
Medizinische Hochschule Hannover

Institut für Klinische Chemie

**Die Rolle des Transkriptionsfaktors C/EBP β
bei der Regulation der Proliferation und Differenzierung
von monozytären Zellen**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften

- Doctor rerum naturalium -

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Romina Gutsch

Geboren am 22.04.1983 in Neuruppin

Hannover (2013)

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover am 14.03.2014

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med. Christopher Baum
Betreuer: Prof. Dr. med. Korbinian Brand
Kobetreuer: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Gaestel

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Korbinian Brand
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Gaestel
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Karl Welte

Tag der mündlichen Prüfung vor der Prüfungskommission: 14.03.2014

Prof. Dr. rer. nat. Matthias Gaestel
Prof. Dr. med. Korbinian Brand
Prof. Dr. rer. nat. Matthias Gaestel
Prof. Dr. med. Karl Welte

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Korbinian Brand für die Überlassung des interessanten Themas, das mir entgegen gebrachte Vertrauen, für seine fachliche Betreuung und die vielen Ratschläge bedanken.

Herrn Prof. Dr. rer. nat Matthias Gaestel möchte ich für die Zweitbegutachtung sowie für die kompetenten Hinweise danken.

Herrn Dr. rer. nat René Huber möchte ich für die Bereitschaft danken, diese Dissertation zu beurteilen sowie für die etlichen Tipps und Anregungen, die er mir während der Bearbeitung gegeben hat.

Weiterhin möchte ich Dr. Johann Meier und Elke Barczak für die technische Hilfe bei der Herstellung der viral transduzierten Zellen danken.

Den Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie und besonders meinen lieben Kollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit, die Hilfe und Unterstützung.

Ein großer Dank gebührt meiner Familie, besonders meinen Eltern, meinen Großeltern und meinem Bruder dafür, dass sie so viel Geduld während der langen Zeit mit mir hatten. Ein ganz besonderer Dank gilt Maxim für sein Verständnis und die liebe Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

<i>Danksagung</i>	3
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	6
1 Zusammenfassung	9
<i>Summary</i>	10
2 Einleitung	12
2.1 C/EBPs (CCAAT/enhancer-binding-proteins).....	12
2.2 C/EBP β	15
2.2.1 Expression und Funktionalität von C/EBP β	17
2.2.2 Einfluss von C/EBP β während der Proliferation, Differenzierung und Apoptose.....	18
2.3 Zellzyklusregulation	20
2.4 Der Einfluss von C/EBP β auf das hämatopoetische System	25
2.5 Die monozytäre Differenzierung	26
2.6 Ziel der Arbeit.....	30
3 Material und Methoden	32
3.1 Material	32
3.1.1 Oligonukleotide	32
3.1.2 Antikörper.....	34
3.1.3 Vektoren	35
3.1.4 Zelllinien.....	35
3.1.5 Zellkulturmedium und Zusätze	35
3.1.6 Enzyme	36
3.1.7 Bakterien.....	36
3.1.8 Nährmedien für E.coli	36
3.1.9 Puffer und Lösungen	36
3.1.10 Reagenzien.....	38
3.1.11 Kits.....	39
3.1.12 Geräte.....	40
3.1.13 Software.....	40
3.2 Methoden.....	41
3.2.1 Molekularbiologische Methoden	41
3.2.2 Zellkultur	48
3.2.3 Proteinchemische Methoden.....	51
4 Ergebnisse	55
4.1 Herstellung stabiler C/EBP β -Zelllinien	55
4.2 Der Einfluss von C/EBP β auf die Zellproliferation	56
4.3 Untersuchung der apoptotischen Wirkung von C/EBP β	58
4.4 Molekulare Analysen zur Proliferationsinhibition	60
4.5 Molekulare Analysen der G1- und S-Phasen-Proteine.....	62
4.6 Untersuchung der Interaktion von C/EBP β und Rb	65
4.7 Auswirkung von C/EBP β auf die Stabilität von Rb.....	65
4.8 Analyse der Zellmorphologie.....	66
4.9 Analyse der Proliferation in differenzierten, prämonozytären Zellen.....	67

4.10	Zellzyklusanalysen in differenzierten, prämonozytären Zellen	68
4.11	Analyse der Promotoraktivität in Abhängigkeit von C/EBP β	69
4.12	Analysen zur Bindung von C/EBP β an verschiedenen Promotoren	71
4.13	Analyse der Proliferation von C/EBP β ko- und C/EBP β wt-Zellen	72
4.14	Zellzyklusanalysen der C/EBP β ko- und C/EBP β wt-Zellen	73
4.15	Molekulare Analysen von C/EBP β ko- und C/EBP β wt-Zellen.....	74
4.16	Proliferations- und Morphologieanalysen von C/EBP β ko- und wt-Zellen nach Stimulierung mit PMA	75
5	<i>Diskussion</i>	78
5.1	C/EBP β in der Regulation zellulärer Prozesse.....	78
5.1.1	Der Einfluss von C/EBP β auf die Zellproliferation	80
5.1.2	Die Rolle von C/EBP β im Zuge der Differenzierung.....	84
5.1.3	Die Funktion von C/EBP β bei der Zellzyklusregulation.....	87
5.1.4	Der Einfluss von C/EBP β auf die Apoptose.....	92
5.1.5	Ausblick	94
	<i>Referenzen</i>	97
	<i>Lebenslauf</i>	121
	<i>Publikationen und Präsentationen</i>	123
	<i>Erklärung</i>	124

Abkürzungsverzeichnis

Abl	<i>Ableson leukemia oncogene cellular homolog</i>
AD	Aktivierungsdomäne
AGP	<i>α1-Acid glycoprotein</i>
ALCL	Anaplastisches-großzelliges Lymphom
AML	Akute myelische Leukämie
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
ARF	<i>Auxin response factor</i>
ATRA	All-trans Retinolsäure
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BD	basische Domäne
BSA	Rinderserumalbumin
bZIP	<i>Basic leucine zipper</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Cdc	<i>Cell division cycle</i>
CDK	Cyclin abhängige Kinase
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer binding protein</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CHX	Cycloheximid
CKI	CDK-Inhibitoren
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMP	<i>Common myeloid progenitor</i>
CMV	Cytomegalievirus
c-Myc	<i>Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog</i>
CRT	Calreticulin
CUGBP1	<i>CUG repeat binding protein 1</i>
DC	dendritische Zelle
DMBA	7,12-Dimethylbenz[a]anthracen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP-1	<i>Dimerization partner 1</i>
DTT	Dithiothreitol
E2F	<i>E2 promoter binding factor</i>
EGR	<i>Early growth response protein</i>
eIF	<i>Eukaryotic initiation factor</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>

FL	<i>Full length</i>
FLT	<i>FMS-like tyrosine kinase</i>
Fos	<i>FBJ murine osteosarcoma</i>
Gadd153	<i>Growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte/monocyte colony stimulating factor</i>
GMP	<i>Granulocyte/monocyte progenitor</i>
HDAC	Histon-Deacetylase
HL-60	Humane promyelozytische Leukämiezelllinie
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukin
IL-6DBP	<i>IL-6-dependent DNA binding protein</i>
INK4	<i>Inhibitors of CDK4</i>
IP	Immunpräzipitation
ITD	interne Tandemduplikation
ko	<i>Knock out</i>
LAP	<i>Liver-enriched activatory protein</i>
LDHA	Lactat-Dehydrogenase A
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LIP	<i>Liver-enriched inhibitory protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LZ	Leucin-Zipper
Mad	<i>Max dimerization protein</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
Max	<i>Myc-associated factor X</i>
M-CSF	<i>Monocyte colony stimulating factor</i>
MD-2	<i>Myeloid differentiation protein-2</i>
MDP	<i>Macrophage/DC progenitor</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>
Miz-1	<i>Myc-interacting zinc finger protein 1</i>
MLL	<i>Myeloid/lymphoide leukemia</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
Mxi1	<i>Max-interacting protein 1</i>

NDGR	<i>N-myc downstream-regulated gene</i>
NPAT	<i>nuclear protein mapped to the ATM locus</i>
NPM1	Nucleophosmin 1
NF-IL-6	<i>Nuclear factor-IL-6</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
ODC	Ornithin-Decarboxylase
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PU-1	<i>Purine rich box-1</i>
RACK	<i>Receptor for activated protein kinase C</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
Rb	Retinoblastoma
RD	regulatorische Domäne
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SOC	<i>Super optimal broth with catabolite repression</i>
Sp-1	<i>Specificity protein-1</i>
TGF	Transforming growth factor
THP-1	Humane monozytäre Leukämiezelllinie
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand</i>
U937	Humane monozytären leukämische Lymphomazelllinie
UTR	untranslatierte Region
uORF	<i>Upper open reading frame</i>
VD3	1,25-Dihydroxy-Vitamin D3
wt	Wildtyp

1 Zusammenfassung

Die Entstehung und Funktionalität von Organismen und deren Organen wird durch ein spezifisches Zusammenwirken bestehend aus Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose sichergestellt. Der korrekte Ablauf dieser Vorgänge unterliegt der Regulation durch verschiedene Faktoren, welche durch eine Reihe von äußeren Einflüssen gestört werden können. Bei vielen zellulären Prozessen spielt C/EBP β (CCAAT/*enhancer binding protein* β) eine entscheidende Rolle. C/EBP β ist ein Transkriptionsfaktor, der durch alternative Translation von verschiedenen im Leseraster liegenden Startcodons in drei Proteinisoformen gebildet wird. Die beiden größeren Isoformen LAP* und LAP (*liver-enriched activatory protein*) sind vor allem für die Modulation der Zelldifferenzierung verantwortlich, während die verkürzte Form LIP (*liver-enriched inhibitory protein*) insbesondere als wichtiger Regulator bei der Proliferation von Zellen fungiert. In vorherigen Untersuchungen wurde bei einer durch PMA (Phorbolester) induzierten Differenzierung von prämonozytären THP-1-Zellen eine Erhöhung der Proteinkonzentration von C/EBP β mit gleichzeitiger Inhibierung der Proliferation festgestellt. Die in dieser Arbeit generierten C/EBP β -stabil-überexprimierenden THP-1-Zelllinien zeigten ebenfalls einen Einfluss auf die Proliferation. LAP* konnte im Gegensatz zu LIP das Zellwachstum deutlich hemmen und gleichzeitig die Expression verschiedener Zellzyklusproteine, wie c-Myc (*Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog*) und Rb (Retinoblastoma) beeinflussen. Diese Ergebnisse konnten in gleicher Weise in C/EBP β ko-Zellen bestätigt werden. Ebenso konnte LAP* die transkriptionelle Aktivität des Cyclin E1-Promotors inhibieren. Des Weiteren hatte C/EBP β das Potential mit Rb zu interagieren, während eine Interaktion mit dem Rb- und E2F1-Promotor nicht nachgewiesen werden konnte. Auch auf die Proteinstabilität von Rb hatte C/EBP β keinen Einfluss. Im Gegensatz dazu konnte die Stimulation der LIP-überexprimierenden Zellen mit PMA eine Erhöhung der Proliferation verursachen. LIP konnte hierbei inhibierend auf die beiden größeren Isoformen LAP* und LAP wirken und dadurch die Hemmung der Proliferation aufheben. Die Wirkung von C/EBP β auf die Morphologie von monozytären Zellen hatte hingegen unterschiedliche Effekte. Durch den *knock out* (ko) von C/EBP β veränderten sich die eigentlich spindelförmigen Zellen zu einer runden Zellform. Im Gegensatz dazu hatte die stabile Überexpression in den THP-1-Zellen keine Auswirkung auf die Morphologie. Des Weiteren war C/EBP β in der Lage, den programmierten Zelltod bei unbehandelten sowie mit UV-Licht behandelten THP-1-Zellen zu hemmen. Dabei hatte LIP eine höhere inhibierende Wirkung auf die Auslösung der Apoptose als LAP*. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die C/EBP β -Isoformen LAP* und LIP die Proliferation sowie Apoptose von monozytären

Zellen stark beeinflusst, wobei die Morphologie durch C/EBP β hingegen nicht modifiziert wurde. Die hier vorliegenden Daten könnten dazu beitragen, neue diagnostische und therapeutische Konzepte für die Bekämpfung entzündlicher und maligner Erkrankungen zu entwickeln.

Summary

The development and precise functionality of mammals and their organs is ensured by a specific network of cellular processes including proliferation, differentiation and apoptosis. The correct proceeding of these processes depends on the regulation by various factors (e.g., C/EBP β) which may be disturbed by external influences such as growth factors or nutrients. The transcription factor C/EBP β (CCAAT/enhancer binding protein β), consisting of three different protein isoforms which are produced by alternative translation of three in frame initiation codons, plays a crucial role in many cellular procedures. The two larger isoforms LAP* and LAP (liver-enriched activatory protein) are predominantly involved in the modulation of cell differentiation whereas the shorter isoform LIP (liver enriched inhibitory protein) appears to be associated with cell proliferation. In initial studies, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced differentiation of premonocytic THP-1 cells was accompanied by a marked increase of LAP*/LAP protein levels and a dramatic inhibition of proliferation. The generation of stably transduced THP-1 cells overexpressing different C/EBP β isoforms demonstrated a strong effect on proliferation. LAP* was able to markedly reduce cell growth and had a significant influence on the expression of various cell cycle proteins such as c-Myc (Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog) and Rb (Retinoblastoma). Furthermore, C/EBP β -deficient macrophage-like cells showed an enhanced proliferation compared to C/EBP β wt cells. In addition, LAP* overexpression was found to inhibit cycline E1 promoter-dependent transcription. C/EBP β was able to interact with Rb but not with the promoters of Rb and E2F1. As assessed by cycloheximid (CHX) application, Rb protein stability was not altered in the presence of C/EBP β . In contrast, PMA-induced inhibition of proliferation was attenuated in stably transduced THP-1 cells predominantly overexpressing LIP, suggesting that LIP was able to neutralize LAP*/LAP mediated inhibition of proliferation. The effect of C/EBP β on the development of a macrophage-like morphology by monocytic cells, however, was inconsistent. A C/EBP β -knock out induced morphologic alterations in macrophage-like cells (i.e., from spindle-shaped to round cells) whereas stable overexpression of LAP* or LIP had no effect on morphology of THP-1 cells. In addition C/EBP β inhibits apoptotic cell death in untreated as well as in UV-irradiated THP-1 cells.

Thereby, LIP overexpression had a stronger effect on inhibition of apoptosis than LAP*. These results suggest that C/EBP β reduces monocytic proliferation by affecting the retinoblastoma/E2F/cyclin E pathway and attenuates apoptosis but is not directly required for macrophage morphology. Overall, the data presented in this study thus could contribute to develop new therapeutic and diagnostic approaches against inflammatory and malignant diseases.

2 Einleitung

2.1 C/EBPs (*CCAAT/enhancer-binding-proteins*)

CCAAT/enhancer-binding-proteins gehören zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die in der Regulation von vielen zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Inflammation eine entscheidende Rolle spielen (Takiguchi 1998). Es konnten bisher sechs C/EBP-Mitglieder identifiziert werden, welche entsprechend ihrer chronologischen Entdeckung C/EBP α , C/EBP β , C/EBP γ , C/EBP δ , C/EBP ϵ und C/EBP ζ benannt wurden, andererseits auch unter alternativen Namen bekannt sind (Cao et al. 1991; Ramji und Foka 2002). Sie alle besitzen eine hoch konservierte (> 90%) basische Leucin-Zipper-Domäne (bZIP) am C-Terminus, welche eine DNA-Binderegion aus basischen Aminosäuren (basische Domäne; BD) und einen darauffolgenden Dimerisierungsbereich, den Leucin-Zipper (LZ) enthält (Landschulz et al. 1988). Der Leucin-Zipper besteht aus einem Heptadenmuster von vier bis fünf Leucinresten und bildet eine amphipathische α -Helix. Durch die hohe Konservierung in der bZIP-Domäne sind C/EBP-Proteine in der Lage sowohl Homodimere als auch intrafamiliäre Heterodimere zu bilden (Hattori et al. 2003; Williams et al. 1991; Vinson et al. 1989). Weiterhin sind sie fähig, Protein-Protein-Interaktionen mit anderen bZIP-Transkriptionsfaktoren sowie mit Transkriptionsfaktoren ohne bZIP-Domäne einzugehen. Eine Bindung zwischen den bZIP-Domänen der AP-1-Proteine Jun/Fos und C/EBP β zum Beispiel kann das Transaktivierungspotenzial des Letzteren stark inhibieren (Hsu et al. 1994). Darüber hinaus vermögen C/EBPs mit der Rel-Homologie-Domäne der NF κ B-Untereinheiten physisch und funktionell zu assoziieren und dadurch Promotoren mit einer κ B-*enhancer*-Box transkriptionell zu hemmen sowie gleichzeitig eine synergistische Stimulation von Promotoren mit C/EBP-Bindesequenzen auszulösen (Xia et al. 1997; Stein et al. 1993). C/EBPs interagieren mit der in vielen Genpromotoren präsenten CCAAT-Box (Johnson und Mcknight 1989). Die optimale C/EBP-Bindung erfolgt über eine palindromische Konsensussequenz mit RTTGCGYAAY, wobei R gleich A oder G und Y gleich C oder T ist (Osada et al. 1996). Im Gegensatz zur bZIP-Region besitzen C/EBP-Proteine am N-Terminus eine sehr niedrige Sequenzidentität (< 20%), ausgenommen von drei Teilregionen, welche in den meisten C/EBPs konserviert sind. Diese relativ kurzen Teilregionen repräsentieren die Aktivierungsdomänen, die durch Interaktion mit Komponenten des Transkriptionsapparats die Stimulierung der Transkription beeinflussen (Nerlov und Ziff 1994). Als einzige Ausnahmen besitzen C/EBP γ und C/EBP ζ keine Aktivierungsdomänen, was zu einer Unterdrückung der Gentranskription durch die Bildung von Heterodimeren mit anderen C/EBP-Mitgliedern führt (Cooper et al. 1995).

Einige C/EBPs verfügen zusätzlich über negative regulatorische Domänen, die Zelltyp-abhängig die DNA-Bindeaktivität inhibieren sowie Einfluss auf die Modulation der transkriptionellen Aktivität haben (Williams et al. 1995). Neben den sechs C/EBP-Genen existieren darüber hinaus bei C/EBP α , C/EBP β und C/EBP ϵ verschieden große Isoformen (siehe Abb. 2.1). C/EBP α - und C/EBP β -Isoformen werden hauptsächlich entweder durch alternative Translation der Initiationscodons der gleichen mRNA (*leaky ribosome scanning mechanism*) oder durch regulierte proteolytische Spaltung produziert (Ossipow et al. 1993; Lin et al. 1993; Welm et al. 1999). Dagegen werden die Isoformen von C/EBP ϵ durch alternative Promotoren und differenzielles *splicing* gebildet (Yamanaka et al. 1997).

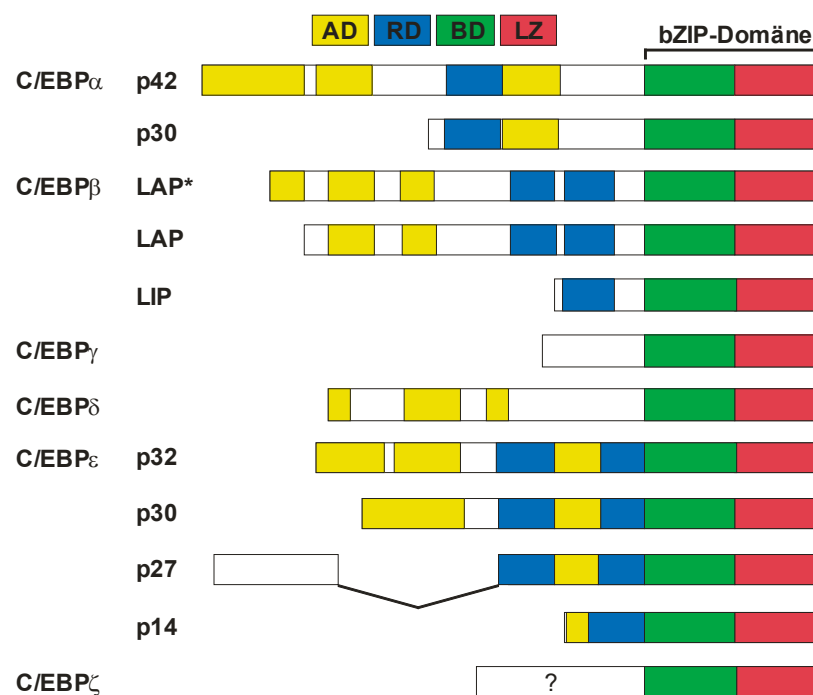


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der C/EBP-Mitglieder

Isoformen der C/EBPs mit ihren Aktivierungsdomänen (AD), regulatorischen Domänen (RD) und der bZIP-Domäne bestehend aus der basischen Domäne (BD) und dem Leucin-Zipper (LZ). Modifiziert nach Ramji und Foka 2002.

Die Aktivität und Expression der C/EBP-Proteine wird durch viele physiologische und pathophysiologische Zustände reguliert, abhängig von der Wirkung einer Reihe von Faktoren wie Hormonen, Mitogenen, Cytokinen, Nährstoffen und Toxinen. Wirkstoffe wie LPS und IL-1 verfügen zum Beispiel über das Potenzial, durch die Auslösung der Akuten-Phase-Reaktion die Transkription von C/EBP β zu induzieren (Akira et al. 1990). Weiterhin vermag das entzündungsfördernde Cytokin TNF α durch das Hervorrufen von inflammatorischem Stress die Lokalisation von C/EBP β und C/EBP δ im Zellkern zu

begünstigen (Yin et al. 1996). Aber auch post-translationale Modifikationen der C/EBPs wie Phosphorylierung, Sumoylierung, Acetylierung und Methylierung haben Einfluss auf deren DNA- und Proteinbindungskapazitäten, Proteinkonformation und nukleare Lokalisation (Nakajima et al. 1993; Eaton und Sealy 2003; Cesena et al. 2007; Pless et al. 2008). Besonders bei C/EBP β spielt die Phosphorylierung bei der Modulation der Funktion eine große Rolle. Zum Beispiel wird die durch C/EBP β hervorgerufene Repression der Transkription durch die Phosphorylierung der inhibitorischen Domäne, infolge der Aktivierung bestimmter Signalwege, wie MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) und PKC (Proteinkinase C) aufgehoben (Kowenz-Leutz et al. 1994). Des Weiteren werden funktionelle Effekte der C/EBP-Proteine durch die spezifische Expression in bestimmten Geweben und abhängig vom individuellen Zellstadium bestimmt. Hierbei sind die Bildung des jeweiligen C/EBP-Proteins und dessen Isoform sowie die Menge an Protein für das Ausmaß an Aktivität entscheidend. Im folgenden Abschnitt wird auf die Expressionsmuster und Funktionen der einzelnen C/EBP-Mitglieder eingegangen, wobei C/EBP β zu einem späteren Zeitpunkt beschrieben wird (siehe 2.2).

C/EBP α wird in hohen Konzentrationen in adipösen Gewebe, in der Leber, im Dünn- sowie Dickdarm, in der Lunge, im Skelettmuskel, in der Plazenta und in Leukozyten des peripheren Blutes gebildet. Eine Expression war hingegen nicht oder nur sehr gering im Gehirn, in der Niere, im Thymus, in den Hoden sowie in den Eierstöcken detektierbar (Cao et al. 1991; Antonson and Xanthopoulos 1995). Interessanterweise wurde das Maximum an C/EBP α in terminal differenzierten Zellen gemessen (Birkenmeier et al. 1989). In der Tat ist C/EBP α ein starker Inhibitor der Zellproliferation und Mutationen im Gen wurden bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie beobachtet (Hendricks-Taylor und Darlington 1995; Pabst et al. 2001). Weiterhin führt die Überexpression von C/EBP α in 3T3-L1-Zellen zur Differenzierung und auch im ko-Mausmodell zeigte sich, dass C/EBP α einen regulatorischen Einfluss auf die Funktion und terminale Differenzierung von Hepatozyten hat (Lin et al. 1993; Flodby et al. 1996).

C/EBP γ ist ein kurzes, intronloses Gen, dessen ubiquitiniertes Protein hauptsächlich in undifferenzierten Vorläuferzellen vorkommt (Roman et al. 1990). Funktionell lässt eine Heterodimerisierung mit C/EBP α und C/EBP β eine dominant-negative Inhibition der C/EBP-Transaktivierung in nicht-induzierten Zellen vermuten (Cooper et al. 1995).

Der Transkriptionsfaktor C/EBP δ wird in adipösen Gewebe, in der Lunge und im Darm exprimiert. Darüber hinaus wurden hohe mRNA-Level in allen Gewebearten nach LPS-, IL-1- oder IL-6-Stimulierung detektiert (Alam et al. 1992; Kinoshita et al. 1992). C/EBP δ formt ebenfalls Heterodimere mit C/EBP β und könnte eine Rolle in der Regulation der Akuten-Phase-Reaktion, bei inflammatorischen Prozessen oder auch bei der Immunantwort spielen (Kinoshita et al. 1992).

C/EBP ϵ wird hauptsächlich in myeloiden und lymphoiden Zellen gebildet, wobei der höchste Expressionslevel in promyelozytären und späten myeloblastischen Zelllinien detektiert wurde (Antonson et al. 1996; Morosetti et al. 1997). Die Induktion von C/EBP ϵ durch Stimulation mit Retinoiden begünstigt die granulozytäre Differenzierung von Promyelozyten. Infolgedessen wird diesem Transkriptionsfaktor eine essentielle Beteiligung an der myeloiden Differenzierung zugeschrieben (Chih et al. 1997).

C/EBP ζ wird als Reaktion auf DNA-Schäden gebildet und ist auch unter dem alternativen Namen Gadd153 (*growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153*) bekannt (Fornace et al. 1989). Es fungiert als dominant-negativer Inhibitor der C/EBP-Transkriptionsaktivierung durch Verhinderung der Bindung von C/EBP α und C/EBP β an C/EBP-*enhancer*-Elemente und ist als einzige Ausnahme in der C/EBP-Familie durch das Beinhalt von zwei Prolinresten in der basischen Region nicht fähig eine DNA-Bindung einzugehen (Ron and Habener 1992). Obwohl C/EBP ζ in allen Gewebearten gebildet wird, ist der Expressionslevel in normal wachsenden Zellen relativ niedrig, steigt aber durch wachstumshemmende Einflüsse wie zellulärer Stress, Nährstoffentzug oder gentoxische Stoffe stark an (Amundson et al. 1998; Kültz et al. 1998).

2.2 C/EBP β

C/EBP β wurde das erste Mal von mehreren Laborgruppen unabhängig von einander charakterisiert und ist daher unter mehreren Namen wie NF-IL-6, AGP/EBP, LAP oder IL-6DBP bekannt (Akira et al. 1990; Chang et al. 1990; Descombes et al. 1990; Poli et al. 1990). C/EBP β ist ein intronloses Gen, das beim Menschen auf dem Chromosom 20 (20q13.13) lokalisiert ist und für ein 1400 bp großes Transkript kodiert (Hendricks-Taylor et al. 1992). Es enthält drei im Leseraster gelegene Initiationscodons, wobei nur drei Proteinisoformen aus einer mRNA translatiert werden (Calkhoven et al. 2000; siehe Abb. 2.2). Durch die Translation des ersten AUG-Startcodons entsteht das 38 kDa große Protein, das als LAP* (*liver-enriched activatory protein*) bezeichnet wird. Die 35 kDa große Isoform LAP wird ausgehend vom zweiten Initiationscodon gebildet während die Translationsinitiation am dritten AUG in ein 20 kDa großes Protein resultiert, welches LIP (*liver-enriched inhibitory protein*) genannt wird. Der verkürzten Isoform LIP fehlen alle drei Aktivierungsdomänen sowie ein Teil der regulatorischen Domäne, besitzt aber das Potenzial an andere C/EBP- sowie C/EBP β -Isoformen zu binden und wird dadurch als dominant-negativer Regulator angesehen (Descombes und Schibler 1991). Es liegen

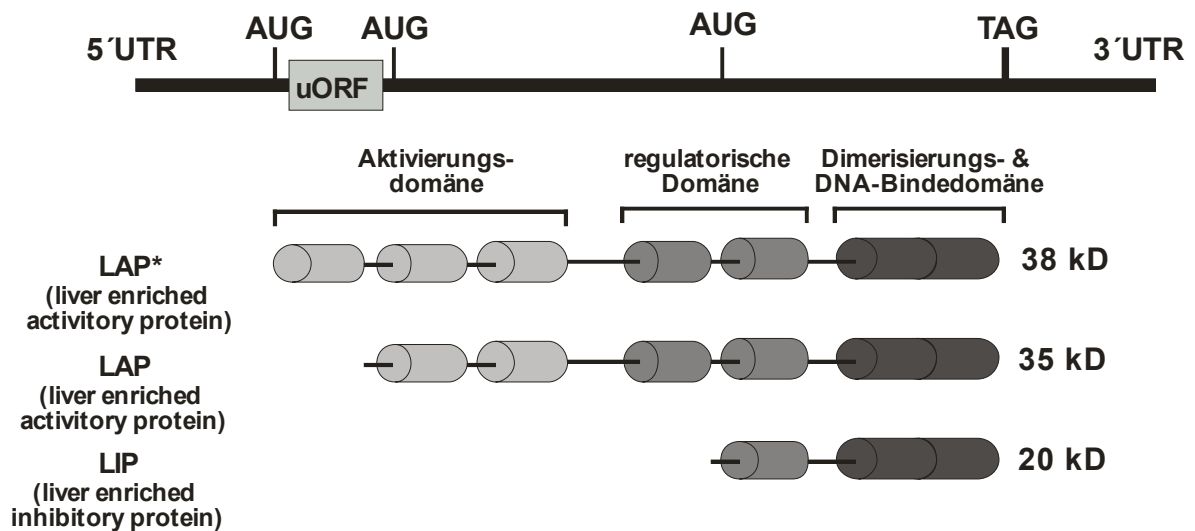


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der C/EBPβ-mRNA und der Proteinisoformen

Die C/EBPβ-mRNA mit der 5' und 3' untranslatierten Region (UTR), den Translationsinitiationscodons (AUG) und dem *upper open reading frame* (uORF). Die C/EBPβ-Isoformen LAP*, LAP und LIP mit ihren Aktivierungsdomänen, regulatorischen Domänen und der Dimerisierungs- und DNA-Bindedomäne.

verschiedene Hypothesen für das Auftreten dieser alternativen Translation vor. Vermutlich werden die Isoformen durch einen bereits erwähnten *leaky-ribosome-scanning*-Mechanismus gebildet. Dabei ignoriert die kleine Untereinheit des Ribosoms das erste AUG und translatiert durch eine nahezu perfekte Kozak-Sequenz das zweite und dritte AUG der C/EBPβ-mRNA (Descombes und Schibler 1991; Kozak 1986; Abb. 2.3). Darüber hinaus könnten bestimmte eukaryotische Translations-Initiationsfaktoren wie eIF-2α und eIF-4 für die alternative Translation verantwortlich sein (Calkhoven et al. 2000). Ebenso können spezifische Bindungsproteine wie CUGBP1 und CRT mit GCN-repeats in der C/EBPβ-mRNA interagieren und dadurch eine erhöhte Translation der C/EBPβ-Isoformen

	<u>LAP*</u>	<u>uORF</u>	<u>LAP</u>	<u>LIP</u>
human	UU <u>C</u> AUG C	<u>AGC</u> AUG U	<u>UCC</u> AUG <u>G</u>	<u>GGC</u> AUG <u>G</u>
murine	UU <u>C</u> AUG C	<u>AGC</u> AUG C	<u>CCC</u> AUG <u>G</u>	<u>GCC</u> AUG <u>G</u>

optimale Kozak-Sequenz = A/G CC AUG G

Abbildung 2.3: Vergleich der humanen und murinen Translations-Initiationssequenzen der C/EBPβ-mRNA

bewirken (Timchenko et al. 2002). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die Entstehung der drei unterschiedlich großen C/EBP β -Proteine durch spezifische Proteolyse einer Calpain-Protease in Abhängigkeit von C/EBP α verursacht wird (Bear und Johnson 2000; Welm et al. 1999). Das C/EBP β -Gen enthält zusätzlich einen zwischen dem ersten und zweiten AUG sowie nicht im Leseraster liegenden *upper open reading frame* (uORF), der ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Expression der C/EBP β -Isoformen einnimmt (Calkhoven et al. 2000). Erst kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass Mäuse, bei denen das Initiationskodon des C/EBP β -uORF mutiert ist, eine gestörte Translation der Isoform LIP, eine Repression von E2F-abhängigen Genen sowie eine verminderte Osteoklastendifferenzierung aufweisen (Wethmar et al. 2010).

Das Gleichgewicht zwischen der Expression der kleineren Variante LIP und den beiden größeren Proteinen LAP* und LAP scheint ein entscheidender Faktor bei zellulären Prozessen zu sein. Es hat sich gezeigt, dass die LIP/LAP-Ratio unter anderem als ein wichtiger Modulator bei der Zellzyklusprogression während der Leberregeneration (Luedde et al. 2004), der Differenzierung von Osteoklasten, der Knochenhomöostase (Smink et al. 2009) und bei der Entstehung von Malignitäten agiert (Quintanilla-Martinez et al. 2006).

2.2.1 Expression und Funktionalität von C/EBP β

C/EBP β wird konstitutiv und teilweise in hohen Konzentrationen in der Leber, im Dünndarm, in der Lunge, im Fettgewebe, im Muskelgewebe, in den Nieren, in der Milz und in myelomonozytären Zellen exprimiert. In geringeren Dosen wird es auch in den Eierstöcken, in den Hoden, im Gehirn und im Herzen gebildet (Descombes et al. 1990; Akira et al. 1990; Katz et al. 1993; Kousteni et al. 1998). Die Funktion und Bedeutung von C/EBP β wurde unter anderem auch durch ko-Mausmodelle untersucht. Es hat sich gezeigt, dass ein Mangel an C/EBP β zu einer Vergrößerung der Milz (Splenomegalie), einer Schwellung der Lymphknoten (Lymphadenopathie) sowie zu einer erhöhten Hämatopoese führt. Weiterhin wurde eine gestörte Aktivierung von Milz-Makrophagen und die damit einhergehende Beeinträchtigung der IL-12-Sezernierung beobachtet, wobei die Ausschüttung von IL-6 nicht beeinflusst war. Zusätzlich wurde eine erhöhte Neigung für *Candida albicans*-Infektionen und eine veränderte Funktion der T-Helferzellen festgestellt (Screpanti et al. 1995). Des Weiteren spielt C/EBP β in der weiblichen Fortpflanzungsphysiologie eine wesentliche Rolle. Seagroves et al. beschreiben C/EBP β als einen wichtigen Faktor für die funktionelle Differenzierung der Brustepithelzellen, der lobuloalveoläre Entwicklung und der Morphogenese der Milchgänge (Seagroves et al.

1998). Gleichzeitig beeinflusst C/EBP β während der Gestation die Differenzierung von sekretorischen Zellen, wie durch die Abwesenheit der Expression von Milchproteinen in C/EBP β ko-Mäusen aufgezeigt wurde (Robinson et al. 1998). Infertilität ist ein wesentliches Merkmal bei diesen Mäusen, was durch einen Defekt in der Differenzierung der Granulosazellen sowie der Ovulation und der Bildung des Gelbkörpers verursacht wird (Sterneck et al. 1997).

2.2.2 Einfluss von C/EBP β während der Proliferation, Differenzierung und Apoptose

In einer Reihe von Studien und Untersuchungen wurde C/EBP β als ein wichtiger Faktor in der Zellzyklusregulation charakterisiert. Es hat sich gezeigt, dass die spezifische Funktion von der Expression der jeweiligen C/EBP β -Isoformen und des entsprechenden Zelltyps abhängig ist. Buck et al. entdeckten schon sehr früh die funktionellen Unterschiede der C/EBP β -Varianten. Sie fanden heraus, dass die Überexpression von LAP zu einer Inhibierung der Proliferation von Hepatomazellen führt und dass LIP die Fähigkeit besitzt dieser Hemmung entgegenzuwirken (Buck et al. 1994). Weiterhin konnten sie zeigen, dass die durch Stimulation mit TGF α (*transforming growth factor alpha*) ausgelöste Phosphorylierung von C/EBP β für die Zellproliferation von differenzierten Hepatozyten von essentieller Bedeutung ist (Buck et al. 1999). Im Gegensatz dazu führte eine Mutation im C/EBP β -Gen bei embryonalen Fibroblasten des Huhns zu einer Inaktivierung des Gens und Erhöhung der Zellzahl. Gleichermaßen zeigten auch murine embryonale C/EBP β ko-Fibroblasten eine verstärkte Proliferation gegenüber den wt-Zellen (Wildtyp). Im Gegensatz dazu führte eine Überexpression von C/EBP β zu einer Reduktion von Proteinen der AP-1-Familie, die maßgeblich zur Tumorphiliferation und Metastasierung beitragen (Gagliardi et al. 2003; Angel et al. 1988). Weiterhin wurden in Bcr/Abl transformierten Leukämiezellen verringerte C/EBP β mRNA- sowie Protein-Level festgestellt, die durch die Behandlung mit dem CML-Cytostatikum STI571 (Imatinib), reinduziert werden konnten. Die konstitutive Expression und Aktivierung von C/EBP β inhibierte die Proliferation mit gleichzeitiger Differenzierung der Leukämiezellen *in vitro* und *in vivo* (Guerzoni et al. 2006). Hirata et al. stellten eine erhöhte Proliferation in primären ko-Chondrozyten mit hypertropher Differenzierung fest. Darüber hinaus führte die retrovirale Überexpression von *full length* C/EBP β in Chondrozyten zu einer reduzierten Zellteilung und einer Akkumulation der Zellen in der G₀/G₁-Phase bei gleichzeitiger Hochregulierung des Inhibitors p57^{Kip2} (Hirata et al. 2009). Während der

Dezidualisierung der Gestation war C/EBP β sowohl in proliferierenden als auch in differenzierten Stromazellen nachweisbar und dezidualisierende Stimuli zeigten bei den Uteri von C/EBP β ko-Mäusen keinerlei Wirkung, was eine regulierende Funktion von C/EBP β innerhalb des Dezidualisierungsprogramms indiziert (Mantena et al. 2006).

Während demnach den beiden größeren C/EBP β -Isoformen LAP* und LAP proliferationsinhibierende Effekte zugeschrieben werden, zeigten Untersuchungen bei LIP eine gegensätzliche Wirkung auf die Zellvermehrung. Die gezielte Expression von LIP in der Brustdrüse von transgenen Mäusen sowie in Brustepithelzellen resultierte in einer drastischen Erhöhung der Proliferation (Zahnow et al. 2001). Zusätzlich wurde eine erhöhte endogene Expression von LIP in ductalen hochproliferativen Tumoren festgestellt, die überdies eine Aneuploidie aufwiesen. LIP könnte daher als prognostischer Marker bei Brustkrebs dienen (Zahnow et al. 1997).

Die verschiedenen C/EBP β -Isoformen verfügen nicht nur über regulierende Eigenschaften während der Zellproliferation, sondern spielen auch als Modulator in der Differenzierung von verschiedenen Zell- und Gewebearten eine entscheidende Rolle. Descombes und Schibler erkannten als erste die Bedeutung von LAP* und LAP während der terminalen Differenzierung der Leber von Ratten. Die Expression der beiden größeren Isoformen war dort gegenüber LIP drastisch erhöht (Descombes und Schibler 1991). Des Weiteren war ein stark erhöhter Level an C/EBP β -Proteinen in differenzierten myelomonozytischen Knochenmarkszellen nach Stimulierung mit G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) festzustellen und auch beim Differenzierungsprozess von verschiedenen Leukämiezellarten zu Makrophagen war die mRNA von C/EBP β deutlich hochreguliert (Scott et al. 1992; Natsuka et al. 1992). Darüber hinaus vermag C/EBP β die Granulopoese bei myeloiden und granulozytischen Vorläuferzellen zu induzieren und ist ebenfalls bei der ATRA-vermittelten Differenzierung von Zellen der akuten promyelozytischen Leukämie von entscheidender Bedeutung (Duprez et al. 2003; Hirai et al. 2006). Auch bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen sowie bei der Aktivierung des Promotors der makrophagen-spezifischen Chitotriosidase ist C/EBP β stark involviert (Pham et al. 2007; Xie et al. 2004). Zudem fungiert C/EBP β während der Adipogenese als wichtiger Regulator (Lane et al. 1999; Yeh et al. 1995). Eine vermehrte Expression bei multipotenten Fibroblasten initiiert die Differenzierung in Adipozyten und konvertiert mesenchymale Vorläuferzellen zu Präadipozyten (Wu et al. 1995). Ergänzend stellt C/EBP β einen essentiellen Faktor während des Differenzierungsprozesses von Keratinozyten *in vivo* und *in vitro* (Maytin und Habener 1998), von Vorläuferzellen der Brustdrüse (Grimm und Rosen 2003) und bei der Osteoklastogenese dar (Smink und Leutz 2010).

In einigen Studien wird überdies ein substanzieller Effekt von C/EBP β auf den Apoptoseprozess postuliert. Hepatische Sternzellen von C/EBP β ko-Mäusen zeigten nach Behandlung mit CCL₄, einem Hepatotoxin, das unter anderem oxidativen Stress auslöst, eine erhöhte Apoptoserate gegenüber der Kontrolle. Weiterhin konnte eine Akkumulation der phosphorylierten C/EBP β -Form (Thr²¹⁷) mit den Procaspasen 1 und 8 sowie deren Inaktivierung nachgewiesen werden (Buck et al. 2001). Im Gegensatz dazu zeigten C/EBP β -transfizierte Pancreaszellen eine erhebliche Resistenz gegen Serumtoxizität und darüber hinaus eine Hochregulierung der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) und Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*) (Shimizu et al. 2007). Eine *Microarray*-Analyse von C/EBP β ko-Makrophagen ließ einen reduzierten Level des Insulinähnlichen Wachstumsfaktors I (IGF-I) erkennen, der als autokriner Überlebensfaktor bei der zellulären Transformation fungiert (Wessells et al. 2004). Eine weitere Untersuchung ergab eine direkte Bindung an die Promotorregion des Bcl-2-Gens sowie die Herunterregulierung des Bcl-2-Proteins durch die Abnahme von C/EBP β (Pal et al. 2009). Ebenso zeigten C/EBP β ko-Keratinozyten nach Behandlung mit dem Toxin DMBA (7,12-Dimethylbenz[a]anthracen) eine signifikant erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu den wt-Zellen (Zhu et al. 2002). Dem gegenüber ergab eine Überexpression und Aktivierung von C/EBP β eine vermehrte Apoptose bei Neuroblastoma- und hämatopoetischen Vorläuferzellen (Cortes-Canteli et al. 2002; Müller et al. 1995).

2.3 Zellzyklusregulation

Der Zellzyklus stellt einen ubiquitären und komplexen Prozess dar, der während des Wachstums und der Proliferation von Zellen, der Entwicklung von Organen durch Differenzierung, der Reparatur von DNA-Schäden, aber auch in der Hyperplasie von geschädigtem Gewebe sowie in der Entstehung von Krebs eine essentielle Rolle spielt. Die Zellteilung besteht aus zwei aufeinander folgenden Vorgängen, die hauptsächlich durch die DNA-Replikation und die Aufteilung der duplizierten Chromosomen auf zwei separate Tochterzellen charakterisiert werden. Der Hauptteil des Zellzyklus wird durch die Interphase bestimmt, welche in die G₁-, S- und G₂-Phasen unterteilt wird. G₁ und G₂ repräsentieren zeitliche Lücken (*gaps*), in denen sich die Zelle auf die DNA-Synthese in der S-Phase sowie auf die Zellkernteilung vorbereitet. Der zweite Teil wird durch die Mitosephase eingenommen, die Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase umfasst. Zellen, die sich in der G₁-Phase befinden, haben die Möglichkeit in eine Ruhephase einzutreten, die G₀ genannt wird. In dieser Phase sind Zellen nicht in der Lage

zu proliferieren und können in diesem Zustand bis zu mehreren Jahren verbleiben. Durch die Stimulation mit mitogenen Faktoren sind diese Zellen fähig von der Ruhephase wieder in die G₁-Phase einzutreten und den Zellzyklus zu durchlaufen. Der korrekte Ablauf der Zellzyklusprogression wird durch ein genaues Kontrollsystem abgesichert. Dieses System ist dafür verantwortlich, dass jedes Zellzyklusstadium abgeschlossen ist, bevor das nächste anfängt und kann durch exogene und endogene Signale beeinflusst werden. Die zwei Hauptkontrollpunkte befinden sich jeweils am Ende der G₁- und G₂-Phase (Pardee 1974). An diesen Kontroll- oder auch Restriktionspunkten wird die DNA auf mögliche Schäden geprüft, bevor die Zelle in die Synthese- bzw. Mitosephase eintritt. Bei Auftreten von Veränderungen der DNA werden der Zellzyklus arretiert und DNA-Reparaturmechanismen aktiviert. Anschließend setzt die Zelle den Zellteilungprozess fort oder geht bei unzureichender Korrektur der DNA-Moleküle in Apoptose (Bartek et al. 2004; Hartwell und Weinert 1989).

Die Transition von einer Zellzyklusphase zur nächsten wird durch verschiedene zelluläre Proteine reguliert. Eine Schlüsselfunktion nehmen Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) ein, die an spezifischen Punkten des Zellzyklus aktiviert werden (siehe Abb. 2.4). Bis heute sind etwa 20 CDKs nachgewiesen worden, wobei vier von Ihnen aktiv an der Zellteilung beteiligt sind (Morgan 1997; Satyanarayana und Kaldis 2009). Sie umfassen drei CDKs der Interphase (CDK2, CDK4 und CDK6) und eine mitotische CDK. Die CDK-Aktivität ist abhängig von der Bindung an bestimmte regulatorische Untereinheiten, die als Cycline bekannt sind. Es existieren 10 für den Zellzyklus relevante Cycline, die zu vier unterschiedlichen Klassen gehören (A-, B-, D- und E-Typ-Cycline). Bestimmte Cycline werden in bestimmten Phasen des Zellzyklus benötigt. Für den Eintritt der Zelle in die G₁-Phase ist die Bindung der drei D-Cycline (Cyclin D1, D2 und D3) an CDK4 und CDK6 essentiell (Sherr 1994). Die Aktivierung dieses Komplexes führt zur Phosphorylierung von Rb und zur Auflösung der Bindung an E2F-1, DP-1 und einer Histon-Deacetylase (HDAC). Durch die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F-1 und DP-1 können wiederum Produkte für die Progression der G₁- und S-Phase, einschließlich Cyclin A, Cyclin E und Cdc25 positiv transkribiert werden (Buchkovich et al. 1989; Kato et al. 1993; Schulze et al. 1995). In der späten G₁-Phase assoziiert Cyclin E mit CDK2 um den Übergang in die S-Phase zu regulieren (Ohtsubo et al. 1995). Diese Komplexbildung ist am Fortbestand des hyperphosphorylierten Zustands von Rb beteiligt (Hinds et al. 1992). Weiterhin vermag der CDK2-Cyclin E-Komplex die Proteine Histon H1 und NPAT (*nuclear protein mapped to the ATM locus*) zu phosphorylieren, welche wichtige Funktionen für den Eintritt in die S-Phase bzw. bei der Chromosomenkondensation während der DNA-Replikation einnehmen (Zhao et al. 1998; Bradbury et al. 1974). Während der späten S-Phase bindet Cyclin A2 (Cyclin A1 in Keimzellen) ebenfalls an CDK2 um die

Phosphorylierung von Proteinen zu ermöglichen, die bei der DNA-Replikation benötigt werden (Petersen et al. 1999). In der späten G₁- und der frühen M-Phase bildet Cyclin A2 mit CDK1 Komplexe um den Beginn der Mitose zu initiieren, die anschließend durch die Assoziation von Cyclin B an CDK1 reguliert wird (King et al. 1994; Arellano und Moreno 1997). Die CDK-Aktivität kann durch inhibitorische Proteine, die an die CDK allein oder an den CDK-Cyclin-Komplex binden, gehemmt werden (siehe Abb. 2.4). Es sind zwei unterschiedliche CDK-Inhibitor-Familien bekannt, die INK4- (*inhibitors of* CDK4) und Cip/Kip-Proteinfamilie (Sherr und Roberts 1995). Die INK4-Familie beinhaltet die Proteine p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c) und p19 (INK4d), die spezifisch die G₁-CDKs (CDK4 und CDK6) inhibieren. Sie sind in der Lage mit den CDK-Enzymen stabile Komplexe einzugehen, um eine Bindung von Cyclin D zu verhindern (Hirai et al. 1995; Carnero und Hannon 1998). Zu den Cip/Kip-Proteinen gehören p21 (Waf1, Cip1), p27 (Cip2) und p57 (Kip2), die die Komplexe Cyclin E- und Cyclin A-CDK2 sowie Cyclin B-CDK1 inhibieren (Aprelikova et al. 1995). p21 ist zusätzlich fähig die DNA-Synthese durch Assoziation und Hemmung von PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) zu blockieren (Waga et al. 1997). Die CDK-Inhibitoren (CKI) werden durch interne und externe Signale reguliert. Die Induzierung von p16 wird unter anderem durch toxische und DNA-schädliche Stimuli erreicht. Die Expression wird *in vivo* und *in vitro* nach UV-Exposition, durch Sauerstoffradikale, ionisierende Strahlung, chemotherapeutische Wirkstoffe sowie durch die Dysfunktionen der Telomere hochreguliert (Pavey et al. 1999; Ito et al. 2004; Meng et al. 2003; Robles und Adami 1998; Jacobs und de Lange 2004). Überdies ist die p16-Regulierung oft mit der Aktivierung des MAPK-Signalweges und der replikativen Seneszenz assoziiert (Bulavin et al. 2004; Dai und Enders 2000). Die Beeinflussung des CDK-Inhibitors p15 durch zelluläre Stressfaktoren wurde nicht postuliert. Im Gegensatz dazu wird p15 durch TGFβ-abhängige Signale aktiviert und ist in die Ras-induzierten Seneszenz involviert (Reynisdottir et al. 1995). Die Aktivierung der Inhibitoren p18 und p19 ist deutlich mit der zellulären Differenzierung verbunden. Während die p18-Expression bei der Differenzierung von IL-6-stimulierten B-Zellen und Myoblasten stark ansteigt (Franklin and Xiong 1996; Morse et al. 1997), ist p19 in terminal differenzierten Neuronen hochreguliert (Zindy et al. 1997). Die Inhibitoren p21, p27 und p57 werden hauptsächlich durch TGFβ induziert (Roninson 2002; Koff et al. 1993; Scandura et al. 2004), während p21 ebenso durch den Tumorsuppressor p53 über die Bindung an den p21-Promotor transkriptionell aktiviert wird (el Deiry et al. 1993).

Einen essentiellen Einfluss auf die Zellzyklusregulation hat der Transkriptionsfaktor c-Myc. c-Myc ist ein Proto-Onkogen und wurde mit erhöhter Expression in einer Reihe von Krebsarten und besonders in aggressiven Tumoren nachgewiesen (Nesbit et al. 1999). Eine der Schlüsselfunktionen von c-Myc ist die Fähigkeit die Zellzyklusprogression zu

fördern. Durch Serumstimulation steigt die mRNA- und Proteinkonzentration von c-Myc in den Zellen schnell an, während nach Entzug von Wachstumsfaktoren der Level nicht

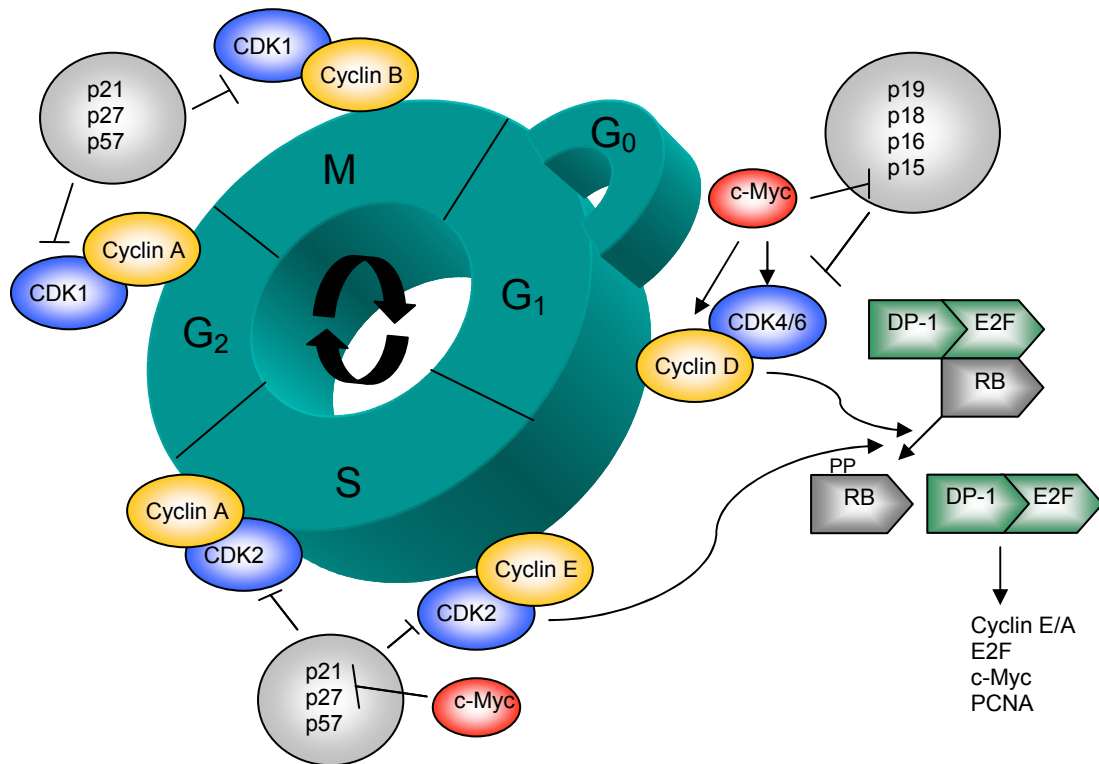


Abbildung 2.4: Der eukaryontische Zellzyklus und seine Kontrollmechanismen

Während der G₁-Phase führt die Phosphorylierung von Rb durch Cyclin D zur Freigabe von E2F, welches die Expression von S-Phase-Genen und Induzierung der Zellzyklusprogression bewirkt. pp, Phosphorylierung; —→ stimulierende Wirkung; —| inhibierende Wirkung

mehr nachweisbar ist und die Zellen arretieren (Eilers 1999). c-Myc hat die Fähigkeit, über eine heterodimere Bindung mit dem Protein Max (*Myc-associated factor X*) die Gene Cyclin D und CDK4 zu aktivieren (Bouchard et al. 1999). Das führt dann zu einer Sequestration und Degradierung von p27, wodurch wiederum Cyclin E und CDK2 die Phosphorylierung von Rb bewirken können (Perez-Roger et al. 1999; Müller et al. 1997). Weiterhin wird die Transaktivierung der CDK-Inhibitoren p15 und p21 durch die Interaktion des Myc-Max-Komplexes mit dem Transkriptionsfaktor Miz-1 (*Myc-interacting zinc finger protein 1*) verhindert (Staller et al. 2001; Herold et al. 2002). c-Myc ist ebenso in der Lage, die Differenzierung von Zellen durch die Hemmung des Austritts aus dem Zellzyklus zu inhibieren, was unabhängig von der Fähigkeit Proliferation zu induzieren auftritt (La Rocca et al. 1994; Henriksson und Lüscher 1996). Umgekehrt kann die Aktivität von c-Myc gehemmt werden. Dabei wirken die transkriptionellen Repressoren Mad/Mxi1, die bei der terminalen Differenzierung, der Inhibierung der Zellzyklusprogression und bei der Tumorsuppression eine Rolle spielen, der Funktion von c-Myc entgegen (Hurlin et al.

1995). Eine weitere wichtige Funktion von c-Myc umfasst die Induzierung der Apoptose. Es hat sich gezeigt, dass c-Myc die Transkription apoptotischer Gene wie Cdc25c, ODC und LDH-A induziert (Galaktionov et al. 1996; Packham und Cleveland 1994; Shim et al. 1997). Aber auch die indirekte Aktivierung von p53 durch die Bindung an den Tumorsuppressor ARF, welches zur Transkription des pro-apoptischen Proteins Bax führt, ist ein möglicher Apoptose-Signalweg (Jacobs et al. 1999; Eischen et al. 1999). Weiterhin sensibilisiert die Expression von c-Myc Zellen für eine Reihe von pro-apoptischen Stimuli, wie den Einfluss von DNA-Schäden und den Entzug von Wachstumsfaktoren, aber auch für Signalwege, die über CD95-, TNF- und TRAIL-Rezeptoren vermittelt werden (Evan et al. 1992; Askew et al. 1991; Hueber et al. 1997; Klefstrom et al. 1994; Lutz et al. 1998).

Die Aktivierung von c-Myc führt über die Transkription und Inhibition einer Reihe von Zielgenen und letztendlich zur Phosphorylierung des Rb-Proteins. Rb nimmt in der Maschinerie der Zellzyklusregulation eine Schlüsselrolle ein und fungiert als Barriere bei einer fehlerhaften Zellzyklusprogression. Rb gehört zu einer Genfamilie, deren Mitglieder (Rb, p107 und p130) sich in ihrer Struktur und Funktion sehr ähneln (Stevaux und Dyson 2002). Rb kommt während des Zellzykluses in phosphorylierter und dephosphorylierter Form vor, wobei die hyperphosphorylierte (inaktive) Form in proliferierenden Zellen vorliegt und die hypophosphorylierte (aktive) Form eher in differenzierten sowie sich in der G₀-Phase befindlichen Zellen exprimiert wird (Chen et al. 1989). Rb kann einen Zellzyklusarrest bewirken, indem es entweder durch eine inhibierende Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor E2F die Aktivierung der Transkription verhindert oder in einem Rb-E2F-Komplex die Transkription aktiv am Promotor unterdrückt (Helin et al. 1993; Weintraub et al. 1995). Rb-Proteine assoziieren mit dem Transkriptionsfaktor E2F durch physische Bindung an dessen Transaktivierungsdomäne oder aber mit Hilfe von Chromatin-Remodellierungsenzyme wie die HDAC (Flemington et al. 1993; Brehm und Kouzarides 1999). Die HDAC ist ein Enzym, das Histone modifiziert, indem es Acetylgruppen von Lysinen am N-terminalen Histoneende entfernt, was zu einer ladungsbedingten starken Affinität von Histon und DNA und dadurch zu einer geschlossenen Konformation des Chromatins führt (Choudhary et al. 2009). Die Acetylierung der Histone ist besonders für die Bindung der DNA an Transkriptionsfaktoren entscheidend und kann durch E2F verstärkt werden, was zu einer Erhöhung der transkriptionellen Aktivität führt (Chen et al. 1999; Lee et al. 1998). E2F moduliert die Transkription von Genen, die in die Zellzyklusregulation, DNA-Replikation und Mitose involviert sind (DeGregori 2002; Trimarchi und Lees 2002) und ist in der Lage verschiedene Formen von Heterodimeren zu bilden, die immer aus einer E2F- und einer DP-Untereinheit bestehen (Dimova und Dyson 2005). Mutationen, die Abwesenheit oder

auch ein Funktionsverlust von Rb treten oft bei Retinoblastoma, Lungenkrebs sowie akuter lymphoblastischer Leukämie auf (Knudsen 1971; Hall und Peters 1996; Tsai et al. 1996), wobei eine Inaktivierung von Rb z.B. durch die Bindung von onkogenen Virusproteinen (z.B. Proteine des Papillomaviruses) ausgelöst werden kann (Gage et al. 1990). Schätzungsweise 90% der menschlichen Tumore enthalten Abnormalitäten innerhalb des Rb-Signalweges (Hall und Peters 1996).

In einer Reihe von Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass C/EBP β einen großen Einfluss auf die Expression und Transkription verschiedener Zellzyklusproteine hat. Es hat sich gezeigt, dass eine Überexpression von LAP in Epithelzellen zu einer Erniedrigung des Proteinlevels von Cyclin D1, Cyclin D2 und Cyclin E führt. Gleichzeitig konnte eine Erhöhung der Proteinexpression der CDK-Inhibitoren p15, p21 und p27 festgestellt werden (Gheorghiu et al. 2001). Ebenso konnte in multipotenten Stammzellen mittels *Microarray*-Analyse eine Abnahme der Cycline B und D sowie eine Induktion der Gene p16, p21 und p57 durch eine C/EBP β -Überexpression detektiert werden (Hirata et al. 2009). Weiterhin inhibiert C/EBP β die mRNA- und Proteinexpression von E2F1, PCNA und c-Myc in Hepatozyten und murinen Fibroblasten (Buck et al. 1994; Luedde et al. 2004; Sebastian et al. 2005) und hat überdies das Potenzial mit Rb, E2F1 sowie Smad3 und Smad4 in Adipozyten und embryonalen Nierenzellen zu interagieren (Chen et al. 1996; Choy und Derynck 2003; Wang et al. 2007). Ebenso binden C/EBP β -Proteine an die Promotoren von E2F1, Cyclin A2, c-Myc sowie p15 und es wurde gezeigt, dass Rb die DNA-Bindeaktivität und transkriptionelle Aktivität von C/EBP β durch eine Assoziation *in vivo* und *in vitro* erhöhen kann (Sebastian et al. 2005; Gomis et al. 2006; Chen et al. 1996b).

2.4 Der Einfluss von C/EBP β auf das hämatopoetische System

Die Hämatopoese bezeichnet die Bildung der zellulären Komponenten des Blutes. Dabei entwickeln sich aus multipotenten hämatopoetischen Stammzellen gemeinsame myeloide und lymphoide Vorläuferzellen, die sich wiederum weiter zu intermediären Vorläuferzellen differenzieren (Akashi et al. 2000a). Jeder dieser zellulären Entwicklungsschritte wird durch eine Reihe von spezifischen Transkriptionsfaktoren reguliert (Orkin 2000), wobei C/EBP β eine entscheidende Rolle bei der Bildung und Reifung dieser Zellen, insbesondere bei myeloiden Zellen wie Monozyten und Granulozyten spielt (Akagi et al. 2010; Kowenz-Leutz und Leutz 1999; Duprez et al. 2003). Es ist bekannt, dass C/EBP β beispielsweise besonders stark in multiplen Myeloma Zellen exprimiert wird (Pal et al.

2009) und dass eine Deletion des C/EBP β -Gens in Mäusen zu einer gestörten Entwicklung von B-Lymphozyten führt (Chen et al. 1997). Weiterhin führte eine erhöhte Expression von C/EBP β in differenzierten B-Lymphozyten zu einer Umprogrammierung in Makrophagen und zu einer Differenzierung von 32D-Cl3 sowie 32D-Bcr/Abl-Zellen (Xie et al. 2004; Wang und Friedman 2002; Guerzoni et al. 2006). Des Weiteren konnte eine starke Beeinflussung von C/EBP β bei der Granulopoese beobachtet werden. Eine Stimulation mit G-CSF führte zu einer erhöhten C/EBP β -Expression in granulozytären Vorläufern und ebenso zu einer vermehrten Proliferation von Granulozyten. C/EBP β -defiziente Vorläuferzellen zeigten hingegen *in vivo* und *in vitro* eine verminderte Granulopoese (Hirai et al. 2006). Ebenso entwickelten C/EBP β ko-Mäuse eine ausgeprägte Splenomegalie, periphere Lymphadenopathie und eine erhöhte Hämatopoese. Des Weiteren zeigten die Mäuse eine defekte Aktivierung der Milz-Makrophagen sowie eine veränderte Funktion der T-Helferzellen (Screpanti et al. 1995). In myeloiden Knochenmarkszellen führte die Expression von C/EBP β zu einer Verminderung von Vorläufern und zu einer vermehrten Anzahl an Granulozyten (Popernack et al. 2001).

2.5 Die monozytäre Differenzierung

Monozyten gehören zur Gruppe der im Blut zirkulierenden Leukozyten und partizipieren an unterschiedlichen biologischen Prozessen wie Entzündung, Entwicklung, Homöostase, Infektabwehr und bei entzündlichen Erkrankungen, etwa der Arteriosklerose. Monozyten repräsentieren eine Gruppe von Zellen, die für die Koordination der angeborenen und adaptiven Immunität durch die Produktion verschiedenster Zytokine und andere Effektormoleküle verantwortlich sind (Auffray et al. 2009).

Hämatopoetische Stammzellen (HSC; *hematopoietic stem cell*) besitzen das Potenzial sowohl sich selbst zu erneuern als auch in verschiedene hämatopoetische Zelllinien zu differenzieren. HSC stellen lediglich einen kleinen Teil der Knochenmarkszellen da und teilen sich sehr langsam (schätzungsweise eine Teilung in 14 Tagen). Während des Differenzierungsprozesses verlieren die Stammzellen zunehmend die Möglichkeit der Selbsterneuerung und die Proliferationsrate der Vorläuferzellen steigt stark an (Reya et al. 2001; Ogawa 1993). Die Entwicklung und Differenzierung von der HSC zum Monozyten findet im Knochenmark statt und wird über eine Reihe von intermediären Vorläuferstadien reguliert. Die pluripotente HSC entwickelt sich durch Stimulation mit den Mediatoren IL-1, IL-3 und/oder IL-6 zur gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle (CMP; *common myeloid*

progenitor) sowie zur granulozytären/makrophagen Vorläuferzelle (GMP; *granulocyte/monocyte progenitor*). Die folgende Aktivierung der Zellen mit den Faktoren M-CSF (*monocyte colony stimulating factor*), GM-CSF (*granulocyte/monocyte colony stimulating factor*) und IL-3 führt über die Bildung der makrophagen/dendritischen Vorläuferzelle (MDP; *macrophage/DC progenitor*) hin zum Monozyten (Valledor et al. 1998). Anschließend verlassen die Zellen das Knochenmark und wandern ins periphere Blut ein. Nach einer Zirkulationszeit von 1-3 Tagen ziehen Monozyten in bestimmte Gewebearten ein und differenzieren dabei zu Makrophagen (Abb. 2.5) (Johnston 1988).

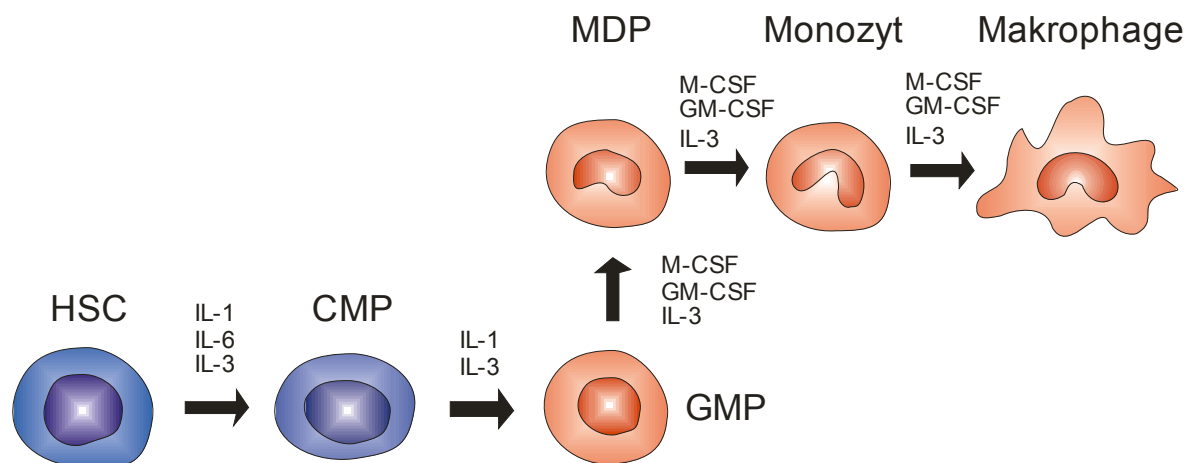


Abbildung 2.5: Die monozytäre Differenzierung

Von der hämatopoetischen Stammzelle (HSC) entwickeln sich Monozyten über die gemeinsame myeloiden Vorläuferzelle (CMP), die granulozytären/makrophagen Vorläuferzelle (GMP) und die makrophagen/dendritische Vorläuferzelle (MDP) bis zum Makrophagen.

In menschlichem Blut repräsentieren Monozyten einen Anteil von 10% der Leukozytenpopulation und bilden zusammen mit dendritischen Zellen (DC), Granulozyten, natürlichen Killerzellen und Mastzellen die zelluläre Komponente des angeborenen Immunsystems (Janeway und Medzhitov 2002). Eine der Hauptaufgaben von Monozyten und Makrophagen ist die spezifische rezeptorvermittelte Identifizierung sowie die Zerstörung körperfremder Strukturen durch Phagozytose, wobei Makrophagen abhängig von der Gewebeart einer funktionellen und morphologischen Diversität unterliegen (Rutherford et al. 1993). Nach dem Prozess der Phagozytose und der Abtötung pathogener Erreger erfolgt die Proteinprozessierung mit anschließender Antigenpräsentation zur Aktivierung von T-Helferzellen. Dies wird durch Gewebemakrophagen, aber auch durch DC realisiert (Medzhitov und Janeway 2000). Weiterhin besitzen Monozyten und Makrophagen die Fähigkeit *Scavenger*-Funktionen auszuüben. Dabei werden durch Apoptose oder Nekrose abgestorbene Zellen sowie

Zellbruchstücke und Matrixbestandteile über die Vermittlung spezifischer *Scavenger*-Rezeptoren beseitigt (Serbina et al. 2008).

Die Regulation der Differenzierungsstufen wird darüber hinaus durch verschiedene Faktoren wie PU.1 (*purine-rich nucleic acid binding protein 1*), C/EBP, EGR-1 (*early growth response protein 1*) und c-Myc beeinflusst (siehe Abb. 2.6). Der Transkriptionsfaktor PU.1 aus der Ets-Familie spielt bei der Induzierung von myeloiden Nachkommen bei unreifen multipotenten Vorläuferzellen eine entscheidende Rolle (Nerlov und Graf 1998) und ist bei der Generierung von gemeinsamen myeloiden Vorläufern essentiell (Dakic et al. 2005). Weiterhin fungiert PU.1 als kritischer Faktor während der Differenzierung, der Proliferation und dem Überleben von Makrophagen durch die Regulation der Expression des M-CSF-Rezeptors (Celada et al. 1996; Olson et al. 1995; Zhang et al. 1994). Ebenso ist die Expression von PU.1 bei frühen Entwicklungsschritten der granulozytären sowie monozytären Reifung stark erhöht (Voso et al. 1994; Sakhinia et al. 2006) und führte bei GMP zu einer monozytären Entwicklung (Chen et al. 1995). Auch während der terminalen Differenzierung zu Makrophagen und Granulozyten steigt der Level von PU.1 drastisch an (Dahl et al. 2003; Cheng et al. 1996). Im Gegensatz dazu zeigten PU.1 ko-HSCs eine gestörte CMP-Entwicklung während PU.1 ko-CMPs und -GMPs eine defekte monozytäre Differenzierung aufwiesen (Iwasaki et al. 2005). Während der Hämatopoese sind C/EBP α , C/EBP β und C/EBP δ vorwiegend in Granulozyten, Monozyten und eosinophilen Zellen exprimiert (Scott et al. 1992; Muller et al. 1995; Radomska et al. 1998). C/EBP α wird primär in undifferenzierten pluripotenten myeloiden Zellen gebildet, während C/EBP β und C/EBP δ in differenzierten, reifen Makrophagen hochreguliert werden (Scott et al. 1992; Natsuka et al. 1992). C/EBP α scheint die monozytäre Entwicklung durch die Modulation der Expression des M-CSF- und GM-CSF-Rezeptors zu kontrollieren, wobei C/EBP α in einigen Fällen mit PU.1 kooperiert (Hohaus et al. 1995). In C/EBP β ko-Mäusen konnte eine gehemmte Aktivierung der Makrophagen nachgewiesen werden, während eine C/EBP β -Überexpression in hämatopoetischen Zellen eine granulozytäre Differenzierung induziert (Tanaka et al. 1995; Wang und Friedman 2002). EGR-1 fördert und kontrolliert die Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen und wird unter anderem durch PU.1 aktiviert (Nguyen et al. 1993). Es wird speziell in murinen Makrophagen, mit GM-CSF oder M-CSF stimulierten peripheralen Blutmonozyten und während der Makrophagendifferenzierung von U937-Zellen induziert. Weiterhin konnte durch das Einbringen von EGR-1-siRNA die Differenzierung von HL-60- und U937-Zellen zu Monozyten/Makrophagen unterbunden werden (Liebermann und Hoffman 1994). EGR-1 transaktiviert die Expression verschiedener Gene wie Sp-1, CEBP β und TGF- β 1, die für die Entwicklung, das Wachstum sowie die Differenzierung wichtig sind (Zhang und Liu

2003; Liu et al. 2003; Liu et al. 1996). Darüber hinaus führte die konstitutive Expression von c-Myc in myeloleukämischen Zellen zur Blockierung der terminalen Differenzierung während der Progression unreifer Myeloblasten zu reifen Makrophagen (Liebermann und Hoffman 1994).

Die Differenzierung von monozytären Zellen kann nicht nur durch den direkten Einfluss verschiedenster Proteine und Faktoren ausgelöst, sondern auch durch exogene chemische Substanzen induziert werden. Diese können in physiologische Stimulantien wie 1,25-Dihydroxyvitamin D3 (VD3) und All-trans-Retinolsäure (ATRA) sowie in nicht-physiologische Stimulantien wie Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) unterschieden werden und sind in der Lage bei promyeloischen und monozytären Zellen unterschiedliche Differenzierungsmechanismen zu erzeugen. Die promyeloische Leukämiezelllinie HL-60 entwickelt sich durch VD3 zu einem monozytären Phänotyp, während eine Behandlung mit PMA eine Differenzierung zum Makrophagen bewirkt (Collins 1987; Rovera et al. 1979). Ebenso ruft PMA bei monozytären Leukämiezellen wie THP-1 einen Phänotyp mit erhöhter Adhärenz und vermehrte Expression von Oberflächenmarkern hervor, der mit einer Makrophagendifferenzierung assoziiert ist (Schwende et al. 1996). PMA bewirkt dabei eine Induzierung der PKC, die als kritischer Faktor bei der Regulation der Zellproliferation und Differenzierung agiert (Cerdea et al. 2006). Weiterhin konnte eine granulozytäre Differenzierung bei einer Reihe von myeloiden Leukämiezelllinien durch die Applikation von ATRA nachgewiesen werden (Brackman et

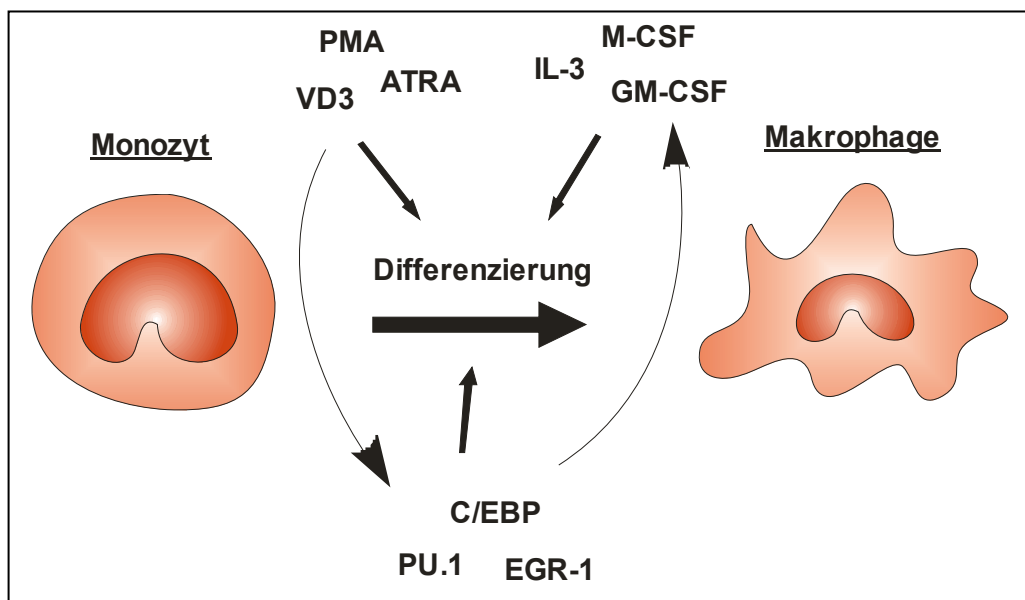


Abbildung 2.6: Schema der monozytären Differenzierung

Die Differenzierung vom Monozyt zum Makrophagen wird unter anderem durch chemische (PMA, VD3, ATRA), transkriptionelle (PU.1, C/EBP, EGR-1) und wachstumsfördernde (IL-3, M-CSF, GM-CSF) Stoffe beeinflusst. Eine Regulation dieser Substanzen untereinander ist ebenfalls möglich.

al. 1995). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine PMA- und ATRA-induzierte Differenzierung bei THP-1- und U937-Zellen durch C/EBP β (Gutsch et al. 2011) und PU.1 (abhängig von NDRG1) vermittelt wird (Chen et al. 2009). Weiterhin ist eine Protein-Protein-Interaktion von C/EBP β und PU.1 für die transkriptionelle Aktivität der Promotoren von IL-1 β und MD-2 (*myeloid differentiation factor 2*) essentiell (Tissieres et al. 2009). Diese beiden Faktoren spielen unter anderem bei der Differenzierung von myeloiden Vorläufern eine Rolle und zeigten währenddessen auch eine verstärkte Sezernierung (Yang et al. 2000; Li et al. 2008).

Störungen der Differenzierung und eine deregulierte Proliferation bei leukozytären Vorläuferzellen treten sehr häufig bei leukämischen Erkrankungen auf. Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) kommt es zu einem Defekt der Hämatopoese durch Akkumulation von funktionsuntüchtigen granulozytären und monozytären Vorläufern im Knochenmark (Pabst und Mueller 2007). Leukämische Zellen können dann ins Blut ausgeschwemmt werden und innere Organe infiltrieren (Estey und Döhner 2006). Untersuchungen zur Pathogenese der AML bezogen sich unter anderem auf die Analyse unterschiedlicher Onkogene und Tumorsuppressorgene. Obwohl die Ursachen des veränderten Proliferations- und Entwicklungsverhalten der Vorläuferzellen noch relativ unerforscht sind, liegt die Vermutung nahe, dass Abnormalitäten bei einigen Transkriptionsfaktoren die Zellzyklusregulation und Differenzierung beeinflussen (Rosmarin et al. 2005). Besonders die veränderte Expression von C/EBP α korreliert mit dem Auftreten von AML. Zwischen 5-14% der AML-Patienten tragen genomische Mutationen im C/EBP α -Gen, wobei entweder eine N-terminale Leserasterverschiebung oder eine C-terminale *in-frame*-Mutation vorliegt (Pabst et al. 2001). Es hat sich zudem gezeigt, dass Mäuse mit einer unterdrückten p42-Isoform, aber einer exprimierten dominant-negativen p30-Isoform eine AML-ähnliche Erkrankung entwickelten (Pabst und Mueller 2007). Darüber hinaus haben *knock in*-Mäuse mit einer gezielten Mutation in der Basisregion des C/EBP α -Gens, welches die C/EBP α -E2F-Interaktion inhibiert, eine myeloproliferative Störung entwickelt (Porse et al. 2005).

2.6 Ziel der Arbeit

C/EBP β fungiert als wichtiger Faktor bei der Regulation von Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose. Während eine vermehrte Expression der langen C/EBP β -Isoform LAP* die Zellteilung inhibiert, führt ein erhöhter Level der kurzen Isoform LIP zu einer vermehrten Zellproliferation. Des Weiteren kann eine verstärkte Expression

von LAP* die Differenzierung von myeloiden Zellen induzieren. Darüber hinaus existiert eine direkte regulatorische Verbindung zwischen dem C/EBP β -System und der FLT3/ITD-Mutation, die mit hoher Prävalenz in AML-Zellen vorkommt (Haas et al. 2010). Die Intention dieser Arbeit war die Charakterisierung der Regulation des C/EBP β -Systems in monozytären bzw. mit Malignität assoziierten und Makrophagen-ähnlichen Zellen sowie die Untersuchungen der Auswirkungen auf unterschiedliche zelluläre Prozesse.

Dafür sollten folgende Aspekte behandelt werden:

- Für die Untersuchung der Rolle von C/EBP β auf verschiedene zelluläre Prozesse sollten C/EBP β -stabil-überexprimierende Zelllinien hergestellt werden.
- Im nächsten Schritt sollte der Einfluss von C/EBP β auf die Proliferation, die Differenzierung und die Apoptose mit Hilfe der stabil-überexprimierenden Zelllinien analysiert werden.
- Ein weiteres Ziel war die Wirkung von C/EBP β auf die molekularen Mechanismen während der Regulation zellulärer Prozesse in proliferierenden und differenzierten monozytären Zellen zu untersuchen. Dabei standen die Modulation der Expression verschiedener Zellzyklusproteine sowie die Veränderung der Zellmorphologie durch C/EBP β im Vordergrund.
- Des Weiteren sollte der Einfluss der verschiedenen C/EBP β -Isoformen auf die Aktivität mehrerer Zellzyklus-assoziiierter Promotoren ermittelt und ebenso eine mögliche direkte Bindung von C/EBP β an Promotorregionen nachgewiesen werden.
- Schließlich sollte eine Veränderung der Regulation des Zellzyklus im C/EBP β ko-Model verifiziert werden. Dazu sollten Zellzyklusanalysen, Proliferationstests sowie morphologische und molekulare Untersuchungen hinsichtlich der Funktion von C/EBP β auch im Makrophagen-Model durchgeführt werden.

Die hier durchgeführten Analysen und die daraus resultierenden Ergebnisse könnten wichtige Grundlagen für die Entwicklung neuer therapeutischer und diagnostischer Strategien bei malignen und entzündlichen Erkrankungen darstellen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden mit dem Programm PerlPrimer v.1.1.17 (<http://perlprimer.sourceforge.net/>) konzipiert und bei der Firma Sigma-Aldrich erworben.

Tabelle 3.1: Primer-Sequenzen für die Amplifikation von C/EBP β -Fragmenten

Primer-Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
h cebpb fl for	AAAGGTACCATGCAACGCCTGGTGGCCTGGGA
h cebpb fl rev	AAAGATATCCTAGCAGTGGCCGGAGGAGGC
h lip for	AAAGGTACCATCGCGGCGGGCTTCCCGTAC
h lip rev	AAAGATATCCTAGCAGTGGCCGGAGGAGGC

Tabelle 3.2: Primer-Sequenzen für die Amplifikation von Promotor-Fragmenten

Primer-Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
h cyclin e prom for	AAAGGTACCAGGACTCAGGGCCCGGAAC TCG
h cyclin e prom rev	AAAGCTAGCGATGGGGCTGCTCCGGCCT
h cyclin a prom for	GGTACCGTTGGTTGCCACAGCTTGGGG
h cyclin a prom rev	GCTAGCGAGTGCTCCCGGGAGTGG
h IL-6 prom for	AAAGGTACCGAGGTGAGTAGTATTCTCCCCCTTT
h IL-6 prom rev	AAAAGATCTAGCTGGGCTCCTGGAGGGA
cebpb cons seq for	GGTACCATTGCGCAATATTGCGCAATATTGCGC- AATATTGCGCAATATTGCGCAATGCTAGC
cebpb cons seq rev	GCTAGCATTGCGCAATATTGCGCAATATTGCGC- AATATTGCGCAATATTGCGCAATGGTACC

Tabelle 3.3: Primer-Sequenzen für die Amplifikation von hypothetischen C/EBP β -Bindestellen nach einer Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Primer-Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
Rb1 for	TTCAATTTATCAGGCTCCCA
Rb1 rev	CCAGTCCTACCTAACTTCAG
Rb2 for	TTCATTCTTTGTAGCTGGAC
Rb2 rev	TAAGCCTCCTGAGTTTATCC
Rb3 for	TAGATGACGGGTTGATAGGTG
Rb3 rev	GATTGTAGTGGTGTAAAGAACGG
Rb4 for	CGTTCTTACACCACTACAATCC
Rb4 rev	TCTGATAGGGAAGACTCTCGG
E2F1 for	GCTTATGTGGTCTCTGTGGTCCC
E2F1 rev	GCAGCCTCAAATCACAGCTCC
E2F2 for	CCTAAGGACCACCCTTGCAG
E2F2 rev	GAGCCCTCCCAAGGATTTACTC
E2F3 for	TGCTATACGTTGGCTGTTGG
E2F3 rev	CCTCAGCTTAGATTTCCAGAGAC
Negativkontrolle for	GCGCTGATTATGTTCTTAAATGG
Negativkontrolle rev	TGGAAATGAAATGAAGGCTAAAA
Positivkontrolle for	GGACTATTTTCCTGATGGTTGGAC
Positivkontrolle rev	GGAACGGAACAACCTGTAATGGC

3.1.2 Antikörper

Tabelle 3.4: Antikörper, verwendet für Western Blot (WB), Immunpräzipitation (IP), ChIP und Durchflusszytometrie (FACS)

Antikörper	Verdünnung				Hersteller
	WB	IP	ChIP	FACS	
C/EBP β (H-7)	1:200			1:20	Santa Cruz, Heidelberg
C/EBP β (C-19)	1:200	1:3	1:20		Santa Cruz, Heidelberg
Cyclin A (C-19)	1:200				Santa Cruz, Heidelberg
Cyclin D1 (A-12)	1:200				Santa Cruz, Heidelberg
Cyclin E (E-4)	1:200				Santa Cruz, Heidelberg
c-Myc (D84C12)	1:1000				Cell Signaling, Danvers, USA
E2F1	1:1000				Cell Signaling, Danvers, USA
GAPDH	1:10000				Sigma-Aldrich, München
Histon H3	1:50				Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen IgG HRP	1:5000				Vector Laboratories, Peterborough, UK
Maus Ig APC				1:20	BD Biosciences, Heidelberg
Maus IgG 2ak				1:20	BD Biosciences, Heidelberg
Maus IgG HRP	1:5000				Vector Laboratories, Peterborough, UK
Normal IgG			1:100		Millipore, Billerica, USA
PCNA (FL-261)	1:200				Santa Cruz, Heidelberg
p15 INK4B	1:1000				Cell Signaling, Danvers, USA
p16 INK4A	1:1000				Cell Signaling, Danvers, USA
p27 Kip1	1:1000				Cell Signaling, Danvers, USA
p-Rb Ser780	1:1000				Cell Signaling, Danvers, USA
p-Rb Ser795	1:1000				Cell Signaling, Danvers, USA
p-Rb Ser807/811	1:1000				Cell Signaling, Danvers, USA
Rb (4H1)	1:1000				Cell Signaling, Danvers, USA
β -Tubulin (H-235)	1:200				Santa Cruz, Heidelberg

3.1.3 **Vektoren**

Tabelle 3.5: Vektoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Vektoren	Referenz
pTracer-CMV2	Invitrogen, Karlsruhe
pTracer hCEBP β LAP*	in dieser Arbeit hergestellt
pTracer hCEBP β LIP	in dieser Arbeit hergestellt
pGL3-Basic Vector	Promega, Mannheim
pGL3 hCyclin E1	in dieser Arbeit hergestellt
pGL3 hCyclin A2	in dieser Arbeit hergestellt
pGL3 hIL-6	in dieser Arbeit hergestellt
pGL3 5x C/EB β -CS	in dieser Arbeit hergestellt
pRL-TK Vector	Promega, Mannheim
SF91.IRES.eGFP.PRE	Li et. al 2003
SF91 hCEBP β LAP*	in dieser Arbeit hergestellt
SF91 hCEBP β LIP	in dieser Arbeit hergestellt

3.1.4 **Zelllinien**

C/EBP β -long	in dieser Arbeit generiert
C/EBP β -short	in dieser Arbeit generiert
SF91	in dieser Arbeit generiert
C/EBP β wt	Gorgoni et al. 2002
C/EBP β ko	Gorgoni et al. 2002
THP-1 (human, akute monozytäre Leukämie)	DSMZ, Braunschweig

3.1.5 **Zellkulturmedium und Zusätze**

RPMI 1640	Biochrom, Berlin
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Penicilin/Streptomycin	Biochrom, Berlin

Trypsin/EDTA-Lösung

Sigma-Aldrich, München

3.1.6 *Enzyme*

FastStart Taq DNA Polymerase, dNTPack

Roche, Mannheim

Klenow-Enzym

Roche, Mannheim

Pwo DNA Polymerase, dNTPack

Roche, Mannheim

Restriktionsenzyme und Puffer

NEB, Frankfurt a. M.

Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) und Puffer

Promega, Mannheim

T4 DNA Ligase und Puffer

NEB, Frankfurt a. M.

3.1.7 *Bakterien*

One Shot TOP10 chemisch kompetente *E. coli*

Invitrogen, Karlsruhe

XL1-Blue kompetente *E. coli*

Stratagene, La Jolla, USA

XL10-Gold ultrakompetente *E. coli*

Stratagene, La Jolla, USA

3.1.8 *Nährmedien für E.coli*

Ampicillin-Lösung 50 mg/ml Ampicillin in H₂O

LB-Medium 1% (w/v) Trypton; 1% (w/v) NaCl; 0,5% (w/v)
Hefeextrakt in H₂O

LB-Amp-Medium LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin

LB-Agarplatten LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar

3.1.9 *Puffer und Lösungen*

Annealing-Puffer (10x) 100 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 M NaCl; 10 mM EDTA pH 8;
in H₂O

Elutionspuffer 100 mM NaHCO₃; 1% (w/v) SDS; in H₂O

FACS-Puffer	5% (w/v) BSA; 0,02% (w/v) NaN ₃ ; in PBS
<i>Filling</i> -Puffer (10x)	500 mM Tris pH 7,5; 100 mM MgCl ₂ ; 10 mM DTT; 500 µg/ml BSA; in H ₂ O
Fixierungspuffer	500 mM HEPES/KOH pH 7,9; 0,1 M NaCl; 1 mM EDTA pH 8; 0,5 mM EGTA pH 8; 11% Formaldehyd; in H ₂ O
Kernlysepuffer (L2)	50 mM Tris/HCl pH 7,4; 1% (w/v) SDS; 10 mM EDTA pH 8; 0,5% (v/v) Empigen BB; in H ₂ O versetzt mit 1 mM PMSF; 1,45 µM Pepstatin; 0,3 µM Aprotinin
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na ₂ HP ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4 in H ₂ O
PBS-T	PBS mit 0,1% (v/v) Tween20
Ponceau-Lösung	0,1% (w/v) Ponceau S; 3% (w/v) TCA; in H ₂ O
SDS-Ladepuffer (4x)	250 mM Tris/HCl; 8% (w/v) SDS; 200 mM DTT; 40% (v/v) Glycerin; 0,04% (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8 in H ₂ O
SDS-Puffer	50 mM Tris; 192 mM Glycin; 1,6 mM EDTA; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,5 in H ₂ O
TAE	1 mM EDTA; 20 mM Eisessig; 40 mM Tris; in H ₂ O
TBS	137 mM NaCl; 20 mM Tris; pH 7,6 in H ₂ O
TBS-T	TBS mit 0,1% (v/v) Tween20
TE	10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7,5 & pH 8 in H ₂ O
Transferpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% (v/v) Ethanol; pH 8,3 in H ₂ O

Stop-Lösung	2,625 M Glycin in H ₂ O
Verdünnungspuffer	20 mM Tris/HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 2 mM EDTA pH 8; 0,5% (v/v) Triton X-100; in H ₂ O versetzt mit 1 mM PMSF; 1,45 µM Pepstatin; 0,3 µM Aprotinin
Waschpuffer I	20 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,1% (w/v) SDS; 1% (v/v) Triton X-100; 2 mM EDTA pH 8; in H ₂ O
Waschpuffer II	20 mM Tris/HCl pH 7,4; 500 mM NaCl; in H ₂ O
Waschpuffer III	10 mM Tris/HCl pH 7,4; 250 mM LiCl; 1% NP-40; 1% Deoxycholsäure; 1 mM EDTA pH 8; in H ₂ O
Zelllysepuffer	150 mM NaCl; 25 mM MgCl ₂ ; 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 10% Glycerin; 1% NP-40; in H ₂ O versetzt mit 3x Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-frei)
Zellpuffer-Mix	10 mM HEPES/KOH pH 7,9; 85 mM KCl; 1 mM EDTA pH 8; in H ₂ O versetzt mit 1 mM PMSF; 1,4 µM Pepstatin; 0,3 µM Aprotinin

3.1.10 Reagenzien

Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Aprotinin	Roche, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Roche, Mannheim
Crystal 5x DNA-Probenpuffer	Bioline, Luckenwalde
Cycloheximid (CHX)	Calbiochem, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dynabeads Protein A	Invitrogen, Karlsruhe
Empigen BB	Calbiochem, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe

Glykogen	Ambion, Austin, TX, USA
Hyperladder I DNA-Leiter	Bioline, Luckenwalde
Kaleidoskope Protein-Leiter	Bio-Rad, München
Nonidet P-40	Roche, Mannheim
PageRuler Protein-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot
Pepstatin	Roche, Mannheim
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, München
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München
Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-frei	Roche, Mannheim
Protein-Assay	Bio-Rad, München
SuperSignal West Femto Substrat	Thermo Scientific, Schwerte
Sepharose Cl-4 Beads	Sigma-Aldrich, München
Sepharose 4 FastFlow	GE Healthcare, München
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Tris-Glycin-Gele	Biostep, Jahnsdorf
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München

3.1.11 *Kits*

Amaya Cell Line Nucleofector Kit V	Lonza, Köln
Annexin V-APC Apoptosis Detection Kit	eBioscience, Frankfurt
CycleTest Plus DNA Reagent Kit	BD Bioscience, Heidelberg
Cytofix/Cytoperm	BD Bioscience, Heidelberg
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
Limulus Amoebocyte Lysate Assay	Lonza, Köln
MycoAlert Mycoplasma Detection Kit	Lonza, Köln
NucleoBond Xtra Maxi EF	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
ViaLight Plus Cell Proliferation BioAssay Kit	Lonza, Köln

3.1.12 Geräte

Bio-Link UV-Crosslinker	Peqlab, Erlangen
Durchflussszytometer FACScalibur	BD Bioscience, Heidelberg
ELx808 Absorptions-Reader	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
Fluoreszenzmikroskop IX81	Olympus, Hamburg
Heraeus Fresco17 Zentrifuge	Thermo Scientific, Schwerte
Heraeus Pico17 Zentrifuge	Thermo Scientific, Schwerte
Heraeus Multifuge 3S-R Zentrifuge	Thermo Scientific, Schwerte
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
MF-ChemiBIS Bioimager	Biostep, Jahnsdorf
Mikroskop TELAVA 31	Carl Zeiss, Jena
Nanodrop Spectrophotometer ND-1000	Peqlab, Erlangen
Nucleofector II Device	Lonza, Köln
Orion L Micorplate Luminometer	Berthold DS, Pforzheim
PCR-Thermocycler	Biometra, Göttingen
PerfectBlue Horizontales Midigelsystem	Peqlab, Erlangen
PerfectBlue Tank-Elektroblotter Web S	Peqlab, Erlangen
PerfectBlue Doppelgelsystem Twin S	Peqlab, Erlangen
pH Meter Micorprocessor pH211	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Ultraschall-Homogenisator Sonopuls	Bandelin electronic, Berlin

3.1.13 Software

CorelDraw 12	Corel Corporation,
EndNote 7	Thomson ISI ResearchSoft
FACSDiVa™ Software	BD Bioscience, Heidelberg
GraphPad Prism 5	GraphPad, La Jolla, USA
PerlPrimer v.1.1.17	http://perlprimer.sourceforge.net/
TFSEARCH vers. 1.3	GBF-Braunschweig
TotalLab TL100 software	Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode um DNA *in vitro* zu amplifizieren (Saiki et al. 1988). Die Reaktion setzt sich aus drei Schritten zusammen, die in mehreren Zyklen hintereinander wiederholt werden. 1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA. 2. *Annealing* kurzer Oligonukleotide (Primer) an die einzelsträngige DNA. 3. Elongation der angelagerten Oligonukleotide durch eine DNA-Polymerase. Zur Identifizierung der optimalen Bindungstemperatur von Primern wurde eine Gradienten-PCR mit folgendem Ansatz (15 µl) eingesetzt:

1,5 µl 10x PCR-Puffer
0,3 µl *Template* (100 ng/µl genomische DNA oder cDNA)
0,3 µl dNTP-Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, je 2,5 mM)
0,3 µl *forward*-Primer (50 µM)
0,3 µl *reverse*-Primer (50 µM)
0,3 µl Taq Polymerase (5 U/µl)
12,0 µl H₂O

Es wurde folgendes PCR-Programm mit 30 Zyklen angewendet:

Initiale Denaturierung	97 °C	5 min
Denaturierung	97 °C	30 sek
<i>Annealing</i> (Gradient)	50 - 70 °C	30 sek
Elongation	72 °C	1 min
Finale Elongation	72 °C	5 min

Für eine Standard-PCR zur Klonierung von Überexpressions- und Reporter-genkonstrukten wurde folgender Ansatz (50 µl) verwendet:

5,0 µl 10x PCR-Puffer
10,0 µl 5x G/C-Lösung
1,0 µl *Template* (100 ng/µl, genomische DNA oder cDNA)

1,0 µl dNTP-Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, je 2,5 mM)
1,0 µl *forward*-Primer (50 µM)
1,0 µl *reverse*-Primer (50 µM)
1,0 µl Pwo DNA-Polymerase (5 U/µl)
30,0 µl H₂O

Es wurde folgendes PCR-Programm mit 35 Zyklen angewendet:

Initiale Denaturierung	97 °C	5 min
Denaturierung	97 °C	1 min
<i>Annealing</i>	57 - 68 °C	30 sek
Elongation	72 °C	2 min
Finale Elongation	72 °C	5 min

3.2.1.2 *Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli*

Für eine Plasmidisolierung im kleinen Maßstab wurde jeweils eine Bakterienkolonie in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37 °C unter Schütteln vermehrt. Die Plasmidisolierung erfolgte dann mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers. Im Anschluss wurde die DNA in 50 µl H₂O eluiert und die Konzentration photometrisch am Nanodrop bestimmt. Für eine Plasmidisolierung im großen Maßstab wurde eine Übernachtskultur aus 200 ml LB-Medium sowie 100 µg/ml Ampicillin angesetzt, mit einer Bakterienkolonie beimpft und bei 37 °C geschüttelt. Die Isolierung der Plasmide erfolgte dann mit dem Kit NucleoBond Xtra Maxi EF nach den Angaben der Firma Macherey-Nagel. Das DNA-Pellet wurde anschließend in 150 µl H₂O resuspendiert und die Konzentration am Nanodrop gemessen.

3.2.1.3 *Klonierung der C/EBPβ-Überexpressionskonstrukte*

Die Generierung der Konstrukte pTracer hCEBPβ LAP* und pTracer hCEBPβ LIP erfolgte durch Amplifizierung der vollständigen codierenden Sequenz des humanen CEBPβ-LAP* und der verkürzten Isoform LIP (Genbank Accession Nr.: NM_005194.2) mit Hilfe der PCR. Dafür wurden Primer mit einer integrierten KpnI- und EcoRV-Restriktionsschnittstelle am 5'- bzw. 3'-Ende verwendet. Das entstandende

PCR-Produkt wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und das entsprechende DNA-Fragment aus dem Agarosegel isoliert. Anschließend erfolgte ein Restriktionsverdau des Ampifikats mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und EcoRV. Das geschnittene Genfragment wurde dann in den Vektor pTracer-CMV2 ligiert, der zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisiert wurde. Die Plasmide wurden dann in One Shot TOP10 *E. coli* transformiert, die auf LB-Platten ausplattiert wurden. Anschließend wurden Klone gepickt, Übernachtskulturen angesetzt und eine Plasmidisolierung im kleinen Maßstab durchgeführt. Die isolierte DNA wurde mittels Restriktionsverdau und Auftrennung im Agarosegel überprüft und durch die Firma Eurofins MWG Operon sequenziert.

Für die Generierung der Konstrukte SF91 hCEBP β LAP* und SF91 hCEBP β LIP wurden die für LAP* und LIP codierenden DNA-Fragmente über die PmeI-Restriktionsschnittstelle aus dem Vektor pTracer herausgeschnitten und mittels Agarosegel-Extraktion aufgereinigt

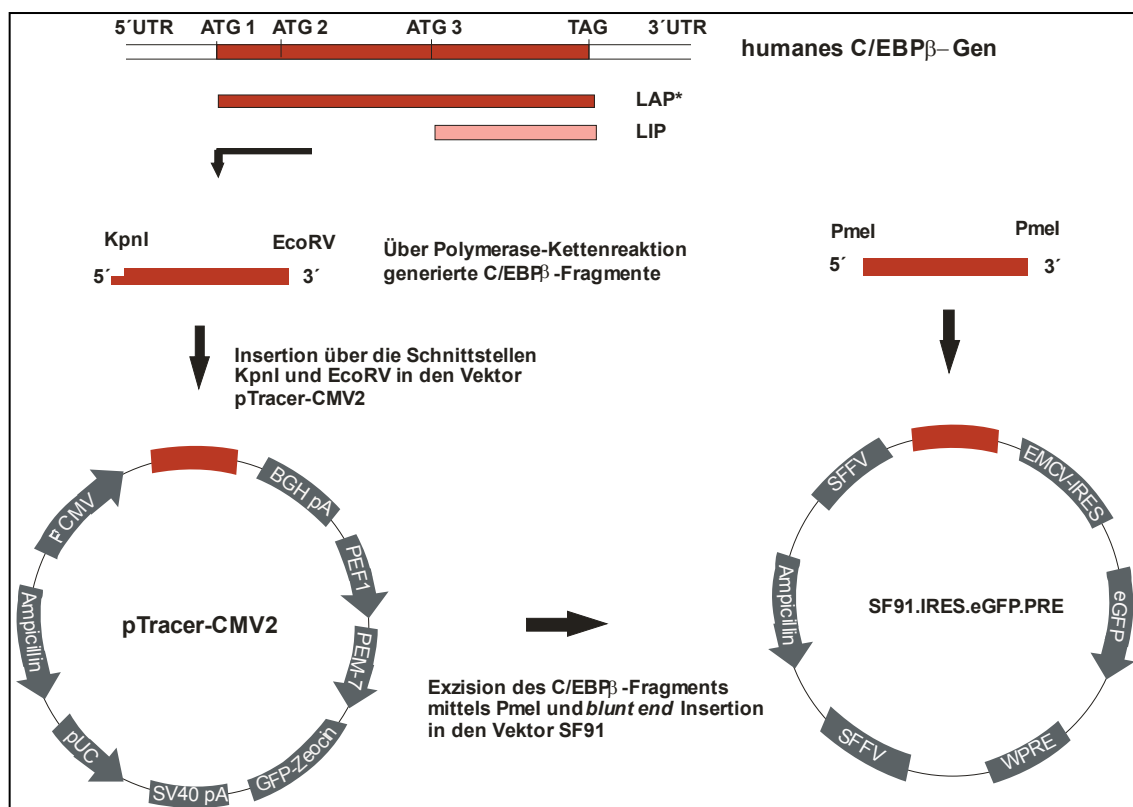


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Generierung der C/EBP β -Überexpressionskonstrukte

C/EBP β -Amplifikate wurden über die KpnI- und EcoRV-Schnittstellen in den Vektor pTracer-CMV2 kloniert. Für die viralen Plasmide wurden die Fragmente mit PmeI exzidiert und *blunt end* in den Vektor SF91 ligiert.

(siehe Abb. 3.1). Der für die Insertion vorgesehene Vektor SF91.IRES.eGFP.PRE wurde mit dem Restriktionsenzym NotI linearisiert und anschließend mittels der *Shrimp Alkaline Phosphatase* dephosphoryliert. Nach Aufreinigung des Vektors unter Verwendung des NucleoSpin Extract II Kits wurden die durch den Verdau entstandenen 5' Überhänge mit Hilfe des Klenow-Enzyms zu glatten Enden (*blunt ends*) aufgefüllt, anschließend aufgereinigt und erneut dephosphoryliert. Im Anschluss wurden die LAP*- und LIP-Inserts in den Vektor *blunt end* ligiert. Nach der Ligation wurden die Plasmide wie oben beschrieben behandelt und überprüft.

3.2.1.4 Klonierung der Promotor-Reportergen-Konstrukte

Für das Konstrukt pGL3 hIL-6 wurde ein DNA-Fragment von Position -1007 bis +1 des humanen IL-6-Gens (NC_000007.13), für pGL3 hCyclin A2 wurde der Bereich von Position -1011 bis -1 des humanen Cyclin A2-Gens (NC_000004.11) und für pGL3 hCyclin E1 wurde der Abschnitt von Position - 1132 bis - 1 des humanen Cyclin E1-Gens (NC_000019.9) mit Hilfe der PCR amplifiziert. Die entstandenen PCR-Produkte wurden über ein Agarosegel aufgereinigt und mit Restriktionsenzymen (KpnI und NheI bei Cyclin A2 und Cyclin E1 sowie KpnI und BglII bei IL-6) verdaut. Gleichzeitig wurde das für die Insertion verwendete Plasmid pGL3-*Basic* mit den entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert. Die geschnittenen Amplifikate wurden anschließend in die Vektoren ligiert, die Konstrukte in One Shot TOP10 *E. coli* transformiert, die auf LB-Platten ausplattiert wurden. Anschließend wurden Klone gepickt, Übernachtskulturen angesetzt und eine Plasmidisolierung im kleinen Maßstab durchgeführt. Die isolierte DNA wurde mittels Restriktionsverdau und Auftrennung im Agarosegel überprüft und durch die Firma Eurofins MWG Operon sequenziert.

Für das Konstrukt pGL3 CEBP β ConsSeq wurde die fünffache CEBP β Consensus Sequenz (ATTGCGCAAT) als *forward*- und *reverse*-Oligonukleotid mit integrierten Restriktionsschnittstellen (KpnI und NheI) konzipiert. Die *forward*- und *reverse*-Primer wurden im Thermo-Cycler annealt, über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt, mit Restriktionsenzymen geschnitten und in den linearisierten pGL3-*Basic* ligiert. Anschließend wurde wie oben beschrieben weiter verfahren.

3.2.1.5 *Agarosegel-Elektrophorese*

Die Agarosegel-Elektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung und Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten. Für das Gel wurden 0,7-1,5% (w/v) Agarose in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und mit 0,01% (v/v) des DNA-interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid vermengt. Nach Auspolymerisierung der Gelmatrix wurde dieses in einer Elektrophoresekammer (PerfectBlue Horizontales Midigelsystem) mit TAE-Puffer überschichtet und mit DNA-Ladepuffer versetzten Proben beladen. Die Elektrophorese erfolgte dann bei 100 V unter Verwendung eines DNA-Markers zur Größenbestimmung der aufgetrennten Oligonukleotide.

3.2.1.6 *Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen*

Ein Restriktionsverdau ist eine Methode um DNA mit Hilfe von Nukleasen spezifisch zu schneiden. Die entstandenen Spaltprodukte ermöglichen es, die eingesetzte DNA analytisch zu überprüfen oder präparativ für Klonierungen zu isolieren.

Für einen Restriktionsverdau wurde folgender Ansatz verwendet:

1 µg DNA
5 µl 10x Restriktionsenzym-Puffer
1 µl Restriktionsenzym (10 U/µl)
ad 50 µl H₂O

Bei bestimmten Restriktionsenzymen wurde zusätzlich 1% BSA (10 mg/ml) verwendet. Der Ansatz wurde dann bei 37 °C für eine Stunde unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurde die gespaltene DNA entweder über eine Säule mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Kits aufgereinigt und weiter verwendet oder durch eine Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und daraus isoliert. Für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde zunächst die gewünschte Bande mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Danach erfolgte die Aufreinigung mit dem QIAquick Gel Extraction Kit.

3.2.1.7 Ligation

Um DNA-Fragmente gezielt miteinander zu verbinden, werden ATP oder NAD⁺ abhängige DNA-Ligasen eingesetzt. Diese bilden eine Phosphodiesterbindung zwischen der 3' Hydroxygruppe eines DNA-Endes und der 5' Phosphatgruppe eines anderen DNA-Segments.

Für die Ermittlung des optimalen Mengenverhältnisses von Vektor und Insert wurde folgende Formel verwendet:

$$[(200 \text{ ng Vektor} \times \text{Größe des Inserts in kb}) / \text{Größe des Vektors in kb}] \times 3 = \text{ng Insert}$$

Für eine Ligation wurde dann folgender Ansatz verwendet:

200 ng Plasmid-DNA
X ng Insert-DNA
1 µl T4 DNA Ligase
2 µl 10x Ligase-Puffer
ad 20 µl H₂O

Der Ligationsansatz wurde dann bei 22 °C für 6-8 Stunden inkubiert und anschließend direkt in *E.coli* transformiert.

3.2.1.8 Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli* XL-1-Blue, XL10-Gold oder One Shot TOP10 wurden auf Eis aufgetaut, mit 0,5 µg der zu transformierenden DNA oder 2 µl eines Ligationsansatzes versetzt und 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen für 30 Sekunden bei 42 °C geschockt und mit 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium versetzt. Im Anschluss daran wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt und auf LB-Platten ausgestrichen oder für die Beimpfung einer Übernachtskultur verwendet.

3.2.1.9 Dephosphorylierung von DNA-Segmenten

Um eine Religation und Rezirkularisierung von linearer Plasmid-DNA zu verhindern, wurde eine Dephosphorylierung der 5' Enden mit Hilfe der SAP durchgeführt. Für eine Dephosphorylierung wurde 1 U SAP/ μ g DNA zusammen mit SAP-Puffer direkt in den Restriktionsansatz gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Hitzeinaktivierung der SAP für 15 Minuten bei 65 °C.

3.2.1.10 Generierung von glatten DNA-Enden

Bei einem Restriktionsverdau mit unterschiedlichen versetzt schneidenden Restriktionsenzymen entstehen inkompatible Überhänge an den Enden der DNA-Fragmente. Zur Erzeugung von *blunt ends*, die eine Religation dieser DNA-Segmente ermöglichen, wurde das Klenow-Enzym verwendet. Dieses Enzym, welches aus dem großen Fragment der DNA-Polymerase I besteht, besitzt eine 5' $\rightarrow$ 3' Polymerase-Aktivität und eine 3' $\rightarrow$ 5' Exonuklease-Aktivität.

Für die Generierung von glatten DNA-Enden wurde folgender Ansatz verwendet:

5 μ l Plasmid-DNA
2 μ l 10x *Filling*-Puffer
5 μ l Klenow-Enzym (2 U/ μ l)
2 μ l dNTP-Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, je 2,5 mM)
ad 20 μ l H₂O

Der Reaktionsansatz wurde 20 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 65 °C inaktiviert.

3.2.1.11 Annealing komplementärer Oligonukleotide

Das gegenseitige Anlagern zweier einzelsträngiger Oligonukleotide wurde in einem Reaktionsansatz von 40 μ l durchgeführt. Dafür wurden äquimolare Anteile (2 mM) beider Oligonukleotide mit 10x *Annealing*-Puffer angesetzt und bei 95 °C für 5 Minuten im PCR-Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz um 1,2 °C/min bis auf 25 °C heruntergekühlt und über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt.

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 Kultivierung und Passage

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen der Größe 25 cm² und 75 cm² bei einer Temperatur von 37 °C, 5% CO₂-Atmosphäre und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde RPMI 1640 mit 9% FKS und 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Die Zellen wurden alle 3 bis 4 Tage passagiert und dann 1:5 ausgedünnt. Bei Suspensionszellen wurde dazu eine entsprechende Menge an Zellen bei 400 x g und RT abzentrifugiert und die Zellen dann in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium ausgesät. Adhärenente Zellen wurden mit Trypsin/EDTA von der Oberfläche der Kulturflasche gelöst und nach Abstoppen der restlichen Trypsinaktivität mit Medium bei 400 x g und RT zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt.

3.2.2.2 Kryokonservierung und Revitalisierung

Für die Kryokonservierung wurden 2 x 10⁶ Zellen bei 400 x g und 4 °C abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in Einfriermedium (70% RPMI 1640; 20% FKS; 10% DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden dann mit Hilfe eines Gefrierblocks um 1 °C/min bis auf -80 °C abgekühlt und anschließend bei -150 °C gelagert.

Zum Revitalisieren wurden die Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in 15 ml Zellkulturmedium gegeben. Nach Zentrifugation bei 400 x g und RT wurden die Zellen in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in einer 25 cm² Zellkulturflasche ausgesät.

3.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Das Zählen der Zellen wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Dazu wurden 25 µl Zellsuspension mit 75 µl H₂O verdünnt und mit 100 µl einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung versetzt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der poröse Zellmembranen durchdringt und somit tote Zellen blau anfärbt. Vitale Zellen bleiben dabei farblos. Für die Zählung wurden 10 µl der Lösung in die Zählkammer pipettiert und die vitalen Zellen

gezählt. Dabei entsprachen die gezählten Zellen der Zellzahl ($\times 10^4$) pro Milliliter unter Einberechnung des jeweiligen Verdünnungsfaktors.

3.2.2.4 *Bestimmung der Proliferationsrate*

Für die Durchführung eines Proliferationstests wurde das ViaLight Plus Cell Proliferation BioAssay Kit verwendet. Das Prinzip dieses Tests basiert auf der Detektion der Biolumineszenz, hervorgerufen durch die Hydrolysierung des ATPs, welches in allen metabolisch aktiven Zellen vorhanden ist. Hierbei katalysiert die Luciferase mit Hilfe von zweiwertigen Magnesiumionen und unter Sauerstoffverbrauch das Substrat Luciferin zu Oxyluciferin. ATP dient dabei als Kofaktor und wird zu Adenosinmonophosphat (AMP) hydrolysiert, wobei Kohlenstoffdioxid und Energie in Form von Licht freigesetzt wird. Dazu wurden 7×10^3 C/EBP β -long, C/EBP β -short und SF91 sowie 5×10^3 C/EBP β wt- und C/EBP β ko-Zellen in 96-Well-Platten ausgesät. In einem Intervall von 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und bei -80°C gelagert. Für die Messung der Proliferation wurden die Zellen aufgetaut und mit 50 μl ATP Monitoring Reagent Plus versetzt und die entstandene Lumineszenz am Luminometer gemessen.

3.2.2.5 *Herstellung stabiler Zelllinien*

Die Generierung der stabilen Zelllinien C/EBP β -long, C/EBP β -short und SF91 wurden in Kooperation mit der Abteilung Experimentelle Hämatologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter Anleitung von Dr. Johan Meyer durchgeführt. Für die Produktion retroviraler Überstände wurden die klonierten Konstrukte SF91 hCEBP β LAP*, SF91 hCEBP β LIP und der entsprechende Leervektor in die Verpackungszelllinie Phoenix-gp (293T Zelllinie mit stabil integriertem gagpol Plasmid) transient transfiziert (Li et al. 2003; Schambach et al. 2006). Die Höhe des viralen Titers wurde mittels Durchflusszytometrie infizierter humaner HT1080-Fibroblasten bestimmt und befand sich in einem Bereich von $1-8 \times 10^6$ IU/ml. Für die Transduktion wurden 2×10^5 THP-1-Zellen mehrmals mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 20 in Anwesenheit von 4 $\mu\text{g/ml}$ Protaminsulfat im Medium infiziert (Schambach et al. 2006). Die Effizienz der viralen Transduktion wurde über die eGFP-Expression der Zellen im Durchflusszytometer berechnet und erreichte einen Wert von 10%. Nach anschließender Zellsortierung über eGFP enthielt die Massenkultur mehr als 90% positive Zellen. Für den Erhalt von

Einzelzellkulturen wurden die Zellen in 96-*Well*-Platten mit einer Konzentration von 0,5 Zellen/*Well* in 100 µl Medium ausgesät und bis zu $0,75 \times 10^6$ Zellen/ml hochgezogen. Die C/EBPβ-Expression wurde anschließend mittels Western Blot und Durchflusszytometrie nach intrazellulärer Färbung überprüft.

3.2.2.6 *Plasmid-Transfektion mittels Elektroporation*

Die Transfektion der THP-1-Zellen wurde mit dem Amaxa *Cell Line* Nucleofector Kit V durchgeführt. Dazu wurden 1×10^6 Zellen bei 90 x g und RT für 10 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 100 µl Nucleofector-Lösung resuspendiert. Es wurden je 0,5 µg C/EBPβ-Überexpressionsplasmid und Luciferase-Reportergen-Plasmid sowie 0,1 µg pRL-TK als Indikatorplasmid dazu pipettiert. Die Zell-DNA-Lösung wurde dann blasenfrei in eine sterile Küvette überführt und mit dem Nucleofector-Programm V-001 elektroporiert. Die Zellen wurden sofort mit vorgewärmtem Zellkulturmedium versetzt, in 12-*Well*-Platten überführt und bei 37 °C bebrütet.

3.2.2.7 *Durchflusszytometrie*

Für eine intrazelluläre Zellfärbung wurde das Cytofix/Cytoperm Kit verwendet. Dafür wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen bei 400 x g, 4 °C abzentrifugiert, in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit 100 µl *Fix-Perm-Solution* versetzt. Der Ansatz wurde für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit *Perm-Wash-Solution* gewaschen und mit 0,5 µg Anti-C/EBPβ (H-7) in 50 µl *Perm-Wash-Solution* für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen der Zellen wurden diese mit je 0,5 µg Anti-Maus Ig APC und Maus IgG 2ak APC Isotyp-Kontrolle in 50 µl *Perm-Wash-Solution* für 30 Minuten bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal gewaschen und im Anschluss das Pellet in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Färbung wurde dann am Durchflusszytometer im APC-Kanal gemessen.

3.2.2.8 *Zellzyklus-Analyse*

Für die Untersuchung des Zellzykluses der C/EBPβ wt- und C/EBPβ ko-Zellen wurde das CycleTest Plus DNA Reagent Kit verwendet. Hierfür wurden abtrysinierte Zellen bei 400

x g, RT zentrifugiert, in 500 µl Pufferlösung aufgenommen und bei -80 °C eingefroren. Für die Zellfärbung mit Propidiumjodid wurden die Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, abzentrifugiert und das Pellet in 250 µl Lösung A resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation wurde der Ansatz mit 200 µl Lösung B versetzt, ebenfalls 10 Minuten inkubiert und mit 200 µl Lösung C versetzt. Nach 10-minütiger Einwirkzeit unter Lichtausschluss wurden die Zellen filtriert und am Durchflusszytometer im PE-Kanal gemessen.

3.2.2.9 *Bestimmung der Apoptose*

Für die Analyse der Apoptose der C/EBPβ-long-, C/EBPβ-short- und SF91-Zellen wurde das Annexin V-APC *Apoptosis Detection* Kit verwendet. Dieser Test beruht auf dem Prinzip der Detektion von Phosphatidylserin (PS). PS gehört zur Gruppe der Phospholipide und wird bei lebenden Zellen durch das Enzym Aminophospholipidtranslocase an die Innenseite der Zellmembran transportiert. Geht die Zelle in Apoptose wird PS auf der Oberfläche der Membran lokalisiert und kann durch Annexin V mit einer hohen spezifischen Affinität gebunden werden. Dafür wurden 7×10^4 Zellen in einer 12-Well-Platte ausgesät. Nach 72 und 96 Stunden wurden die Zellen mit PBS und *Binding*-Puffer gewaschen. Die in 100 µl *Binding*-Puffer resuspendierten Zellen wurden mit 5 µl Annexin V versetzt, 15 Minuten inkubiert und erneut gewaschen. Die gefärbten Zellen wurden am Durchflusszytometer im APC-Kanal gemessen.

Für eine Induktion der Apoptose wurden 1×10^6 Zellen im Bio-Link™ UV-Crosslinker mit 0,06 und 0,12 J/cm² bestrahlt, nach 16 Stunden mit Annexin V-APC gefärbt und im Anschluss im Durchflusszytometer analysiert.

3.2.3 *Proteinchemische Methoden*

3.2.3.1 *Isolierung von Proteinen*

Für die Generierung von Gesamtzellextrakten für eine SDS-PAGE wurden 1×10^6 Zellen bei 400 x g, RT für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 50 µl Lysepuffer resuspendiert und für 10 Sekunden sonifiziert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten auf Eis, wurden die lysierten Zellen bei 17000 x g, 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand für eine Proteinbestimmung weiterverwendet.

Um eine Degradierung empfindlicher Proteine zu vermeiden, wurde das Zellpellet direkt in 50 bis 100 µl heißem SDS-Ladepuffer resuspendiert, 5 Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend auf ein Tris-Glycin-Gel geladen oder bei -20 °C eingefroren.

Für die Herstellung eines Zellextraktes für die Analyse transkriptioneller Aktivität wurden 1×10^6 Zellen in 50 µl PLB (*Passive Lysis Buffer*) lysiert und 15 Minuten bei 4 °C geschüttelt. Der Zellextrakt wurde bei 17000 x g, 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand bei -80 °C eingefroren.

3.2.3.2 *Bestimmung der Proteinkonzentration*

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit der Bradford-Methode mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays in 96-Well-Platten (Bradford 1976). Für den Standard wurde eine Verdünnungsreihe aus einer Rinderserumalbumin-Lösung verwendet. Die Bestimmung der Proteinmenge wurde gemäß den Herstellerangaben in Dreifachbestimmung mittels ELx808 Absorptions-Reader durchgeführt.

3.2.3.3 *Reportergendetektion*

Die transkriptionelle Aktivität der hergestellten Reportergen-Konstrukte wurde mit Hilfe des Dual-Luciferase Reporter Assay System analysiert. Dafür wurden je 20 µl Gesamtzellextrakt in eine 96-Well-Platte gegeben und die Lumineszenz, entstanden durch die enzymatische Aktivität der Luciferasen, am Luminometer gemessen. Während im ersten Messschritt die *Firefly*-Luciferase durch die Zugabe von 100 µl LARII-Reagenz bestimmt wurde, erfolgte im zweiten Schritt die Analyse der Expression der *Renilla*-Luciferase durch das Beimengen von 100 µl Stop&Glo-Lösung zur Probe. Die relative Promotoraktivität wurde durch Bildung des Quotienten der beiden gemessenen Luciferasen (*Firefly*-Luciferase / *Renilla*-Luciferase) berechnet.

3.2.3.4 *SDS-PAGE und Western Blot*

Für die Durchführung einer SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) wurden Proben mit SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Abhängig von der molekularen Größe des zu untersuchenden Proteins wurden

die Proben auf 10 bis 16%ige Tris-Glycin-Gele aufgetragen und in einer Minigel-Kammer mit SDS-Laufpuffer bei 125 V aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mittels Tank-Blot-Verfahren mit 400 mA auf eine 0,45 µm Nitrocellulosemembran übertragen. Im folgenden Schritt wurden die auf der Membran gebundenen Proteine mit einer Ponceau-Lösung angefärbt und fixiert. Nach vollständiger Entfärbung der Membran wurden freie Bindungsstellen mit 5% BSA in TBS-T für eine Stunde bei RT abgesättigt. Im Anschluss wurde die Membran dreimal mit TBS gewaschen und mit dem Erstantikörper, verdünnt in 5% BSA in TBS-T, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dem Waschen der Membran mit TBS-T sowie TBS wurde diese mit dem Sekundärantikörper, verdünnt in TBS, für eine Stunde bei RT überprobt. Anschließend wurde erneut mit TBS gewaschen und die Proteine durch Inkubation mit SuperSignal West Femto-Substrat im MF-ChemiBIS-Bioimager detektiert.

3.2.3.5 Co-Immunpräzipitation

Um eine Interaktion von C/EBPβ mit Rb zu untersuchen wurden Co-Immunpräzipitationen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen durch Serumentzug synchronisiert und nach zweistündiger Serumzugabe Gesamtzellextrakte hergestellt. Für die Präzipitation wurden 100 µl Dynabeads Protein A verwendet. Diese wurden gemäß den Herstellerangaben vorbereitet. Im Anschluss wurden 20 µg Anti-C/EBPβ (C-19) Antikörper, verdünnt in 300 µl PBS für 6 Stunden bei 4 °C an die *beads* gekoppelt. Als Negativkontrolle wurde eine Präzipitation mit *beads* ohne Antikörperinkubation durchgeführt. Die *beads* wurden anschließend mit PBS gewaschen und mit 40 µg Gesamtzellextrakt in 300 µl PBS über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (zweimal mit PBS-T und einmal mit PBS) wurden die *beads* mit 20 µl heißem SDS-Puffer resuspendiert und für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20 °C eingefroren.

3.2.3.6 Chromatin-Immunpräzipitation

Für die Analyse der Bindung von C/EBPβ an die Promotoren mittels Chromatin-Immunpräzipitation (Nelson et al. 2006) wurden 1×10^7 Zellen durch Serumentzug für 90 Stunden synchronisiert und nach zweistündiger Serumzugabe geerntet. Dazu wurden die Zellen bei 365 x g für 10 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml kaltem PBS mit 10% FKS resuspendiert. Die Zellen wurden durch

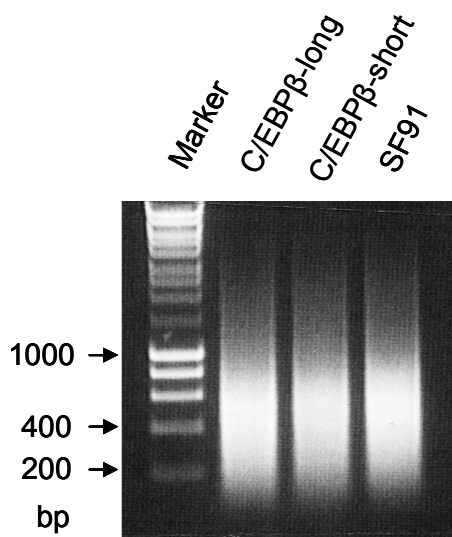


Abbildung 3.2: Gelbild des sonifizierten Chromatins

Chromatinfragmente in den Größen von 200 bis 1000 bp von C/EBP β -long, C/EBP β -short und SF91 nach Ultraschallbehandlung.

Zugabe von 270 μ l Formaldehyd (37%) für 10 Minuten bei RT fixiert. Die Reaktion wurde mit 500 μ l Stop-Lösung beendet. Nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS wurde das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren. Des Weiteren wurden 375 μ l Sepharose CL-4B *beads* mit PBS und Verdünnungspuffer gewaschen sowie mit 10 μ l 20%iger BSA-Lösung und 4 μ l Glykogen für 2 Stunden bei 4 °C geblockt. Die Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und mit 250 μ l L1A (90% Zellpuffer-Mix; 10% H₂O) und 250 μ l L1B (90% Zellpuffer-Mix; 10% NP-40) resuspendiert. Der Ansatz wurde mit 700 x g bei RT abzentrifugiert und die Zellkerne mit 400 μ l Kernlyse-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde fünfmal für 15 Sekunden bei 40% Leistung sonifiziert und anschließend abzentrifugiert. Als Input wurden 4 μ l des Überstands zurückgestellt. Um die Sonifizierung des Chromatins zu überprüfen wurden 30 μ l Lysat

mit Hilfe des QIAquick PCR *Purification* Kits gereinigt und die DNA mit einer Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, wobei die optimale Größe der Chromatinfragmente zwischen 200 und 1000 bp liegen sollte (Abb. 3.2). Das übrige Lysat wurde mit 600 μ l Verdünnungspuffer und 250 μ l geblockten *beads* für eine Vorreinigung für 2 Stunden bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Im Anschluss wurden die *beads* durch Zentrifugation abgetrennt und 200 μ l des Überstands mit je 2 μ g der Antikörper Histon H3, Normal IgG sowie 2 und 5 μ g des Antikörpers C/EBP β (C-19) über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden Protein A 4 *FastFlow beads* wie oben beschrieben geblockt, mit je 35 μ l der *beads* pro Antikörpergemisch versetzt und für 4 Stunden bei 4 °C rotiert. Im Folgenden wurden die *beads* mit je 400 μ l WBI, WBII, WBIII, TE pH 7,5 sowie TE pH 8 gewaschen und das Chromatin mit 200 μ l Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde anschließend mit dem QIAquick PCR *Purification* Kit aufgereinigt. Im darauf folgenden Schritt wurden die DNA-Fragmente mittels PCR und Primern, die die hypothetischen C/EBP β -Bindestellen umspannen auf eine Interaktion mit C/EBP β untersucht.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung stabiler C/EBP β -Zelllinien

Um den Einfluss von C/EBP β auf die Proliferation und Morphologie von prämonozytären Zellen zu untersuchen, wurden THP-1-Zellen generiert, die stabil C/EBP β -Isoformen überexprimieren. THP-1-Zellen repräsentieren ein etabliertes monozytäres Zellmodell, das sich durch einen niedrigen endogenen C/EBP β -Level auszeichnet. Durch virale Induktion wurden die Zellen jeweils mit den Konstrukten SF91 hCEBP β LAP*, SF91 hCEBP β LIP und dem leeren Vektor SF91.IRES.eGFP.PRE transfiziert, anschließend sortiert und nach stabil transduzierten Zellklonen selektiert. Zellen, die mit der vollständigen C/EBP β -Sequenz (LAP*) transduziert waren, wurden als C/EBP β -long bezeichnet. Die Zellen, die mit der verkürzten Sequenz (LIP) transduziert worden sind, wurden C/EBP β -short genannt. Die Identifikation der Überexpression von C/EBP β

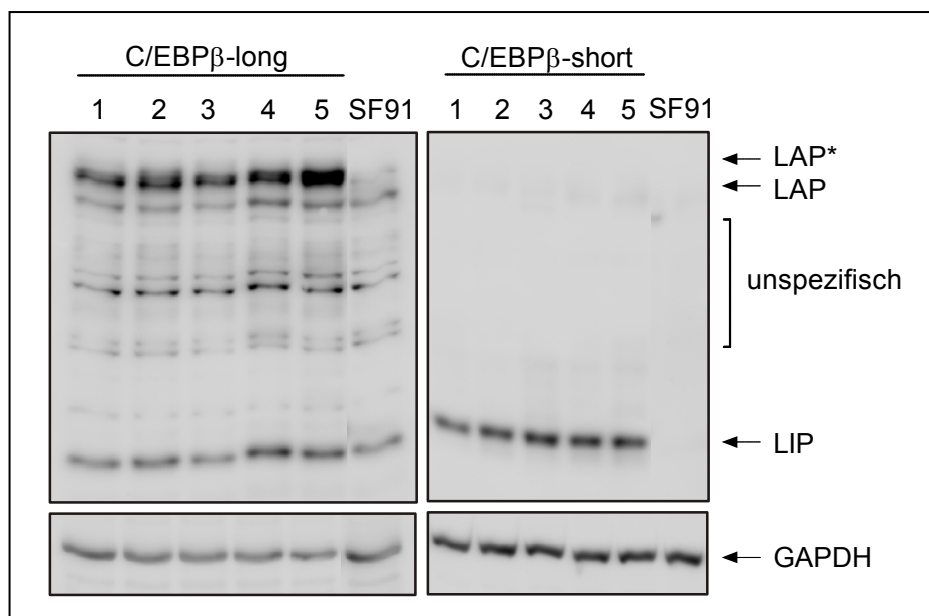


Abbildung 4.1: Identifizierung C/EBP β -positiver Zellklone mittels Western Blot

Bei den C/EBP β -long-Zellen zeigt Klon 5 die stärkste Überexpression von LAP* im Vergleich zu den SF91-Kontrollzellen. Bei den C/EBP β -short-Zellen zeigt Klon 3 die stärkste Überexpression von LIP. Als Ladungskontrolle wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet.

erfolgte durch die SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot sowie mittels Durchflusszytometrie. Der Western Blot zeigt die Proteinexpression der C/EBP β -Isoformen LAP*, LAP und LIP der verschiedenen Zellklone (Abb. 4.1). Klon 5 der C/EBP β -long-Zellen wies die stärkste Expression von LAP* auf, während Klon 3 der

C/EBP β -short-Zellen das deutlichste Signal von LIP zeigte. Zum Vergleich wurden die SF91-Zellen herangezogen. Anschließend wurden die im Western Blot ausgewählten Klone intrazellulär gegen C/EBP β gefärbt und der prozentuale Proteinlevel mittels Durchflusszytometrie gemessen. Der Anteil der überexprimierenden Zellen betrug bei C/EBP β -long 20,4% sowie 19,8% bei C/EBP β -short im Vergleich zu den Kontrollzellen SF91 (Abb. 4.2).

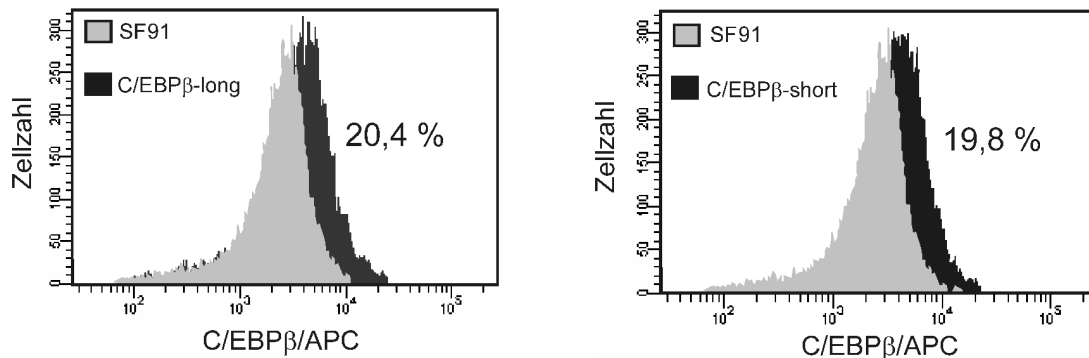


Abbildung 4.2: Identifizierung C/EBP β -positiver Zellklone mittels Durchflusszytometrie
Überprüfung der Überexpression von C/EBP β bei Klon 5 der C/EBP β -long-Zellen und bei Klon 3 der C/EBP β -short-Zellen

4.2 Der Einfluss von C/EBP β auf die Zellproliferation

Für die Untersuchung der Proliferation der stabilen C/EBP β -Zelllinien wurden verschiedene Methoden angewendet. Die erste Analyse beinhaltete die mikroskopische Auszählung der Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer und die darauf folgende Bestimmung der Zellen pro Milliliter. Dafür wurden die Zellen in einer 6-Well-Platte bis zu 96 Stunden kultiviert, in einem Zeitabstand von 24 Stunden gezählt und die Zellzahl berechnet. Die Proliferation der C/EBP β -long-Zellen nahm signifikant um durchschnittlich 47% nach 72 und 96 Stunden ab im Vergleich zu den SF91-Zellen. Im Gegensatz dazu zeigten die C/EBP β -short-Zellen keine Veränderung im Wachstumsverhalten (Abb. 4.3). Um den Proliferationsunterschied der C/EBP β -long-Zellen zu bestätigen, wurde im zweiten Teil der Untersuchung eine Messung des Gehalt an ATP in den Zellen durchgeführt. Für diesen Versuch wurden die Zellen in einer 96-Well-Platte ausgesät und dann in einem Intervall von 24 Stunden lysiert. Anschließend wurde die bei Substratzugabe entstehende Lumineszenz mit einem Luminometer gemessen. Das Licht verhält sich dabei linear proportional zum ATP-Gehalt und wird in *relative light units* (RLU)

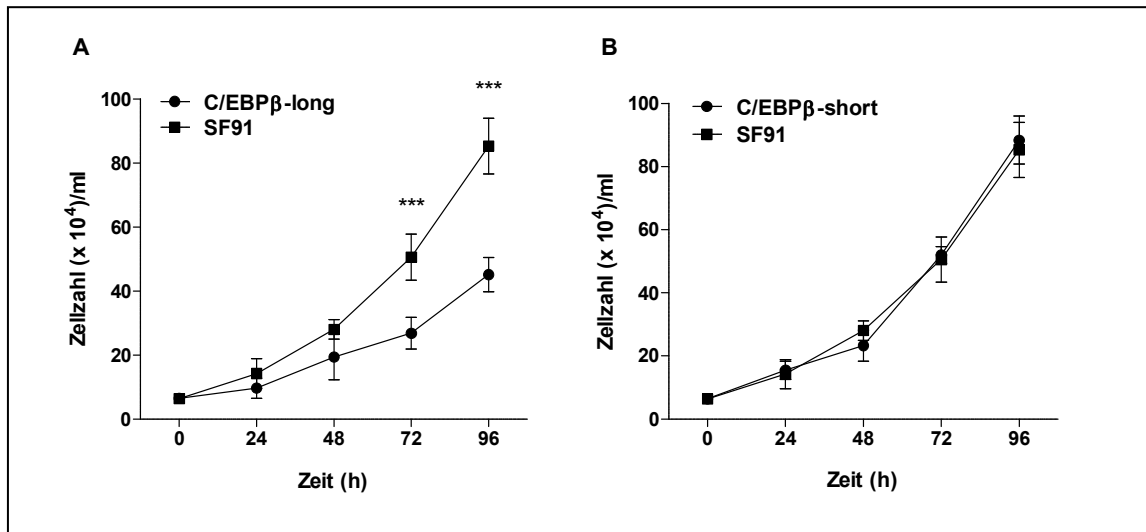


Abbildung 4.3: Bestimmung der Zellzahl von C/EBPβ-long, C/EBPβ-short und SF91
Dargestellt ist die durchschnittliche Zellzahl pro Milliliter von 0 bis 96 Stunden nach Aussaat von C/EBPβ-long (A), C/EBPβ-short (B) im Vergleich zu SF91-Kontrollzellen. Das Zellwachstum wurde durch Auszählung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. *** p<0,001

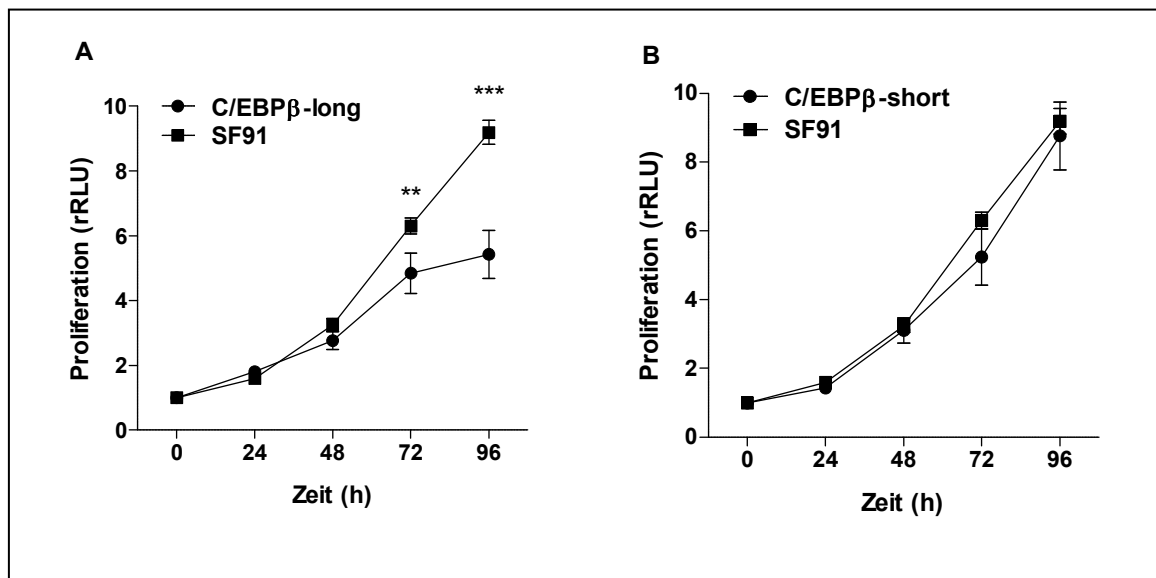


Abbildung 4.4: Analyse der Proliferation von C/EBPβ-long, C/EBPβ-short und SF91
Dargestellt sind die durchschnittliche relative RLU (rRLU) von 0 bis 96 Stunden nach Aussaat von C/EBPβ-long (A), C/EBPβ-short (B) im Vergleich zu SF91-Kontrollzellen. Die Zellproliferation wurde mittels ATP-Assay bestimmt. Der jeweilige RLU-Wert zum Zeitpunkt 0 wurde als 1 definiert. ** p<0,01, *** p<0,001

angegeben. Die Auswertung dieser Analyse ist in Abbildung 4.4 dargestellt. Das erste Diagramm (A) zeigt eine signifikante Inhibition des Zellwachstums der C/EBPβ-long-Zellen um 23% nach 72 Stunden sowie um 41% nach 96 Stunden der

Aussaat im Vergleich zu den Kontrollzellen SF91. Die Messung der ATP-Konzentration in C/EBP β -short (B) ergab im Vergleich zu SF91 keinen signifikanten Unterschied. Der direkte Vergleich des Proliferationsverhalten der beiden Zelllinien ergab eine Hemmung der Zellvermehrung der C/EBP β -long-Zellen um 33% (72 Stunden) bzw. 39% (96 Stunden) im Vergleich zu C/EBP β -short (Abb. 4.5).

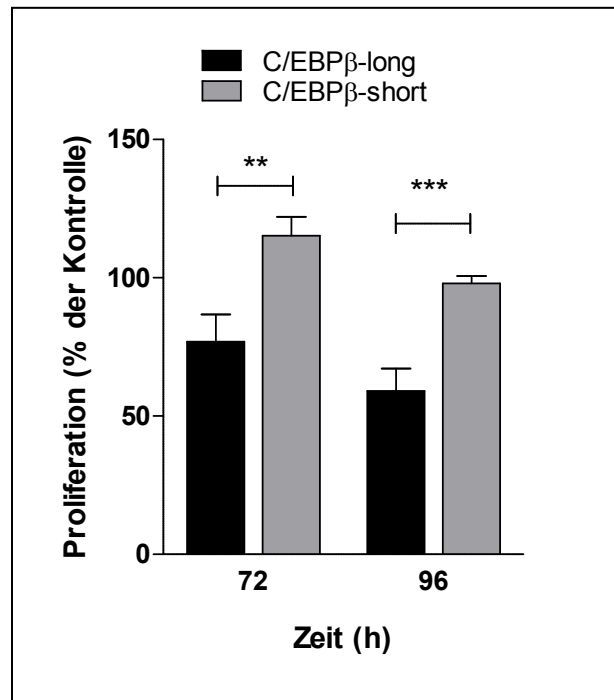


Abbildung 4.5: Bestimmung der Proliferation von C/EBP β -long- und C/EBP β -short-Zellen

Dargestellt sind die Prozentzahlen der RLU von C/EBP β -long und C/EBP β -short 72 und 96 Stunden nach Aussaat. Die absoluten Werte von SF91 wurden als 100% definiert und die Werte von C/EBP β -long und C/EBP β -short darauf bezogen. Die Proliferation wurde mittels ATP-Assay bestimmt. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

4.3 Untersuchung der apoptotischen Wirkung von C/EBP β

Im vorherigen Versuch wurde gezeigt, dass LAP* überexprimierende Zellen (C/EBP β -long) eine verminderte Proliferation aufwiesen. Um auszuschließen, dass diesem verlangsamten Wachstum eine erhöhte Apoptoserate der Zellen zu Grunde liegt, wurde ein Apoptosetest mittels Annexin V-Markierung durchgeführt. Für diesen Versuch wurden die Zellen C/EBP β -long, C/EBP β -short und SF91 bis zu 96 Stunden in einer 12-Well-Platte kultiviert. 72 und 96 Stunden nach Aussaat wurde eine Annexin V-Färbung durchgeführt und die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Die Untersuchung ergab keine signifikante Differenz in der Anzahl apoptotischer Zellen zwischen den drei Zelllinien. Es lässt sich überdies eine leichte, jedoch nicht signifikante Abnahme an toten

Zellen bei C/EBP β -long und C/EBP β -short verglichen mit SF91 erkennen. Insgesamt gab es nach 96 Stunden 6,6% apoptotische Zellen bei C/EBP β -long, 4,9% bei C/EBP β -short sowie 7,2% bei SF91 in der jeweiligen Zellkultur (Abb. 4.6).

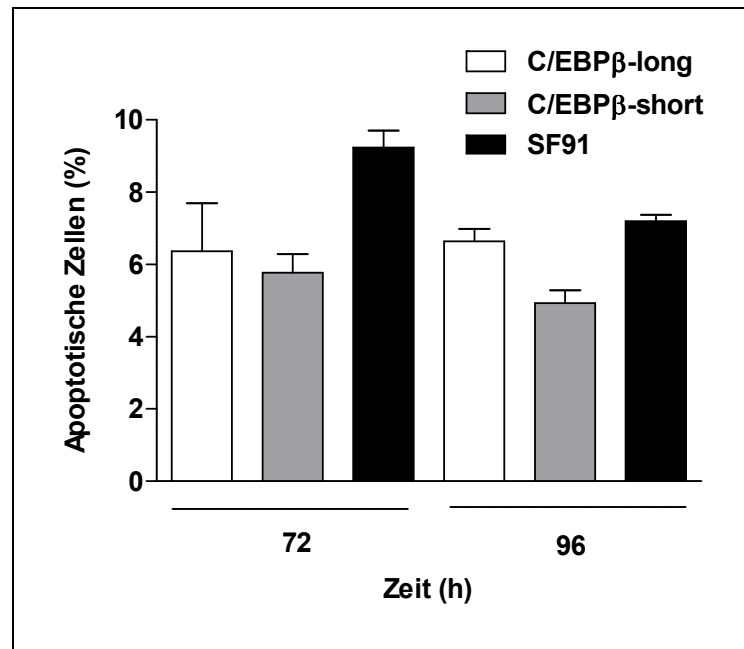


Abbildung 4.6: Untersuchung der Apoptose der C/EBP β -long-, C/EBP β -short- und SF91-Zellen

Dargestellt ist der Anteil apoptotischer Zellen in Prozent 72 und 96 Stunden nach Aussaat. Die Apoptoserate wurde mittels Annexin V-Färbung und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt.

Um einen möglichen anti-apoptotischen Effekt von C/EBP β genauer zu untersuchen wurde in einem weiteren Ansatz bei den Zellen Apoptose durch UV-Strahlung mit unterschiedlichen Dosen induziert und eine Annexin V-Färbung durchgeführt. Bei Nichtbestrahlung der Zellen existierte kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Zelllinien im Vorkommen apoptotischer Zellen, wobei es im Durchschnitt 8,3% tote Zellen gab. Nach einer Bestrahlung mit 0,06 J/cm² konnte eine Differenz bei der Anzahl apoptotischer Zellen festgestellt werden. C/EBP β -long Zellpopulationen hatten durchschnittlich 7,4% und C/EBP β -short 8,7% weniger apoptotische Zellen als SF91. Bei einer UV-Intensität von 0,12 J/cm² lag die Differenz bei 11,8% (C/EBP β -long) bzw. 25,7% (C/EBP β -short) gegenüber SF91. Hierbei stieg die Zahl toter Zellen bei C/EBP β -long auf 63,8%, bei C/EBP β -short auf 49,9% sowie auf 75,6% bei SF91 (Abb. 4.7). Diese Unterschiede waren statistisch signifikant.

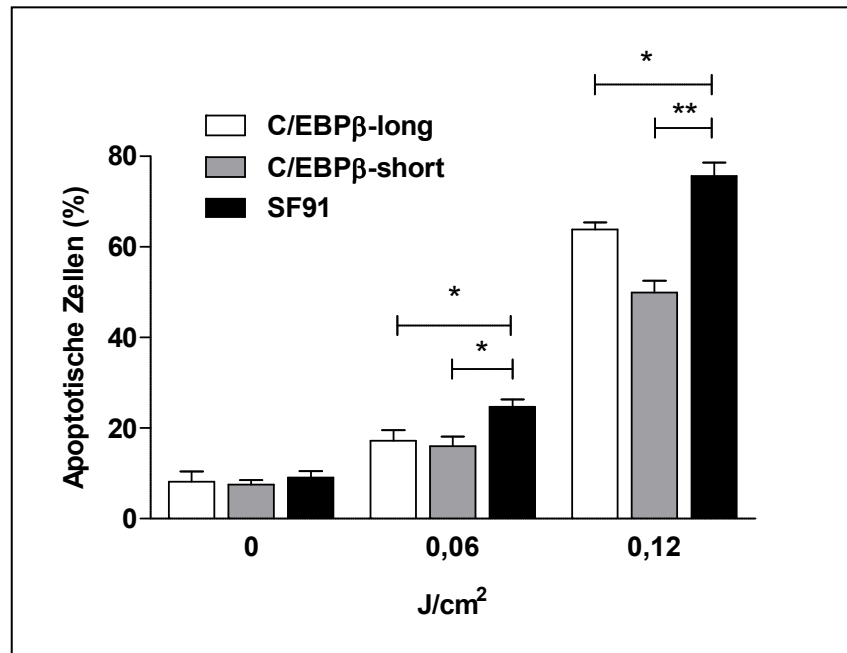


Abbildung 4.7: Analyse der Apoptose bei C/EBPβ-long-, C/EBPβ-short- und SF91-Zellen

Dargestellt ist der Anteil apoptotischer Zellen in Prozent nach 0; 0,06 und 0,12 J/cm² UV-Strahlung. Die Apoptose wurde mittels Annexin V-Färbung und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. * p<0,05, ** p<0,01

4.4 Molekulare Analysen zur Proliferationsinhibition

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten die Ursachen und molekularen Mechanismen untersucht werden, die zur Proliferationshemmung bei den C/EBPβ-long-Zellen führten. Des Weiteren sollte die Funktion von C/EBPβ in der Regulation von Zellwachstum und Zellteilung aufgeklärt werden. C/EBPβ interagiert mit Rb, welches in seiner hypophosphorylierten Form als ein zentraler Repressor des Zellzyklus und der Proliferation fungiert (Charles et al. 2001). Um einen Einfluss von C/EBPβ auf die Phosphorylierung von Rb zu untersuchen, wurden Western Blot-Analysen für die Detektion von phosphoryliertem und Gesamt-Rb durchgeführt. Da ein unterschiedlicher Proteingehalt aufgrund des individuellen Zustands einer Zelle innerhalb des Zellzyklus ausgeschlossen werden muss, war eine vorherige Synchronisation der Zellen notwendig. Dafür wurden C/EBPβ-long, C/EBPβ-short und SF91 für 90 Stunden in Medium ohne FKS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium mit 9% FKS überführt und zu den angegebenen Zeiten lysiert. Der in diesem Versuch verwendete Rb-Antikörper detektierte das gesamte endogene Level von Rb, während der pRb-Antikörper nur gegen an der jeweiligen Aminosäure phosphoryliertes Rb gerichtet war. Die Expression von Rb in

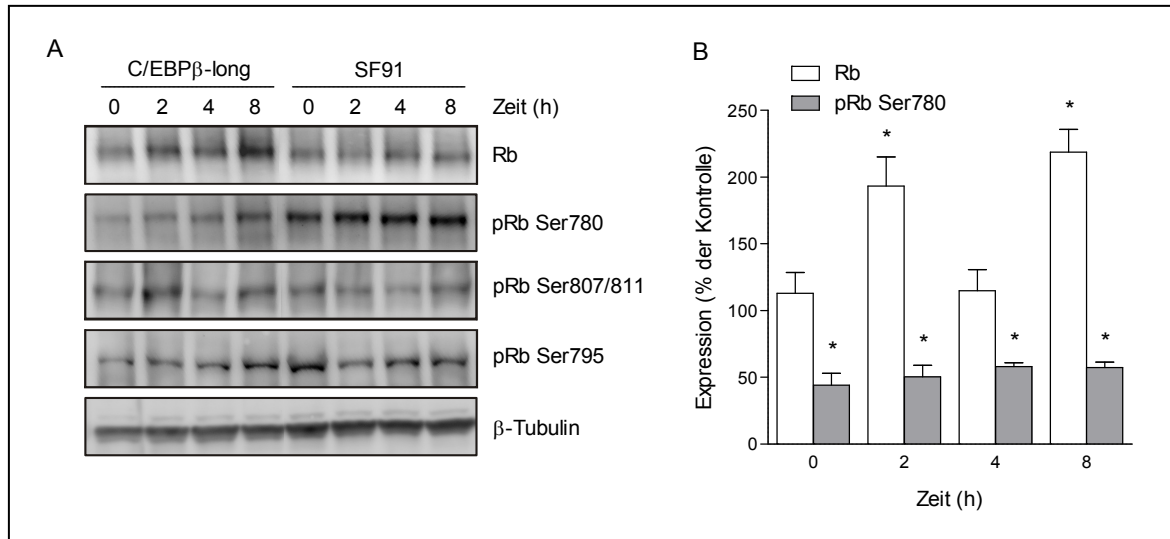


Abbildung 4.8: Analyse der Expression von Rb, pRb Ser780, pRb Ser807/811 und pRb Ser795

(A) Western Blots nach 90-stündiger Synchronisation von C/EBPβ-long und SF91 durch Serumentzug und anschließender Zugabe von Serum für 0 bis 8 Stunden (Ladungskontrolle: β-Tubulin). (B) Densitometrische Auswertung der Western Blots von Rb und pRb Ser780. Die absoluten Werte von SF91 wurden als 100% definiert und die Werte von C/EBPβ-long darauf bezogen. * $p < 0,05$

C/EBPβ-long ist deutlich höher als in SF91, wobei das Maximum des Signals bei acht Stunden lag (Abb. 4.8 A). Im Gegensatz dazu war der Proteinlevel der phosphorylierten Form pRb Ser780 erkennbar geringer als in den Kontrollzellen. Gleichzeitig existierte kein Unterschied bei pRb Ser795 und pRb Ser807/811 in den C/EBPβ-long-Zellen. Die densitometrische Auswertung der Western Blots von Rb und pRb Ser780 erfolgte mit dem Programm TotalLab von der Firma Nonlinear Dynamics mit anschließender Normalisierung durch die Ladungskontrolle (Abb. 4.8 B). In dieser Abbildung wurden die absoluten Werte der SF91 Zellen auf 100% gesetzt und die Werte von C/EBPβ-long dazu in Bezug gesetzt. Die Expression von Rb war in den C/EBPβ-long-Zellen um bis zu 118% (8h) stärker als bei den Kontrollzellen SF91. Gleichzeitig war der Gehalt von pRb Ser780 um bis zu 56% (0h) geringer verglichen mit SF91. Bei den C/EBPβ-short-Zellen war der Proteingehalt von Rb und pRb Ser780 im Western Blot stärker hochreguliert als bei SF91 (Abb. 4.9 A). Die quantitative Auswertung der Western Blots macht aber deutlich, dass der Gesamtlevel von Rb nur bis zu 41% über der Kontrolle lag, während die phosphorylierte Form bis zu 177% erhöht in C/EBPβ-short vorlag (Abb. 4.9 B).

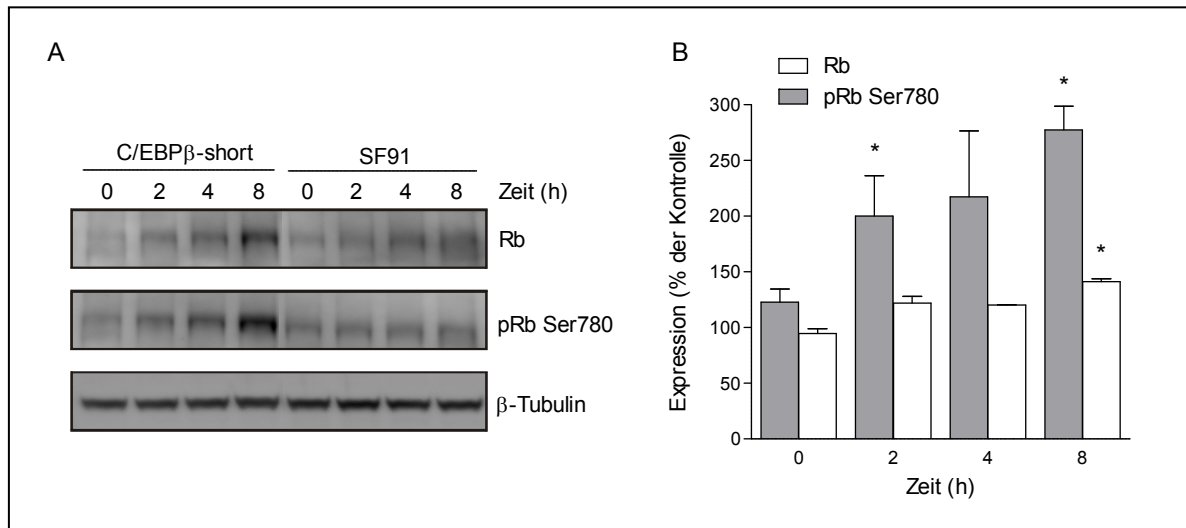


Abbildung 4.9: Analyse der Expression von Rb und pRb Ser780

(A) Western Blots nach 90-stündiger Synchronisation von C/EBPβ-short und SF91 durch Serumentzug und anschließender Zugabe von Serum für 0 bis 8 Stunden (Ladungskontrolle: β-Tubulin). (B) Densitometrische Auswertung der Western Blots von Rb und pRb Ser780. Die absoluten Werte von SF91 wurden als 100% definiert und die Werte von C/EBPβ-short darauf bezogen. * $p < 0,05$

4.5 Molekulare Analysen der G1- und S-Phasen-Proteine

Die Progression durch den Zellzyklus wird unter anderem durch die Bildung von Cyclinen und Cyclin-abhängige Kinasen bestimmt. Die Aktivierung von Cyclin D erfolgt durch extrazelluläre Signale wie Wachstumsfaktoren und führt durch die Phosphorylierung von Rb zur Initiation der Transkription durch E2F. Zielgene von E2F sind u.a. die Cycline E und A sowie PCNA und c-Myc. Die Blockierung der Zellzyklusprogression wird durch verschiedene Inhibitoren wie p15, p16 oder p27 erzielt (siehe Einleitung 2.3). Da im vorherigen Versuch eine Veränderung der Expression und Phosphorylierung von Rb durch C/EBPβ gezeigt wurde, sollte im nächsten Schritt eine Auswirkung auf die Proteine der G1- und S-Phase untersucht werden. Daher wurden C/EBPβ-long, C/EBPβ-short und SF91 für 90 Stunden synchronisiert, zu den angegebenen Zeiten lysiert und die Proteinexpression der Proteine Cyclin D1, E und A sowie für E2F1 mit Hilfe von Western Blot-Analysen überprüft (Abb. 4.10 A). Diese zeigen eine Herunterregulierung der Expression von Cyclin D1, E und E2F1 bei den C/EBPβ-long-Zellen. Bei Cyclin A hingegen konnte kein Expressionsunterschied zwischen C/EBPβ-long und SF91 nachgewiesen werden. Die densitometrischen Auswertungen bestätigen dieses Ergebnis (Abb. 4.10 B). Der Gehalt von Cyclin D1 in C/EBPβ-long-Zellen war bis zu 70% und der von Cyclin E bis zu 55% niedriger als in SF91. Weiterhin war die Konzentration von E2F1

um bis zu 50% herunterreguliert. Im nächsten Schritt wurde die Expression der Zellzyklusinhibitoren p27, p15 und p16 sowie des Transkriptionsfaktors c-Myc und PCNA

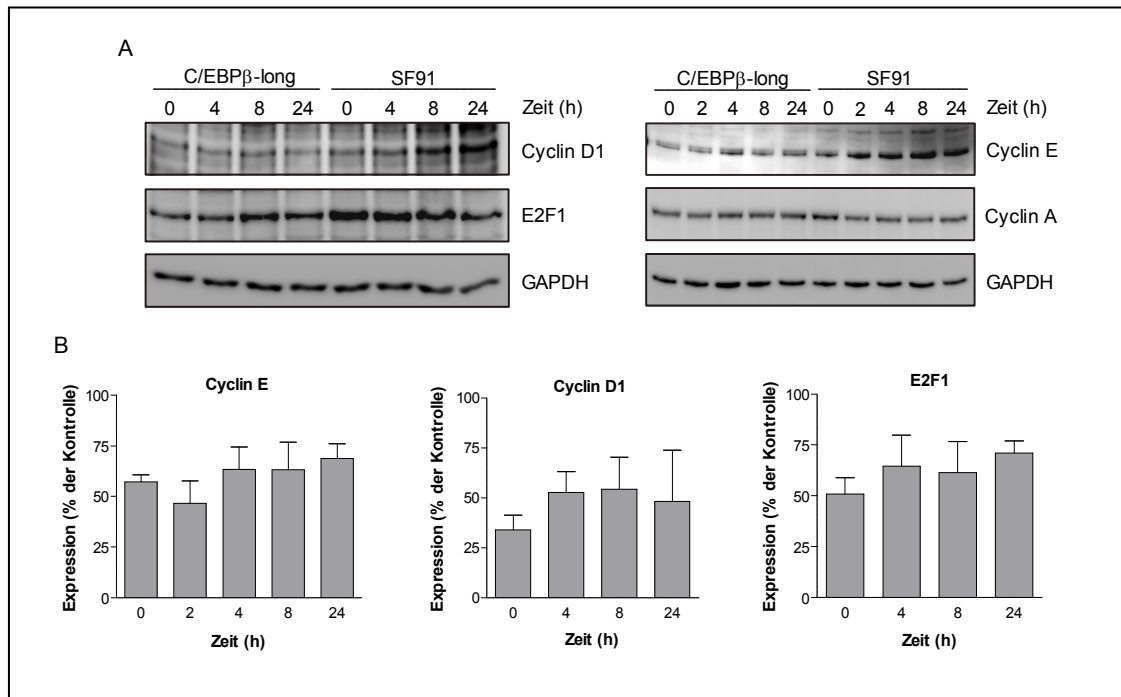


Abbildung 4.10: Analyse der Zellzyklusproteine Cyclin D1, Cyclin E, Cyclin A und E2F1

(A) Western Blots nach 90-stündigem Serumentzug bei C/EBPβ-long und SF91 sowie anschließender Zugabe von Serum von 0 bis 24 Stunden (Ladungskontrolle: GAPDH). (B) Densitometrische Auswertung der Western Blots von Cyclin D1, Cyclin E und E2F1 in C/EBPβ-long-Zellen. Die absoluten Werte von SF91 wurden als 100% definiert.

untersucht. Das Protein p27 war, verglichen mit SF91, in den C/EBPβ-long-Zellen stark hochreguliert, während die Western Blots von p15 sowie p16 keinen Expressionsunterschied aufwiesen (Abb. 4.11 A). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass c-Myc, das sowohl p27 inhibiert als auch Cyclin D aktiviert, in den C/EBPβ-long-Zellen stärker exprimiert war als in SF91. Das Protein PCNA hingegen zeigte keine Differenz im Proteingehalt. Die quantitative Analyse der Western Blots zeigt eine Abnahme von c-Myc um bis zu 70% sowie eine Zunahme von p27 um bis zu 100% bei C/EBPβ-long (Abb. 4.11 B).

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte untersucht werden, ob in den C/EBPβ-short-Zellen ebenfalls eine Expressionsveränderung der G₁- und S-Phase-Proteine vorliegt. Bei den dazu angefertigten Western Blots hat sich gezeigt, dass keine Expressionsunterschiede bei den Cyclinen D1, E und A sowie bei E2F1, p27 und c-Myc zwischen den Zelllinien C/EBPβ-short und SF91 existierten (Abb. 4.12).

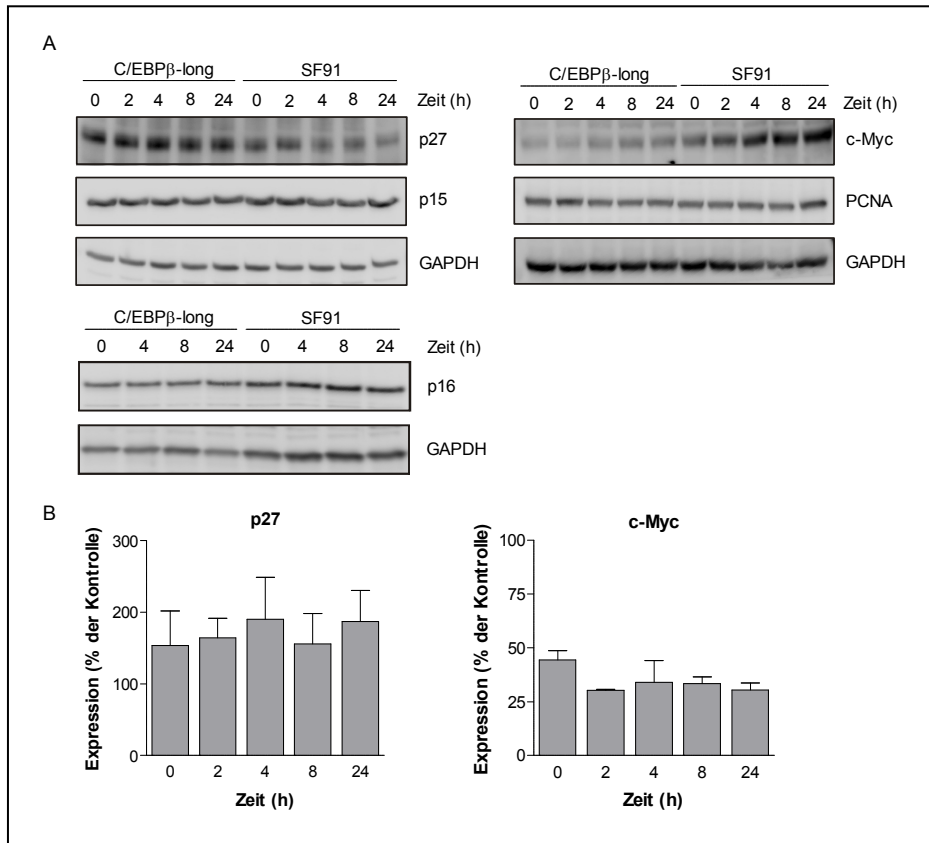


Abbildung 4.11: Untersuchung der Zellzyklusproteine p27, p15, p16, c-Myc und PCNA

(A) Western Blots nach 90-stündigem Serumentzug bei C/EBP β -long- und SF91-Zellen sowie anschließender Serumzugabe von 0 bis 24 Stunden (Ladungskontrolle: GAPDH). (B) Densitometrische Auswertung der Western Blots von p27 und c-Myc. Die absoluten Werte von SF91 wurden als 100% definiert.

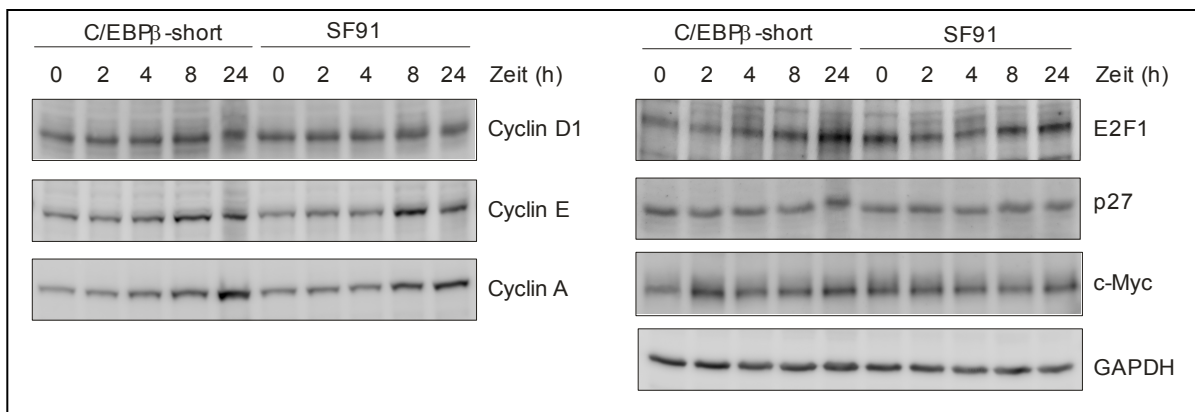


Abbildung 4.12: Untersuchung der Zellzyklusproteine Cyclin D1, Cyclin E, Cyclin A, E2F1, p27 und c-Myc

Western Blots nach 90-stündigem Serumentzug bei C/EBP β -short- und SF91-Zellen sowie anschließender Serumzugabe von 0 bis 24 Stunden (Ladungskontrolle: GAPDH).

4.6

Untersuchung der Interaktion von C/EBP β und Rb

In den vorherigen Experimenten wurde gezeigt, dass eine Überexpression von C/EBP β zu einer erhöhten Proteinkonzentration von Rb in THP-1-Zellen führt. Es wurde vermutet, dass dies zu einer verstärkten Interaktion von C/EBP β und Rb führt. Um zu analysieren ob eine direkte Protein-Protein-Bindung von C/EBP β und Rb in diesem Zelltyp existiert, wurde im nächsten Schritt eine Immunpräzipitation durchgeführt. Um gleiche Ausgangsbedingungen wie in Kapitel 4.1.4 zu schaffen, wurden die C/EBP β -long-, C/EBP β -short- und SF91-Zellen für 90 Stunden ohne FKS synchronisiert, anschließend für 2 Stunden in Medium mit FKS inkubiert und die Proteine aus den Zellen extrahiert. Die nachfolgende Immunpräzipitation wurde mit einem C/EBP β -spezifischen Antikörper durchgeführt und der anschließende Western Blot mit einem Rb-Antikörper überprüft. Der Western Blot zeigt eine deutliche Bindung von C/EBP β an Rb in allen drei Zelllinien. Als Negativkontrolle diente eine Präzipitation ohne C/EBP β -Antikörper (Abb. 4.13).

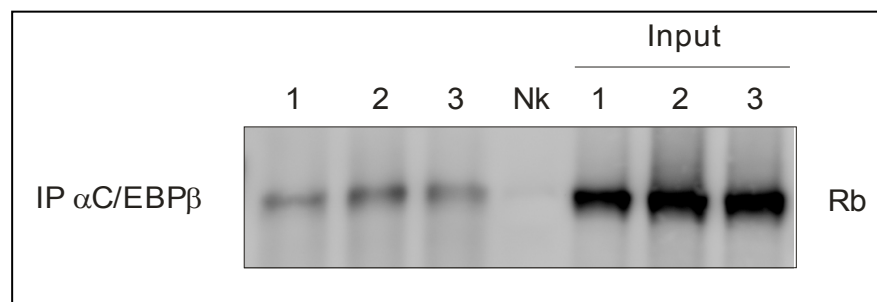


Abbildung 4.13: Analyse der Interaktion von C/EBP β und Rb

Immunpräzipitation von C/EBP β und anschließender Western Blot gegen Rb. Dargestellt ist die Interaktion von C/EBP β mit Rb in den Zelllinien C/EBP β -long (1), C/EBP β -short (2) und SF91 (3). Für die Negativkontrolle (NK) wurde eine Präzipitation ohne C/EBP β -Antikörper durchgeführt.

4.7

Auswirkung von C/EBP β auf die Stabilität von Rb

Da im vorangegangenen Versuch eine Bindung von C/EBP β an Rb festgestellt wurde, sollte im weiteren Verlauf der Arbeit ein Einfluss von C/EBP β auf die Stabilität von Rb untersucht werden. Dafür wurde der klassische Translationshemmer CHX zum Blockieren der Proteinbiosynthese an den Ribosomen eingesetzt. Dazu wurden C/EBP β -long, C/EBP β -short und SF91 für 90 Stunden synchronisiert, anschließend in Medium mit FKS ausgesät und mit 10 μ g/ml CHX behandelt. Nach 0, 1, 2, und 4 Stunden wurden die Zellen geerntet, die Proteine extrahiert und diese dann anschließend im

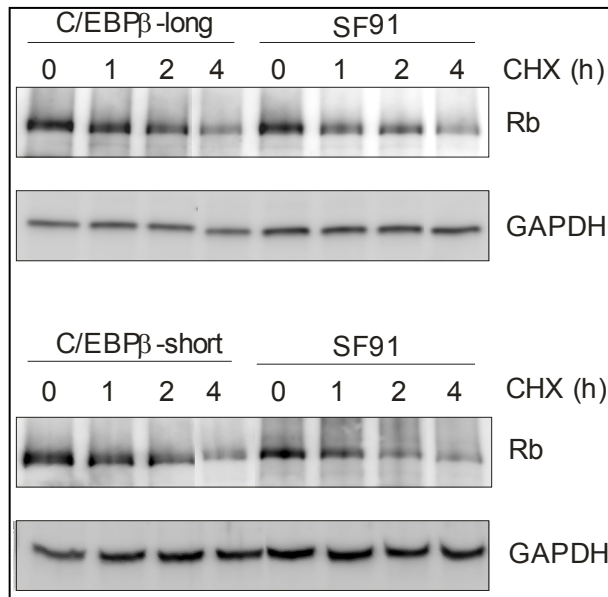


Abbildung 4.14: Untersuchung der Stabilität von Retinoblastoma

Western Blots nach 0 bis 4-stündiger Stimulation von C/EBPβ-long, C/EBPβ-short und SF91 mit CHX (Ladungskontrolle: GAPDH).

Western Blot detektiert (Abb. 4.14). Nach densitometrischer Auswertung der Western Blots konnte gezeigt werden, dass die Proteinkonzentration von Rb nach vierstündiger Zugabe von CHX um 50% reduziert war (Daten nicht dargestellt). Weiterhin war die Abnahme des Proteinlevels von Rb in allen drei Zelllinien konstant.

4.8 Analyse der Zellmorphologie

Um den Effekt von C/EBPβ auf die Morphologie von THP-1-Zellen zu untersuchen, wurden verschiedene Analysen durchgeführt. Es ist bekannt, dass C/EBPβ die Fähigkeit besitzt die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen zu beeinflussen (siehe Einleitung 2.4). Im folgenden Schritt sollte analysiert werden wie das Erscheinungsbild von THP-1-Zellen durch eine stabile Überexpression von C/EBPβ beeinflusst wird. Dazu wurden die C/EBPβ-long-, C/EBPβ-short- und SF91-Zellen 72 Stunden lang kultiviert und anschließend mikroskopiert. Abbildung 4.15 zeigt repräsentativ den morphologischen Phänotyp dieser Zellen. Die Zellen aller drei Zelllinien waren anfänglich rund, befanden sich in Suspension und existierten überwiegend einzeln mit gelegentlicher Clusterbildung. C/EBPβ-long und C/EBPβ-short zeigten in Bezug auf Form, Größe oder Struktur im Vergleich zu SF91 keine Unterschiede. Demnach scheint C/EBPβ keine Wirkung auf die Morphologie von unbehandelten THP-1-Zellen zu haben. Im zweiten Teil der Analyse wurden die Zellen 72 Stunden mit 100 nM PMA behandelt und anschließend mikroskopisch untersucht. PMA hat das Potenzial in prämonozytären Zellen, wie THP-1

Differenzierung zu initiieren (Daigneault et al. 2010; Park et al. 2007). Gleichzeitig vermag das Verabreichen von PMA den endogenen Proteinlevel von C/EBP β in monozytären

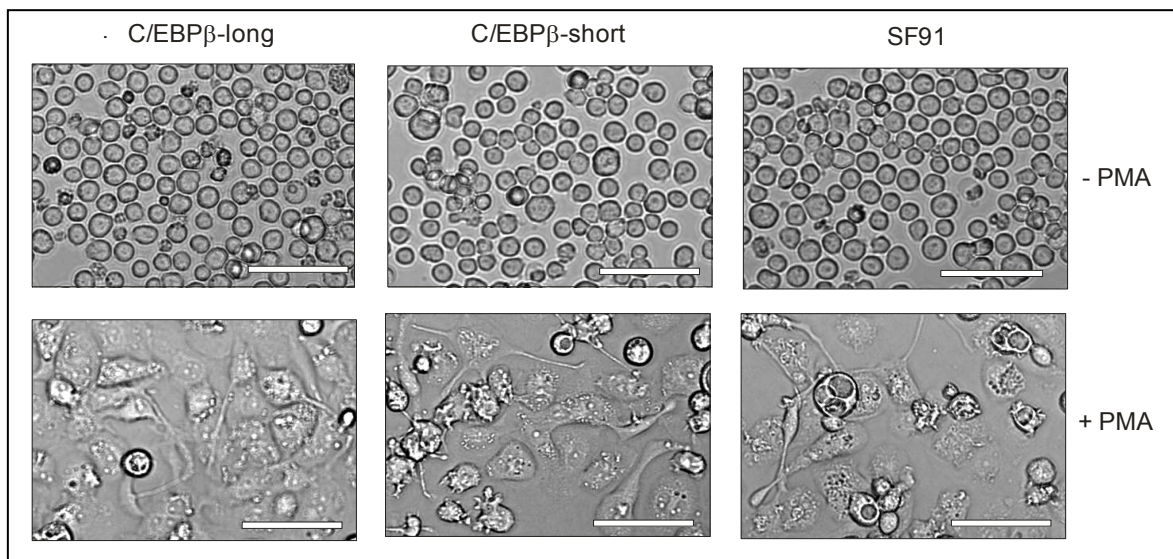


Abbildung 4.15: Untersuchung der Morphologie von C/EBP β -long-, C/EBP β -short- und SF91-Zellen

Die Zellen wurden 72 Stunden ohne (-) und mit (+) 100 nM PMA kultiviert und mikroskopiert. Maßstab: 50 μ m

Zellen zu erhöhen (Goethe et al. 2007). In dem Versuch hatten sich die Zellen durch PMA von runden, in Suspension befindlichen Zellen zu adhären, abgeflachten und spindelförmigen bzw. polygonalen Zellen mit langen cytoplasmatischen Ausläufern modifiziert (Abb. 4.15). Weiterhin waren die Zellen auch sehr vergrößert und entwickelten verstärkt granuläre Strukturen. Wie im vorherigen Experiment ohne Stimulation gab es keinen Unterschied bei der Morphologie zwischen C/EBP β -long, C/EBP β -short und SF91 nach PMA-Behandlung.

4.9 Analyse der Proliferation in differenzierten, prämonozytären Zellen

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte die Proliferation von PMA-differenzierten, prämonozytären Zellen untersucht werden. Wie bereits erwähnt, besitzt PMA die Fähigkeit bei verschiedenen Zelllinien Differenzierung hervorzurufen und gleichzeitig die Proliferation zu hemmen (Gutsch et al. 2011; Jasek et al. 2008; Afrasiabi et al. 2008). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, welchen Einfluss C/EBP β auf die Proliferation bei der PMA-induzierten Differenzierung von prämonozytären Zellen hat. Dazu wurden

C/EBP β -long, C/EBP β -short und SF91 bis zu 72 Stunden mit 50 nM PMA behandelt und die Proliferation in einem Intervall von 24 Stunden mittels ATP-Test untersucht (Abb. 4.16). In diesem Versuch wurde das Wachstum der Zellen durch die PMA-Behandlung stark gehemmt (Vergleich zu Abb. 3.4). Interessanterweise proliferierten die C/EBP β -short-Zellen trotz der PMA-Stimulation signifikant bis zu 40% stärker als die SF91-Zellen. Im Gegensatz dazu bestand kein Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen C/EBP β -long und SF91.

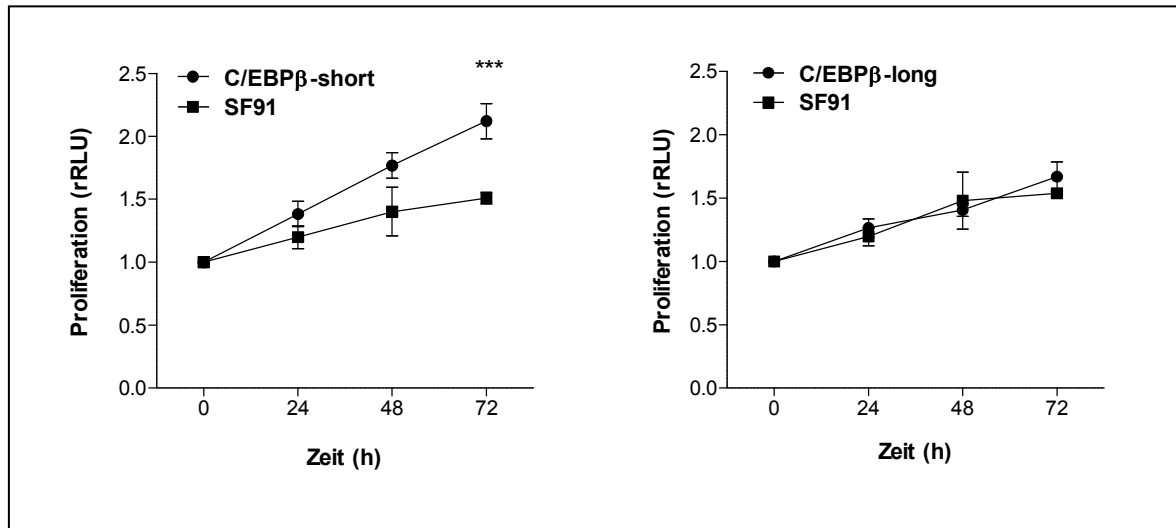


Abbildung 4.16: Bestimmung der Proliferation von differenzierten C/EBP β -long-, C/EBP β -short- und SF91-Zellen

Dargestellt ist die durchschnittliche relative RLU (rRLU) von 0 bis 72 Stunden nach PMA Stimulation (50 nM). Die Zellproliferation wurde mittels ATP-Assay bestimmt. Der jeweilige RLU-Wert zum Zeitpunkt 0 wurde als 1 definiert. *** $p < 0,001$

4.10 Zellzyklusanalysen in differenzierten, prämonozytären Zellen

Im nächsten Schritt sollten die Ursachen und molekularen Mechanismen untersucht werden, die zu einer deutlichen Proliferation der C/EBP β -short-Zellen trotz der PMA-Stimulierung führten. Dazu wurden C/EBP β -short- und SF91-Zellen in einer 6-Well-Platte kultiviert und bis zu 72 Stunden mit 50 nM PMA stimuliert. In einem Zeitabstand von 24 Stunden wurden Gesamtzellextrakte präpariert und mittels SDS-PAGE und anschließend Western Blot analysiert. Abbildung 4.17 A zeigt die Detektion der Proteine Cyclin E, D1 und A sowie von E2F1, Rb und pRb Ser780. Es ist in beiden Zelllinien eine deutliche Hochregulierung der Expression von Cyclin D1, E, und A sowie von E2F1 nach 72 Stunden zu erkennen. Dabei war allerdings ein stärkerer Anstieg dieser Proteine stärker in C/EBP β -short zu beobachten. Das spiegelte sich auch in den

densitometrischen Auswertungen wieder (Abb. 4.17 B). Cyclin E und Cyclin D1 waren in den C/EBP β -short-Zellen bis zu 70% höher exprimiert, während E2F1 bis zu 87% erhöht war. Die Western Blots für p27 und p15 zeigen einen moderaten Anstieg von p27 über eine Zeitspanne von 72 Stunden in beiden Zelllinien (Abb. 4.17). Gleichzeitig war eine Abnahme von p15 zu erkennen. Dennoch war die Expression beider Proteine bei C/EBP β -short deutlich geringer als in den Kontrollzellen. In dem Versuch ist außerdem ersichtlich, dass die Proteinkonzentration von Rb sowie pRb Ser780 nach 24 Stunden PMA-Behandlung stark verringert war. Zu bemerken ist, dass der Proteinlevel von Rb in C/EBP β -short bei 0 Stunden im Vergleich zu SF91 deutlich geringer war, während pRb Ser780 erheblich stärker vorhanden war.

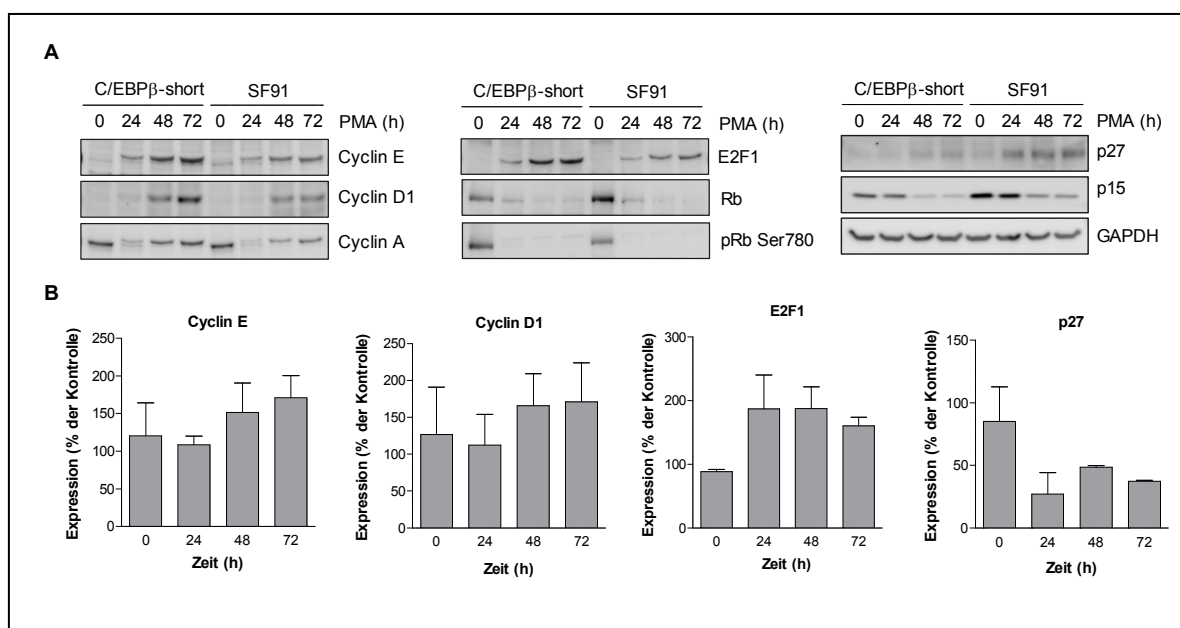


Abbildung 4.17: Untersuchung der Zellzyklusproteine Cyclin E, D1, A sowie E2F1, Rb, pRb Ser780, p27 und p15

(A) Western Blots der Zellen C/EBP β -short und SF91 nach Stimulation mit 50 nM PMA von 0 bis 72 Stunden (Ladungskontrolle: GAPDH). (B) Densitometrische Auswertung der Western Blots von Cyclin E, Cyclin D1, E2F1 und p27 in C/EBP β -short-Zellen. Dafür wurden die absoluten Werte von SF91 als 100% definiert.

4.11 Analyse der Promotoraktivität in Abhängigkeit von C/EBP β

Um einen Einfluss von C/EBP β auf die Transkription verschiedener Gene zu identifizieren, wurden mehrere Analysen durchgeführt. Dazu wurden Promotorkonstrukte der Gene Cyclin E1, Cyclin A2 und IL-6 hergestellt sowie das Konstrukt 5xC/E β -CS mit der fünffachen C/EBP β Consensus Sequenz generiert (Osada et al. 1996). Diese wurden zusammen mit C/EBP β Überexpressionskonstrukten oder dem Leervektor pTracer

transient in THP-1-Zellen transfiziert. Anschließend wurde die Transaktivierung der Promotoren indirekt über eine Aktivitätsmessung des Luciferase-Reportergens gemessen.

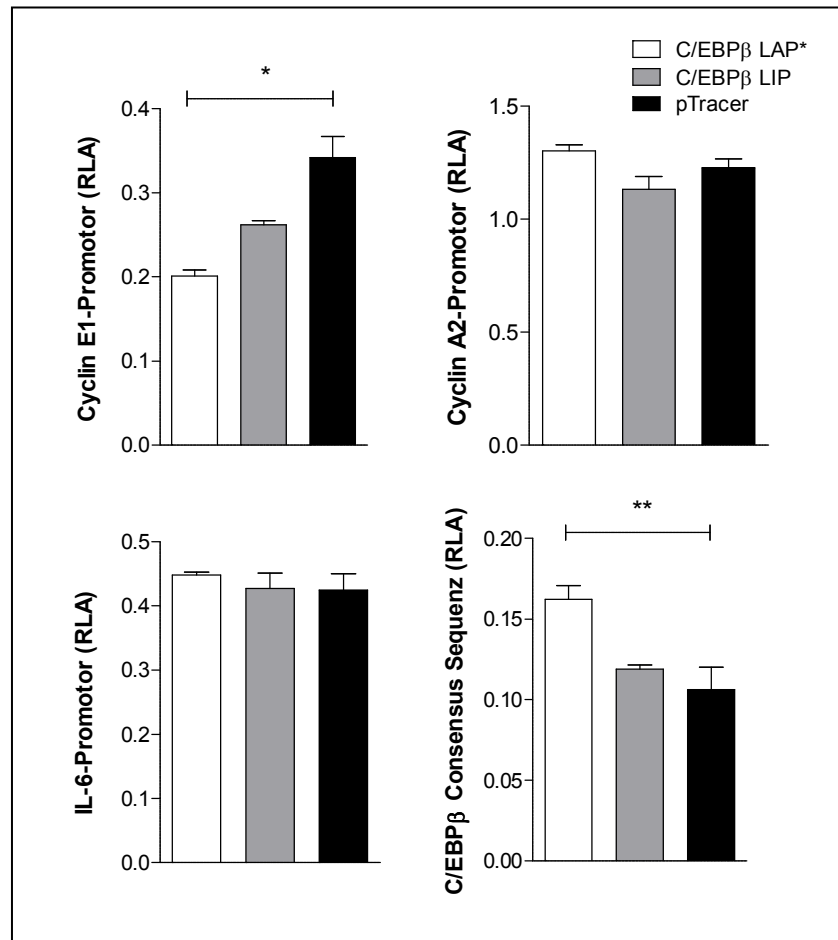


Abbildung 4.18: Transkriptionelle Untersuchung der Promotoren von Cyclin E1, Cyclin A2, IL-6 und der C/EBPβ Consensus Sequenz in THP-1-Zellen

Dargestellt ist die durchschnittliche relative Luciferase Aktivität (RLA), die in Abhängigkeit von verschiedenen Promotoren erzeugt wurde. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Die Transkription des Cyclin E1-Promotors wurde durch C/EBPβ-LAP* um 41% und durch C/EBPβ-LIP um 30% im Vergleich zu dem Leervektor inhibiert (Abb. 4.18). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass beide C/EBPβ-Isoformen keinen signifikanten Einfluss auf die Transkription des Cyclin A2- und IL-6-Promotors hatten. Erwartungsgemäß erzeugte aber C/EBPβ-LAP* eine höhere Luciferase-Aktivität in Zellen, die mit der C/EBPβ Consensus Sequenz transfiziert wurden als der Leervektor pTracer. C/EBPβ-LIP hingegen verursachte keine signifikante Veränderung der Luciferase-Aktivität in den 5xC/EBβ-CS transduzierten THP-1-Zellen.

4.12 Analysen zur Bindung von C/EBP β an verschiedenen Promotoren

Um die Bindung von C/EBP β an bestimmte Genabschnitte zu untersuchen, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit eine Chromatin-Immunopräzipitation durchgeführt. Dazu wurden potenzielle C/EBP β -Bindestellen in den Promotorregionen (siehe 3.2.1.4) der Gene Rb und E2F1 mit Hilfe einer Analysesoftware (TFSEARCH ver. 1.3, Heinemeyer et. al 1998) identifiziert. In der jeweiligen Promotorsequenz von Rb und E2F1 wurden insgesamt 4 bzw. 3 potentielle C/EBP β -Bindestellen gefunden. Für die Analyse wurden Zellextrakte von C/EBP β -long, C/EBP β -short und SF91 mit verschiedenen Antikörpern inkubiert, um promotorgebundene Proteine und die assoziierte Chromatinsequenz zu

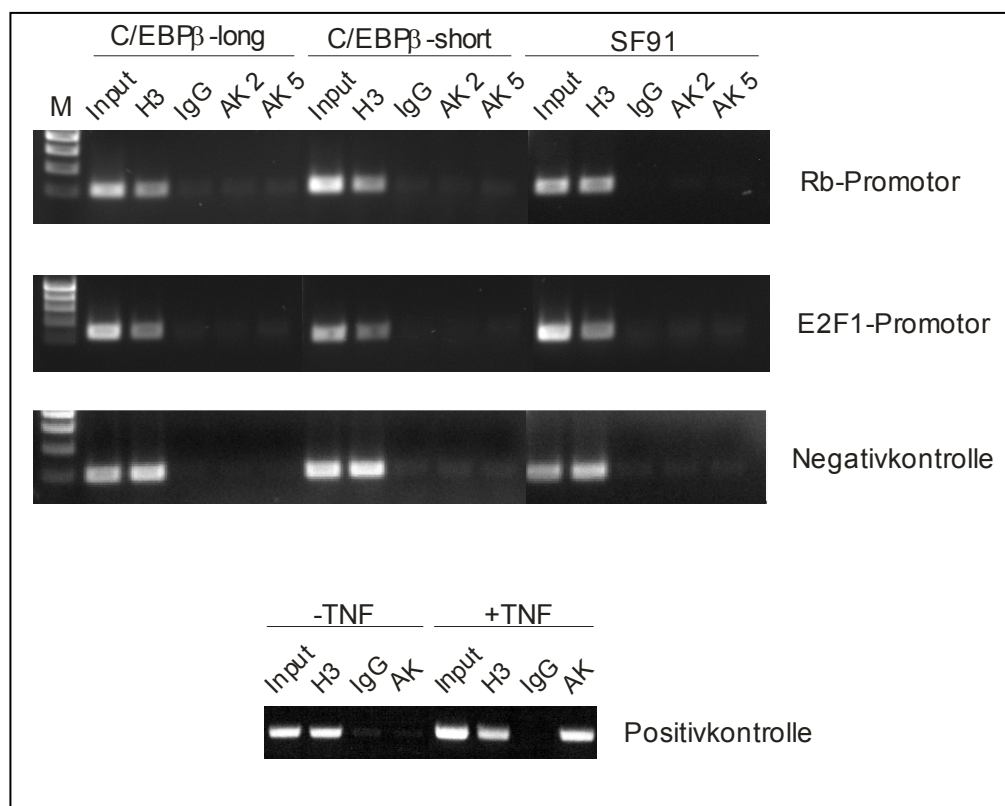


Abbildung 4.19: Untersuchung der Bindung von C/EBP β an die Promotoren von Rb und E2F1

Chromatin-Immunpräzipitation nach 90-stündiger Synchronisation von C/EBP β -long, C/EBP β -short und SF91. Für die Präzipitation wurden Antikörper gegen Histon H3 (H3) als IP-Positivkontrolle, Immunglobulin G (IgG) als IP-Negativkontrolle und C/EBP β in den Konzentrationen 2 und 5 μ g (AK 2, AK 5) eingesetzt. Als Kontrollen für die PCR wurden ein Abschnitt des MMP-13-Promotors (Negativkontrolle) und mit TNF stimulierte THP-1-Zellen (Positivkontrolle) verwendet.

isolieren. Es wurden C/EBP β -Antikörper in zwei verschiedenen Konzentrationen (2 μ g, 5 μ g) eingesetzt und eine Positivkontrolle (Histon-Antikörper) sowie eine Negativkontrolle (IgG-Antikörper) verwendet. Über eine PCR mit spezifischen Primern konnte nun eine eventuelle physische Interaktion von C/EBP β mit den Bindestellen identifiziert werden.

Allerdings konnte keine Interaktionen zwischen C/EBP β und den Promotoren von Rb und E2F1 in den drei Zelllinien festgestellt werden (Abb. 4.19). Für die Negativkontrolle wurden C/EBP β -negative Sequenzbereiche im MMP-13-Promotor mittels PCR amplifiziert. Als Positivkontrolle wurden mit TNF stimulierte THP-1-Zellen eingesetzt und eine Region im MMP-13-Promotor, die ein C/EBP β -Bindemotiv enthält, analysiert (Hayashida et al. 2009). Hier wurde exemplarisch die Analyse einer C/EBP β -Bindestelle im jeweiligen Promotor abgebildet. Es wurden aber alle vorhergesagten C/EBP β -Bindestellen auf eine Interaktion der beiden Promotoren untersucht. Auch hier konnte keine Bindung von C/EBP β an die Promotoren Rb und E2F1 nachgewiesen werden.

4.13 Analyse der Proliferation von C/EBP β ko- und C/EBP β wt-Zellen

In vorherigen Experimenten wurde bereits eine Beeinflussung der Proliferation von monozytären THP-1-Zellen durch C/EBP β gezeigt. Um die Wirkung von C/EBP β auf die Proliferation von Makrophagen zu untersuchen, wurden makrophagenähnliche C/EBP β ko- und C/EBP β wt-Zellen für weitere Analysen verwendet (Gorgoni et al. 2002). Dafür

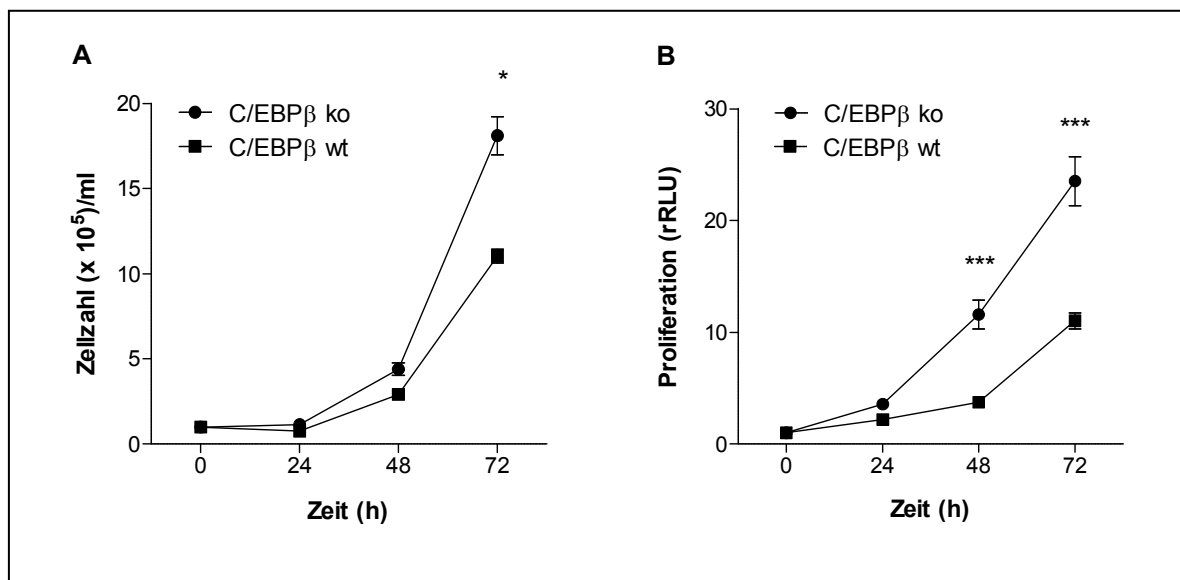


Abbildung 4.20: Bestimmung der Proliferation von C/EBP β ko- und C/EBP β wt-Zellen

Dargestellt ist (A) die durchschnittliche Zellzahl pro Milliliter sowie (B) die durchschnittliche relative RLU (rRLU) von 0 bis 72 Stunden nach Aussaat. Das Zellwachstum wurde durch Auszählung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (A) bzw. mittels ATP-Assay (B) bestimmt. Der jeweilige RLU-Wert zum Zeitpunkt 0 wurde als 1 definiert. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

wurden zwei verschiedene Methoden angewendet. Im ersten Schritt wurde die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die C/EBP β ko-Zellen zeigten hier nach 72 Stunden ein um 59% höheres Wachstum als die C/EBP β wt-Zellen (Abb. 4.20 A). Des Weiteren wurde mit den Zellen ein Proliferationstest, basierend auf der Messung des ATP-Gehalts, durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass die C/EBP β ko-Zellen nach 48 Stunden ein um 209% und nach 72 Stunden ein um 113% höheres Zellwachstum besaßen (Abb. 4.20 B).

4.14 Zellzyklusanalysen der C/EBP β ko- und C/EBP β wt-Zellen

Um den prozentualen Anteil der C/EBP β ko- und C/EBP β wt-Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen zu untersuchen, wurde eine Färbung mit Propidiumjodid durchgeführt. Dazu wurden die Zellen bis zu 48 Stunden durch Kontaktinhibition synchronisiert, anschließend nach 0, 24 und 48 Stunden mit Propidiumjodid gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Methode beruht auf der stöchiometrischen Interkalation von Propidiumjodid in die DNA-Helix. Eine darauf folgende Anregung mit

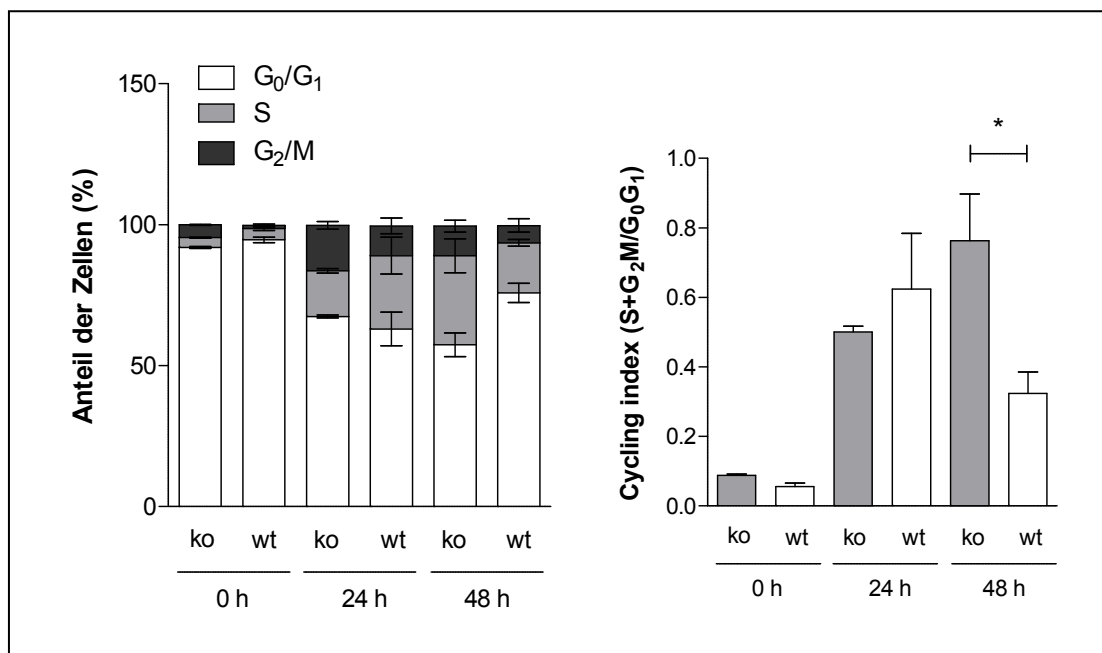


Abbildung 4.21: Analyse der Zellzyklusphasen von C/EBP β ko- und C/EBP β wt-Zellen
Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Zellen in den jeweiligen Phasen des Zellzyklus von 0 bis 48 Stunden nach Aussaat (A) sowie der daraus berechnete Cycling Index (B). * p<0,05

blauem Licht bei 488 nm gibt somit Aufschluss über den DNA-Gehalt und den Zellzyklusstatus der Zellen. Nach 48 Stunden zeigten C/EBP β ko-Zellen einen deutlich höheren Anteil an Zellen, die sich in der S-Phase befanden (Abb. 4.21 A). Gleichzeitig war der prozentuale Anteil der C/EBP β ko-Zellen in G₀/G₁ erkennbar geringer als in C/EBP β wt. Weiterhin hatten die C/EBP β ko-Zellen einen signifikant höheren Cycling Index im Vergleich zu C/EBP β wt (Abb. 4.21 B).

4.15 Molekulare Analysen von C/EBP β ko- und C/EBP β wt-Zellen

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten die Ursachen und molekularen Mechanismen untersucht werden, die zur Zunahme der Proliferation bei den C/EBP β ko-Zellen führten. Gleichzeitig sollte der Einfluss von C/EBP β auf den Zellzyklus im ko-Model ermittelt

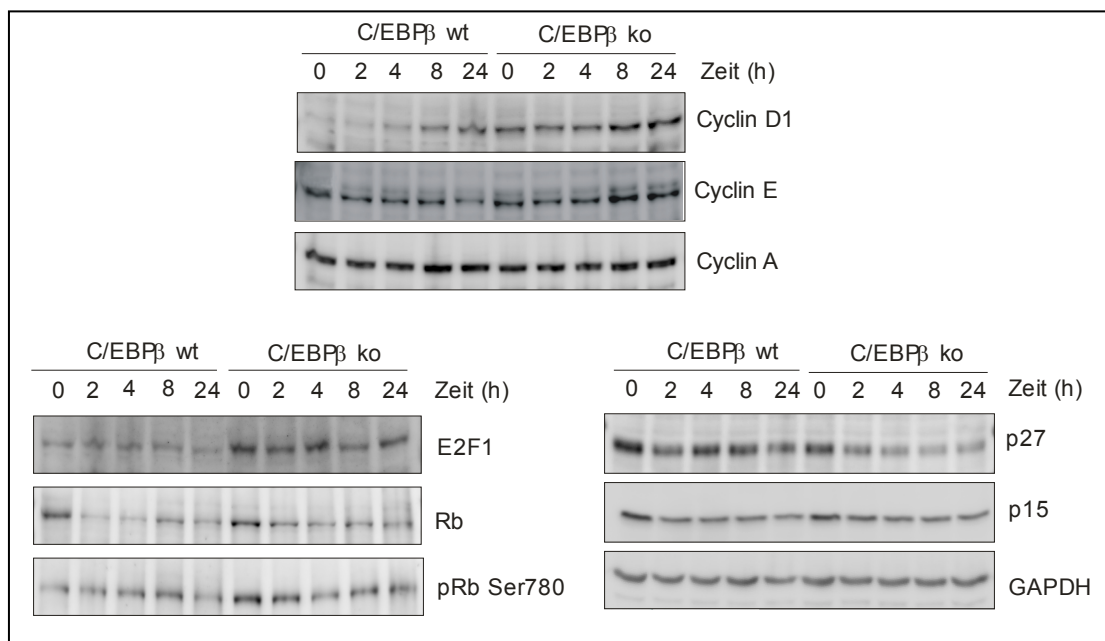


Abbildung 4.22: Untersuchung der Zellzyklusproteine Cyclin D1, E, A, E2F1, Rb, pRb Ser780, p27 und p15 in C/EBP β wt- und ko-Zellen

Western Blots nach 48-stündiger Synchronisation sowie erneuter Aussaat von 0 bis 24 Stunden (Ladungskontrolle: GAPDH).

werden. Dazu wurden Western Blots für verschiedene Zellzyklusproteine angefertigt. C/EBP β ko- und C/EBP β wt-Zellen wurden in 75 cm² Flaschen für 48 Stunden durch Kontaktinhibition synchronisiert. Anschließend wurden die Zellen in einer geringen Dichte ausgesät und zu den angegebenen Zeiten geerntet. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der Cycline D1 und E in den C/EBP β ko-Zellen deutlich stärker war als in den

C/EBP β wt-Zellen (Abb. 4.22). Im Gegensatz dazu gab es bei Cyclin A keinen Expressionsunterschied zwischen den beiden Zelllinien. Weiterhin wurden die Expressionslevel von E2F1 und Rb sowie pRb Ser780 analysiert. Es konnte eine deutliche Hochregulierung von E2F1 in den C/EBP β ko-Zellen nachgewiesen werden. Die Expression von Rb und der Anteil an pRb Ser780 war leicht erhöht in den C/EBP β ko-Zellen. Weiterhin wurden die Proteinlevel der Zellzyklusinhibitoren p27 und p15 untersucht. Während die Konzentration von p27 in den C/EBP β ko-Zellen erheblich niedriger war, gab es in Bezug auf p15 keinen Expressionsunterschied zwischen C/EBP β ko und C/EBP β wt.

4.16 Proliferations- und Morphologieanalysen von C/EBP β ko- und wt-Zellen nach Stimulierung mit PMA

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten das Zellwachstum und die Morphologie der C/EBP β ko- und C/EBP β wt-Zellen mit und ohne PMA-Stimulierung analysiert werden. Für den Proliferationsversuch wurden die Zellen in einer 96-Well-Platte ausgesät und bis zu 72 Stunden mit 0, 10, 50 und 100 nM PMA bis zu 72 Stunden kultiviert. In einem Intervall von

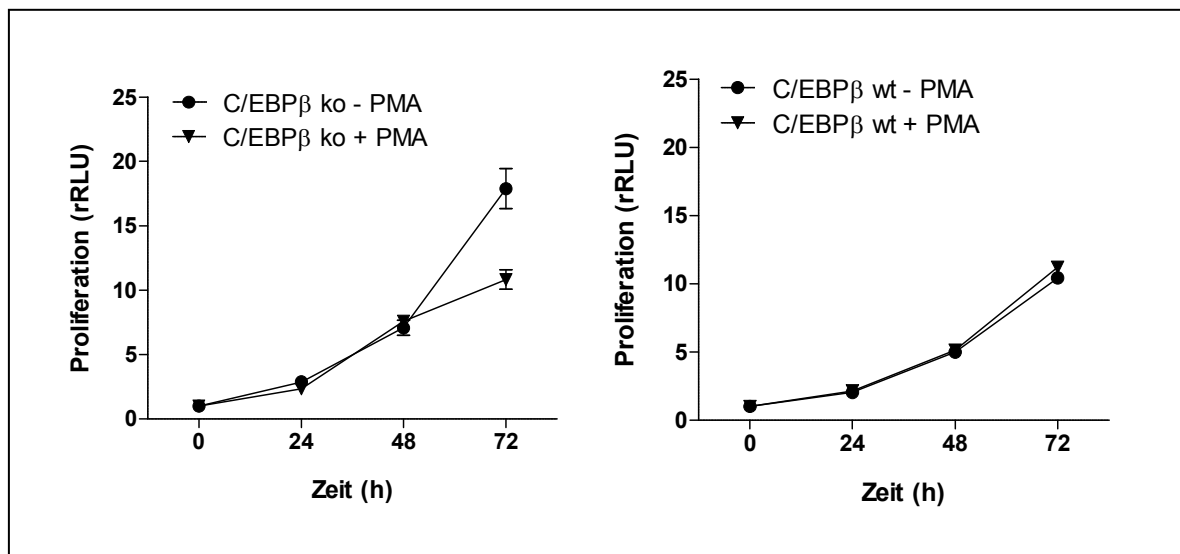


Abbildung 4.23: Untersuchung der Proliferation von stimulierten und unstimulierten C/EBP β ko- und C/EB β wt-Zellen

Dargestellt ist die durchschnittliche relative RLU (rRLU) von 0 bis 72 Stunden nach Aussaat ohne (-) und mit (+) 100 nM PMA. Das Zellwachstum wurde mittels ATP-Assay bestimmt. Der jeweilige RLU-Wert zum Zeitpunkt 0 wurde als 1 definiert. * $p < 0,05$

24 Stunden wurde das Wachstum der Zellen mittels ATP-Test untersucht. In Abbildung 4.23 ist ersichtlich, dass die C/EBP β ko-Zellen ohne PMA-Stimulierung deutlich stärker

proliferierten als die C/EBP β wt-Zellen (Abb. 4.23 vgl. mit Abb. 4.20). 72 Stunden nach Zugabe von 100 nM PMA sank das Wachstum der C/EBP β ko-Zellen signifikant um 39%. Bei den C/EBP β wt-Zellen hingegen hatte PMA keinen Einfluss auf die Proliferation. Für die Untersuchung der Morphologie wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und 72 Stunden lang mit 0, 10, 50 und 100 nM PMA behandelt. Anschließend wurden die Zellen mikroskopiert und die Morphologie dokumentiert. Zusätzlich wurde die Anzahl

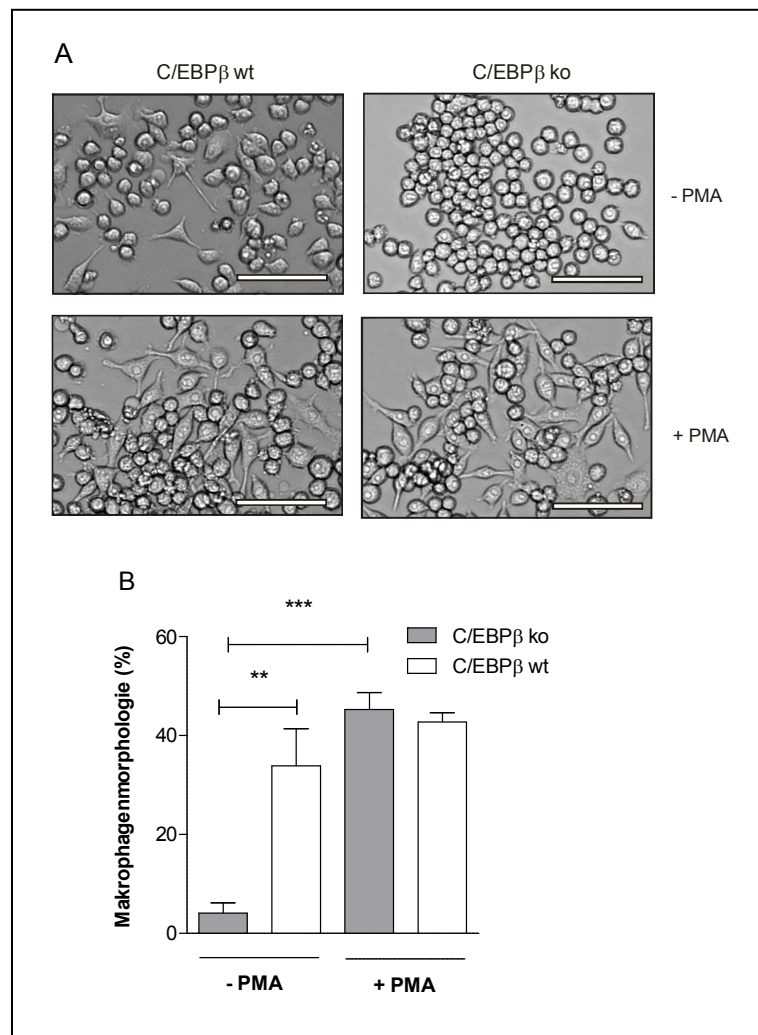


Abbildung 4.24: Untersuchung der Morphologie von stimulierten und unstimulierten C/EBP β wt- und C/EBP β ko-Zellen

Dargestellt sind die Morphologie (A) und die durchschnittliche Anzahl von makrophagenförmigen Zellen pro mikroskopischem Feld (B) nach 72 Stunden ohne (-) und mit (+) 100 nM PMA. Maßstab: 50 μ m. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

runder bzw. makrophagenförmiger Zellen pro mikroskopischem Feld bestimmt. Ohne PMA zeigten nur 4% der C/EBP β ko-Zellen nach 72 Stunden eine makrophagenähnliche Morphologie (Abb. 4.24 A, B). Im Gegensatz dazu hatten 34% der C/EBP β wt-Zellen im unstimulierten Zustand ein makrophagenförmiges Aussehen. Durch die Stimulation der

C/EBP β ko-Zellen mit PMA (100 nM) stieg die Anzahl an makrophagenförmigen Zellen signifikant an. Hierbei bekamen 45% der C/EBP β ko-Zellen ein spindelförmiges und abgeflachtes Aussehen, wobei dieses unabhängig von der PMA-Konzentration auftrat (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigten die C/EBP β wt-Zellen durch die Zugabe von PMA nur eine leicht erhöhte Anzahl an makrophagenförmigen Zellen.

5.1 C/EBP β in der Regulation zellulärer Prozesse

Proliferation, Differenzierung und Apoptose sind fundamentale zelluläre Vorgänge in vielzelligen Organismen, die durch eine Vielzahl von Proteinen und Faktoren kontrolliert werden. Eine abnormale wie exzessive Zellproliferation kann zum Beispiel zur Entstehung von Krebs führen. Faktisch zielten die Mehrzahl der Krebstherapien auf eine Reduzierung von Anzahl und Akkumulation der Tumorzellen ab (Clark 1991; Molinari 2000; Vermeulen et al. 2003; Deininger et al. 2005; Shepherd et al. 2005). Dieses Ziel erweist sich jedoch als schwierig, da die Mechanismen der Proliferation von normalen und malignen Zellen ähnlichen Abläufen unterliegen (Reya et al. 2001). Bei der Krebsentstehung stellt das Auftreten genetischer Mutationen eine primäre Disposition dar. Das Vorkommen genetisch abnormaler Zellen resultiert aus Umweltschäden und natürlichen Fehlern bei der Replikation, die dann bei der Zellteilung auf die nächste Zellgeneration vererbt werden können. Ein Teil dieser Zellen kann den Kontrollmechanismen entgehen, z.B. wenn ein Fehler im DNA-Reparatursystem vorliegt, Zellen des Immunsystems nicht mehr fähig sind entartete Zellen zu erkennen oder Störungen bei der Auslösung des programmierten Zelltods bestehen (Vogelstein et al. 2000; Kim et al. 2007; Lowe und Lin 2000). Zellen mit diesen Defekten sind dann fähig ungehindert zu expandieren. Ein Schlüssel zum Verständnis der Entstehung von Tumorzellen ist die Charakterisierung der Mechanismen während der normalen Zellproliferation und die Kenntnis, wie sich diese Vorgänge bei der Entstehung und Entwicklung von Krebs verändern.

Während der Entwicklung und in adulten Geweben ist die Zellproliferation eng mit der Differenzierung verbunden. Im frühen Zellstadium werden durch Teilung und schnelles Wachstum Zellzahl sowie Zellmasse stark erhöht, während in höheren Entwicklungsstufen die Zellen ihre Proliferation beschränken und sich zu spezifischen Zelltypen differenzieren (Ogawa 1993). Im Gegensatz dazu werden eine verstärkte Zellproliferation ebenso wie das Vorkommen von unreifen und das Fehlen von terminal differenzierten Zellen als charakteristische Merkmale für Tumorgenität angesehen. In der Tat weisen fast alle Karzinome eine Abnormalität bei der Differenzierung von Zellen auf (Almand et al. 2000). Bei der AML ist die Differenzierung von Monoblasten gestört, wobei unreife Zellen stark proliferieren, anschließend in den Blutkreislauf sowie in die Organe ausgeschwemmt werden und damit einhergehend ausgereifte Zellen wie Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten verdrängen (Löwenberg et al. 1999). Patienten, die diese Form der Leukämie entwickeln, bekommen eine Knochenmarksinsuffizienz, Anämie, eine erhöhte Neigung zu Blutungen und sind verstärkt anfällig für Infektionen (Estey und Döhner 2006).

Bei der Entstehung der AML spielen unter anderem Faktoren wie FLT3, MDR-1, Ras, MLL, NPM1 sowie Proteine der C/EBP-Familie eine wichtige Rolle (Gregory et al. 2009; Tafuri et al. 2002). In Patienten mit AML wurden Mutationen insbesondere bei den Genen der C/EBP-Isoformen C/EBP α und C/EBP ϵ nachgewiesen (Pabst et al. 2001; Akasaka et al. 2007). Ebenfalls wird angenommen, dass auch C/EBP β einen Einfluss auf die Reifung von myelischen Zellen haben könnte (Akagi et al. 2010).

C/EBP β ist ein Transkriptionsfaktor der spezifisch mit regulatorischen Sequenzen von Promotoren und *enhancer*-Regionen von Zielgenen interagiert und sowohl aktivierend als auch inhibierend auf andere Transkriptionsfaktoren und Proteine wirkt. Dadurch ist C/EBP β in der Lage verschiedene zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und apoptotische sowie entzündliche Vorgänge zu kontrollieren und zu beeinflussen (Ramji und Foka 2002). Weiterhin wird vermutet, dass C/EBP β bei der Entwicklung von Krebs eine wichtige Rolle spielt. Jundt et al. detektierten in Zellen des Hodgkin Lymphoms sowie des anaplastisch-großzelligem Lymphoms (ALCL) eine erhöhte Expression von C/EBP β , die auch für das Wachstum und Überleben der ALCL-Zellen von essentieller Bedeutung ist (Jundt et al. 2005; Piva et al. 2006). Auch die Tatsache, dass C/EBP β stark in die Regulation der Zellteilung und der Differenzierung von Tumorzellen involviert ist, gibt einen Hinweis darauf, dass es sowohl als Proto-Onkogen, als auch als Tumorsuppressorgen fungieren kann (Zahnow et al. 1997; Eaton et al. 2001).

Die in dieser Arbeit verwendeten THP-1-Zellen stellen ein etabliertes Modell für prämonozytäre Zellen dar (Auwerx 1991; Tsuchiya et al. 1980) und wurden ursprünglich aus peripherem Blut eines Patienten mit akuter monozytärer Leukämie isoliert. Die Zellen enthalten eine Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 11 (p22;q23), was zu einer Expression des Fusionsproteins MLL-AF9 führt und eine Leukämogenese auslöst (Drexler et al. 2004). THP-1-Zellen werden häufig für die Analyse von Differenzierungsmechanismen herangezogen, da sie sich durch die Behandlung mit unterschiedlichen Substanzen (wie zum Beispiel PMA) zu Makrophagen entwickeln können (Daigneault et al. 2010; Gocek et al. 2009).

Die primäre Intention dieser Arbeit war, die grundlegenden Wirkmechanismen von C/EBP β und deren Isoformen auf zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose im monozytären Zelltyp zu untersuchen. Langfristig könnte die Erforschung von C/EBP β einen bedeutenden Schritt für die Aufklärung der Entstehung verschiedener Krebsarten, z.B. Leukämien, darstellen und damit zur Entwicklung wirkungsvoller Krebstherapien beitragen.

5.1.1 Der Einfluss von C/EBP β auf die Zellproliferation

Etliche Studien haben gezeigt, dass C/EBP β großes Potential besitzt auf die Teilung von Zellen einzuwirken. Die beiden größeren Isoformen LAP* und LAP haben die Fähigkeit bei einer Vielzahl von Zellen die Proliferation zu inhibieren (Buck et al. 1994; Guerzoni et al. 2006). Im Gegensatz dazu ist die verkürzte C/EBP β -Isoform LIP fähig das Zellwachstum zu erhöhen (Zahnow et al. 1997; Zahnow et al. 2001; Orellana et al. 2010). Dabei werden unterschiedliche Zellzyklusproteine wie die Cycline, E2F, Rb und Mitglieder der Cip/Kip- und INK4-Familien in der Expression beeinflusst sowie transkriptionell reguliert (Nerlov 2007; Park und Park 2010; Luedde et al. 2004). Darüber hinaus spielt die Balance der Expression der beiden größeren Isoformen LAP* und LAP sowie der verkürzten Isoform LIP eine entscheidende Rolle. Eine hohe LIP/LAP-Ratio (LAP* und LAP werden hier zu LAP zusammengefasst) wird mit einer verstärkten Zellproliferation und Malignität assoziiert (Li et al. 2011). Des Weiteren besitzen die beiden größeren Isoformen LAP* und LAP die Fähigkeit die Differenzierung von Zellen zu modulieren (Descombes und Schibler 1991). In dieser Arbeit wurden in einem initialen Experiment THP-1-Zellen mit PMA stimuliert, wodurch eine Differenzierung der Zellen hervorgerufen wurde, was mit einer Reduzierung der Proliferation bei gleichzeitiger Erhöhung der Proteinexpression von C/EBP β einherging. Dabei war die Expression der beiden größeren Isoformen LAP* und LAP stärker ausgeprägt, als die Bildung der verkürzten Isoform LIP (Gutsch et al. 2011). Dies ließ vermuten, dass die verstärkte Bildung von C/EBP β , insbesondere der größeren Isoformen, am verlangsamten Zellwachstum und der verstärkten Differenzierung von monozytären Zellen beteiligt ist. Um einen direkten Effekt von C/EBP β auf die Proliferation von THP-1-Zellen zu untersuchen, wurden stabil C/EBP β -überexprimierende THP-1-Zellen hergestellt. Dazu wurden die codierenden Sequenzen von LAP* bzw. LIP in einen viralen Vektor kloniert und anschließend die Zellen transduziert. Erstmals konnten hier monozytäre Zellen generiert werden, die die verschiedenen C/EBP β -Isoformen stabil überexprimieren. Die Zellen wurden als C/EBP β -long (LAP*), C/EBP β -short (LIP) und SF91 (Leervektor-Kontrolle) bezeichnet, wobei die C/EBP β -long-Zellen überwiegend die größte Isoform LAP* und die C/EBP β -short-Zellen die kleinste Isoform LIP bilden, was im Western Blot nachgewiesen wurde (Abb. 3.1). Durch eine intrazelluläre Färbung der Zellen mit anschließender Durchflusszytometrie konnte ebenfalls die C/EBP β -Überexpression detektiert werden (Abb. 4.2).

Der Fokus der folgenden Analysen lag nun auf der Untersuchung des Einflusses von C/EBP β auf die Proliferation der Zellen. Dazu wurden verschiedene Proliferationstests durchgeführt. Zuerst wurde die Zellzahl von C/EBP β -long, C/EBP β -short und SF91 durch

eine Zellzählung bestimmt. Hier konnte eine Abnahme der Proliferation bei den C/EBP β -long-Zellen im Vergleich zu den SF91-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.3; 4.4; 4.5). Zusätzlich wurde die verringerte Proliferation der Zellen durch einen ATP-Test bestätigt. Auch hier konnte eine deutliche Verringerung der Proliferation der C/EBP β -long-Zellen im Vergleich zu C/EBP β -short und SF91 festgestellt werden.

Im *knock out*-Modell konnte ebenfalls ein Einfluss von C/EBP β auf die Zellvermehrung beobachtet werden. C/EBP β ko-Makrophagen hatten ein erheblich stärkeres Wachstumsverhalten als die wt-Zellen, was ebenfalls durch die Bestimmung der Zellzahl und des ATP-Gehalts ermittelt wurde (Abb. 4.20). Durch Untersuchung der Zellzyklusphasen mittels Propidiumjodid-Färbung konnte eine prozentuale Erhöhung der C/EBP β ko-Makrophagen, die sich in der S-Phase befanden sowie eine Abnahme der Zellen in der G₀/G₁-Phase im Vergleich zu den C/EBP β wt-Makrophagen aufgezeigt werden. Des Weiteren wiesen die C/EBP β ko-Zellen einen erhöhten Cycling Index im Vergleich zu den wt-Zellen auf (Abb. 4.21). Dieser wurde durch Addition des prozentualen Anteils der Zellen in der S-Phase mit dem Anteil der Zellen in der G₂M-Phase und der Division durch den Teil der Zellen in den Phasen G₀/G₁ berechnet $((S+G_2M)/G_0G_1)$. Die hier dargelegten Ergebnisse deuten darauf hin, dass C/EBP β und besonders die große Isoform LAP* als wichtiger Faktor bei der Inhibition der Proliferation und der Regulation des Zellzyklus von monozytären Zellen und Makrophagen agiert. LAP* könnte demzufolge das Potenzial aufweisen das Wachstum leukämischer Zellen zu hemmen, während ein Verlust von C/EBP β eine vermehrte Zellteilung der Zellen unterstützt. In verschiedenen Arbeiten wird diese Hypothese vertreten. Buck et al. postulierten eine Inhibition der Proliferation von Hepatozyten durch die Expression von LAP, da LAP den Eintritt der Zellen in die S-Phase verhinderte sowie die Bildung von PCNA hemmte (Buck et al. 1994). Der Einsatz von C/EBP β -siRNA wiederum führte zu einer erhöhten Zellteilung in diesen Zellen (Buck et al. 1999). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Expression von LAP* in Bcr/Abl-positiven 32D-Zellen sowie von LAP in intestinalen Epithelzellen eine verminderte Proliferation zur Folge hatte (Guerzoni et al. 2006; Gheorghiu et al. 2001). Des Weiteren wurde die Progression des Zellzyklus durch C/EBP β beeinflusst. So führte die Überexpression von LAP* in murinen mesenchymalen Stammzellen zu einer Akkumulation der Zellen in der G₀/G₁-Phase und die Überexpression von LAP in Hepatozyten einen verlangsamten Eintritt in die S-Phase (Hirata et al. 2009; Luedde et al. 2004). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden ebenfalls stabile LAP-überexprimierende THP-1-Zellen auf ihr Proliferationsverhalten geprüft (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu C/EBP β -long wiesen diese Zellen keine verminderte Proliferation auf. Ein Grund dafür könnte der bei LAP (gegenüber LAP*) fehlende uORF sein, der ein translationales Kontrollelement in eukaryotischen

Transkripten darstellt. Verkürzte C/EBP-Isoformen ohne uORF führen durch hohe eIF2/eIF4-Aktivität eher zu einer Proliferationsinduzierung (Calkhoven et al. 2002). Eine weitere Ursache könnte der in den Zellen vorhandene relativ hohe Expressionslevel von LIP sein, der in den C/EBP β -long-Zellen nicht nachgewiesen wurde. Wie bereits erwähnt, fungiert LIP als dominant-negativer Regulator der beiden größeren C/EBP β -Isoformen und könnte demnach in diesem Experiment die regulatorische Funktion von LAP in den THP-1-Zellen blockieren.

In einem vorherigen Versuch wurde bereits festgestellt, dass ein *knock out* von C/EBP β in Makrophagen zu einem stark erhöhten Wachstum der Zellen führte. Daher liegt die Vermutung nahe, dass ein *knock down* durch das stabile Einbringen von siRNA gegen C/EBP β in THP-1-Zellen ebenfalls zu einer Zunahme der Proliferation führen könnte, was in weiteren Untersuchungen geklärt werden müsste. Außerdem wäre es interessant die C/EBP β überexprimierenden Zellen mittels einer Zellzyklusanalyse zu überprüfen, da anzunehmen ist, dass sich der überwiegende Anteil der C/EBP β -long-Zellen in der G₀/G₁-Phase befindet.

Insgesamt wird davon ausgegangen, dass die verkürzte C/EBP β -Isoform LIP das Potenzial hat die Proliferation von verschiedenen Zelltypen zu erhöhen (Zahnow et al. 2001; Orellana et al 2010). Eine stabile Überexpression von LIP in monozytären THP-1-Zellen hatte allerdings keine Auswirkung auf die Zellvermehrung im Vergleich zu den SF91-Zellen (Abb. 4.3; 4.4; 4.5). Eine der Ursachen kann die Anwendung einer relativ kurzen Inkubationsdauer für die Untersuchung des Wachstums der Zellen sein. Bei den Experimenten von Zahnow et al. wurden die LIP-überexprimierenden Zellen sowie die Kontrollzellen in einem Zeitraum von bis zu 13 Tagen kultiviert und analysiert. Dabei wurde ein Proliferationsunterschied erst nach 5 Tagen ersichtlich. In dieser Arbeit wurden die Zellen lediglich bis zu 4 Tagen untersucht. Eine längere Versuchszeit hätte möglicherweise eine vermehrte Zellproliferation durch LIP gezeigt. Diese war aber aus methodischen Gründen nicht durchführbar, da das längere Kultivieren der Zellen (über 4 Tage hinaus) ein Stoppen des Wachstums durch Kontaktinhibition und Nährstoffverbrauch zur Folge gehabt hätte, wie in Vorversuchen gezeigt wurde. Ein weiterer Grund könnte das Auftreten einer sehr niedrigen endogenen Proteinkonzentration von C/EBP β in THP-1-Zellen darstellen. LIP fungiert als inhibitorisches Protein durch die Interaktion mit den beiden größeren C/EBP β -Isoformen LAP* und LAP, wodurch letztendlich die hemmende Wirkung der beiden Faktoren auf die Proliferation aufgehoben wird und eine vermehrte Zellteilung stattfinden kann (Descombes und Schibler 1991). Durch den geringen Gesamtproteinlevel von C/EBP β in den untersuchten Zellen ist die Wahrscheinlichkeit einer Assoziation mit LIP eher gering, sodass eine Überexpression dieser Isoform keinen signifikanten Effekt auf die

Proliferation von THP-1-Zellen hatte. Es existieren mehrere Studien, in denen ebenfalls kein signifikanter Effekt von LIP auf die Proliferation gezeigt werden konnte. Sowohl in intestinalen Epithelzellen als auch in Hepatozyten nach partieller Hepatektomie und in Hepatomazellen bewirkte eine Überexpression von LIP keine erhöhte Proliferation (Buck et al. 1994; Luedde et al. 2004; Gheorghiu et al. 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte allerdings durch Stimulation eine Wirkung von LIP auf das Zellwachstum nachgewiesen werden. Die Behandlung von THP-1-Zellen mit PMA lässt den endogenen Proteingehalt von C/EBP β deutlich ansteigen, wobei die LIP/LAP-Ratio sich erheblich zu Gunsten von LAP verschiebt. Gleichzeitig wird dadurch die Proliferation dieser Zellen gehemmt (Gutsch et al. 2011; Schwende et al. 1996; Goethe et al. 2007). Im Folgenden wurden auch C/EBP β -long-, C/EBP β -short- und SF91-Zellen mit PMA stimuliert und dessen Wirkung auf die Proliferation überprüft. Die PMA-Behandlung führte bei allen drei Zelllinien ebenso wie bei untransduzierten THP-1-Zellen zu einer starken Reduzierung der Proliferation. Dennoch zeigten die C/EBP β -short-Zellen ein um 70% höheres Zellwachstum im Vergleich zu SF91. Dieses verstärkte Wachstumsverhalten konnte bei den C/EBP β -long-Zellen nicht beobachtet werden (Abb. 4.16). LIP ist demzufolge in der Lage der hemmenden Funktion von LAP* und LAP entgegenzuwirken, was zu einer weniger gehemmten Proliferation der Zellen führte. In gleicher Weise war LIP fähig die von LAP induzierte Proliferationsinhibition durch Inaktivierung mittels Dimerisierung in Hepatoma Zellen aufzuheben (Buck et al. 1994; Descombes und Schibler 1991).

Wie bereits angedeutet, spielt die LIP/LAP-Ratio bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen ebenfalls eine entscheidende Rolle. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine hohe LIP/LAP-Ratio in Hepatozyten sowie myeloiden Zellen mit einer erhöhten Zellzyklusprogression sowie einer verstärkten Zellvermehrung assoziiert ist (Luedde et al. 2004; Haas et al. 2009). Darüber hinaus wurde eine hohe LIP/LAP-Ratio in Brustkrebszellen, im Hodgkin Lymphom sowie im ALCL mit verstärkter Tumorgenität in Verbindung gebracht (Zahnow 2009; Gomis et al. 2006; Jundt et al. 2005; Quintanilla-Martinez et al. 2006). Im Gegensatz dazu bewirkte eine niedrige LIP/LAP-Ratio einen erhöhte Differenzierung von Myofibroblasten, Brustepithelzellen und Präadipozyten (Hu et al. 2004; Dearth et al. 2001; Bae und Kim 2005). In dieser Arbeit konnte durch eine Überexpression von LIP in THP-1-Zellen trotz PMA-Behandlung (und damit einhergehenden verstärkten endogenen Expression von LAP*/LAP) eine Verschiebung der Proteinlevel zu Gunsten von LIP gezeigt werden. Die dadurch erhöhte LIP/LAP-Ratio ging mit einer verstärkten Proliferation in PMA-stimulierten THP-1-Zellen einher. Dies zeigt, dass das Verhältnis der beiden größeren Proteinisoformen LAP* und LAP zur verkürzten Isoform LIP ein entscheidender Faktor bei der Proliferation ist.

Eine Behandlung mit PMA führte bei den C/EBP β ko-Makrophagen, wie auch bei den C/EBP β -überexprimierenden Zellen, zu einer Reduzierung der Proliferation. Bei den wt-Zellen konnte dies nicht beobachtet werden, was vermutlich auf den ausdifferenzierten Zustand der wt-Makrophagen zurückzuführen ist (Abb. 4.23). Gleichzeitig veränderten die C/EBP β ko- Zellen ihre runde Form und entwickelten eine spindelförmige, makrophagenähnliche Morphologie, die im Kapitel 5.1.2 diskutiert wird. Das lässt darauf schließen, dass die Hemmung der Proliferation durch PMA auch durch einen alternativen, C/EBP β -unabhängigen Mechanismus bewirkt werden kann. Es ist beschrieben worden, dass C/EBP α und C/EBP β sich bei einer fehlenden Expression gegenseitig funktionell, strukturell und regulatorisch ersetzen können und dass auch C/EBP α die Zellproliferation unterdrückt sowie die Differenzierung von Zellen induziert (Ramji und Foka 2002; Halmos et al. 2002). Es hat sich jedoch gezeigt, dass C/EBP α vermutlich nicht an der Abnahme der Proliferation in den C/EBP β ko-Zellen beteiligt ist, da eine PMA-Behandlung in diesen Zellen nicht zu einer Erhöhung der C/EBP α -Konzentration führte (Gutsch et al. 2011, Fig. 6).

PMA gehört zu den tetrazyklischen Diterpenoiden und wandelt die PKC in ihre aktive Form um, die durch Bindung an RACK (*receptor for activated C-kinase*) irreversibel in die Plasmamembran verankert wird, um verschiedene Signalwege zu dirigieren (Mosior und Newton 1995). Die PKC umfasst eine Familie aus 12 ähnlichen Serin/Threonin-Kinasen, die unterschiedliche Signalwege vermitteln (Hata et al. 1993). Unter anderem spielt die PKC bei der Zellzykluskontrolle während der G₁-Phase und der Transition der G₂/M-Phase eine wichtige Rolle. Es hat sich gezeigt, dass die CDK2-Aktivität sowie die Cycline E und A durch PKC expressionell runterreguliert wurden. Weiterhin konnte eine erhöhte Expression der CDK Inhibitoren p27 und p21 sowie eine Hypophosphorylierung von Rb durch die PKC initiiert werden (Livneh und Fishman 1997). Dies deutet darauf hin, dass die durch PMA induzierte Inhibierung der Zellproliferation in den C/EBP β ko-Zellen von der PKC-Aktivität abhängig ist und unabhängig von C/EBP β vermittelt wird.

5.1.2 Die Rolle von C/EBP β im Zuge der Differenzierung

In einem weiteren Schritt sollte die Funktion von C/EBP β während der Differenzierung untersucht werden. Die Bestimmung der Differenzierung wurde in dieser Arbeit ausschließlich durch die morphologische Analyse und das Adhäsionsverhalten der Zellen vorgenommen. Wie bereits erwähnt bewirkte eine PMA-Behandlung von THP-1-Zellen eine Hemmung der Proliferation und Zunahme der C/EBP β -Expression. Gleichzeitig

veränderte sich die Morphologie der monozytären THP-1-Zellen von rund zu flach, spindelförmig und polygonal, was dem charakteristischen Erscheinungsbild von Makrophagen entspricht. Ebenso zeigten die Suspensionszellen eine verstärkte Adhärenz (Gutsch et al. 2011). Weiterhin beeinträchtigte der *knock out* von C/EBP β in den Makrophagen die Differenzierungsfähigkeit. Im Vergleich zu den wt-Zellen, die eine Makrophagenform ausbilden konnten, blieben die ko-Zellen rund. Das Adhäsionsverhalten blieb hingegen unverändert, da beide Zelllinien die Fähigkeit besaßen zu adhären (Abb. 4.24). Darüber hinaus führte eine Retransfektion von C/EBP β in die ko-Zellen bei einem Teil der Zellen zu einer spindelförmigen Zellmorphologie (Gutsch et al. 2011). Daher lag die Vermutung nahe, dass C/EBP β ein bedeutender Faktor bei der Differenzierung von monozytären Zellen darstellt. Allerdings hatte eine stabile Überexpression von LAP* bzw. LIP bei THP-1-Zellen keinen direkten Einfluss auf die Morphologie sowie das Adhäsionsverhalten (Abb. 4.15). Erst eine Stimulierung mit PMA führte in den stabil überexprimierenden Zellen C/EBP β -long, C/EBP β -short und SF91 zu der oben beschriebenen typischen Makrophagenmorphologie. Ebenso wie bei unstimulierten Zellen hatte die vermehrte Anwesenheit von C/EBP β bei PMA-differenzierten Zellen keine Auswirkungen auf die Zellform (Abb. 4.15). Die ursprünglich erwartete Verstärkung der Differenzierung durch LAP* sowie die Verringerung durch LIP bei C/EBP β -long bzw. C/EBP β -short fand demnach nicht statt. In vorherigen Studien wurde ebenfalls der Einfluss von C/EBP β auf die Zelldifferenzierung untersucht. Diese zeigten, dass ein *knock out* von C/EBP β in myeloiden Zellen (Akagi et al. 2010), uterinen Epithelzellen (Bagchi et al. 2006), Chondrozyten (Hirata et al. 2009; Smink und Leutz 2010), Stromalzellen (Mantena et al. 2006), Brustepithelzellen (Robinson et al. 1998; Seagroves et al. 1998), Lungenepithelzellen (Roos et al. 2012) und Adipozyten (Tanaka et al. 1997; Tang et al. 2003) zu einer erheblichen Inhibierung der Differenzierung führt. Ebenso konnte eine Differenzierung durch die Applikation von verschiedenen differenzierungsinduzierenden Stimuli wie PMA, Vitamin D₃ und ATRA bei gleichzeitiger Hochregulierung von C/EBP β nachgewiesen werden (Duprez et al. 2003; Ji und Studzinski 2004; Park et al. 2008). Einige Untersuchungen zeigten eine direkte Wirkung von C/EBP β auf die Differenzierung von B-Zellen anhand der Hochregulierung von Differenzierungsmarkern wie CD19 sowie Mac-1, allerdings ohne Morphologieänderung (Xie et al. 2004). Weiterhin konnte eine Erhöhung von Differenzierungsmarkern wie MMP-13 und Collagen X bei Chondrozyten durch C/EBP β detektiert werden. Auch hier war eine direkte Veränderung der Morphologie nicht nachweisbar (Hirata et al. 2009). Im Gegensatz dazu konnten andere Studien einen direkten Einfluss auf die Differenzierung und die damit verbundene Morphologieänderung zeigen. Die stabile Überexpression von C/EBP β in Keratinozyten zum Beispiel führte zu

einem differenzierten Phänotyp mit gleichzeitiger Hochregulierung von Keratin 1 und Keratin 10 (Zhu et al. 1999). Weiterhin zeigten 3T3-L1-Zellen durch Überexpression von C/EBP β eine differenzierte Form und konnten sich dadurch zu Adipozyten formieren (Yeh et al. 1995; Calkhoven et al. 2000). Ebenfalls konnten Neuro2A-Zellen und 32D-Bcr/Abl-Zellen durch die Überexpression von C/EBP β verstärkt differenzieren (Cortes-Canteli et al. 2002; Guerzoni et al. 2006). Ein essentieller Einfluss von C/EBP β auf die Differenzierung von monozytären THP-1-Zellen konnte in dieser Arbeit also nicht nachgewiesen werden, da der Einfluss von C/EBP β zelltypabhängig zu sein scheint. Allerdings könnte die Untersuchung von makrophagenspezifischen Markern wie CD11b, CD14 und des Scavengerrezeptors genauere Einblicke in den Differenzierungsstatus ermöglichen. In der Literatur ist beispielsweise eine verstärkte Bildung von CD11b nach C/EBP β -Überexpression in NB4-Zellen (Zellen der akuten Promyelozytenleukämie) belegt (Zhang et al. 2010). Diese Ergebnisse führten zu der Erkenntnis, dass die Differenzierung der monozytären THP-1-Zellen durch PMA über einen alternativen, nicht nur auf C/EBP β gerichteten Signalweg ausgelöst wird.

PMA hat, wie schon erwähnt, die Fähigkeit die Differenzierung von monozytären Zellen zu induzieren (Tsuchiya et al. 1982; Schwende et al. 1996; Park et al. 2008). Dabei wird die PKC aktiviert, die den physiologischen Aktivator Diacylglycerol (DAG) nachahmt und verschiedene zelluläre Funktionen, wie die Zelldifferenzierung reguliert (Nishizuka 1992; Ono et al. 1988). Einige Studien zeigten eine Veränderung der Expression der PKC-Enzyme PKC- α und PKC- β während der Differenzierung bei einer Vielzahl von Zelllinien (Devalia et al. 1992). Weiterhin wird eine Aktivierung von C/EBP α durch verschiedene PKC-Isoformen postuliert, wodurch es zu einer verstärkten Zelldifferenzierung kommen kann (Efimova et al. 2002). Allerdings bewirkte eine PMA-Behandlung bei THP-1 im Zellkern lediglich eine schwache Zunahme der p30-Isoform sowie eine gleich bleibende Expression der p42-Isoform von C/EBP α , während der Proteinlevel von p42 im Cytosol sogar abnahm (Gutsch et al. 2011). Demzufolge scheint C/EBP α auch hier keine wesentliche Rolle bei der Differenzierung von monozytären Zellen zu spielen.

Eine andere Möglichkeit wäre die Beeinflussung der PMA-induzierten Differenzierung durch die Modulation der Expression des Transkriptionsfaktors PU.1. PU.1 agiert als einer der Hauptfaktoren bei der Differenzierung und Aktivierung von lymphoiden und myeloiden Vorläuferzellen (Celada et al. 1996). Verschiedene Untersuchungen zeigten beispielsweise eine Aktivierung der Phosphorylierung von PU.1 durch die PKC, wodurch es etwa zu einer Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen kommt (Hamdorf et al. 2011; Mazzi et al. 2004; Ikizawa et al. 2001). In unserer Gruppe konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Stimulierung der THP-1-Zellen mit PMA eine deutliche

Erhöhung der Proteinkonzentration von PU.1 bei gleichzeitiger morphologischer Differenzierung bewirkte (Dissertation Judith Kandemir), während PU.1 in unbehandelten THP-1-Zellen nicht nachgewiesen werden konnte. Weiterhin hat sich gezeigt, dass PU.1 in den C/EBP β wt-Makrophagen erheblich stärker exprimiert wird als in den ko-Zellen. Dies weist deutlich auf eine Regulation von PU.1 durch C/EBP β hin. Vermutlich liegt die Ursache für die fehlende Differenzierung der ko-Makrophagen bei dem defizienten C/EBP β -Level und der daraus resultierenden Reduzierung von PU.1. Die Tatsache, dass die Retransfizierung der C/EBP β ko-Makrophagen mit C/EBP β nur bei 30% der Zellen eine Makrophagenmorphologie hervorbrachte, spricht allerdings gegen die Annahme, dass PU.1 allein für die PMA-induzierte Differenzierung verantwortlich ist (Gutsch et al. 2011). Daher liegt die Vermutung nahe, dass möglicherweise C/EBP β zusammen mit PU.1 den Prozess der Differenzierung reguliert. Etliche Studien weisen auf eine Kooperation von C/EBP β und PU.1 bei der Expression von Genen, die für die Differenzierung verantwortlich sind, hin (Yang et al. 2000; Tissieres et al. 2009). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Kombination dieser beiden Transkriptionsfaktoren zu einer Makrophagen-Differenzierung führt und an der Aktivierung eines makrophagenspezifischen Enzyms, der Chitotriosidase, beteiligt ist (Feng et al. 2008; Pham et al. 2007). Um eine Interaktion von C/EBP β und PU.1 in THP-1-Zellen nachzuweisen, wäre die Durchführung einer Co-Immunpräzipitation nötig. Ebenso müssten Expressionstudien in den C/EBP β -long- und C/EBP β -short-Zellen durchgeführt werden um eine Regulierung von PU.1 durch C/EBP β nachzuweisen. Eine erhöhte Expression von PU.1 in den C/EBP β -long-Zellen wäre möglich, da bereits gezeigt wurde, dass PU.1 durch C/EBP β beeinflusst wird und einen entscheidenden Faktor bei der monozytären Differenzierung darstellt (Weigelt et al. 2009). Ebenso könnte die Aktivierung von PU.1 durch die PKC einer der Gründe für die Reduzierung der Proliferation der C/EBP β ko-Makrophagen nach PMA-Stimulierung sein, da einige Daten zeigen, dass PU.1 die Fähigkeit besitzt die Zellvermehrung zu inhibieren (Oikawa et al. 1999). Hierzu müssten aber weitere Analysen in Bezug auf PU.1 in den C/EBP β ko- und wt-Zellen folgen.

5.1.3 Die Funktion von C/EBP β bei der Zellzyklusregulation

Der Zellzyklus durchläuft verschiedene Phasen und wird dabei durch eine Vielzahl von Genen moduliert. C/EBP β scheint hierbei einen wichtigen Einfluss auf die Regulation der Zellzyklusprogression zu haben. Etliche Untersuchungen waren in der Lage dies zu

bestätigen. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass C/EBP β in Darmepithelzellen die Expression der Cycline D, E und B herunterreguliert und gleichzeitig eine Erhöhung der Proteinkonzentration der Zellzyklusinhibitoren p15, p21 und p27 verursacht (Gheorghiu et al. 2001). Weiterhin hat C/EBP β das Potential in MEFs und Brustkrebszellen die Transkriptionsfaktoren E2F1 und c-Myc, die essentiell für die Progression des Zellzyklusses sind, zu inhibieren (Nerlov 2007; Sebastian et al. 2005; Gomis et al. 2006). Überdies konnte eine Proteininteraktion von C/EBP β mit E2F1 und Rb sowie eine Bindung an den Promotor von E2F1 bestätigt werden (Chen et al. 1996; Sebastian et al. 2005). In dieser Arbeit konnte ein Einfluss von C/EBP β auf die Expression sowie die transkriptionelle Aktivität verschiedener Zellzyklusproteine im monozytären Zelltyp nachgewiesen werden. Die Überexpression von LAP* verursachte in den C/EBP β -long-Zellen eine Erniedrigung des G₁-Phasen-Proteins Cyclin D1 und des frühen S-Phasen-Proteins Cyclin E. Im Gegensatz dazu war die Expression von Cyclin A,

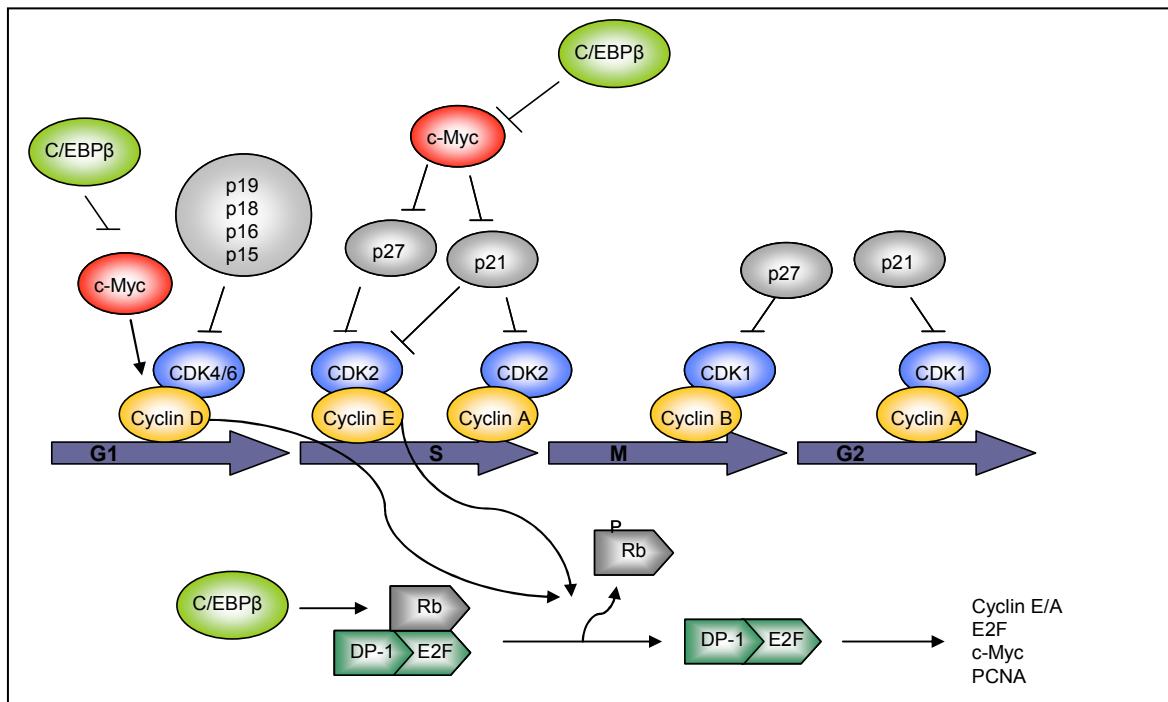


Abbildung 5.1: Einfluss von C/EBP β auf die Zellzyklusprogression

C/EBP β hemmt die Zellzyklusprogression durch Reduzierung der c-Myc- und Erhöhung der Rb-Expression; p, Phosphorylierung

welches in der späten S-Phase des Zellzyklus gebildet wird, nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit vorherigen Untersuchungen. Eine vermehrte Expression von C/EBP β zeigte eine Herunterregulierung von Cyclin E in Hepatozyten. Außerdem konnte ein *knock out* von C/EBP β in Chondrozyten einen erhöhten Cyclin D1-Level bewirken (Luedde et al. 2004; Hirata et al. 2009) während C/EBP β als

konstitutiver Repressor von Cyclin D1-Zielgenen wirkte (Lamb et al. 2003). Die Proteinkonzentration von c-Myc, E2F1 und phosphorylierten Rb (pRb-Ser780) war in den C/EBP β -long-Zellen ebenfalls herunterreguliert, wobei der Proteinlevel von unphosphoryliertem Rb gleichzeitig stark erhöht war. Darüber hinaus war die Expression des Zellzyklusinhibitors p27 durch C/EBP β verstärkt worden, wobei die Bildung der Proteine p15 und p16 nicht beeinflusst wurde. Außerdem war die relative Proteinmenge von PCNA sowie von pRb-Ser795 und pRb-Ser807/811 durch C/EBP β unverändert (Abb. 4.10; 4.11). LIP wiederum hatte ausschließlich auf die Expression von Rb und die Konzentration von pRb-Ser780 Auswirkungen, wobei ein deutlich stärkerer Anstieg bei phosphoryliertem Rb festgestellt wurde (Abb. 4.12). Die hier beschriebenen Ergebnisse weisen auf eine inhibierende Wirkung von LAP* auf die Zellzyklusprogression hin. Dabei scheint LAP* die Expression von c-Myc während der S-Phase zu hemmen, wodurch es zu einer Akkumulation von p27 kommt, die sich in der erhöhten p27-Expression in den C/EBP β -long-Zellen gezeigt hat. Normalerweise führt eine verstärkte Expression von c-Myc zu einer erhöhten Cyclin E/Cdk2-Aktivität und einer Phosphorylierung und Degradierung von p27. c-Myc hat das Potenzial durch Dimerisierung mit Max sequenzspezifisch an die DNA zu binden und dadurch die Transkription von proliferationsrelevanten Genen zu aktivieren (Bouchard et al. 1999; Müller et al. 1997; Vlach et al. 1996). Weiterhin besitzt c-Myc die Fähigkeit die Expression von Cyclin D zu beeinflussen. Studien konnten eine verminderte Expression von Cyclin D1/CDK4 bzw. CDK6 in c-Myc ko-Zellen nachweisen (Mateyak et al. 1999). Durch die LAP*-induzierte c-Myc-Hemmung kommt es zu einer verminderten Expression der Proteine Cyclin D1 und E, was darüber hinaus eine reduzierte Phosphorylierung von Rb herbeiführte. Die Anhäufung von unphosphoryliertem Rb führte vermutlich zu einer vermehrten Interaktion mit E2F1, wodurch die Progression des Zellzyklus gehemmt wird. Eine direkte Wirkung von C/EBP β auf E2F1 konnte in dieser Arbeit hingegen nicht nachgewiesen werden. Einige wichtige Zielgene von E2F1 wie PCNA und Cyclin A waren in den C/EBP β -long-Zellen expressionell nicht verändert. In Abbildung 5.1 ist die wahrscheinliche Wirkung von C/EBP β auf verschiedene Zellzyklusproteine zusammengefasst. Einerseits reduziert C/EBP β die Expression von c-Myc, andererseits aktiviert C/EBP β den Tumorsuppressor Rb, wodurch es in beiden Fällen zu einer verminderten Zellzyklusprogression kommt. Die inhibierende Wirkung von C/EBP β auf die Expression von c-Myc wurde bereits in vorherigen Studien beschrieben. Es wurde beschrieben, dass eine direkte Bindung von C/EBP β an den c-Myc-Promotor besteht und dass es dadurch zu einer verringerten Bildung von c-Myc mit gleichzeitigem Zellzyklusarrest von T-Lymphozyten kommt (Berberich-Siebelt et al. 2006). Im Gegensatz dazu war ein erhöhter mRNA-Level von c-Myc in Lebergewebe von C/EBP β ko-Mäusen detektiert

worden (Greenbaum et al. 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass C/EBP β durch direkte Bindung an den Promotor die Expression des Zellzyklusinhibitors p15 induziert und ebenso die Repression c-Mycs bewirkte (Gomis et al. 2006). Für den Nachweis einer direkten Einflussnahme von C/EBP β auf die Bildung von c-Myc in den THP-1-Zellen sollten weitergehende Untersuchungen wie die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen bzw. eine Protein-Promotor-Assoziationen unternommen werden. Beispielsweise identifizierte eine Sequenzanalyse des c-Myc-Promotors mehrere potentielle C/EBP β -Bindestellen (Daten nicht gezeigt). Außerdem ist ein direkter Einfluss von C/EBP β auf E2F sowie Rb bekannt. C/EBP β hat die Fähigkeit mit E2F und Rb direkt zu interagieren und dadurch die Autoregulation dieser Faktoren sowie die Transkription ihrer Zielgene zu modulieren (Nerlov 2007; Sebastian et al. 2005; Wang et al. 2007). C/EBP β und Rb assoziieren besonders in differenzierenden, myelomonozytären Zellen und Rb ist gleichzeitig in der Lage die Bindungsaktivität von C/EBP β an spezifische DNA-Sequenzen zu erhöhen (Chen et al. 1996b). Eine erhöhte Expression von Rb korrelierte mit einer erhöhten Bildung von C/EBP β zusammen mit einer verstärkten Interaktion (Ji und Studzinski 2004). Des Weiteren wurde in anderen Studien die Regulation von Zellzyklusinhibitoren durch C/EBP β untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Zunahme von C/EBP β mit einer vermehrten Expression von p57 korreliert. Gleichzeitig konnte in C/EBP β ko-Chondrozyten eine verminderte Bildung von p57 sowie eine schwach verringerte p21- mRNA-Expression detektiert werden (Hirata et al. 2009). Der *knock down* mittels C/EBP β -siRNA in Hepatozyten führte ebenso zu einer schwächeren Aktivierung des p21-Promotors sowie zu einer Reduzierung des Proteinlevels von p21 (Park et al. 2000). Außerdem konnte eine durch Hypoxie ausgelöste abgeschwächte C/EBP β -Aktivität die Induzierung von p27 unterbinden (Park und Park 2010). Der Einfluss von C/EBP β auf die Expression sowie Aktivität der Inhibitoren p21 und p57 *via* c-Myc wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Es wird aber vermutet, dass C/EBP β bei der Regulation der beiden Faktoren eine große Rolle spielt, da bekanntermaßen c-Myc eine inhibierende Wirkung auf die Proteine der Cip/Kip-Familie zeigte (Vlach et al. 1996; Bouchard et al. 1999; Perez-Roger et al. 1999). Auch eine transkriptionelle Regulation des Cyclin A2-Promotors durch C/EBP β (LAP* und LIP) konnte nicht nachgewiesen werden. Eine Hemmung der Transkription des Cyclin E1-Promotors durch LAP* konnte im Gegensatz dazu zwar festgestellt werden, da aber bisher keine C/EBP β -Bindestellen im Cyclin E1-Promotor gefunden wurden (Analyse des Promotors mit TFSEARCH), erscheint eine indirekte Regulation von Cyclin E1 als wahrscheinlich.

Des Weiteren hat sich bei der Akuten-Phase-Reaktion gezeigt, dass C/EBP β die Fähigkeit besitzt proinflammatorische Cytokine und andere makrophagenaktivierende Faktoren zu

regulieren (Chang et al. 1990). Unter anderem kann C/EBP β an ein IL-1-*responsive*-Element des IL-6-Gens binden und so die Expression von IL-6 modulieren (Natsuka et al. 1992; Akira et al. 1990). Daher wurde hier die Analyse der transkriptionellen Aktivität des IL-6-Promotors und der C/EBP β Consensus Sequenz als Positivkontrolle eingesetzt (Abb. 4.18). In dieser Arbeit konnte eine direkte Einflussnahme von C/EBP β auf die Transkription des IL-6-Promotors nicht nachgewiesen werden. Vermutlich hätte eine Stimulierung des Promotors mit LPS zu einer transkriptionellen Aktivierung durch C/EBP β geführt (Su et al. 2003; Ray und Ray 1995). Ebenso hat sich gezeigt, dass C/EBP β nur in Verbindung mit NF κ B die Transkription von IL-6 verstärkt (Xiao et al. 2004; Stein und Yang 1995). Wie erwartet konnte aber eine erhöhte Aktivität an der C/EBP β Consensus Sequenz durch LAP* gezeigt werden. LIP hatte im Gegensatz dazu keine Wirkung auf die durch die Consensus Sequenz regulierte Transkription.

Wie bereits erwähnt hat C/EBP β einen aktivierenden Einfluss auf die Expression von Rb. Es wurde vermutet, dass die Stimulierung von Rb durch eine Protein-Protein- bzw. Protein-DNA-Bindung verursacht wurde. Eine direkte Proteinbindung von C/EBP β und Rb in den C/EBP β -long- und C/EBP β -short-Zellen wurde zwar mit einer Co-Immunpräzipitation nachgewiesen, aber diese ist vermutlich nicht für die veränderte Proteinexpression von Rb verantwortlich, da auch in den Kontrollzellen SF91 eine Assoziation detektiert wurde (Abb. 4.13). Die Überexpression von C/EBP β in den stabilen Zelllinien war vermutlich nicht ausreichend hoch, um eine Differenz zu den Kontrollzellen bei der Analyse der Proteininteraktion von C/EBP β und Rb zu detektieren, da wie bereits erwähnt in den Kontrollzellen ebenfalls C/EBP β gebildet wird. Dennoch deutet die Assoziation von C/EBP β und Rb auf einen möglichen direkten Einfluss hin. So könnte durch die Bindung von C/EBP β und Rb die Phosphorylierung von Rb zumindest zeitweise blockiert werden, wodurch die Interaktion mit Rb und E2F stabilisiert werden könnte. Dies würde sich in dem bereits beschriebenen Zellzyklusarrest äußern, da für die Zellteilung wichtige Zielgene, wie die Cycline oder c-Myc, durch E2F nicht aktiviert werden könnten. Des Weiteren wurde angenommen, dass die Interaktion mit C/EBP β die Stabilität von Rb beeinflusst. Für die Untersuchung der Halbwertszeit von Rb wurden daher C/EBP β -long, C/EBP β -short und SF91 mit dem Translationshemmer CHX behandelt. Die Applikation erbrachte allerdings bei allen drei Zelllinien eine Halbwertszeit von schätzungsweise vier Stunden (Abb. 4.14). Demnach hat C/EBP β unter den genannten Bedingungen keinen Einfluss auf die Stabilität von Rb. Des Weiteren konnte durch die Durchführung einer Chromatin-Immunopräzipitation eine Bindung von C/EBP β an die verschiedenen Bindestellen der Promotoren von Rb und E2F1 in C/EBP β stabil überexprimierenden Zellen ausgeschlossen werden (Abb. 3.19). Eine transkriptionelle Aktivierung oder Reprimierung der Promotoren von Rb und E2F1 durch C/EBP β konnte anhand eines

Reporter-Gen-Assays in THP-1-Zellen ebenfalls nicht nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten). Die hier gezeigten Ergebnisse deuten daher sowohl auf eine direkte als auch indirekte Einflussnahme von C/EBP β auf die Proteinexpression und Phosphorylierung von Rb hin. Insgesamt lassen die Daten den Schluss zu, dass C/EBP β durch die Reduzierung der Expression von c-Myc die Bildung der in der Zellzyklus-Signalkaskade abwärts gelegenen Proteine reguliert und dadurch auch die Konzentration und die Phosphorylierung von Rb moduliert. Der Nachweis einer Proteinbindung von C/EBP β und Rb scheint auch auf eine direkte Wirkung hinzuweisen. Diese Annahme wird auch durch die Ergebnisse unterstützt, dass LIP ebenfalls die Expression von Rb und pRb-Ser780, beeinflusst, aber im Gegensatz dazu keine Auswirkung auf andere untersuchte Proteine des Zellzyklus hatte.

5.1.4 Der Einfluss von C/EBP β auf die Apoptose

Viele physiologische Prozesse, wie die exakte Entwicklung von Gewebe oder die Homeostase, setzen ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose voraus. Es gibt auffallende Verbindungen zwischen den Regulatoren dieser beiden zellulären Vorgänge. Eine basiert auf der Beobachtung, dass langsam wachsende Krebsformen, wie die chronische lymphatische Leukämie, das non-Hodgkin-Lymphom oder auch das multiple Myelom, die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 sowie Bcl-xL überexprimieren (Robertson et al. 1996; Winter et al. 1998; Puthier et al. 1999), wobei diese nicht nur die Apoptose inhibieren, sondern auch den Eintritt in den Zellzyklus unterbinden (Mazel et al. 1996; O'Reilly et al. 1996).

Apoptose umfasst den Prozess des programmierten Zelltods und spielt bei der Steuerung vieler biologischer Vorgänge wie Zellentwicklung, Differenzierung, Proliferation und Regulation des Immunsystems eine Rolle. Apoptose wird durch eine Reihe von intrinsischen und extrinsischen Signalen kontrolliert, die sich entweder positiv oder negativ auf ihren Verlauf auswirken können. Eine Dysregulation des programmierten Zelltods resultiert oft in der Entstehung von Krebs, Autoimmunerkrankungen oder auch neurodegenerativen Erkrankungen (Fadeel et al. 1999). C/EBP β spielt bei der Regulation der Apoptose ebenfalls eine wichtige Rolle. Es hat sich beispielsweise gezeigt, dass C/EBP β die Hochregulierung des Bcl-2-Proteins in Lymphomazellen und von Bcl-2 und Bcl-xL in pankreatischen Tumorzellen vermittelt (Heckman et al. 2003; Shimizu et al. 2007). Außerdem scheint C/EBP β ein essentieller Regulator für das Überleben von großen anaplastischen Zellen (Piva et al. 2006), myeloiden Tumorzellen (Wessells et al.

2004), multiplen Myelomazellen (Pal et al. 2009) und Neuroblastomazellen zu sein (Cortes-Canteli et al. 2001). In dieser Arbeit konnte C/EBP β ebenfalls als bedeutender Faktor bei der Regulation der Apoptose von monozytären Zellen identifiziert werden. In unbehandelten C/EBP β -überexprimierenden THP-1-Zellen wurde eine leicht verringerte Apoptoserate, detektiert durch eine Annexin V-Färbung, nachgewiesen (Abb. 4.6). Nach einer Apoptose-Induktion durch UV-Applikation konnte C/EBP β die Anzahl apoptotischer Zellen verringern, wobei LIP einen stärkeren Effekt als die größeren Isoformen hatte (Abb. 4.7). Die Anwendung einer stärkeren UV-Dosis hatte darüber hinaus auch eine stärkere Hemmung der Apoptose durch C/EBP β zur Folge. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass C/EBP β direkt an der Inhibition der durch UV-Strahlung induzierten Apoptose beteiligt ist. Das konnte ebenfalls in früheren Studien gezeigt werden. In primären Sternzellen führte ein *knock out* von C/EBP β zu einer 9-mal höheren Anzahl an apoptotischen Zellen im Vergleich zu den wt-Zellen. Ebenso führte die Verabreichung eines Lebertoxins bei den C/EBP β ko-Zellen zu einer Erhöhung der Apoptose sowie der Caspase 3-Expression. Darüber hinaus konnte eine verminderte Expression und eine verstärkte Interaktion der Procaspasen 1 sowie 8 durch p-C/EBP β hervorgerufen werden (Buck et al. 2001). Gleichmaßen wurde in C/EBP β ko-Keratinocyten eine deutlich höhere Apoptoserate festgestellt als bei den wt-Zellen, die durch UV-Strahlung noch verstärkt werden konnte (Ewing et al. 2008). Interessanterweise wurde bei PMA-induzierten THP-1-Zellen eine vermehrte Resistenz gegen apoptotische Stimuli wie Staurosporin und UV-Strahlung detektiert (Daigneault et al. 2010). Dies könnte mit der erhöhten C/EBP β -Expression durch Verabreichung von PMA bei monozytären Zellen zusammenhängen. Wie auch in den vorherigen Kapiteln beschrieben konnte eine Verminderung der c-Myc-Expression durch eine vermehrte Expression von C/EBP β detektiert werden. Die Inhibierung von c-Myc könnte eine mögliche Ursache sein, die zu der verminderten Apoptose durch die verstärkte Expression von C/EBP β führte, da c-Myc als potenter Aktivator der Apoptose gilt. Dies kann über einen p53-abhängigen oder -unabhängigen Signalweg vermittelt werden, was ebenfalls zelltypabhängig ist (Hermeking und Eick 1994; Wagner et al. 1994; Hsu et al. 1995; Sakamuro et al. 1995). Für eine weitergehende Aufklärung bei der Wirkung von C/EBP β auf apoptotische Signalwege wäre es interessant den nekrotischen Zellanteil durch eine Propidiumjodid-Färbung bei den THP-1 zu untersuchen sowie die Regulation der Effektorcaspasen (wie zum Beispiel Caspase 3, Caspase 6 oder Caspase 7) oder der Initiatorcaspasen (Caspase 8 und Caspase 9) durch C/EBP β zu bestimmen, da Caspasen als zentrale Initiatoren bei der Modulation des apoptotischen Signalwegs gelten (Earnshaw et al. 1999). Sinnvoll wäre ebenfalls die Wirkung von C/EBP β auf den Prozess der Apoptose nach Verabreichung von chemischen Stoffen, wie dem

Proteinkinaseinhibitor Staurosporin zu analysieren. Es ist zu erwarten, dass sich, wie bei der UV-induzierten Apoptose, die Zahl an apoptotischen Zellen durch C/EBP β deutlich reduziert. Wie bereits erwähnt, konnte ein durch Staurosporin ausgelöster Zelltod durch C/EBP β verhindert werden (Daigneault et al. 2010). Desgleichen wäre die Untersuchung der Expression des Tumorsuppressors p53 in den C/EBP β -überexprimierenden Zellen bedeutend. Es ist bekannt, dass C/EBP β und p53 physisch interagieren und dass in C/EBP β ko-Zellen die Bildung von p53 hochreguliert ist (Schneider-Merck et al. 2006; Ewing et al. 2008). Der p53-Proteinlevel steigt in der Zelle auf Grund von gentoxischem Stress wie beispielsweise UV-Strahlung, DNA-schädigende Agenzien, Hypoxie oder Hitzeschock akut an (Appella und Anderson 2001; Chao et al 2000; Oren 1999). Die dabei erfolgte posttranslationale Modifikation führt zu einer Akkumulation des Proteins und zur nachfolgenden Transaktivierung von Genen, die bei Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und der Induktion der Apoptose eine Rolle spielen (May und May 1999). Die verminderte Apoptoserate der C/EBP β stabil überexprimierenden Zellen könnte demzufolge durch die Inhibierung von p53 hervorgerufen worden sein.

5.1.5 Ausblick

C/EBP β ist in der Lage die Proliferation von monozytären und Makrophagen-ähnlichen Zellen sowohl positiv als auch negativ zu beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die große Isoform LAP* einen inhibierenden und die kleine Isoform LIP einen verstärkenden Einfluss auf die Proliferation von THP-1-Zellen hat. Weiterhin wurde das Wachstum durch einen *knock out* von C/EBP β in Makrophagen-ähnlichen-Zellen stark induziert. Diese Proliferationserhöhung konnte ebenso durch eine erhöhte Akkumulation der Zellen in der S-Phase sowie durch die vermehrte Expression zellzyklusaktivierender Proteine und durch die verringerte Bildung von proliferationsinhibierenden Proteinen bestätigt werden. Daher könnten LAP* bzw. LIP funktionell sowohl als Tumorsuppressor als auch als potenzielles Proto-Onkogen fungieren. Weitere Untersuchungen zur Regulation der Expression der C/EBP β -Isoformen könnten daher zum Verständnis der Entstehung von Krebs und insbesondere leukämischer Erkrankungen beitragen und somit die Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Ansätze verbessern. Für nachfolgende Analysen wäre die weitere Charakterisierung der C/EBP β -long-, C/EBP β -short- sowie der C/EBP β ko-Zellen notwendig. Denkbar wäre der Einsatz von siRNA in den C/EBP β -long-Zellen, um eine Reduzierung des proliferationsinhibierenden Effekts zu überprüfen. Umgekehrt könnte

eine Retransfizierung von C/EBP β in den C/EBP β ko-Zellen zu einer Reduzierung des Zellwachstums führen. Die meisten Therapieformen zur Bekämpfung von Leukämien beruhen auf der Hemmung von DNA-Polymerasen, der Inhibierung der Topoisomerase II und der DNA-Interkalationen, was zu Doppelstrangbrüchen und letztendlich zur Reduzierung der Zellproliferation führt. Ein alternativer Therapieansatz stellt die Verabreichung von ATRA bzw. die Applikation von Vitamin D-Präparaten dar, um so die Differenzierung der unreifen leukämischen Zellen zu induzieren. Zu untersuchen wäre, ob die Applikation dieser Substanzen auch Einfluss auf die C/EBP β -Expression sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hätte. Ebenso könnte die Behandlung von CDDO (2-Cyan-3,12-dioxo-1,9-dien-28-oleanolsäure), einem chemopräventiven Zytostatikum, ein vielversprechender Ansatz sein, die Bildung von LAP* zu erhöhen bzw. LIP zu reduzieren und so die Differenzierung von Leukämiezellen zu bewirken. Beispielsweise haben Untersuchungen gezeigt, dass CDDO die Translation von C/EBP α induzieren und die p42/p30-Ratio zu Gunsten der größeren Isoform verändern kann (Koschmieder et al. 2007). Zukünftig könnten die Ergebnisse auch genutzt werden, um mittels Gentherapie oder durch Anwendung von molekularen Therapien der akuten monozytären Leukämie entgegenzuwirken. Bestimmte Fusionspeptide (TAT oder VP22) oder auch lenitvirale Vektoren, die den Eintritt in die Zelle ermöglichen sind hilfreiche Methoden, um dies zu ermöglichen (Zhou et al. 2008; Miyoshi et al. 1999). Außerdem könnte eine Überexpression im Mausmodel Aufschluss über eine mögliche proto-onkogene Funktion von C/EBP β geben.

Während die Analyse des C/EBP β -Einflusses auf die Proliferation ziemlich eindeutig war, konnte die Untersuchung der Differenzierung von monozytären Zellen hingegen einen gegensätzlichen Effekt von C/EBP β aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der C/EBP β -Isoformen keine Morphologieänderung erbrachte, wohingegen der *knock out* von C/EBP β zu einer Hemmung der Differenzierung führte. Für die weitere Analyse zum Einfluss von C/EBP β auf die Differenzierung müsste die Expression monozytärer Differenzierungsmarker, z.B. CD11b (Mac-1), CD14 oder dem Scavenger-Rezeptor untersucht werden. Ebenso wäre das stabile oder transiente Einbringen von siRNA in die THP-1-Zellen und die dadurch bedingte Herunterregulierung von C/EBP β ein möglicher Ansatz, um einen Einfluss auf zelluläre Prozesse während der monozytären Entwicklung zu untersuchen. Darüber hinaus liegt durch die hier dargestellten Ergebnisse die Vermutung nahe, dass C/EBP β ein wichtiger Faktor bei der Regulation der Apoptose ist. Dazu sollten allerdings noch Expressionanalysen z.B. der Caspasen, Proteine der Bcl-2-Familie oder auch von p53 durchgeführt werden. Ebenfalls wäre ein stabiler oder induzierbarer *knock out* von C/EBP β in den THP-1-Zellen ein interessanter Ansatz um die Rolle von C/EBP β bei zellulären Prozessen wie Proliferation,

Apoptose oder Differenzierung funktionell im myelomonozytären System zu charakterisieren.

Referenzen

- Afrasiabi E, Ahlgren J, Bergelin N, Tornquist K. 2008. Phorbol 12-myristate 13-acetate inhibits FRO anaplastic human thyroid cancer cell proliferation by inducing cell cycle arrest in G1/S phase: evidence for an effect mediated by PKCdelta. *Molecular and cellular endocrinology* **292**: 26-35.
- Akagi T, Thoennissen NH, George A, Crooks G, Song JH, Okamoto R, Nowak D, Gombart AF, Koeffler HP. 2010. In vivo deficiency of both C/EBPbeta and C/EBPepsilon results in highly defective myeloid differentiation and lack of cytokine response. *PLoS one* **5**: e15419.
- Akasaka T, Balasas T, Russell LJ, Sugimoto KJ, Majid A, Walewska R, Karran EL, Brown DG, Cain K, Harder L et al. 2007. Five members of the CEBP transcription factor family are targeted by recurrent IGH translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). *Blood* **109**: 3451-3461.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**: 193-197.
- Akira S, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T, Hirano T, Kishimoto T. 1990. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *The EMBO journal* **9**: 1897-1906.
- Alam T, An MR, Papaconstantinou J. 1992. Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response. *The Journal of biological chemistry* **267**: 5021-5024.
- Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, Carbone DP, Gabrilovich DI. 2000. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **6**: 1755-1766.
- Amundson SA, Zhan Q, Penn LZ, Fornace AJ, Jr. 1998. Myc suppresses induction of the growth arrest genes gadd34, gadd45, and gadd153 by DNA-damaging agents. *Oncogene* **17**: 2149-2154.
- Angel P, Allegretto EA, Okino ST, Hattori K, Boyle WJ, Hunter T, Karin M. 1988. Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature* **332**: 166-171.
- Antonson P, Stellan B, Yamanaka R, Xanthopoulos KG. 1996. A novel human CCAAT/enhancer binding protein gene, C/EBPepsilon, is expressed in cells of lymphoid and myeloid lineages and is localized on chromosome 14q11.2 close to the T-cell receptor alpha/delta locus. *Genomics* **35**: 30-38.
- Antonson P, Xanthopoulos KG. 1995. Molecular cloning, sequence, and expression patterns of the human gene encoding CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha). *Biochemical and biophysical research communications* **215**: 106-113.

-
- Appella E, Anderson CW. 2001. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *European journal of biochemistry / FEBS* **268**: 2764-2772.
- Aprelikova O, Xiong Y, Liu ET. 1995. Both p16 and p21 families of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors block the phosphorylation of cyclin-dependent kinases by the CDK-activating kinase. *The Journal of biological chemistry* **270**: 18195-18197.
- Arellano M, Moreno S. 1997. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *The international journal of biochemistry & cell biology* **29**: 559-573.
- Askew DS, Ashmun RA, Simmons BC, Cleveland JL. 1991. Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* **6**: 1915-1922.
- Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. 2009. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology* **27**: 669-692.
- Auwerx J. 1991. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* **47**: 22-31.
- Bae EJ, Kim SG. 2005. Enhanced CCAAT/enhancer-binding protein beta-liver-enriched inhibitory protein production by Oltipraz, which accompanies CUG repeat-binding protein-1 (CUGBP1) RNA-binding protein activation, leads to inhibition of preadipocyte differentiation. *Molecular pharmacology* **68**: 660-669.
- Baer M, Johnson PF. 2000. Generation of truncated C/EBPbeta isoforms by in vitro proteolysis. *The Journal of biological chemistry* **275**: 26582-26590.
- Bagchi MK, Mantena SR, Kannan A, Bagchi IC. 2006. Control of uterine cell proliferation and differentiation by C/EBPbeta: functional implications for establishment of early pregnancy. *Cell cycle* **5**: 922-925.
- Bartek J, Lukas C, Lukas J. 2004. Checking on DNA damage in S phase. *Nature reviews Molecular cell biology* **5**: 792-804.
- Berberich-Siebelt F, Berberich I, Andrulis M, Santner-Nanan B, Jha MK, Klein-Hessling S, Schimpl A, Serfling E. 2006. SUMOylation interferes with CCAAT/enhancer-binding protein beta-mediated c-myc repression, but not IL-4 activation in T cells. *Journal of immunology* **176**: 4843-4851.
- Birkenmeier EH, Gwynn B, Howard S, Jerry J, Gordon JI, Landschulz WH, McKnight SL. 1989. Tissue-specific expression, developmental regulation, and genetic mapping of the gene encoding CCAAT/enhancer binding protein. *Genes & development* **3**: 1146-1156.
- Bouchard C, Thieke K, Maier A, Saffrich R, Hanley-Hyde J, Ansorge W, Reed S, Sicinski P, Bartek J, Eilers M. 1999. Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *The EMBO journal* **18**: 5321-5333.

-
- Brackman D, Lund-Johansen F, Aarskog D. 1995. Expression of cell surface antigens during the differentiation of HL-60 cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃, retinoic acid and DMSO. *Leukemia research* **19**: 57-64.
- Bradbury EM, Inglis RJ, Matthews HR, Langan TA. 1974. Molecular basis of control of mitotic cell division in eukaryotes. *Nature* **249**: 553-556.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254.
- Brehm A, Kouzarides T. 1999. Retinoblastoma protein meets chromatin. *Trends in biochemical sciences* **24**: 142-145.
- Buchkovich K, Duffy LA, Harlow E. 1989. The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* **58**: 1097-1105.
- Buck M, Poli V, Hunter T, Chojkier M. 2001. C/EBPbeta phosphorylation by RSK creates a functional XEXD caspase inhibitory box critical for cell survival. *Molecular cell* **8**: 807-816.
- Buck M, Poli V, van der Geer P, Chojkier M, Hunter T. 1999. Phosphorylation of rat serine 105 or mouse threonine 217 in C/EBP beta is required for hepatocyte proliferation induced by TGF alpha. *Molecular cell* **4**: 1087-1092.
- Buck M, Turler H, Chojkier M. 1994. LAP (NF-IL-6), a tissue-specific transcriptional activator, is an inhibitor of hepatoma cell proliferation. *The EMBO journal* **13**: 851-860.
- Bulavin DV, Phillips C, Nannenga B, Timofeev O, Donehower LA, Anderson CW, Appella E, Fornace AJ, Jr. 2004. Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nature genetics* **36**: 343-350.
- Calkhoven CF, Muller C, Leutz A. 2000. Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression. *Genes & development* **14**: 1920-1932.
- Calkhoven CF, Muller C, Leutz A. 2002. Translational control of gene expression and disease. *Trends in molecular medicine* **8**: 577-583.
- Cao Z, Umek RM, McKnight SL. 1991. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes & development* **5**: 1538-1552.
- Carnero A, Hannon GJ. 1998. The INK4 family of CDK inhibitors. *Current topics in microbiology and immunology* **227**: 43-55.
- Celada A, Borrás FE, Soler C, Lloberas J, Klemsz M, van Beveren C, McKercher S, Maki RA. 1996. The transcription factor PU.1 is involved in macrophage proliferation. *The Journal of experimental medicine* **184**: 61-69.
- Cerda SR, Mustafi R, Little H, Cohen G, Khare S, Moore C, Majumder P, Bissonnette M. 2006. Protein kinase C delta inhibits Caco-2 cell proliferation by selective changes in cell cycle and cell death regulators. *Oncogene* **25**: 3123-3138.

-
- Cesena TI, Cardinaux JR, Kwok R, Schwartz J. 2007. CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) beta is acetylated at multiple lysines: acetylation of C/EBPbeta at lysine 39 modulates its ability to activate transcription. *The Journal of biological chemistry* **282**: 956-967.
- Chang CJ, Chen TT, Lei HY, Chen DS, Lee SC. 1990. Molecular cloning of a transcription factor, AGP/EBP, that belongs to members of the C/EBP family. *Molecular and cellular biology* **10**: 6642-6653.
- Chao C, Saito S, Kang J, Anderson CW, Appella E, Xu Y. 2000. p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage. *The EMBO journal* **19**: 4967-4975.
- Charles A, Tang X, Crouch E, Brody JS, Xiao ZX. 2001. Retinoblastoma protein complexes with C/EBP proteins and activates C/EBP-mediated transcription. *Journal of cellular biochemistry* **83**: 414-425.
- Chen H, Lin RJ, Xie W, Wilpitz D, Evans RM. 1999. Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* **98**: 675-686.
- Chen HM, Zhang P, Voso MT, Hohaus S, Gonzalez DA, Glass CK, Zhang DE, Tenen DG. 1995. Neutrophils and monocytes express high levels of PU.1 (Spi-1) but not Spi-B. *Blood* **85**: 2918-2928.
- Chen PL, Riley DJ, Chen Y, Lee WH. 1996. Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. *Genes & development* **10**: 2794-2804.
- Chen PL, Riley DJ, Chen-Kiang S, Lee WH. 1996b. Retinoblastoma protein directly interacts with and activates the transcription factor NF-IL6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 465-469.
- Chen S, Han YH, Zheng Y, Zhao M, Yan H, Zhao Q, Chen GQ, Li D. 2009. NDRG1 contributes to retinoic acid-induced differentiation of leukemic cells. *Leukemia research* **33**: 1108-1113.
- Chen X, Liu W, Ambrosino C, Ruocco MR, Poli V, Romani L, Quinto I, Barbieri S, Holmes KL, Venuta S et al. 1997. Impaired generation of bone marrow B lymphocytes in mice deficient in C/EBPbeta. *Blood* **90**: 156-164.
- Cheng T, Shen H, Giokas D, Gere J, Tenen DG, Scadden DT. 1996. Temporal mapping of gene expression levels during the differentiation of individual primary hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 13158-13163.
- Chih DY, Chumakov AM, Park DJ, Silla AG, Koeffler HP. 1997. Modulation of mRNA expression of a novel human myeloid-selective CCAAT/enhancer binding protein gene (C/EBP epsilon). *Blood* **90**: 2987-2994.
- Choy L, Derynck R. 2003. Transforming growth factor-beta inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function. *The Journal of biological chemistry* **278**: 9609-9619.

-
- Clark WH. 1991. Tumour progression and the nature of cancer. *British journal of cancer* **64**: 631-644.
- Collins SJ. 1987. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* **70**: 1233-1244.
- Cooper C, Henderson A, Artandi S, Avitahl N, Calame K. 1995. Ig/EBP (C/EBP gamma) is a transdominant negative inhibitor of C/EBP family transcriptional activators. *Nucleic acids research* **23**: 4371-4377.
- Cortes-Canteli M, Pignatelli M, Santos A, Perez-Castillo A. 2002. CCAAT/enhancer-binding protein beta plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells. *The Journal of biological chemistry* **277**: 5460-5467.
- Dahl R, Walsh JC, Lancki D, Laslo P, Iyer SR, Singh H, Simon MC. 2003. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nature immunology* **4**: 1029-1036.
- Dai CY, Enders GH. 2000. p16 INK4a can initiate an autonomous senescence program. *Oncogene* **19**: 1613-1622.
- Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. 2010. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PloS one* **5**: e8668.
- Dakic A, Metcalf D, Di Rago L, Mifsud S, Wu L, Nutt SL. 2005. PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. *The Journal of experimental medicine* **201**: 1487-1502.
- Dearth LR, Hutt J, Sattler A, Gigliotti A, DeWille J. 2001. Expression and function of CCAAT/enhancer binding proteinbeta (C/EBPbeta) LAP and LIP isoforms in mouse mammary gland, tumors and cultured mammary epithelial cells. *Journal of cellular biochemistry* **82**: 357-370.
- DeGregori J. 2002. The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles. *Biochimica et biophysica acta* **1602**: 131-150.
- Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. 2005. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* **105**: 2640-2653.
- Descombes P, Chojkier M, Lichtsteiner S, Falvey E, Schibler U. 1990. LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. *Genes & development* **4**: 1541-1551.
- Descombes P, Schibler U. 1991. A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* **67**: 569-579.
- Devalia V, Thomas NS, Roberts PJ, Jones HM, Linch DC. 1992. Down-regulation of human protein kinase C alpha is associated with terminal neutrophil differentiation. *Blood* **80**: 68-76.
- Dimova DK, Dyson NJ. 2005. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* **24**: 2810-2826.

-
- Drexler HG, Quentmeier H, MacLeod RA. 2004. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of MLL gene alterations. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* **18**: 227-232.
- Duprez E, Wagner K, Koch H, Tenen DG. 2003. C/EBPbeta: a major PML-RARA-responsive gene in retinoic acid-induced differentiation of APL cells. *The EMBO journal* **22**: 5806-5816.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual review of biochemistry* **68**: 383-424.
- Eaton EM, Hanlon M, Bundy L, Sealy L. 2001. Characterization of C/EBPbeta isoforms in normal versus neoplastic mammary epithelial cells. *Journal of cellular physiology* **189**: 91-105.
- Eaton EM, Sealy L. 2003. Modification of CCAAT/enhancer-binding protein-beta by the small ubiquitin-like modifier (SUMO) family members, SUMO-2 and SUMO-3. *The Journal of biological chemistry* **278**: 33416-33421.
- Efimova T, Deucher A, Kuroki T, Ohba M, Eckert RL. 2002. Novel protein kinase C isoforms regulate human keratinocyte differentiation by activating a p38 delta mitogen-activated protein kinase cascade that targets CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *The Journal of biological chemistry* **277**: 31753-31760.
- Eilers M. 1999. Control of cell proliferation by Myc family genes. *Molecules and cells* **9**: 1-6.
- Eischen CM, Weber JD, Roussel MF, Sherr CJ, Cleveland JL. 1999. Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes & development* **13**: 2658-2669.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**: 817-825.
- Estey E, Dohner H. 2006. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* **368**: 1894-1907.
- Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC. 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* **69**: 119-128.
- Ewing SJ, Zhu S, Zhu F, House JS, Smart RC. 2008. C/EBPbeta represses p53 to promote cell survival downstream of DNA damage independent of oncogenic Ras and p19(Arf). *Cell death and differentiation* **15**: 1734-1744.
- Fadeel B, Zhivotovsky B, Orrenius S. 1999. All along the watchtower: on the regulation of apoptosis regulators. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **13**: 1647-1657.
- Feng R, Desbordes SC, Xie H, Tillo ES, Pixley F, Stanley ER, Graf T. 2008. PU.1 and C/EBPalpha/beta convert fibroblasts into macrophage-like cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 6057-6062.

-
- Flodby P, Barlow C, Kylefjord H, Ahrlund-Richter L, Xanthopoulos KG. 1996. Increased hepatic cell proliferation and lung abnormalities in mice deficient in CCAAT/enhancer binding protein alpha. *The Journal of biological chemistry* **271**: 24753-24760.
- Fornace AJ, Jr., Nebert DW, Hollander MC, Luethy JD, Papathanasiou M, Fargnoli J, Holbrook NJ. 1989. Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. *Molecular and cellular biology* **9**: 4196-4203.
- Franklin DS, Xiong Y. 1996. Induction of p18INK4c and its predominant association with CDK4 and CDK6 during myogenic differentiation. *Molecular biology of the cell* **7**: 1587-1599.
- Gage JR, Meyers C, Wettstein FO. 1990. The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *Journal of virology* **64**: 723-730.
- Gagliardi M, Maynard S, Miyake T, Rodrigues N, Tjew SL, Cabannes E, Bedard PA. 2003. Opposing roles of C/EBPbeta and AP-1 in the control of fibroblast proliferation and growth arrest-specific gene expression. *The Journal of biological chemistry* **278**: 43846-43854.
- Galaktionov K, Chen X, Beach D. 1996. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* **382**: 511-517.
- Gheorghiu I, Deschenes C, Blais M, Boudreau F, Rivard N, Asselin C. 2001. Role of specific CCAAT/enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* **276**: 44331-44337.
- Gocek E, Kielbinski M, Burska H, Haus O, Kutner A, Marcinkowska E. 2010. Different susceptibilities to 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced differentiation of AML cells carrying various mutations. *Leukemia research* **34**: 649-657.
- Goethe R, Basler T, Phi-van L. 2007. Regulation of C/EBPbeta mRNA expression and C/EBPbeta promoter activity by protein kinases A and C in a myelomonocytic cell line (HD11). *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* **56**: 274-281.
- Gomis RR, Alarcon C, Nadal C, Van Poznak C, Massague J. 2006. C/EBPbeta at the core of the TGFbeta cytostatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells. *Cancer cell* **10**: 203-214.
- Gorgoni B, Maritano D, Marthyn P, Righi M, Poli V. 2002. C/EBP beta gene inactivation causes both impaired and enhanced gene expression and inverse regulation of IL-12 p40 and p35 mRNAs in macrophages. *Journal of immunology* **168**: 4055-4062.
- Greenbaum LE, Li W, Cressman DE, Peng Y, Ciliberto G, Poli V, Taub R. 1998. CCAAT enhancer-binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *The Journal of clinical investigation* **102**: 996-1007.
- Gregory TK, Wald D, Chen Y, Vermaat JM, Xiong Y, Tse W. 2009. Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Journal of hematology & oncology* **2**: 23.

-
- Grimm SL, Rosen JM. 2003. The role of C/EBPbeta in mammary gland development and breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **8**: 191-204.
- Guerzoni C, Bardini M, Mariani SA, Ferrari-Amorotti G, Neviani P, Panno ML, Zhang Y, Martinez R, Perrotti D, Calabretta B. 2006. Inducible activation of CEBPB, a gene negatively regulated by BCR/ABL, inhibits proliferation and promotes differentiation of BCR/ABL-expressing cells. *Blood* **107**: 4080-4089.
- Gutsch R, Kandemir JD, Pietsch D, Cappello C, Meyer J, Simanowski K, Huber R, Brand K. 2011. CCAAT/enhancer-binding protein beta inhibits proliferation in monocytic cells by affecting the retinoblastoma protein/E2F/cyclin E pathway but is not directly required for macrophage morphology. *The Journal of biological chemistry* **286**: 22716-22729.
- Haas SC, Huber R, Gutsch R, Kandemir JD, Cappello C, Krauter J, Duyster J, Ganser A, Brand K. 2010. ITD- and FL-induced FLT3 signal transduction leads to increased C/EBPbeta-LIP expression and LIP/LAP ratio by different signalling modules. *British journal of haematology* **148**: 777-790.
- Hall M, Peters G. 1996. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Advances in cancer research* **68**: 67-108.
- Halmos B, Huettner CS, Kocher O, Ferenczi K, Karp DD, Tenen DG. 2002. Down-regulation and antiproliferative role of C/EBPalpha in lung cancer. *Cancer research* **62**: 528-534.
- Hamdorf M, Berger A, Schule S, Reinhardt J, Flory E. 2011. PKCdelta-induced PU.1 phosphorylation promotes hematopoietic stem cell differentiation to dendritic cells. *Stem cells* **29**: 297-306.
- Hartwell LH, Weinert TA. 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**: 629-634.
- Hata A, Akita Y, Suzuki K, Ohno S. 1993. Functional divergence of protein kinase C (PKC) family members. PKC gamma differs from PKC alpha and -beta II and nPKC epsilon in its competence to mediate-12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA)-responsive transcriptional activation through a TPA-response element. *The Journal of biological chemistry* **268**: 9122-9129.
- Hattori T, Ohoka N, Inoue Y, Hayashi H, Onozaki K. 2003. C/EBP family transcription factors are degraded by the proteasome but stabilized by forming dimer. *Oncogene* **22**: 1273-1280.
- Hayashida M, Okazaki K, Fukushi J, Sakamoto A, Iwamoto Y. 2009. CCAAT/enhancer binding protein beta mediates expression of matrix metalloproteinase 13 in human articular chondrocytes in inflammatory arthritis. *Arthritis and rheumatism* **60**: 708-716.
- Heckman CA, Wheeler MA, Boxer LM. 2003. Regulation of Bcl-2 expression by C/EBP in t(14;18) lymphoma cells. *Oncogene* **22**: 7891-7899.

-
- Hendricks-Taylor LR, Bachinski LL, Siciliano MJ, Fertitta A, Trask B, de Jong PJ, Ledbetter DH, Darlington GJ. 1992. The CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP alpha) gene (CEBPA) maps to human chromosome 19q13.1 and the related nuclear factor NF-IL6 (C/EBP beta) gene (CEBPB) maps to human chromosome 20q13.1. *Genomics* **14**: 12-17.
- Hendricks-Taylor LR, Darlington GJ. 1995. Inhibition of cell proliferation by C/EBP alpha occurs in many cell types, does not require the presence of p53 or Rb, and is not affected by large T-antigen. *Nucleic acids research* **23**: 4726-4733.
- Henriksson M, Luscher B. 1996. Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Advances in cancer research* **68**: 109-182.
- Hermeking H, Eick D. 1994. Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science* **265**: 2091-2093.
- Herold S, Wanzel M, Beuger V, Frohme C, Beul D, Hillukkala T, Syvaoja J, Saluz HP, Haenel F, Eilers M. 2002. Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Molecular cell* **10**: 509-521.
- Hinds PW, Mitnacht S, Dulic V, Arnold A, Reed SI, Weinberg RA. 1992. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* **70**: 993-1006.
- Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA, Sherr CJ. 1995. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Molecular and cellular biology* **15**: 2672-2681.
- Hirai H, Zhang P, Dayaram T, Hetherington CJ, Mizuno S, Imanishi J, Akashi K, Tenen DG. 2006. C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis. *Nature immunology* **7**: 732-739.
- Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Ohba S, Kawamura N, Ogasawara T, Kawasaki Y, Saito T, Yano F, Ikeda T et al. 2009. C/EBPbeta Promotes transition from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through transactivation of p57. *PloS one* **4**: e4543.
- Hohaus S, Petrovick MS, Voso MT, Sun Z, Zhang DE, Tenen DG. 1995. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Molecular and cellular biology* **15**: 5830-5845.
- Hsu B, Marin MC, el-Naggar AK, Stephens LC, Brisbay S, McDonnell TJ. 1995. Evidence that c-myc mediated apoptosis does not require wild-type p53 during lymphomagenesis. *Oncogene* **11**: 175-179.
- Hsu W, Kerppola TK, Chen PL, Curran T, Chen-Kiang S. 1994. Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region. *Molecular and cellular biology* **14**: 268-276.
- Hu B, Wu Z, Jin H, Hashimoto N, Liu T, Phan SH. 2004. CCAAT/enhancer-binding protein beta isoforms and the regulation of alpha-smooth muscle actin gene expression by IL-1 beta. *Journal of immunology* **173**: 4661-4668.

-
- Hueber AO, Zornig M, Lyon D, Suda T, Nagata S, Evan GI. 1997. Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. *Science* **278**: 1305-1309.
- Hurlin PJ, Queva C, Koskinen PJ, Steingrimsson E, Ayer DE, Copeland NG, Jenkins NA, Eisenman RN. 1995. Mad3 and Mad4: novel Max-interacting transcriptional repressors that suppress c-myc dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation. *The EMBO journal* **14**: 5646-5659.
- Ikizawa K, Kajiwarra K, Izuhara K, Yanagihara Y. 2001. PKCdelta and zeta mediate IL-4/IL-13-induced germline epsilon transcription in human B cells: a putative regulation via PU.1 phosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications* **288**: 34-41.
- Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, Nomiyama K, Hosokawa K, Sakurada K, Nakagata N et al. 2004. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **431**: 997-1002.
- Iwasaki H, Somoza C, Shigematsu H, Duprez EA, Iwasaki-Arai J, Mizuno S, Arinobu Y, Geary K, Zhang P, Dayaram T et al. 2005. Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood* **106**: 1590-1600.
- Iwasaki M, Adachi Y, Minamino K, Suzuki Y, Zhang Y, Okigaki M, Nakano K, Koike Y, Wang J, Mukaide H et al. 2005. Mobilization of bone marrow cells by G-CSF rescues mice from cisplatin-induced renal failure, and M-CSF enhances the effects of G-CSF. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **16**: 658-666.
- Jacobs JJ, de Lange T. 2004. Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Current biology : CB* **14**: 2302-2308.
- Jacobs JJ, Scheijen B, Voncken JW, Kieboom K, Berns A, van Lohuizen M. 1999. Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes & development* **13**: 2678-2690.
- Janeway CA, Jr., Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annual review of immunology* **20**: 197-216.
- Jasek E, Mirecka J, Litwin JA. 2008. Effect of differentiating agents (all-trans retinoic acid and phorbol 12-myristate 13-acetate) on drug sensitivity of HL60 and NB4 cells in vitro. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* **46**: 323-330.
- Ji Y, Studzinski GP. 2004. Retinoblastoma protein and CCAAT/enhancer-binding protein beta are required for 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced monocytic differentiation of HL60 cells. *Cancer research* **64**: 370-377.
- Johnson PF, McKnight SL. 1989. Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annual review of biochemistry* **58**: 799-839.
- Johnston RB, Jr. 1988. Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. *The New England journal of medicine* **318**: 747-752.

-
- Jundt F, Raetzel N, Muller C, Calkhoven CF, Kley K, Mathas S, Lietz A, Leutz A, Dorken B. 2005. A rapamycin derivative (everolimus) controls proliferation through down-regulation of truncated CCAAT enhancer binding protein {beta} and NF-{kappa}B activity in Hodgkin and anaplastic large cell lymphomas. *Blood* **106**: 1801-1807.
- Kato J, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ. 1993. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes & development* **7**: 331-342.
- Katz S, Kowenz-Leutz E, Muller C, Meese K, Ness SA, Leutz A. 1993. The NF-M transcription factor is related to C/EBP beta and plays a role in signal transduction, differentiation and leukemogenesis of avian myelomonocytic cells. *The EMBO journal* **12**: 1321-1332.
- Kim R, Emi M, Tanabe K. 2007. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* **121**: 1-14.
- King RW, Jackson PK, Kirschner MW. 1994. Mitosis in transition. *Cell* **79**: 563-571.
- Kinoshita S, Akira S, Kishimoto T. 1992. A member of the C/EBP family, NF-IL6 beta, forms a heterodimer and transcriptionally synergizes with NF-IL6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 1473-1476.
- Kleefstrom J, Vastrik I, Saksela E, Valle J, Eilers M, Alitalo K. 1994. c-Myc induces cellular susceptibility to the cytotoxic action of TNF-alpha. *The EMBO journal* **13**: 5442-5450.
- Knudson AG, Jr. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**: 820-823.
- Koff A, Ohtsuki M, Polyak K, Roberts JM, Massague J. 1993. Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF-beta. *Science* **260**: 536-539.
- Koschmieder S, D'Alo F, Radomska H, Schoneich C, Chang JS, Konopleva M, Kobayashi S, Levantini E, Suh N, Di Ruscio A et al. 2007. CDDO induces granulocytic differentiation of myeloid leukemic blasts through translational up-regulation of p42 CCAAT enhancer binding protein alpha. *Blood* **110**: 3695-3705.
- Kousteni S, Kockar FT, Sweeney GE, Ramji DP. 1998. Characterisation and developmental regulation of the *Xenopus laevis* CCAAT-enhancer binding protein beta gene. *Mechanisms of development* **77**: 143-148.
- Kowenz-Leutz E, Twamley G, Ansieau S, Leutz A. 1994. Novel mechanism of C/EBP beta (NF-M) transcriptional control: activation through derepression. *Genes & development* **8**: 2781-2791.
- Kozak M. 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**: 283-292.

-
- Kultz D, Madhany S, Burg MB. 1998. Hyperosmolality causes growth arrest of murine kidney cells. Induction of GADD45 and GADD153 by osmosensing via stress-activated protein kinase 2. *The Journal of biological chemistry* **273**: 13645-13651.
- La Rocca SA, Crouch DH, Gillespie DA. 1994. c-Myc inhibits myogenic differentiation and myoD expression by a mechanism which can be dissociated from cell transformation. *Oncogene* **9**: 3499-3508.
- Lamb J, Ramaswamy S, Ford HL, Contreras B, Martinez RV, Kittrell FS, Zahnow CA, Patterson N, Golub TR, Ewen ME. 2003. A mechanism of cyclin D1 action encoded in the patterns of gene expression in human cancer. *Cell* **114**: 323-334.
- Landschulz WH, Johnson PF, Adashi EY, Graves BJ, McKnight SL. 1988. Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP. *Genes & development* **2**: 786-800.
- Lane MD, Tang QQ, Jiang MS. 1999. Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochemical and biophysical research communications* **266**: 677-683.
- Lee CW, Sorensen TS, Shikama N, La Thangue NB. 1998. Functional interplay between p53 and E2F through co-activator p300. *Oncogene* **16**: 2695-2710.
- Li C, Yu Y, Wang Y, Liu L, Zhang M, Sugano S, Wang Z, Chang Z. 2008. Both ERK and JNK are required for enhancement of MD-2 gene expression during differentiation of HL-60 cells. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **100**: 365-375.
- Li H, Baldwin BR, Zahnow CA. 2011. LIP expression is regulated by IGF-1R signaling and participates in suppression of anoikis. *Molecular cancer* **10**: 100.
- Li Z, Schwieger M, Lange C, Kraunus J, Sun H, van den Akker E, Modlich U, Serinsoz E, Will E, von Laer D et al. 2003. Predictable and efficient retroviral gene transfer into murine bone marrow repopulating cells using a defined vector dose. *Experimental hematology* **31**: 1206-1214.
- Liebermann DA, Hoffman B. 1994. Differentiation primary response genes and proto-oncogenes as positive and negative regulators of terminal hematopoietic cell differentiation. *Stem cells* **12**: 352-369.
- Lin FT, MacDougald OA, Diehl AM, Lane MD. 1993. A 30-kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein alpha message: transcriptional activator lacking antimitotic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 9606-9610.
- Liu C, Adamson E, Mercola D. 1996. Transcription factor EGR-1 suppresses the growth and transformation of human HT-1080 fibrosarcoma cells by induction of transforming growth factor beta 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 11831-11836.
- Livneh E, Fishman DD. 1997. Linking protein kinase C to cell-cycle control. *European journal of biochemistry / FEBS* **248**: 1-9.

-
- Lowe SW, Lin AW. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* **21**: 485-495.
- Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. 1999. Acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* **341**: 1051-1062.
- Luedde T, Duderstadt M, Streetz KL, Tacke F, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. 2004. C/EBP beta isoforms LIP and LAP modulate progression of the cell cycle in the regenerating mouse liver. *Hepatology* **40**: 356-365.
- Lutz W, Fulda S, Jeremias I, Debatin KM, Schwab M. 1998. MycN and IFNgamma cooperate in apoptosis of human neuroblastoma cells. *Oncogene* **17**: 339-346.
- Mantena SR, Kannan A, Cheon YP, Li Q, Johnson PF, Bagchi IC, Bagchi MK. 2006. C/EBPbeta is a critical mediator of steroid hormone-regulated cell proliferation and differentiation in the uterine epithelium and stroma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 1870-1875.
- Mateyak MK, Obaya AJ, Sedivy JM. 1999. c-Myc regulates cyclin D-Cdk4 and -Cdk6 activity but affects cell cycle progression at multiple independent points. *Molecular and cellular biology* **19**: 4672-4683.
- May P, May E. 1999. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* **18**: 7621-7636.
- Maytin EV, Habener JF. 1998. Transcription factors C/EBP alpha, C/EBP beta, and CHOP (Gadd153) expressed during the differentiation program of keratinocytes in vitro and in vivo. *The Journal of investigative dermatology* **110**: 238-246.
- Mazel S, Burtrum D, Petrie HT. 1996. Regulation of cell division cycle progression by bcl-2 expression: a potential mechanism for inhibition of programmed cell death. *The Journal of experimental medicine* **183**: 2219-2226.
- Mazzi P, Donini M, Margotto D, Wientjes F, Dusi S. 2004. IFN-gamma induces gp91phox expression in human monocytes via protein kinase C-dependent phosphorylation of PU.1. *Journal of immunology* **172**: 4941-4947.
- Medzhitov R, Janeway C, Jr. 2000. Innate immunity. *The New England journal of medicine* **343**: 338-344.
- Meng A, Wang Y, Van Zant G, Zhou D. 2003. Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells. *Cancer research* **63**: 5414-5419.
- Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE, Verma IM, Torbett BE. 1999. Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* **283**: 682-686.
- Molinari M. 2000. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell proliferation* **33**: 261-274.
- Morgan DO. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annual review of cell and developmental biology* **13**: 261-291.

-
- Morosetti R, Park DJ, Chumakov AM, Grillier I, Shiohara M, Gombart AF, Nakamaki T, Weinberg K, Koeffler HP. 1997. A novel, myeloid transcription factor, C/EBP epsilon, is upregulated during granulocytic, but not monocytic, differentiation. *Blood* **90**: 2591-2600.
- Morse L, Chen D, Franklin D, Xiong Y, Chen-Kiang S. 1997. Induction of cell cycle arrest and B cell terminal differentiation by CDK inhibitor p18(INK4c) and IL-6. *Immunity* **6**: 47-56.
- Mosior M, Newton AC. 1995. Mechanism of interaction of protein kinase C with phorbol esters. Reversibility and nature of membrane association. *The Journal of biological chemistry* **270**: 25526-25533.
- Muller C, Kowenz-Leutz E, Grieser-Ade S, Graf T, Leutz A. 1995. NF-M (chicken C/EBP beta) induces eosinophilic differentiation and apoptosis in a hematopoietic progenitor cell line. *The EMBO journal* **14**: 6127-6135.
- Muller D, Bouchard C, Rudolph B, Steiner P, Stuckmann I, Saffrich R, Ansorge W, Huttner W, Eilers M. 1997. Cdk2-dependent phosphorylation of p27 facilitates its Myc-induced release from cyclin E/cdk2 complexes. *Oncogene* **15**: 2561-2576.
- Nakajima T, Kinoshita S, Sasagawa T, Sasaki K, Naruto M, Kishimoto T, Akira S. 1993. Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 2207-2211.
- Natsuka S, Akira S, Nishio Y, Hashimoto S, Sugita T, Isshiki H, Kishimoto T. 1992. Macrophage differentiation-specific expression of NF-IL6, a transcription factor for interleukin-6. *Blood* **79**: 460-466.
- Nelson JD, Denisenko O, Sova P, Bomsztyk K. 2006. Fast chromatin immunoprecipitation assay. *Nucleic acids research* **34**: e2.
- Nerlov C. 2007. The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. *Trends in cell biology* **17**: 318-324.
- Nerlov C, Graf T. 1998. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes & development* **12**: 2403-2412.
- Nerlov C, Ziff EB. 1994. Three levels of functional interaction determine the activity of CCAAT/enhancer binding protein-alpha on the serum albumin promoter. *Genes & development* **8**: 350-362.
- Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. 1999. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* **18**: 3004-3016.
- Nguyen HQ, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. 1993. The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell* **72**: 197-209.
- Nishizuka Y. 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**: 607-614.
- Ogawa M. 1993. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* **81**: 2844-2853.

-
- Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M. 1995. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Molecular and cellular biology* **15**: 2612-2624.
- Oikawa T, Yamada T, Kihara-Negishi F, Yamamoto H, Kondoh N, Hitomi Y, Hashimoto Y. 1999. The role of Ets family transcription factor PU.1 in hematopoietic cell differentiation, proliferation and apoptosis. *Cell death and differentiation* **6**: 599-608.
- Olson MC, Scott EW, Hack AA, Su GH, Tenen DG, Singh H, Simon MC. 1995. PU. 1 is not essential for early myeloid gene expression but is required for terminal myeloid differentiation. *Immunity* **3**: 703-714.
- Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y. 1988. The structure, expression, and properties of additional members of the protein kinase C family. *The Journal of biological chemistry* **263**: 6927-6932.
- O'Reilly LA, Huang DC, Strasser A. 1996. The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *The EMBO journal* **15**: 6979-6990.
- Orellana D, Liu X, Wang GL, Jin J, Iakova P, Timchenko NA. 2010. Calmodulin controls liver proliferation via interactions with C/EBPbeta-LAP and C/EBPbeta-LIP. *The Journal of biological chemistry* **285**: 23444-23456.
- Oren M. 1999. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *The Journal of biological chemistry* **274**: 36031-36034.
- Orkin SH. 2000. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nature reviews Genetics* **1**: 57-64.
- Osada S, Yamamoto H, Nishihara T, Imagawa M. 1996. DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *The Journal of biological chemistry* **271**: 3891-3896.
- Ossipow V, Descombes P, Schibler U. 1993. CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 8219-8223.
- Pabst T, Mueller BU. 2007. Transcriptional dysregulation during myeloid transformation in AML. *Oncogene* **26**: 6829-6837.
- Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, Behre G, Hiddemann W, Tenen DG. 2001. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nature genetics* **27**: 263-270.
- Packham G, Cleveland JL. 1994. Ornithine decarboxylase is a mediator of c-Myc-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology* **14**: 5741-5747.
- Pal R, Janz M, Galson DL, Gries M, Li S, Johrens K, Anagnostopoulos I, Dorken B, Mapara MY, Borghesi L et al. 2009. C/EBPbeta regulates transcription factors critical for proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Blood* **114**: 3890-3898.

-
- Pardee AB. 1974. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**: 1286-1290.
- Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. 2007. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* **56**: 45-50.
- Park JS, Qiao L, Gilfor D, Yang MY, Hylemon PB, Benz C, Darlington G, Firestone G, Fisher PB, Dent P. 2000. A role for both Ets and C/EBP transcription factors and mRNA stabilization in the MAPK-dependent increase in p21 (Cip-1/WAF1/mda6) protein levels in primary hepatocytes. *Molecular biology of the cell* **11**: 2915-2932.
- Park MH, Park SY, Kim Y. 2008. Induction of proline-rich tyrosine kinase2 (Pyk2) through C/EBPbeta is involved in PMA-induced monocyte differentiation. *FEBS letters* **582**: 415-422.
- Park YK, Park H. 2010. Prevention of CCAAT/enhancer-binding protein beta DNA binding by hypoxia during adipogenesis. *The Journal of biological chemistry* **285**: 3289-3299.
- Pavey S, Conroy S, Russell T, Gabrielli B. 1999. Ultraviolet radiation induces p16CDKN2A expression in human skin. *Cancer research* **59**: 4185-4189.
- Perez-Roger I, Kim SH, Griffiths B, Sewing A, Land H. 1999. Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *The EMBO journal* **18**: 5310-5320.
- Petersen BO, Lukas J, Sorensen CS, Bartek J, Helin K. 1999. Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *The EMBO journal* **18**: 396-410.
- Pham TH, Langmann S, Schwarzfischer L, El Chartouni C, Lichtinger M, Klug M, Krause SW, Rehli M. 2007. CCAAT enhancer-binding protein beta regulates constitutive gene expression during late stages of monocyte to macrophage differentiation. *The Journal of biological chemistry* **282**: 21924-21933.
- Piva R, Pellegrino E, Mattioli M, Agnelli L, Lombardi L, Boccalatte F, Costa G, Ruggeri BA, Cheng M, Chiarle R et al. 2006. Functional validation of the anaplastic lymphoma kinase signature identifies CEBPB and BCL2A1 as critical target genes. *The Journal of clinical investigation* **116**: 3171-3182.
- Pless O, Kowenz-Leutz E, Knoblich M, Lausen J, Beyermann M, Walsh MJ, Leutz A. 2008. G9a-mediated lysine methylation alters the function of CCAAT/enhancer-binding protein-beta. *The Journal of biological chemistry* **283**: 26357-26363.
- Poli V, Mancini FP, Cortese R. 1990. IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP. *Cell* **63**: 643-653.

-
- Popernack PM, Truong LT, Kamphuis M, Henderson AJ. 2001. Ectopic expression of CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPbeta) in long-term bone marrow cultures induces granulopoiesis and alters stromal cell function. *Journal of hematology & stem cell research* **10**: 631-642.
- Porse BT, Bryder D, Theilgaard-Monch K, Hasemann MS, Anderson K, Damgaard I, Jacobsen SE, Nerlov C. 2005. Loss of C/EBP alpha cell cycle control increases myeloid progenitor proliferation and transforms the neutrophil granulocyte lineage. *The Journal of experimental medicine* **202**: 85-96.
- Puthier D, Derenne S, Barille S, Moreau P, Harousseau JL, Bataille R, Amiot M. 1999. Mcl-1 and Bcl-xL are co-regulated by IL-6 in human myeloma cells. *British journal of haematology* **107**: 392-395.
- Quintanilla-Martinez L, Pittaluga S, Miething C, Klier M, Rudelius M, Davies-Hill T, Anastasov N, Martinez A, Vivero A, Duyster J et al. 2006. NPM-ALK-dependent expression of the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Blood* **108**: 2029-2036.
- Radomska HS, Huettnner CS, Zhang P, Cheng T, Scadden DT, Tenen DG. 1998. CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Molecular and cellular biology* **18**: 4301-4314.
- Ramji DP, Foka P. 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *The Biochemical journal* **365**: 561-575.
- Ray A, Ray BK. 1995. Lipopolysaccharide-mediated induction of the bovine interleukin-6 gene in monocytes requires both NF-kappa B and C/EBP binding sites. *DNA and cell biology* **14**: 795-802.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**: 105-111.
- Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, Massague J. 1995. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes & development* **9**: 1831-1845.
- Robertson LE, Plunkett W, McConnell K, Keating MJ, McDonnell TJ. 1996. Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* **10**: 456-459.
- Robinson GW, Johnson PF, Hennighausen L, Sterneck E. 1998. The C/EBPbeta transcription factor regulates epithelial cell proliferation and differentiation in the mammary gland. *Genes & development* **12**: 1907-1916.
- Robles SJ, Adami GR. 1998. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* **16**: 1113-1123.
- Roman C, Platero JS, Shuman J, Calame K. 1990. Ig/EBP-1: a ubiquitously expressed immunoglobulin enhancer binding protein that is similar to C/EBP and heterodimerizes with C/EBP. *Genes & development* **4**: 1404-1415.

-
- Ron D, Habener JF. 1992. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes & development* **6**: 439-453.
- Roninson IB. 2002. Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer letters* **179**: 1-14.
- Roos AB, Berg T, Barton JL, Didon L, Nord M. 2012. Airway epithelial cell differentiation during lung organogenesis requires C/EBPalpha and C/EBPbeta. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **241**: 911-923.
- Rosmarin AG, Yang Z, Resendes KK. 2005. Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Experimental hematology* **33**: 131-143.
- Rovera G, Santoli D, Damsky C. 1979. Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 2779-2783.
- Rutherford MS, Witsell A, Schook LB. 1993. Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited. *Journal of leukocyte biology* **53**: 602-618.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sakamuro D, Eviner V, Elliott KJ, Showe L, White E, Prendergast GC. 1995. c-Myc induces apoptosis in epithelial cells by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene* **11**: 2411-2418.
- Sakhinia E, Byers R, Bashein A, Hoyland J, Buckle AM, Brady G. 2006. Gene expression analysis of myeloid and lymphoid lineage markers during mouse haematopoiesis. *British journal of haematology* **135**: 105-116.
- Satyanarayana A, Kaldis P. 2009. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* **28**: 2925-2939.
- Scandura JM, Boccuni P, Massague J, Nimer SD. 2004. Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 15231-15236.
- Schambach A, Bohne J, Chandra S, Will E, Margison GP, Williams DA, Baum C. 2006. Equal potency of gammaretroviral and lentiviral SIN vectors for expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in hematopoietic cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **13**: 391-400.

-
- Schneider-Merck T, Pohnke Y, Kempf R, Christian M, Brosens JJ, Gellersen B. 2006. Physical interaction and mutual transrepression between CCAAT/enhancer-binding protein beta and the p53 tumor suppressor. *The Journal of biological chemistry* **281**: 269-278.
- Schulze A, Zerfass K, Spitkovsky D, Middendorp S, Berges J, Helin K, Jansen-Durr P, Henglein B. 1995. Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 11264-11268.
- Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P. 1996. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Journal of leukocyte biology* **59**: 555-561.
- Scott LM, Civin CI, Rorth P, Friedman AD. 1992. A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. *Blood* **80**: 1725-1735.
- Screpanti I, Romani L, Musiani P, Modesti A, Fattori E, Lazzaro D, Sellitto C, Scarpa S, Bellavia D, Lattanzio G et al. 1995. Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice. *The EMBO journal* **14**: 1932-1941.
- Seagroves TN, Krnacik S, Raught B, Gay J, Burgess-Beusse B, Darlington GJ, Rosen JM. 1998. C/EBPbeta, but not C/EBPalpha, is essential for ductal morphogenesis, lobuloalveolar proliferation, and functional differentiation in the mouse mammary gland. *Genes & development* **12**: 1917-1928.
- Sebastian T, Malik R, Thomas S, Sage J, Johnson PF. 2005. C/EBPbeta cooperates with RB:E2F to implement Ras(V12)-induced cellular senescence. *The EMBO journal* **24**: 3301-3312.
- Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annual review of immunology* **26**: 421-452.
- Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R et al. 2005. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine* **353**: 123-132.
- Sherr CJ. 1994. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* **79**: 551-555.
- Sherr CJ, Roberts JM. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & development* **9**: 1149-1163.
- Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV. 1997. c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 6658-6663.
- Shimizu Y, Kishimoto T, Ohtsuka M, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Miyazaki M. 2007. CCAAT/enhancer binding protein-beta promotes the survival of intravascular rat pancreatic tumor cells via antiapoptotic effects. *Cancer science* **98**: 1706-1713.

-
- Smink JJ, Begay V, Schoenmaker T, Sterneck E, de Vries TJ, Leutz A. 2009. Transcription factor C/EBPbeta isoform ratio regulates osteoclastogenesis through MafB. *The EMBO journal* **28**: 1769-1781.
- Smink JJ, Leutz A. 2010. Rapamycin and the transcription factor C/EBPbeta as a switch in osteoclast differentiation: implications for lytic bone diseases. *Journal of molecular medicine* **88**: 227-233.
- Staller P, Peukert K, Kiermaier A, Seoane J, Lukas J, Karsunky H, Moroy T, Bartek J, Massague J, Hanel F et al. 2001. Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nature cell biology* **3**: 392-399.
- Stein B, Cogswell PC, Baldwin AS, Jr. 1993. Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. *Molecular and cellular biology* **13**: 3964-3974.
- Stein B, Yang MX. 1995. Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta. *Molecular and cellular biology* **15**: 4971-4979.
- Sterneck E, Tessarollo L, Johnson PF. 1997. An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes & development* **11**: 2153-2162.
- Stevaux O, Dyson NJ. 2002. A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Current opinion in cell biology* **14**: 684-691.
- Su WC, Chou HY, Chang CJ, Lee YM, Chen WH, Huang KH, Lee MY, Lee SC. 2003. Differential activation of a C/EBP beta isoform by a novel redox switch may confer the lipopolysaccharide-inducible expression of interleukin-6 gene. *The Journal of biological chemistry* **278**: 51150-51158.
- Tafari A, Gregorj C, Petrucci MT, Ricciardi MR, Mancini M, Cimino G, Mecucci C, Tedeschi A, Fioritoni G, Ferrara F et al. 2002. MDR1 protein expression is an independent predictor of complete remission in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **100**: 974-981.
- Takiguchi M. 1998. The C/EBP family of transcription factors in the liver and other organs. *International journal of experimental pathology* **79**: 369-391.
- Tanaka T, Akira S, Yoshida K, Umemoto M, Yoneda Y, Shirafuji N, Fujiwara H, Suematsu S, Yoshida N, Kishimoto T. 1995. Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell* **80**: 353-361.
- Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. 1997. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *The EMBO journal* **16**: 7432-7443.
- Tang QQ, Otto TC, Lane MD. 2003. CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 850-855.
- Timchenko LT, Iakova P, Welm AL, Cai ZJ, Timchenko NA. 2002. Calreticulin interacts with C/EBPalpha and C/EBPbeta mRNAs and represses translation of C/EBP proteins. *Molecular and cellular biology* **22**: 7242-7257.

-
- Tissieres P, Araud T, Ochoda A, Drifte G, Dunn-Siegrist I, Pugin J. 2009. Cooperation between PU.1 and CAAT/enhancer-binding protein beta is necessary to induce the expression of the MD-2 gene. *The Journal of biological chemistry* **284**: 26261-26272.
- Trimarchi JM, Lees JA. 2002. Sibling rivalry in the E2F family. *Nature reviews Molecular cell biology* **3**: 11-20.
- Tsai T, Davalath S, Rankin C, Radich JP, Head D, Appelbaum FR, Boldt DH. 1996. Tumor suppressor gene alteration in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). Analysis of retinoblastoma (Rb) and p53 gene expression in lymphoblasts of patients with de novo, relapsed, or refractory ALL treated in Southwest Oncology Group studies. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* **10**: 1901-1910.
- Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, Tada K. 1982. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer research* **42**: 1530-1536.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International journal of cancer Journal international du cancer* **26**: 171-176.
- Valledor AF, Borrás FE, Culléll-Young M, Celada A. 1998. Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *Journal of leukocyte biology* **63**: 405-417.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation* **36**: 131-149.
- Vinson CR, Sigler PB, McKnight SL. 1989. Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* **246**: 911-916.
- Vlach J, Hennecke S, Alevizopoulos K, Conti D, Amati B. 1996. Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc. *The EMBO journal* **15**: 6595-6604.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* **408**: 307-310.
- Voso MT, Burn TC, Wulf G, Lim B, Leone G, Tenen DG. 1994. Inhibition of hematopoiesis by competitive binding of transcription factor PU.1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 7932-7936.
- Waga S, Li R, Stillman B. 1997. p53-induced p21 controls DNA replication. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* **11 Suppl 3**: 321-323.
- Wagner AJ, Kokontis JM, Hay N. 1994. Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21waf1/cip1. *Genes & development* **8**: 2817-2830.

-
- Wang H, Larris B, Peiris TH, Zhang L, Le Lay J, Gao Y, Greenbaum LE. 2007. C/EBPbeta activates E2F-regulated genes in vivo via recruitment of the coactivator CREB-binding protein/P300. *The Journal of biological chemistry* **282**: 24679-24688.
- Wang QF, Friedman AD. 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins are required for granulopoiesis independent of their induction of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood* **99**: 2776-2785.
- Weigelt K, Lichtinger M, Rehli M, Langmann T. 2009. Transcriptomic profiling identifies a PU.1 regulatory network in macrophages. *Biochemical and biophysical research communications* **380**: 308-312.
- Weintraub SJ, Chow KN, Luo RX, Zhang SH, He S, Dean DC. 1995. Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature* **375**: 812-815.
- Welm AL, Timchenko NA, Darlington GJ. 1999. C/EBPalpha regulates generation of C/EBPbeta isoforms through activation of specific proteolytic cleavage. *Molecular and cellular biology* **19**: 1695-1704.
- Wessells J, Yakar S, Johnson PF. 2004. Critical prosurvival roles for C/EBP beta and insulin-like growth factor I in macrophage tumor cells. *Molecular and cellular biology* **24**: 3238-3250.
- Wethmar K, Begay V, Smink JJ, Zaragoza K, Wiesenthal V, Dorken B, Calkhoven CF, Leutz A. 2010. C/EBPbetaDeltaORF mice--a genetic model for uORF-mediated translational control in mammals. *Genes & development* **24**: 15-20.
- Williams SC, Baer M, Dillner AJ, Johnson PF. 1995. CRP2 (C/EBP beta) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *The EMBO journal* **14**: 3170-3183.
- Williams SC, Cantwell CA, Johnson PF. 1991. A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro. *Genes & development* **5**: 1553-1567.
- Winter JN, Andersen J, Reed JC, Krajewski S, Variakojis D, Bauer KD, Fisher RI, Gordon LI, Oken MM, Jiang S et al. 1998. BCL-2 expression correlates with lower proliferative activity in the intermediate- and high-grade non-Hodgkin's lymphomas: an Eastern Cooperative Oncology Group and Southwest Oncology Group cooperative laboratory study. *Blood* **91**: 1391-1398.
- Wu Z, Xie Y, Bucher NL, Farmer SR. 1995. Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. *Genes & development* **9**: 2350-2363.
- Xia C, Cheshire JK, Patel H, Woo P. 1997. Cross-talk between transcription factors NF-kappa B and C/EBP in the transcriptional regulation of genes. *The international journal of biochemistry & cell biology* **29**: 1525-1539.
- Xiao W, Hodge DR, Wang L, Yang X, Zhang X, Farrar WL. 2004. Co-operative functions between nuclear factors NFkappaB and CCAAT/enhancer-binding protein-beta (C/EBP-beta) regulate the IL-6 promoter in autocrine human prostate cancer cells. *The Prostate* **61**: 354-370.

-
- Xie H, Ye M, Feng R, Graf T. 2004. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* **117**: 663-676.
- Yamanaka R, Kim GD, Radomska HS, Lekstrom-Himes J, Smith LT, Antonson P, Tenen DG, Xanthopoulos KG. 1997. CCAAT/enhancer binding protein epsilon is preferentially up-regulated during granulocytic differentiation and its functional versatility is determined by alternative use of promoters and differential splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 6462-6467.
- Yang Z, Wara-Aswapati N, Chen C, Tsukada J, Auron PE. 2000. NF-IL6 (C/EBPbeta) vigorously activates il1b gene expression via a Spi-1 (PU.1) protein-protein tether. *The Journal of biological chemistry* **275**: 21272-21277.
- Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL. 1995. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes & development* **9**: 168-181.
- Yin M, Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Chatterjee S, Diehl AM. 1996. Tumor necrosis factor alpha promotes nuclear localization of cytokine-inducible CCAAT/enhancer binding protein isoforms in hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* **271**: 17974-17978.
- Zahnow CA. 2009. CCAAT/enhancer-binding protein beta: its role in breast cancer and associations with receptor tyrosine kinases. *Expert reviews in molecular medicine* **11**: e12.
- Zahnow CA, Cardiff RD, Laucirica R, Medina D, Rosen JM. 2001. A role for CCAAT/enhancer binding protein beta-liver-enriched inhibitory protein in mammary epithelial cell proliferation. *Cancer research* **61**: 261-269.
- Zahnow CA, Younes P, Laucirica R, Rosen JM. 1997. Overexpression of C/EBPbeta-LIP, a naturally occurring, dominant-negative transcription factor, in human breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **89**: 1887-1891.
- Zhang DE, Hetherington CJ, Chen HM, Tenen DG. 1994. The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Molecular and cellular biology* **14**: 373-381.
- Zhang F, Lin M, Abidi P, Thiel G, Liu J. 2003. Specific interaction of Egr1 and c/EBPbeta leads to the transcriptional activation of the human low density lipoprotein receptor gene. *The Journal of biological chemistry* **278**: 44246-44254.
- Zhang K, Li J, Meng W, Xing H, Yang Y. 2010. C/EBPbeta and CHOP participate in tanshinone IIA-induced differentiation and apoptosis of acute promyelocytic leukemia cells in vitro. *International journal of hematology* **92**: 571-578.
- Zhang X, Liu Y. 2003. Suppression of HGF receptor gene expression by oxidative stress is mediated through the interplay between Sp1 and Egr-1. *American journal of physiology Renal physiology* **284**: F1216-1225.

-
- Zhao J, Dynlacht B, Imai T, Hori T, Harlow E. 1998. Expression of NPAT, a novel substrate of cyclin E-CDK2, promotes S-phase entry. *Genes & development* **12**: 456-461.
- Zhou Y, Du W, Koretsky T, Bagby GC, Pang Q. 2008. TAT-mediated intracellular delivery of NPM-derived peptide induces apoptosis in leukemic cells and suppresses leukemogenesis in mice. *Blood* **112**: 2474-2483.
- Zhu S, Oh HS, Shim M, Sterneck E, Johnson PF, Smart RC. 1999. C/EBPbeta modulates the early events of keratinocyte differentiation involving growth arrest and keratin 1 and keratin 10 expression. *Molecular and cellular biology* **19**: 7181-7190.
- Zhu S, Yoon K, Sterneck E, Johnson PF, Smart RC. 2002. CCAAT/enhancer binding protein-beta is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic Ras signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 207-212.
- Zindy F, Quelle DE, Roussel MF, Sherr CJ. 1997. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* **15**: 203-211.

Publikationen und Präsentationen

Publikationen

Gutsch R, Kandemir JD, Pietsch D, Cappello C, Meyer J, Simanowski K, Huber R, Brand K. 2011. CCAAT/enhancer-binding protein beta inhibits proliferation in monocytic cells by affecting the retinoblastoma protein/E2F/cyclin E pathway but is not directly required for macrophage morphology. *The Journal of biological chemistry* **286**: 22716-22729.

Haas SC, Huber R, **Gutsch R**, Kandemir JD, Cappello C, Krauter J, Duyster J, Ganser A, Brand K. 2010. ITD- and FL-induced FLT3 signal transduction leads to increased C/EBPbeta-LIP expression and LIP/LAP ratio by different signalling modules. *British journal of haematology* **148**: 777-790.

Präsentationen

05/2013 1. Internationales Symposium für Pädiatrische Forschung, Hannover
„Aspects of fibrocystin function in renal epithelial cell morphologie”

10/2010 7. Jahrestagung der DGKL, Mannheim
„C/EBPβ inhibiert die Proliferation in monozytären Zellen durch
Modulation der Rb/E2F-Kaskade – differenzielle Effekte auf die
Morphologie“

11/2007 SFB 665 Internationales Symposium, Potsdam
„Lipid Phosphate Phosphatase 1 und 1a: Expression and
functional role in the brain”

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation

Die Rolle des Transkriptionsfaktors C/EBP β bei der Regulation der Proliferation
und Differenzierung von monozytären Zellen

selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine anderen als die angegebenen
Quellen und Hilfsmittel benutzt und Zitate kenntlich gemacht habe.

Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch
genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar entgeltliche Leistungen für
Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation
stehen. Ich habe die Dissertation an folgenden Institutionen angefertigt:

Institut für Klinische Chemie
Medizinische Hochschule Hannover

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen
ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht. Ich versichere, dass ich die vorstehenden
Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

Hannover, den 09. September 2013