	Irgc1	21,7
Mm.161174	Retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1	Rpgrip1	17,0
Mm.114758	bone morphogenic protein receptor, type II	Bmpr2	14,6
Mm.1452	CD86 antigen	Cd86	8,9
Mm.3711	glycerol phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial	Gpd2	5,8
Mm.57175	CD83 antigen	Cd83	5,5
Mm.223674	Synaptophysin, mRNA	Syp	5,2
Mm.87787	lymphotoxin A	Lta	4,8
Mm.24820	midline 1	Mid1	4,5
Mm.38527	EGF-like-domain, multiple 4	Egfl4	3,9
Mm.3370	chemokine (C-C motif) ligand 5	Ccl5	3,8
Mm.1359	urokinase plasminogen activator receptor	Plaur	3,7
Mm.1121	Loricrin (Lor), mRNA	Lor	3,3
Mm.216113	activated leukocyte cell adhesion molecule	Alcam	2,8
Mm.104744	tight junction protein 2	Tjp2	2,8
Mm.1452	CD86 antigen	Cd86	2,7
Mm.23662	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain	Sema6c	2,7
Mm.3711	glycerol phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial	Gpd2	2,5
Mm.102737	Mannoside acetylglucosaminyltransferase 5 (Mgat5), mRNA	Mgat5	2,4
Mm.21070	glutamate-rich WD repeat containing 1	Grwd1	2,3
Mm.240437	immunoglobulin heavy chain (J558 family)	Igh-VJ558	2,3
Mm.27794	intersex-like (Drosophila)	Ixl	2,3
Mm.6442	polycystic kidney disease 2	Pkd2	2,2
Mm.289615	St6galnac3, mRNA	Siat7c	2,2
Mm.4606	branched chain aminotransferase 1, cytosolic	Bcat1	2,2
Mm.944	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1	Lrig1	2,2
Mm.127482	gem (nuclear organelle) associated protein 4	Gemin4	2,2
Mm.189782	monocyte to macrophage differentiation-associated	Mmd	2,1
Mm.1282	chemokine (C-C motif) ligand 3	Ccl3	2,1
Mm.3845	eukaryotic translation termination factor 1	Etf1	2,1
Mm.3711	glycerol phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial	Gpd2	2,0
Mm.36726	ladinin	Lad1	2,0
Mm.2034	neurofilament, heavy polypeptide	Nefh	2,0
Mm.181740	interferon-related developmental regulator 2	Ifrd2	2,0
Mm.22524	cold shock domain containing C2, RNA binding	Csdc2	2,0
Mm.27159	ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 2	Asb2	2,0
Mm.190	chemokine (C motif) ligand 1	Xcl1	2,0
Mm.30242	peptidylprolyl isomerase D (cyclophilin D)	Lamp3	2,0
Mm.28548	lipin 1	Lpin1	-2,0
Mm.3689	CD37 antigen	Cd37	-2,0
Mm.30088	caseinolytic peptidase X (E. coli)	Clpx	-2,0
Mm.269857	solute carrier family 2, member 3	Slc2a3	-2,0
Mm.260207	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	Hmgcr	-2,0
Mm.29856	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	Pck2	-2,0
Mm.36710	solute carrier family 25, member 37	Slc25a37	-2,0
Mm.41457	ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 1	Abtb1	-2,0

Unigene	Name	Symbol	x-fache Induktion
Mm.29616	centaurin, delta 1	Centd1	-2,0
Mm.35493	activating transcription factor 7 interacting protein	Atf7ip	-2,1
Mm.254904	SH3-domain kinase binding protein 1	Sh3kbp1	-2,1
Mm.222867	death-associated protein	Dap	-2,1
Mm.43081	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3	Mapk8ip3	-2,1
Mm.28548	lipin 1	Lpin1	-2,1
Mm.26658	interleukin 10 receptor, alpha	Il10ra	-2,1
Mm.24457	aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1	Aldh1b1	-2,1
Mm.22025	FCH domain only 1	Fcho1	-2,1
Mm.34608	citrate lyase beta like	Clybl	-2,1
Mm.259829	histone deacetylase 7A	Hdac7a	-2,1
Mm.495	arrestin, beta 1	Arrb1	-2,1
Mm.23776	proline/serine-rich coiled-coil 1	Psrc1	-2,1
Mm.22216	TSC22 domain family 3	Tsc22d3	-2,1
Mm.25848	branched chain ketoacid dehydrogenase E1	Bckdha	-2,1
Mm.33799	symplesin	Sympk	-2,1
Mm.249873	CD38 antigen	Cd38	-2,1
Mm.29454	Niemann Pick type C2	Npc2	-2,1
Mm.149029	beta galactoside alpha 2,6 sialyltransferase 1	St6gal1	-2,1
Mm.193096	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	Scd2	-2,1
Mm.135677	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 2	Trem12	-2,1
Mm.11982	growth arrest-specific 2 like 3	Gas2l3	-2,1
Mm.169240	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1	Malat1	-2,1
Mm.203870	expressed sequence AI413582	AI413582	-2,1
Mm.239470	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 3	Abca3	-2,1
Mm.100638	xylosyltransferase II	Xylt2	-2,1
Mm.193096	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	Scd2	-2,1
Mm.1056	solute carrier family 1, member 5	Slc1a5	-2,1
Mm.179747	integrin alpha 7	Itga7	-2,1
Mm.21109	gelsolin	Gsn	-2,1
Mm.22147	GTP binding protein 2	Gtpbp2	-2,1
Mm.28566	arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase	As3mt	-2,1
Mm.26378	tescalcin	MGI:1930803	-2,1
Mm.21697	DNA-damage-inducible transcript 4	Ddit4	-2,1
Mm.219462	retinol dehydrogenase 11	Rdh11	-2,2
Mm.3204	farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1	Fdft1	-2,2
Mm.207457	REST corepressor 3	Rcor3	-2,2
Mm.3213	low density lipoprotein receptor	Ldlr	-2,2
Mm.3468	suppressor of cytokine signaling 3	Socs3	-2,2
Mm.24201	hydroxyacylglutathione hydrolase-like	Haghl	-2,2
Mm.30849	prenylcysteine oxidase 1	Pcyox1	-2,2
Mm.147226	metallothionein 2	Mt2	-2,2
Mm.28424	additional sex combs like 1 (Drosophila)	Asx11	-2,2
Mm.34079	inositol (myo)-1(or 4)-monophosphatase 2	Impa2	-2,2
Mm.13264	regulator of G-protein signaling 11	Rgs11	-2,2
Mm.269857	solute carrier family 2, member 3	Slc2a3	-2,2
Mm.2918	megakaryocyte-associated tyrosine kinase	Matk	-2,2
Mm.4839	activin A receptor, type II-like 1	Acvrl1	-2,2
Mm.21935	signal transducer and activator of transcription 2	Stat2	-2,2
Mm.2621	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	Aldh2	-2,2
Mm.33484	EGL nine homolog 3 (C. elegans)	Egln3	-2,2
Mm.24304	LUC7-like 2 (S. cerevisiae) (Luc7I2), mRNA	Luc7I2	-2,2
Mm.35850	ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2	Abtb2	-2,3

Unigene	Name	Symbol	x-fache Induktion
Mm.260747	damage specific DNA binding protein 2	Ddb2	-2,3
Mm.21109	gelsolin	Gsn	-2,3
Mm.28498	caspase recruitment domain 4	Card4	-2,3
Mm.24477	dedicator of cytokinesis 9	Dock9	-2,3
Mm.264645	histone 1, H2bp	Hist1h2bp	-2,3
Mm.100818	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G like	Polr3gl	-2,3
Mm.49752	ring finger protein 157	Rnf157	-2,3
Mm.7044	acyl-CoA synthetase short-chain family member 1	Acss1	-2,3
Mm.21935	signal transducer and activator of transcription 2	Stat2	-2,3
Mm.5043	FBJ osteosarcoma oncogene	Fos	-2,3
Mm.17911	lectin, galactose binding, soluble 4	Lgals4	-2,4
Mm.389	interleukin 7 receptor	Il7r	-2,4
Mm.13917	ribosomal protein L22	Rpl22	-2,4
Mm.4437	mitogen activated protein kinase 14	Mapk14	-2,4
Mm.196558	selenium binding protein 1	Selenbp1	-2,4
Mm.100579	RAB GTPase activating protein 1-like	Rabgap1l	-2,4
Mm.77432	thioredoxin interacting protein	Txnip	-2,4
Mm.77432	thioredoxin interacting protein	Txnip	-2,4
Mm.211720	arylsulfatase B	Arsb	-2,4
Mm.40708	F-box and leucine-rich repeat protein 4	Fbxl4	-2,4
Mm.86338	ALS2 C-terminal like	Als2cl	-2,5
Mm.233031	acid phosphatase-like 2	Acpl2	-2,5
Mm.49752	ring finger protein 157	Rnf157	-2,5
Mm.31817	dyslexia susceptibility 1 candidate 1 homolog (human)	Dyx1c1	-2,5
Mm.21109	gelsolin	Gsn	-2,5
Mm.27944	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	Acsl3	-2,5
Mm.30100	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	Haa0	-2,6
Mm.389	interleukin 7 receptor	Il7r	-2,6
Mm.7660	Bcl-2 binding component 3	Bbc3	-2,6
Mm.29997	reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain	Rcn3	-2,6
Mm.233802	interleukin 4 receptor, alpha	Il4ra	-2,6
Mm.3532	dedicator of cytokinesis 8	Dock8	-2,6
Mm.30047	liver glycogen phosphorylase	Pygl	-2,6
Mm.25620	deoxynucleotidyltransferase, terminal	Dntt	-2,6
Mm.4063	N-myc downstream regulated gene 1	Ndrp1	-2,6
Mm.87128	absent in melanoma 1-like	Aim1l	-2,7
Mm.246332	bone marrow stromal cell antigen 1	Bst1	-2,7
Mm.15918	mitogen activated protein kinase kinase kinase 1	Map3k1	-2,7
Mm.235194	thymoma viral proto-oncogene 3	Akt3	-2,7
Mm.32950	general transcription factor II I repeat domain-containing 1	Gtf2ird1	-2,7
Mm.43081	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3	Mapk8ip3	-2,8
Mm.1147	calmodulin 3	Calm3	-2,8
Mm.104972	claudin 10	Cldn10	-2,8
Mm.276277	expressed sequence AI839550	AI839550	-2,8
Mm.2918	megakaryocyte-associated tyrosine kinase	Matk	-2,8
Mm.148007	AKT1 substrate 1 (proline-rich)	Akt1s1	-2,9
Mm.9925	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	Idh1	-2,9
Mm.25694	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2	Srgap2	-2,9
Mm.3468	suppressor of cytokine signaling 3	Socs3	-2,9
Mm.27287	dickkopf-like 1	Dkk1	-2,9
Mm.3544	calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit	Cacnb3	-3,0
Mm.225405	selenium binding protein 1	Selenbp1	-3,0
Mm.18843	transglutaminase 2, C polypeptide	Tgm2	-3,0

Unigene	Name	Symbol	x-fache Induktion
Mm.266417	sorbin and SH3 domain containing 1	Sorbs1	-3,0
Mm.44490	doublecortin and CaM kinase-like 2	Dcamkl2	-3,0
Mm.29140	C1q domain containing 2	C1qdc2	-3,2
Mm.255080	poliovirus receptor	Pvr	-3,2
Mm.246332	bone marrow stromal cell antigen 1	Bst1	-3,2
Mm.24536	bromodomain, testis-specific	Brdt	-3,2
Mm.29140	C1q domain containing 2	C1qdc2	-3,3
Mm.30837	N-myc downstream regulated-like	Ndrl	-3,3
Mm.4063	N-myc downstream regulated gene 1	Ndrp1	-3,3
Mm.7729	aldolase 3, C isoform	Aldoc	-3,4
Mm.77620	inter-alpha (globulin) inhibitor H5	Itih5	-3,5
Mm.21109	gelsolin	Gsn	-3,5
Mm.7756	solute carrier family 2, member 3	Slc2a3	-3,5
Mm.159813	ethanol induced 1	Etohi1	-3,6
Mm.22961	pre-B-cell leukemia transcription factor 4	Pbx4	-3,6
Mm.7756	solute carrier family 2, member 3	Slc2a3	-3,6
Mm.180409	ubiquitin-conjugating enzyme E2H	Ube2h	-3,6
Mm.25620	deoxynucleotidyltransferase, terminal	Dntt	-3,6
Mm.4063	N-myc downstream regulated gene 1	Ndrp1	-3,7
Mm.267377	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	Scd1	-3,8
Mm.38901	fatty acid desaturase 2	Fads2	-3,8
Mm.3468	suppressor of cytokine signaling 3	Socs3	-3,8
Mm.265786	Heparanase (Hpse), mRNA	Hpse	-3,9
Mm.267377	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	Scd1	-4,1
Mm.34363	suprabasin	MGI:2446326	-4,2
Mm.4063	N-myc downstream regulated gene 1	Ndrp1	-4,3
Mm.276198	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4	Mark4	-5,2
Mm.171334	syntaxin 17	Stx17	-5,4
Mm.14487	mitogen activated protein kinase kinase 6	Map2k6	-5,6
Mm.240548	benzodiazapine receptor associated protein 1	Bzap1	-5,8
Mm.23789	SNF1-like kinase (Snf1k), mRNA	Snf1k	-6,3
Mm.27735	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1	Smurf1	-6,4
Mm.35372	carboxypeptidase M	Cpm	-6,4
Mm.87012	transmembrane inner ear	Tmie	-6,9
Mm.255080	poliovirus receptor	Pvr	-7,4
Mm.22628	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 3	Mapre3	-7,9
Mm.23458	zinc finger protein 261	Zfp261	-8,2
Mm.3440	adenylosuccinate synthetase like 1	Adssl1	-8,6
Mm.3815	syndecan 4	Sdc4	-9,6
Mm.3992	transforming growth factor, beta 3	Tgfb3	-9,8
Mm.21855	peptidoglycan recognition protein 1	Pglyrp1	-9,9
Mm.25291	RAS guanyl releasing protein 4	Rasgrp4	-10,2
Mm.250802	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1a	Serpib1a	-10,4
Mm.31598	mitogen activated protein kinase 1 interacting protein 1 sirtuin 5 (silent mating type information regulation 2 homolog)	Mapk1ip1	-10,8
Mm.35325	homolog)	Sirt5	-12,5
Mm.33956	kinesin family member 21B	Kif21b	-14,1
Mm.4081	runt related transcription factor 1	Runx1	-16,1
Mm.3705	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase	P4ha2	-16,8
Mm.16080	dynamamin 1	Dnm1	-18,9
Mm.34363	suprabasin	MGI:2446326	-27,5

Danksagung:

Herrn Prof. Dr. Georg Häcker danke ich für die Vergabe dieses interessanten und spannenden Themas. Seine hilfreichen Diskussionen und Anregungen, sein Vertrauen in meine Arbeit und sein stetes Interesse an deren Fortgang, haben mich fortwährend sehr motiviert und begeistert.

Bei **Herrn Prof. Dr. Michael Schemann** möchte ich mich bedanken für die freundliche Bereitschaft, die Betreuung meiner Arbeit von Seiten der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt zu übernehmen

Herrn **Prof. Dr. Dr. h.c. Hermann Wagner** danke ich für die Möglichkeit, am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München diese Arbeit anzufertigen.

Herrn **Prof. Roland M. Schmid** danke ich für das Interesse an meiner Arbeit, die Zusammenarbeit mit seiner Arbeitsgruppe und die Bereitstellung verschiedener Knockout-Mäuse.

Univ.-Doz. Dr. Andreas Villunger danke ebenfalls für sein Interesse an meiner Arbeit und die entstandene Kooperation in diesem Projekt.

Trotz großer Entfernung möchte ich **Prof. Dr. Andreas Strasser** und der ehemaligen Kollegin **Dr. Silke F. Fischer** (WEHI, Melbourne) für die gute Zusammenarbeit in diesem Projekt danken.

Weiterhin gilt mein Dank den Experten des Mircoarrays im Labor von **PD Dr. R. Lang** (**Dr. Jörg Mages** und **Angela Servatius**) sowie der FACS-Analyse im Labor von **Prof. Dr. Dirk Busch** (**PD Dr. Katharina Huster**, **Dr. Matthias Schiemann**, **Dipl.-biol. Christian Stemberger**)

Natürlich geht mein ganz besonderer Dank an alle jetzigen und ehemaligen Arbeitskollegen im Labor von Prof. Georg Häcker. Deren ständige Hilfsbereitschaft, deren offenes Ohr für tiefgründige Diskussionen und auch die gemeinsamen Unternehmungen außerhalb des Labors haben ein sehr angenehmes Arbeitsklima entstehen lassen und mir viel Freude beim Arbeiten bereitet. Auch innerhalb des Instituts und den Nachbarinstituten haben jetzige und ehemalige Arbeitskollegen eine sehr freundschaftliche Atmosphäre geschaffen für die ich ihnen danken möchte. Ganz besonders sei hier **Michael Hammer** erwähnt. Den Mitarbeitern im Mausstall danke ich für die gute Betreuung der Mäuse.

Besonder Dank geht auch an **Heidi Randlkofer** und **Frank Lehmann**, die immer an mich geglaubt und mich unterstützt haben.

Am meisten habe ich aber sicherlich meiner Familie und ganz besonders meinen Eltern und meiner Schwester mit Ben und Max zu verdanken, die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben. Vielen Dank.