

## The role of Gadd45 $\beta$ in apoptosis and autophagy

**Growth Arrest and DNA Damage** inducible 45 (Gadd45) proteins have been found to play an essential role as a stress sensor in several key events of cellular function, such as cell homeostasis, cell cycle control, senescence and apoptosis. They are a family of three small proteins, which exhibit their biological function via direct protein-protein interaction and show a certain degree of similarity. Of particular interest is their interaction with mitogen-activated protein kinases (MAPK), through which they are able to influence life-and death decisions for cells. Here, Gadd45 $\beta$  has been identified to act together with the MAPK kinase kinase MEKK4 on the MAPK p38 to induce apoptosis. Moreover, Gadd45 $\beta$  was also identified as an interaction partner of MKK7, a MAPKK that is essential for JNK activation. By these means, Gadd45 $\beta$  can also inhibit apoptosis.

We found that Gadd45 $\beta$  acts together with MEKK4 on p38 and directs it to certain cytosolic spots that could be identified as autophagosomes, an up to now unknown function of p38. Autophagosomes are a central component of a cellular process, autophagy. Research in the field could classify autophagy as a cell survival mechanism in times of starvation, but identified also numerous other functions, such as defence against intracellular pathogens and a potential role as a cell death mechanism.

The molecular details of how phosphorylated p38 interacts with an essential protein of the autophagic machinery, Atg5, could be elucidated and more importantly, proven. p38 phosphorylates Atg5 at the threonine T75 and thereby blocks the autophagic flux, an imperative function to prevent cell death after periods of e.g. starvation. In this way, the newly discovered MEKK4-Gadd45 $\beta$ -p38 pathway constitutes an important regulatory mechanism of this essential cellular process.

Gadd45 $\beta$  could also be identified as the most abundant transcript after T cell receptor (TCR) triggering with a high-affinity peptide in T cells. Involvement of Gadd45 $\beta$  in apoptotic-related signalling events could already be shown in a CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double-positive T cell-line and also in a fetal thymic organ culture *in vitro*. Here, Gadd45 $\beta$ -deficient cells were more resistant to apoptosis. In order to prove a

pro-apoptotic function of Gadd45 $\beta$  *in vivo*, TCR-transgenic mice were bred with Gadd45 $\beta$ -deficient mice and subjected to a specific TCR activation. Indeed, apoptosis in the context of negative selection in thymocytes was impaired in these Gadd45 $\beta$ <sup>-/-</sup> mice. By these means a new signalling pathway in negative selection of T cells could possibly be proven.

## **The role of Gadd45 $\beta$ in apoptosis and autophagy**

**Growth Arrest and DNA Damage** inducible 45 (Gadd45) Proteine konnten mit Funktionen wie Zellzyklusregulation, zellulärer Homöostase, Seneszenz und Apoptose in Verbindung gebracht werden. Gadd45 $\beta$  ist hier Teil einer Familie die aus insgesamt drei ähnlichen Proteinen besteht. Diese Proteine haben selbst keine katalytische Funktion, sondern agieren durch direkte Protein-Protein Interaktion. Alle drei Proteine sind relativ klein und weisen eine gewisse Homologie untereinander auf. Von speziellem Interesse für diese Arbeit ist Ihre Interaktion mit den sogenannten Mitogen-aktivierenden Proteinkinase (MAPK). MAPK sind wichtige Bestandteile intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden, die an der Steuerung von vielen relevanten Vorgängen innerhalb einer Zelle beteiligt sind. Durch die Interaktion mit einer MAPK kinase kinase, MEKK4, ist Gadd45 $\beta$  in der Lage die Apoptose einer Zelle indirekt zu beeinflussen. Durch diese Interaktion werden p38 und JNK aktiviert, zwei MAPK welche für die Initiierung der Apoptose entscheidend sind. Zugleich wurde jedoch ebenfalls berichtet, dass Gadd45 $\beta$  durch eine direkte Interaktion mit der MAPK kinase MKK7 JNK inhibiert, was in verminderter Apoptose resultiert.

In unserem Labor konnten wir mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie eine ungewöhnliche Lokation der p38 erkennen: Durch normale Stimuli, wie z.B. UV-Bestrahlung, transloziert p38 in den Zellkern. Im untersuchten Fall jedoch sammelte sich phosphoryliertes p38 in distinkten, cytosolischen Punkten. Nähere Untersuchungen ergaben, dass es sich dabei um Autophagosomen handelt. Autophagosomen sind intrazelluläre Vesikel, die von einer Doppellipidmembran umschlossen sind und die den Hauptbestandteil der Autophagie darstellen. Autophagie wurde inzwischen als ein zellulärer Überlebensmechanismus identifiziert, mit dessen Hilfe eine Zelle z.B. Zeiten der Nahrungsmittelknappheit überleben kann, indem sie sich teilweise selbst verdaut. Außerdem wurde gezeigt, dass sich Zellen mittels Autophagie intrazelluläre Pathogene entledigen können. In dieser Arbeit wurde bewiesen, dass p38, welches von Gadd45 $\beta$  in Zusammenarbeit mit MEKK4 zu Autophagosomen dirigiert wurde, Atg5 phosphoryliert. Atg5 ist ein zentrales Protein im Mechanismus der Autophagie, ohne welches diese generell nicht ablaufen kann. Durch die besagte Phosphorylierung am Threonin 75 in Atg5 wird dieser zentrale

Mechanismus blockiert und Autophagie kann nicht, oder zumindest nur noch in einem sehr kleinen Ausmaß, ablaufen. Diese Inhibition wurde in dieser Arbeit durch eine Vielzahl von Techniken untersucht, zentral hierfür waren jedoch die Untersuchung mittels Immunoblots und vor allem mit Hilfe eines konfokalen Laserscanningmikroskops mit einer drehenden Scheibe. Die potentielle physiologische Relevanz wurde mittels Lipopolysaccharidstimulation bewiesen, die eine Infektion einer Zelle mit einem Gram-negativen Bakterium simuliert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Gadd45 $\beta$ -Defizienz offenbar auch bei der T-Zell-Rezeptor induzierten Autophagie von Bedeutung zu sein scheint.

Ein weiterer Teil dieser Dissertation bestand darin, die Rolle von Gadd45 $\beta$  in der negativen Selektion von T Zellen zu untersuchen. Der Zusammenhang von Gadd45 $\beta$  und Apoptose ist bereits hinlänglich in der Literatur belegt. Darüber hinaus konnte Vorarbeit an einer CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> doppelt-positiven Thymozytenzelllinie in unserem Labor zeigen, dass ein Fehlen von Gadd45 $\beta$  zu verminderter Apoptose in diesen Zellen führte. Diese *in vitro* generierten Daten konnten mittels fötaler Thymus Organkultur verifiziert werden. Auch hier führte eine Stimulation des T-Zell-Rezeptors mittels  $\alpha$ CD3 bei Gadd45 $\beta$ -defizienten Thymozyten zu einer verminderten Apoptose im Vergleich zu wildtypischen Thymozyten. In dieser Arbeit wurde daher zuerst bestimmt, ob sich dieser Defekt in der Apoptose auf T-Zell-Rezeptor Stimulation beschränkt, oder ob es sich um einen Defekt allgemein handelt. Interessanterweise zeigte sich, dass sich das apoptotische Verhalten Gadd45 $\beta$ -defizienter Thymozyten ausschließlich bei einer Stimulation des T-Zell-Rezeptors vom Wildtyp unterschied. Daher wurde die Gadd45 $\beta$ -defiziente Maus mit einer Maus gekreuzt, welche über einen monovalenten T-Zell-Rezeptor verfügt. Hierdurch wurde es ermöglicht, den T-Zell-Rezeptor zu aktivieren, ohne dabei störende Nebeneffekte der Peripherie zu riskieren. Es zeigte sich auch hier, dass in der Gadd45 $\beta$ -defizienten Maus eine erhöhte Anzahl von T-Zellen der negativen Selektion entkamen. Diese konnten als reife, einzeln-positive T-Zellen identifiziert werden die potentiell autoreaktiv sind. Dieses Ergebnis bestätigt den Autoimmunphänotyp, der mit der Gadd45 $\beta$ -defizienten Maus in Verbindung gebracht wird. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch diese Experimente ein potentieller neuer Signaltransduktionsweg der negativen Selektion bestätigt werden konnte.