

## 8 APPENDIX

### 8.1 List of abbreviations and acronyms

A:	adenine	ICAD:	inhibitor of CAD
aa:	amino acid(s)	Ig:	immunoglobulin
AIDS:	acquired immunodeficiency syndrome	IP <sub>3</sub> :	inositol 1,4,5-triphosphate
AIF:	apoptosis inducing factor	IPTG:	isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
APC:	antigen-presenting cell	ITAM:	immunoreceptor tyrosine-based activation motive
ARE:	AU-rich region	J:	joule
ATP:	adenosine triphosphate	k:	kilo
BCR:	B cell receptor (surface IgM)	kb:	kilobasepair
Berg36:	B cell early response gene 36	l:	liter
BH:	Bcl-2 homology domain	M:	molar
BL:	Burkitt's lymphoma	m:	milli
bp:	base pair	μ:	micro
Bq:	becquerel	Mcm:	minichromosome maintenance
°C:	degrees Celsius	MEF:	murine embryonal fibroblasts
C:	cytosine	min:	minute(s)
CAD:	caspase-activated DNase	mRNA:	messenger RNA
Ca-I:	calcium ionophore	n:	nano
CARD:	caspase recruitment domain	NES:	nuclear export sequence
caspase:	cysteiny l aspartate-specific protease	NF-AT:	nuclear factor of activated T cells
Cdc6:	cell division cycle gene 6	NHEJ:	non-homologous end joining
cDNA:	complementary DNA	NLS:	nuclear localization signal
<i>C. elegans</i> :	<i>Caenorhabditis elegans</i>	OD:	optical density
Ci:	curie (1 Ci = 3.7*10 <sup>10</sup> Bq)	ORC:	origin recognition complex
cm:	centimeter	p:	pico
cpm:	counts per minute	PAGE:	polyacrylamide gelelectrophoresis
cs:	catalytic subunit (of DNA-PK)	PARP:	poly (ADP)-ribose polymerase
Da:	Dalton	PCR:	polymerase chain reaction
DAG:	diacylglycerol	PI:	propidium iodide
DAPI:	4.6-diamidino-2-phenylindole	PMSF:	phenylmethylsulfonylchloride
DED:	death-effector domain	pre-RC:	pre-replicative complex
DISC:	death-inducing signaling complex	PSL:	photo-stimulated luminescence
DMSO:	dimethylsulfoxide	RAG:	recombination activating gene
DNA:	2'-desoxyribonucleic acid	RNA:	ribonucleic acid
DNA-PK:	DNA-dependent protein kinase	RPA:	RNase protection assay
dNTP:	2'-desoxynucleoside 5'-triphosphate	rRNA:	ribosomal RNA
DTT:	dithiothreitol	RT:	room temperature
DUSP5:	dual-specificity phosphatase 5	RT-PCR:	reverse transcription PCR
ECL:	enhanced chemiluminescence	SDS:	sodium dodecylsulfate
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>	sec:	seconds
EDTA:	ethylenediaminetetraacetat	siRNA:	small interfering RNA
EGR:	early growth response	STS:	staurosporine
ER:	endoplasmatic reticulum	T:	thymine
EtBr:	ethidium bromide	TBP:	TATA-binding protein
FACS:	fluorescence activated cell sorting	TCR:	T cell receptor
FADD:	fas-associated death domain protein	TGF:	transforming growth factor
FCS:	fetal calf serum	TNF:	tumor necrosis factor
FITC:	fluorescein-5-isothiocyant	TNT:	transcription and translation assay
FLIP:	flice (caspase-8) inhibitory protein	TTP:	tristetraprolin
G:	guanine	U:	uracil
g:	gram	UTR:	untranslated region
GM-CSF:	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	UV:	ultra violet
h:	hour(s)	V:	volt
HRP:	horseradish peroxidase	wt:	wildtype
IAP:	inhibitor of apoptosis protein		

## **8.2 Declaration**

I hereby certify that I prepared the present work independently using exclusively the indicated resources.

### **8.3 Zusammenfassung**

Apoptose (programmierter Zelltod) ist ein wichtiger Prozess, der in allen mehrzelligen Lebewesen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung, Differenzierung und Erhaltung von Geweben spielt. Dieses zelluläre Selbstmord-Programm eliminiert unter anderem überschüssige und infizierte Zellen sowie Zellen mit irreparabel geschädigter DNA. Im Immunsystem von Säugetieren spielt Apoptose eine entscheidende Rolle bei der Selektion eines funktionellen Antikörper- und T-Zell-Rezeptor-Repertoires und bei der Eliminierung autoreaktiver Lymphozyten.

Die *in vivo* durch Selbst-Antigene ausgelöste Apoptose autoreaktiver B-Zellen kann *in vitro* an der Zelllinie BL60-2 (Burkitt-Lymphom) durch Antikörper-vermittelte Quervernetzung der B-Zell-Rezeptoren nachgeahmt werden. Über 70% der BL60-2-Zellen sterben nach 24 Stunden Stimulation durch Apoptose. Dieser hohe Prozentsatz macht die BL60-2-Zelllinie zu einem idealen Modellsystem.

In Proliferations-Experimenten konnte ich zeigen, dass die DNA-Replikation in apoptotischen BL60-2-Zellen massiv herunterreguliert wird. Ein Ziel der Dissertation war es deshalb, den Einfluss der Apoptose auf den prä-replikativen Komplex zu untersuchen. Dieser Multi-Protein-Komplex wird für die Initiation der DNA-Replikation benötigt. Mit „RNase protection assays“ (RPAs) konnte eine Abnahme der mRNA-Menge für die Komponenten Mcm2-7 und Cdc6 nachgewiesen werden. Außerdem konnte ich zeigen, dass die Proteine Mcm3 und Cdc6 in apoptotischen BL60-2-Zellen gespalten werden. Die gleichen Proteinfragmente konnten nach verschiedenen Apoptose-Stimuli und in weiteren Zelllinien nachgewiesen werden, was auf einen generellen apoptotischen Mechanismus hinweist. Beide Proteine werden von Caspasen (Apoptose-spezifischen Proteasen) gespalten. Die involvierten Effektor-Caspasen und die jeweiligen Schnittstellen wurden *in vitro* ermittelt. Die Mutation der Schnittstellen erzeugte Proteine, die nach Überexpression in HeLa-Zellen und Apoptose-Induktion nicht mehr gespalten wurden. Die Klonierung und Überexpression der Apoptose-spezifischen Mcm3- und Cdc6-Fragmente ermöglichte es, ihre intrazelluläre Lokalisation sowie ihre Fähigkeit zur Komplexbildung mit Mcm4 (für Mcm3-Fragmente) bzw. zur Chromatinbindung (für Cdc6-Fragmente) im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp-Protein zu untersuchen. Für das in apoptotischen Zellen generierte N-terminale Mcm3-Fragment konnte eine pro-apoptotische Wirkung gezeigt werden, was auf einen positiven Rückkopplungsmechanismus hindeutet.

Apoptose ist als aktiver Prozess im Gegensatz zur Nekrose abhängig von der Transkription und Translation spezifischer, für die apoptotischen Prozesse benötigter Gene. Andererseits muss die Wirkung anti-apoptotischer Proteine inhibiert werden. Dies

kann durch ihren Abbau, Inaktivierung oder durch Modulation ihrer Expression geschehen. Ein weiteres Ziel der Dissertation war es deshalb, mit verschiedenen Methoden die Regulation von Genen in apoptotischen B-Zellen zu untersuchen. Verwendet wurden dazu Affymetrix Gen-Chips, cDNA-Membranen und RPAs. Es konnte die negative Regulation von DNA-Reparaturgenen, von denen zwei außerdem auf Proteinebene durch Caspasen gespalten werden, gezeigt werden. DNA-Reparatur in apoptotischen Zellen wäre kontraproduktiv, da die Fragmentierung des Genoms einen wichtigen Schritt in der apoptotischen Degradierung der Zelle darstellt. Darüber hinaus wird durch DNA-Reparatur ATP verbraucht, das für die apoptotischen Prozesse benötigt wird. Weitere Gene, für die eine differenzielle Expression gezeigt werden konnte, sind unter anderem mehrere Transkriptionsfaktoren, zwei Phosphatasen und andere Gene, die verschiedenen funktionellen Gruppen zugeordnet werden können.

Insgesamt konnte ich eine negative Regulation von wichtigen Komponenten der DNA-Replikation und -Reparatur in apoptotischen Zellen auf mRNA- und Protein-Ebene nachweisen. An deren transkriptioneller Regulation könnten auch einige der differenziell exprimierten Transkriptionsfaktoren beteiligt sein. Die Repression von DNA-Replikation und DNA-Reparatur sorgt wahrscheinlich für eine effektive Inhibition der DNA-Synthese und trägt damit zu einem reibungslosen Ablauf der DNA-Fragmentierung in apoptotischen Zellen bei. Darüber hinaus wird durch die negative Regulation beider Prozesse der Verbrauch von ATP reduziert. Da Zellen bei ATP-Mangel von der apoptotischen zur nekrotischen Form des Zelltodes umschwenken können, wodurch eine Lyse der Zelle und eventuell Entzündungs-Reaktionen verursacht würden, ist die Aufrechterhaltung eines bestimmten ATP-Levels in apoptotischen Zellen essentiell. Des Weiteren konnte ich den pro-apoptotischen Effekt eines während der Apoptose entstehenden Mcm3-Fragments zeigen. Die Spaltung von Proteinen des prä-replikativen Komplexes erfüllt demnach durch Induktion eines Amplifikationsschritts im apoptotischen Prozess eine weitere wichtige Funktion, die deutlich über die reine Inhibition der DNA-Replikation hinausgeht. Möglicherweise löst eine durch die Spaltung bewirkte Störung der DNA-Replikation den DNA-Replikations-Kontrollpunkt aus und induziert dadurch ein die Apoptose verstärkendes Signal.

## **8.4 Acknowledgements**

I wish to thank Prof. Dr. B. Dörken for the opportunity of working in his department of Medical Oncology and Tumorimmunology at the Max-Delbrück-Center under optimal scientific conditions.

Special thanks go to Dr. Kurt Bommert for the friendly and supportive supervision of my thesis, his never ending repertoire of new ideas, many fruitful discussions, and great CDs.

I would like to thank Prof. Dr. F.G. Rathjen and Dr. Ralf Bargou for the scientific appraisal of my thesis.

In addition, I wish to thank Dr. Manfred Gossen and his research group for the good cooperation.

Thanks also to Ute Nitschke and Björn Lamprecht for their excellent technical assistance and to all lab members for their helpfulness and the good times we had. Thanks in particular to Andreas Lietz for always listening to reports about exciting and not so exciting results, for helpful suggestions and for making me laugh even on bad days.

Another big thank you goes to Emma und Dr. Frank Thomalla for reading carefully what was all Greek to them and for their help with the English grammar and punctuation rules which, on occasion, are still Greek to me.

I wish to especially thank my parents Christiane and Manfred Tiedt for their encouragement and support at all times that enabled me to follow my path, even if it was a little curvaceous in between.

Last but not least, I would like to thank Alexander Schories for his patience in stressful phases, for forcing me to go to the zoo and for his general support in many ways.

## 8.5 Curriculum vitae of Barbara Tiedt

### Personal information:

Date of birth: 11.07.1974  
 Place of birth: Hannover, Germany  
 Nationality: German  
 Contact details: Max-Delbrück-Center Berlin  
 Robert-Rössle-Str. 10, 13092 Berlin, Germany  
 Phone/Fax: ##49-30/94063244, E-mail: tiedt@mdc-berlin.de

### Education

since 01.02.2000 Ph.D. thesis  
 Max-Delbrück-Center Berlin, Germany  
 Department of Medical Oncology and Tumorimmunology  
 Title: "Cleavage of DNA Replication Proteins Mcm3 and Cdc6  
 and Differential Gene Expression in B Cell Apoptosis"

26.06.1998 Diploma in Biology  
 Technical University Braunschweig, Germany

01.08.1997 – 26.06.1998 Diploma thesis  
 GBF Braunschweig, Germany  
 Department of Cell Biology and Immunology  
 Title: "Herstellung und Charakterisierung von rekombinanten  
 Antikörpern gegen die Tubulin-Tyrosin Ligase und Tubulin"

01.10.1993 – 26.06.1998 Study of Biology  
 Technical University Braunschweig, Germany

18.05.1993 School leaving examination  
 Ratsgymnasium Hannover, Germany

### Professional Experience:

01.12.1998 – 31.12.1999 Research Scientist  
 Heinrich-Pette-Institut Hamburg, Germany  
 Department of Tumorvirology

01.07.1998 – 31.10.1998 Internship  
 Wake Forest University, Winston-Salem, North Carolina, USA  
 Departments of Cardiology and Anesthesiology

## **8.6 Publications**

### **Peer-reviewed scientific publications:**

Tiedt, B., Janz, M., Dörken, B., and Bommert, K. (under review). Downregulation of Genes Involved in DNA Repair and Differential Expression of Transcription Regulators and Phosphatases Precede IgM-Induced Apoptosis in the Burkitt's Lymphoma Cell Line BL60-2. *Biochimica et Biophysica Acta*.

Tiedt, B., Gossen, M., Dörken, B., and Bommert, K. (in preparation). Cleavage of Mcm3 and Cdc6 During Apoptosis Generates Pro-Apoptotic Fragments.

### **Accepted poster abstracts:**

Tiedt, B., Dörken, B., and Bommert, K.. Berg36: An Early Response Gene Involved in IgM-Mediated B Cell Apoptosis. C.N.R.S. Jaques Monod Conference 2001: mRNA Enigmas: Transport, Silencing, Decay, and their Interplay with Translation.

Tiedt, B., Dörken, B., and Bommert, K.. IgM-Mediated B Cell Apoptosis Involves Enhanced Expression of Early Response Gene Berg36. 11<sup>th</sup> International Congress of Immunology 2001.

Bommert, K., Tiedt, B., Gossen, M., and Dörken, B.. Expression and Cleavage of Mcm Proteins During Anti-IgM Induced B Cell Apoptosis. 11<sup>th</sup> International Congress of Immunology 2001.