

# **Charakterisierung von BRUCE als antiapoptotisches IAP**

Dissertation der  
Fakultät für Biologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt von  
Diplom-Biologe  
Till Bartke

25. Januar 2005







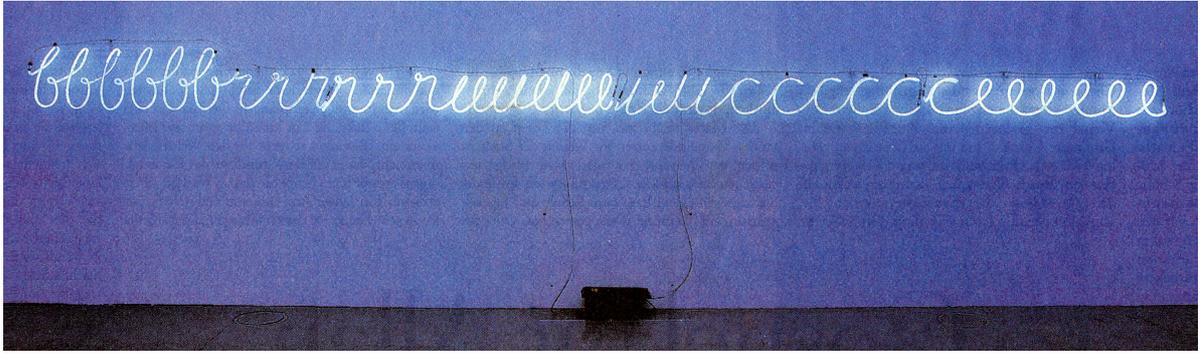
# **Charakterisierung von BRUCE als antiapoptotisches IAP**

Dissertation der  
Fakultät für Biologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt von  
Diplom-Biologe  
Till Bartke

25. Januar 2005





My Name as though it were written on the surface of the moon  
Lichtinstallation  
Bruce Nauman  
1968



Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Till Bartke  
München, den 25. Januar 2005



Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Dezember 2000 und Januar 2005 unter Anleitung von Prof. Dr. Stefan Jentsch am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind in folgender Publikation veröffentlicht:

Bartke, T., Pohl, C., Pyrowolakis, G., und Jentsch S. (2004). Dual Role of BRUCE as an Antiapoptotic IAP and a Chimeric E2/E3 Ubiquitin Ligase. *Mol. Cell* 14, 801-811.

Promotionsgesuch eingereicht am 25. Januar 2005

Tag der mündlichen Prüfung 14. April 2005

Erster Gutachter Prof. Dr. Stefan Jentsch

Zweiter Gutachter Prof. Dr. Charles N. David



<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
Abkürzungsverzeichnis	II-IV
<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>2</b>
Der programmierte Zelltod	2
Apoptotische Signalwege	3
Die Rolle von Caspasen	7
Inhibitor of Apoptosis Proteins	10
Mechanismen zur Inhibition von IAPs	13
Regulation der Apoptose durch Ubiquitin	14
Das BRUCE-Protein	17
Zielsetzung der Arbeit	19
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>20</b>
Wildtyp und funktionelle Mutanten von BRUCE	20
BRUCE schützt Zellen gegen den programmierten Zelltod	21
Bestimmte Säugierzellen benötigen BRUCE zum Überleben	23
BRUCE bindet Caspasen	24
BRUCE inhibiert die Caspase-Kaskade	26
BRUCE ist ein Caspase-Substrat	28
Caspase-Spaltung inaktiviert die antiapoptotische Funktion von BRUCE	29
BRUCE bindet Smac und HtrA2	32
Smac und HtrA2 inaktivieren BRUCE	35
<b>4. Diskussion</b>	<b>39</b>
Der programmierte Zelltod ist streng reguliert	39
BRUCE ist ein Inhibitor of Apoptosis Protein	40
BRUCE ist ein Überlebensfaktor	42
BRUCE wird während der Apoptose inaktiviert	43
BRUCE ist Teil eines regulatorischen Netzwerks	45
<b>5. Material und Methoden</b>	<b>48</b>
Mikrobiologische Methoden	48
Zellbiologische Methoden	50
Molekularbiologische Methoden: DNA	53
Molekularbiologische Methoden: RNA	57
Proteinbiochemische Methoden	58
<b>6. Literatur</b>	<b>65</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AFC	7-Amino-4-Trifluoromethyl-Cumarin
AIF	apoptosis-inducing factor
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor 1
APC	anaphase promoting complex
APS	Ammoniumperoxodisulphat
ATP	Adenosin Triphosphat
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BES	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
Bid	Bcl-2-interacting death protein
BIR	baculovirus inhibitor of apoptosis repeat
BIRP	BIR domain-containing protein
BRUCE	BIR repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme
BSA	bovine serum albumin
CAD	caspase-activated DNase (DFF40)
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-propansulfonsäure
CARD	caspase recruitment domain
cDNA	complementary DNA
CHAPS	3-([3-Cholamidopropyl]dimethylammonio)-1-propansulfonat
-CHO	Aldehyd
CHX	Cycloheximid
ciAP1	cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (MIHB, HIAP-1)
ciAP2	cellular inhibitor of apoptosis protein 2 (MIHC, HIAP-2)
CrmA	cytokine response modifier A
Cyto-c	Cytochrom c
dATP	Deoxyadenosin Triphosphat
DED	death effector domain
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEVD-AFC	N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-AFC
DEVD-CHO	N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-CHO
DIABLO	direct IAP-binding protein with low pI (Smac)
DIAP1	<i>Drosophila</i> inhibitor of apoptosis protein 1
DISC	death-inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleinsäure
DNase	Deoxyribonuclease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP-F	enhanced GFP (farnesylated)
EndoG	Endonuclease G
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FACS	fluorescence activated cell sorter
FADD	Fas-associated death domain (MORT1)
FCS	fetal calf serum

GFP	green fluorescent protein
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
HBS	HEPES buffered saline
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
Hid	head involution defective
HtrA2	High-temperature requirement (Omi)
IAP	inhibitor of apoptosis protein
IBM	IAP-Bindemotiv
ICAD	inhibitor of CAD (DFF45)
IgG	Immunglobulin G
I $\kappa$ B	inhibitor of nuclear factor $\kappa$ B
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
Luc	Luciferase
M	molar
mAb	monoklonaler Antikörper
Mdm2	mouse double minute 2
MEF	mouse embryonic fibroblast
min	Minute
ML-IAP	melanoma IAP (Livin, KIAP)
mRNA	messenger RNA
NAIP	neuronal apoptosis inhibitory protein
NF $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
NP-40	Nonidet P-40
Nrdp1	neuregulin receptor degradation protein 1
OD	Optische Dichte
PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymerase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
PTP	permeability transition pore
RING	really interesting new gene
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
S	Sedimentationskoeffizient (Svedberg)
SCF	Skp1-Cullin-F-box complex
sec	Sekunde
shRNA	short hairpin RNA
SDS	sodium dodecylsulphate

SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases (DIABLO)
tBid	truncated Bid
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGN	trans Golgi-Netzwerk
TNF	tumor necrosis factor
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand (Apo2L)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	units
UBC	ubiquitin-conjugating enzyme
UE	Untereinheit
UV	Ultraviolett
vl	Volllänge
WB	Westernblot/Immunblot
WT	Wildtyp
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein (MIHA, hILP)
zVAD-fmk	N-Benzylloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-Fluoromethyl-Keton

## 1. Zusammenfassung

Der programmierte Zelltod, oder Apoptose, ist ein physiologischer Vorgang mit zentraler Bedeutung für die Entwicklung und Homöostase mehrzelliger Organismen. Die Auslösung der Apoptose führt zur Aktivierung von Caspasen. Dies sind Cysteinproteasen, die gezielte Substratproteine spalten und so die koordinierte Zerstörung der Zelle herbeiführen. Apoptose wird durch pro- und antiapoptotische Proteine reguliert, die die Aktivierung von Caspasen stimulieren bzw. unterdrücken. Da diese Proteine sich gegenseitig beeinflussen, wird das Schicksal einer Zelle durch die relative Aktivität pro- und antiapoptotischer Faktoren bestimmt.

BRUCE (*BIR repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme*) ist ein konserviertes, 528 kDa großes, peripheres Membranprotein des trans-Golgi Netzwerks. Seine charakteristischen Merkmale sind eine N-terminale BIR-Domäne und eine C-terminale UBC-Domäne, die dem Molekül Ubiquitin-Konjugationsaktivität verleiht. Diese Arbeit demonstriert, dass BRUCE Zellen vor der Apoptose schützt und als ein *inhibitor of apoptosis protein* (IAP) wirkt, indem es an aktive Caspasen bindet und diese inhibiert. Die Verwendung von Wildtyp und Mutanten des BRUCE Proteins zeigt, dass diese Aktivitäten von der BIR-Domäne abhängen. Während der Apoptose wird BRUCE durch unterschiedliche Mechanismen blockiert. Zum einen wird BRUCE durch Caspasen und HtrA2 proteolytisch gespalten und dadurch inaktiviert. Zum anderen bindet der mitochondriale IAP-Antagonist Smac an die BIR-Domäne von BRUCE und unterdrückt dessen Caspase-inhibitorische Aktivität, indem es die Bindung von BRUCE an Caspasen verhindert.

Aufgrund seiner Lokalisierung an Membranen des trans-Golgi Netzwerks könnte BRUCE ein spezialisiertes, antiapoptotisches Protein mit räumlich begrenzter Aktivität sein. Wie die stark negative Regulation verdeutlicht, scheint außerdem die Entfernung von BRUCE aus der Zelle während der Apoptose wichtig zu sein. Räumlich und zeitlich begrenzte Inhibition von Caspasen während der Apoptose könnte daher für einen geordneten Ablauf apoptotischer Prozesse, wie zum Beispiel den Abbau des Golgi-Apparates und seine Verpackung in apoptotische Vesikel, notwendig sein.

## 2. Einleitung

### Der programmierte Zelltod

Die Fähigkeit mehrzelliger Organismen, die Anzahl ihrer Zellen zu kontrollieren, ist eine Grundvoraussetzung für viele physiologische Vorgänge. Die gezielte Vernichtung von Zellen geschieht durch ein aktives molekulares Selbstmord-Programm, den sogenannten programmierten Zelltod. Dieser erlaubt es dem Organismus, als Gegenspieler der Zellteilung, die Anzahl seiner Zellen zu regulieren, und Zellen, die eine Gefahr darstellen, gezielt zu zerstören. Der programmierte Zelltod ist daher bei Entwicklungsvorgängen und bei der Aufrechterhaltung von Geweben von zentraler Bedeutung. Eine Fehlregulation mit vermindertem oder exzessivem Zelltod kann zu schweren Krankheiten wie Krebs oder Autoimmunerkrankungen bzw. zu neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson führen (Thompson, 1995).

Schon frühzeitig unter verschiedenen Namen beschrieben, wurde für den programmierten Zelltod 1972 letztendlich durch Kerr et al. der Begriff Apoptose geprägt (Kerr et al., 1972). Hierunter versteht man eine stereotype Form des Zelltods, der durch bestimmte morphologische Veränderungen der sterbenden Zellen charakterisiert ist und in vielen Zelltypen und Geweben beobachtet wird. Die frühen Merkmale der Apoptose sind ein Schrumpfen der Zelle, die Kondensation des Chromatins und Blasenbildung der Zellmembran. Später kommt es zur Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen und zum Zusammenbrechen der gesamten Zelle. Die Zellreste werden letztlich in apoptotische Vesikel verpackt und von phagozytischen Zellen aufgenommen. Da während des gesamten Vorgangs die Zellmembran der sterbenden Zelle intakt bleibt, werden keine Zellinhaltsstoffe in die Umgebung freigesetzt. Der apoptotische Zelltod läuft daher ohne begleitende Entzündungsreaktionen ab. Dies unterscheidet ihn vom nekrotischen Zelltod. Die Nekrose ist eine unkontrolliert ablaufende Form des Zelltods, der eintritt, wenn Zellen durch Trauma oder durch schädliche Umwelteinflüsse geschädigt werden. Da hierbei die Plasmamembran beschädigt wird, gelangen Zellinhaltsstoffe ins Freie. Die hiergegen gerichtete Immunantwort führt häufig zu Entzündungen, die

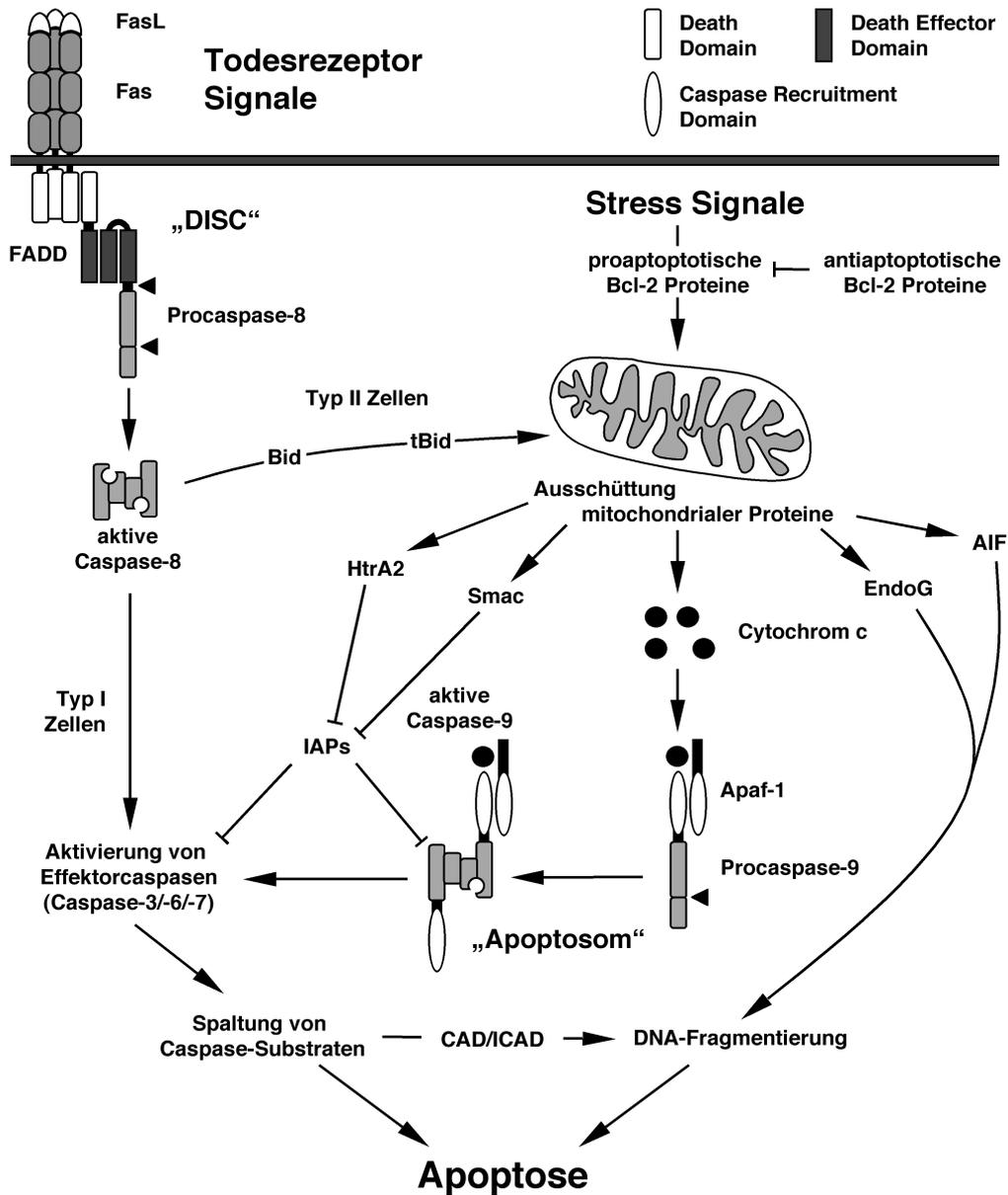
das umliegende Gewebe in Mitleidenschaft ziehen können (Edinger und Thompson, 2004).

In den letzten Jahren wurde zunehmend erkannt, dass neben der Apoptose eine weitere Form des programmierten Zelltods existiert. Bei dieser, Autophagie genannten, Variante des Zelltods zerstört sich die sterbende Zelle, indem sie Teile des Zytoplasmas in sogenannte Autophagosomen verpackt, die dann im Lysosom zersetzt werden. Die Regulation und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen dieser Art des Zelltods, bei dem sich die Zelle letztendlich selbst verdaut, sind aber leider noch nicht in dem Maße verstanden, wie es für den apoptotischen Zelltod der Fall ist (Levine und Klionsky, 2004).

### **Apoptotische Signalwege**

Die von Kerr et al. beschriebenen morphologischen Veränderungen werden durch eine Gruppe von Cysteinproteasen verursacht, die normalerweise als inaktive Vorläuferenzyme (Zymogene) vorliegen und spezifisch während der Apoptose aktiviert werden. Diese Zelltodproteasen sind einander homolog und gehören zur Proteinfamilie der Caspasen. Im Menschen sind zwei unabhängige Signalwege beschrieben, die zur Aktivierung von Caspasen führen (Abb. 1). Der extrinsische Signalweg führt über sogenannte Todesrezeptoren zur Aktivierung von Caspase-8. Der intrinsische Signalweg, aktiviert in Folge von Stress, Genom-Schädigungen oder Entwicklungssignalen Caspase-9. Die Aktivierung dieser sogenannten Initiatorcaspasen führt in einer Caspase-Kaskade zur Aktivierung nachgeordneter Effektorcaspasen. Diese spalten bestimmte Substratproteine durch limitierte Proteolyse und führen so in einem koordinierten Prozess den Tod der Zelle herbei (Hengartner, 2000).

Der extrinsische Signalweg wird aktiviert, wenn Zytokine der TNF-Ligandenfamilie (wie FasL, TNF $\alpha$  oder TRAIL) an sogenannte Todesrezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie (wie Fas, TNF-Rezeptor-1 oder die TRAIL-Rezeptoren) binden (Ashkenazi und Dixit, 1999; Locksley et al., 2001). Todesrezeptoren besitzen ein charakteristisches intrazelluläres Strukturmotiv, welches als *death-domain* bezeichnet wird. Die Bindung des Liganden führt zur Oligomerisierung der



**Abbildung 1. Apoptotische Signalwege**

Apoptose wird über zwei Hauptsignalwege ausgelöst. Der extrinsische Signalweg führt über die Bindung von Liganden an Todesrezeptoren zur Aktivierung von Caspase-8. Der intrinsischen Signalweg aktiviert Caspase-9 über die Ausschüttung proapoptotischer Proteine aus dem Mitochondrium infolge unterschiedlicher Stress Signale. Die Aktivierung der beiden Initiatorcaspasen führt zur Prozessierung von nachgeschalteten Effektorcaspasen, die gezielte Substratproteine spalten und so den Zelltod herbeiführen. Der extrinsische und der intrinsische Signalweg sind über die Spaltung von Bid in tBid durch Caspase-8 miteinander verbunden. Je nach Zelltyp führt die Aktivierung von Todesrezeptoren entweder direkt (Typ I Zellen) oder über das Mitochondrium (Typ II Zellen) zur Aktivierung von Effektorcaspasen.

Rezeptoren und zum Aufbau membrangebundener Signalkomplexe, sogenannter „DISCs“ (für *death-inducing signaling complex*), an den aggregierten *death-domains*. Durch homophile Interaktionen von *death-domains* und *death-effector-*

*domains* (DED) wird über das Adapterprotein FADD (für *Fas-associated death-domain*) Procaspase-8 in den DISC rekrutiert und dort autoproteolytisch aktiviert. Prozessierte Caspase-8 wird in ihrer aktiven Form als Tetramer freigesetzt und kann nun die nachgeordneten Effektorcaspasen der Kaskade aktivieren (Peter und Krammer, 2003).

Der intrinsische Signalweg wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Stimuli, wie DNA-Schäden, Wachstumsfaktormangel oder Sauerstoffunterversorgung ausgelöst und führt zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus dem Mitochondrium (Adams und Cory, 2001; Kuwana und Newmeyer, 2003). Der wohl wichtigste dieser Faktoren ist Cytochrom c, welches unter normalen Umständen an der Elektronentransportkette der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung beteiligt ist. Freigesetztes Cytochrom c bindet im Zytosol an das Molekül Apaf-1 und erlaubt diesem unter Bindung von dATP zu einen großen Proteinkomplex zu polymerisieren. Dieser, Apoptosom genannte, Proteinkomplex stellt eine Aktivierungsplattform für Caspase-9 dar, indem Procaspase-9 über homophile Interaktion der CARDS (für *caspase recruitment domains*) von Procaspase-9 und Apaf-1 rekrutiert und durch Dimerisierung aktiviert wird. Wie im Falle von Caspase-8 führt auch die Aktivierung von Caspase-9 zur proteolytischen Aktivierung von Effektorcaspasen und zum Voranschreiten der Apoptose. Der Mechanismus, welcher zur Ausschüttung proapoptotischer Faktoren aus dem Mitochondrium führt, ist bis heute nicht vollständig verstanden. Es ist jedoch eindeutig, dass die Freisetzung dieser Faktoren durch Proteine der Bcl-2 Familie reguliert wird. Bcl-2-Proteine zeichnen sich durch konservierte Bcl-2-Homologie-Domänen (BH) aus und lassen sich in drei funktionelle Gruppen einteilen (Abb. 2). Die Proteine der ersten Gruppe, wie Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub>, wirken antiapoptotisch und besitzen vier BH-Domänen und eine C-terminale Transmembrandomäne, die sie an mitochondriale oder gelegentlich auch an Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert. Im Gegensatz hierzu besteht die zweite Gruppe aus Proteinen mit proapoptotischer Aktivität. Diese Proteine, zu denen Bax und Bak gehören, besitzen eine ähnliche Struktur wie die Proteine der ersten Gruppe, ihnen fehlt jedoch die N-terminale BH4-Domäne. Die dritte Gruppe besteht aus einer großen Anzahl unterschiedlicher

**Antiapoptotisch**

Gruppe I  Bcl-2 (Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1, Boo)

**Proapoptotisch**

Gruppe II  Bax (Bak, Bok)

Gruppe III  Bik (Bim, Hrk, Blk, Nip3, BNip3)  
Bid (Bad, Bmf, Puma, Noxa)

**Abbildung 2. Die Proteine der Bcl-2 Familie**

Die Proteine der Bcl-2 Familie gliedern sich in einen antiapoptotischen Zweig und zwei proapoptotische Zweige. Proteine der ersten Gruppe, wie Bcl-2, nach dem diese Protein-Familie benannt ist, wirken dem Zelltod entgegen. Bis auf A1 besitzen alle Proteine dieser Gruppe eine Transmembrandomäne (TM). Die Proteine der zweiten Gruppe haben Homologie zu Bax und wirken proapoptotisch. Die proapoptotischen Proteine der dritten Gruppe besitzen eine einzige zentrale BH3-Domäne und kommen entweder mit oder ohne Transmembrandomäne vor.

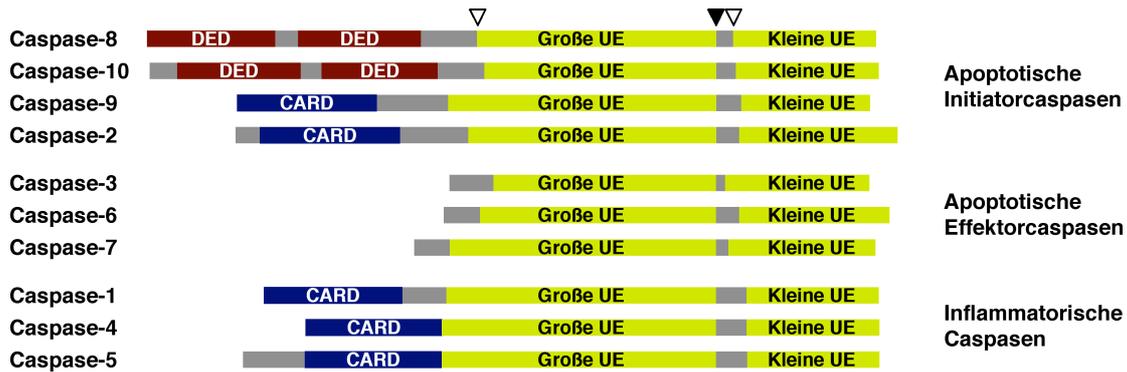
Proteine, deren gemeinsames Merkmal eine einzige BH3-Domäne ist. Die Proteine dieser Gruppe wirken allesamt proapoptotisch und scheinen jeweils aufgrund unterschiedlicher Signale aktiviert zu werden. Über die Spaltung des BH3-Proteins Bid in seine aktive Form tBid durch Caspase-8 kann der intrinsische Signalweg auch über Todesrezeptoren aktiviert werden. Das Ausmaß der Beteiligung des intrinsischen Signalwegs an der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose ist jedoch je nach Zelltyp unterschiedlich (Scaffidi et al., 1998). Ein Hauptmerkmal pro- und antiapoptotischer Bcl-2-Proteine ist ihre Fähigkeit, Homo- und Heterodimere auszubilden und sich so gegenseitig in ihrer Aktivität beeinflussen zu können. Die Balance der pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteine beeinflusst daher die Sensitivität einer Zelle gegenüber dem Zelltod. Weiterhin können proapoptotische Bcl-2-Proteine nach einer Konformationsänderung in die äußere Mitochondrienmembran inserieren und diese permeabilisieren. Sie könnten daher entweder selbst oder im Zusammenspiel mit anderen Proteinen Kanäle bilden, die die Freisetzung von Proteinen aus dem Intermembranraum ermöglichen. Außerdem regulieren Bcl2-Proteine offensichtlich die Homöostase der Mitochondrien. Dies geschieht entweder direkt durch Regulation der „permeability transition pore“ (PTP) oder indirekt durch Regulation der Calciumausschüttung aus dem ER, welche eine Überladung der Mitochondrien mit Calcium verursachen kann. Proapoptotische Bcl-2-Proteine verursachen in beiden Fällen eine Öffnung der PTP und ein Anschwellen der Mitochondrienmatrix in dessen Folge die äußere Mitochondrienmembran reißt und

Proteine des Intermembranraums das Mitochondrium verlassen können. Abgesehen von Cytochrom c wird eine ganze Reihe weiterer proapoptotischer Faktoren aus dem Mitochondrium ausgeschüttet. So sind einige Procaspasen, wie Procaspase-2, -3 und -9, die IAP-Antagonisten Smac/DIABLO und HtrA2/Omi (siehe unten), AIF und EndoG in Mitochondrien lokalisiert und werden nach einem apoptotischen Stimulus freigesetzt. Die Freisetzung von AIF und EndoG führt zur Caspase-unabhängigen Fragmentierung der DNA, welche, zusätzlich zur Caspase-induzierten Fragmentierung durch die DNase CAD (siehe unten), die Kondensation des Chromatins während der Apoptose herbeiführt (Li et al., 2001; Susin et al., 1999).

Neben den oben beschriebenen Signalwegen zur Aktivierung von Caspasen, existiert in Säugern offensichtlich ein weiterer vom ER ausgehender Signalweg, der infolge von ER-Stress aktiviert wird. Dieser wird in der Maus durch die Aktivierung von Caspase-12 induziert, ist aber sonst bislang wenig charakterisiert. Außerdem ist das ER, wie oben beschrieben, über die Regulation der Calcium-Ausschüttung durch Bcl-2 Proteine an der Verstärkung des mitochondrialen Signalwegs beteiligt (Breckenridge et al., 2003; Kuwana und Newmeyer, 2003).

### **Die Rolle von Caspasen**

Die Caspasen sind die zentralen Enzyme der Apoptose. Sie gehören zur Familie der Cystein-Proteasen und spalten Substratproteine spezifisch nach Aspartatresten. Im Menschen sind elf Mitglieder der Caspase-Familie bekannt, die, abgesehen von ihrer Beteiligung an apoptotischen Prozessen, auch die Reifung von Zytokinen vermitteln (Abb. 3). Diese liegen im Normalfall als inaktive Procaspasen vor und werden durch proteolytische Spaltung aktiviert. Alle Caspasen besitzen eine ähnliche Struktur und bestehen aus einer N-terminalen Prodomäne, einer großen Untereinheit mit dem Cystein des aktiven Zentrums und einer C-terminalen kleinen Untereinheit. Während sich Caspasen in ihren katalytischen großen und kleinen Untereinheiten einander sehr ähnlich sind, unterscheiden sich ihre Prodomänen deutlich. Die apoptotischen Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9 und 10) besitzen lange Prodomänen, die an ihrer Aktivierung in oligomeren Aktivierungs-



**Abbildung 3. Schematische Darstellung der humanen Caspasen**

Aufgrund ihrer Funktion lassen sich die humanen Caspasen in drei Gruppen einteilen. Die apoptotischen Initiatorcaspasen besitzen lange Prodomänen mit Protein-Interaktionsmotiven wie *death effector domains* (DED) oder *caspase recruitment domains* (CARD), die ihre Rekrutierung und Aktivierung in oligomeren Aktivierungskomplexen ermöglichen. Apoptotische Effektorcaspasen hingegen werden von anderen Caspasen aktiviert und benötigen daher nur kurze Prodomänen. Inflammatorische Caspasen besitzen wie die apoptotischen Initiatorcaspasen lange Prodomänen mit CARD-Motiven, die ihre Aktivierung z.B. im Inflammasom vermitteln. Inflammatorische Caspasen sind nicht an apoptotischen Vorgängen beteiligt, sondern spielen eine Rolle bei Entzündungsreaktionen und bei der Zytokinreifung. Die Position der ersten aktivierenden Spaltung (alle Caspasen) zwischen der großen und der kleinen katalytischen Untereinheit (UE) und weitere Spaltstellen am N-Terminus der großen und der kleinen Untereinheit (bestimmte Caspasen) sind durch schwarze bzw. weiße Pfeile markiert. Außer den abgebildeten Caspasen existiert im Menschen noch Caspase-14. Caspase-14 besitzt wie Effektorcaspasen eine kleine Prodomäne, ihre Funktion ist bisher jedoch nicht geklärt.

komplexen beteiligt sind. Apoptotische Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) hingegen besitzen kurze Prodomänen, die möglicherweise ihre Lokalisierung in der Zelle regulieren (Fuentes-Prior und Salvesen, 2004; Shi, 2002).

Alle bisher strukturell untersuchten Caspasen liegen in ihrer aktiven Form als Tetramer vor. Dieses besteht aus zwei Heterodimeren aus einer großen und einer kleinen Untereinheit und entsteht durch proteolytische Spaltung der Proformen der Caspasen. Es sind zwei Mechanismen für die Aktivierung von Caspasen erkennbar. Effektorcaspasen existieren in ihrer inaktiven Proform als Zymogen-Dimere und werden durch proteolytische Spaltung zwischen ihrer großen und kleinen Untereinheit und zwischen ihrer Prodomäne und großen Untereinheit aktiviert. Durch die Prozessierung nimmt die in der Proform in einer ungeordneten Faltung vorliegende Substratbindestelle ihre aktive Konformation an, so dass Substrate an das katalytische Zentrum binden und gespalten werden können. Da die Spaltung von Effektorcaspasen in der Regel durch andere Caspasen erfolgt, resultiert hieraus eine proteolytische Signal-Kaskade, in der übergeordnete

(Initiator-) Caspasen nachgeordnete (Effektor-) Caspasen aktivieren. Da Initiator-caspasen keine übergeordneten Caspasen besitzen, die sie prozessieren können, werden sie über einen anderen Mechanismus aktiviert. Im Gegensatz zu Effektor-caspasen sind Initiator-Procaspasen im Normalzustand latent aktive Monomere. Die Zymogenizität (das Verhältnis der Aktivität der prozessierten gegenüber der unprozessierten Form) von Caspase-8 und -9 beträgt nur 100 bzw. 10, im Gegensatz zu >10.000 für Caspase-3 (Stennicke und Salvesen, 1999). Dies heißt, dass Initiator-Procaspasen durch Spaltung nur wenig mehr aktiviert werden können. Ihre Aktivierung erfolgt daher während der Apoptose durch Rekrutierung in große Proteinkomplexe, wo sie durch Dimerisierung aktiviert werden (Boatright et al., 2003; Donepudi et al., 2003; Renatus et al., 2001). Im Falle des Todesrezeptor Signalwegs wird Procaspase-8 über die DEDs ihrer N-terminalen Prodomäne in den DISC rekrutiert. Durch die so induzierte hohe Zymogen-Konzentration und durch Dimerisierung reicht die Aktivität von Procaspase-8 dazu aus, dass sich unterschiedliche Proenzym-Moleküle gegenseitig durch „*induced proximity*“ proteolytisch aktivieren und aktive Caspase-8 Moleküle freigesetzt werden (Muzio et al., 1998). Die Aktivierung von Caspase-9 im intrinsischen Signalweg erfolgt hingegen im Apotosom, an das Procaspase-9 über ihre N-terminale CARD-Prodomäne gebunden wird. Für die Aktivierung von Caspase-9 ist eine proteolytische Spaltung offensichtlich nicht notwendig (Stennicke et al., 1999). Vielmehr führt die Bindung an das Apotosom zu einer Dimerisierung von Procaspase-9, welche das katalytische Zentrum in seine aktive Konformation bringt. Hierdurch entsteht eine 1000fach höhere katalytische Aktivität (Rodriguez und Lazebnik, 1999). Die eigentlich aktive Caspase-9 ist daher nicht eine prozessierte Form sondern die an das Apotosom gebundene dimerisierte Procaspase-9. Die nachfolgende Spaltung von Caspase-9 zwischen der großen und der kleinen Untereinheit dient wahrscheinlich eher zur Stabilisierung der aktiven Form und weniger zur weiteren Aktivierung.

Die Aktivierung von Caspasen führt nicht zu einem generellen Abbau zellulärer Proteine. Vielmehr spalten aktive Caspasen eine begrenzte Anzahl (schätzungsweise einige hundert) bestimmter Substrate an einer oder manchmal

mehreren genau definierten Schnittstellen (Fischer et al., 2003). Die Spaltung dieser Zielsubstrate führt in den meisten Fällen zur Inaktivierung des Proteins. Beispiele hierfür sind die Inaktivierung des an der DNA-Reparatur beteiligten Enzyms Poly(ADP-Ribose)Polymerase (Lazebnik et al., 1994) oder die Spaltung von Strukturproteinen der Zelle wie Laminen (Rao et al., 1996). Durch die Spaltung und Inaktivierung antiapoptotischer Proteine wie z.B. der *inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs) wird die Inhibition von Caspasen aufgehoben und das apoptotische Signal verstärkt (Clem et al., 2001; Deveraux et al., 1999; Johnson et al., 2000). Caspase-Spaltung kann aber auch zur Aktivierung von Proteinen führen. Beispiele für eine direkte Aktivierung sind die Caspase-Kaskade oder die Spaltung des proapoptotischen BH3-Proteins Bid in tBid durch Caspase-8 (Li et al., 1998b; Luo et al., 1998). Ein Beispiel für einen indirekten Mechanismus ist die Aktivierung der Caspase-aktivierten DNase (CAD). CAD liegt in Zellen in einem inaktiven Komplex mit ihrer inhibitorischen Untereinheit ICAD vor. Die Spaltung der inhibitorischen Untereinheit durch Caspase-3 führt zur Freisetzung der katalytischen Untereinheit, die dann genomische DNA in nukleosomale Fragmente zerschneidet (Enari et al., 1998; Liu et al., 1997; Sakahira et al., 1998). Global gesehen führt die Spaltung von Caspase-Substraten zur Verstärkung des apoptotischen Signals durch Inaktivierung antiapoptotischer und Aktivierung proapoptotischer Faktoren. Hierauf folgt der Zusammenbruch des Stoffwechsels und die Zerstörung der Zellstruktur. Apoptotische Zellen senden außerdem lösliche und auf ihrer Oberfläche exponierte Signale aus, die phagozytische Zellen anlocken und es diesen ermöglichen, die sterbende Zelle aufzunehmen (Lauber et al., 2004). In einer koordinierten Abfolge von Ereignissen wird somit der Tod der Zelle herbeigeführt.

### **Inhibitor of Apoptosis Proteins**

Da die Aktivierung der Apoptose durch die proteolytische Caspase-Kaskade ein irreversibler Prozess ist, muss die Aktivität der Caspasen streng reguliert werden. Abgesehen von den viralen Caspase-Inhibitoren CrmA (Ray et al., 1992) und p35 (Clem et al., 1991), sind die *inhibitor of apoptosis proteins* die einzigen bisher bekannten Caspase-Inhibitoren (Deveraux und Reed, 1999; Miller, 1999; Salvesen

und Duckett, 2002). Sie wurden in Studien mit Baculoviren entdeckt und kurz darauf auch in Säugern und *Drosophila* gefunden. Die humanen IAPs (Abb. 4) besitzen ein bis drei Kopien eines charakteristischen, etwa 70 Aminosäuren großen Zinkbindemotivs, in dem konservierte Cysteine und ein Histidin in der Sequenz  $CX_2CX_{16}HX_{6-8}C$  angeordnet sind. Aufgrund dieses, *baculoviral-IAP-repeat* (BIR) genannten, Strukturmotivs werden die IAPs den sogenannten *BIR-domain-containing proteins* (BIRPs) zugerechnet (Verhagen et al., 2001). Da IAPs über ihre BIR-Domänen an Caspasen binden und diese inhibieren können, sind sie wahrscheinlich der wichtigste Kontrollpunkt bei der Aktivierung von Caspasen während der Apoptose. Sie sind nicht nur in der Lage der zufälligen Aktivierung von Caspasen in geringen Mengen entgegenzuwirken, sondern setzen auch einen Schwellenwert, ab dem eine effektive Verstärkung des Caspase-Signals erst möglich ist. In der Tat sind Zellen, die eine erhöhte Expression von IAPs aufweisen, vor der Apoptose geschützt, wobei hier auch Caspase-unabhängige Mechanismen eine Rolle spielen können.

Aufgrund einer Vielzahl zellbiologischer, biochemischer und struktureller Studien ist XIAP (Duckett et al., 1996; Liston et al., 1996; Uren et al., 1996) das am besten charakterisierte IAP. XIAP hat die stärkste Caspase-inhibitorische Aktivität aller bekannten IAPs und kann mehrere Caspasen mit unterschiedlichen Mechanismen inhibieren (Deveraux et al., 1998; Deveraux et al., 1997). Die Inhibition der Effektorcaspasen-3 und -7 geschieht durch das Verbindungsstück zwischen BIR1 und BIR2 von XIAP (Chai et al., 2001; Huang et al., 2001; Riedl et al., 2001). Dieses Verbindungspeptid bindet als Pseudosubstrat an die Substratbindestelle der Caspasen, ohne jedoch gespalten zu werden, und blockiert so den Zugang für echte Caspase-Substrate zum aktiven Zentrum. Da sich, wie oben beschrieben, die durch XIAP erkannte Struktur der Substratbindestelle erst in den aktiven Caspasen ausbildet, bindet XIAP nur aktive Effektorcaspasen, nicht aber deren Proformen. Die Inhibition von Caspase-9 erfolgt nach einem anderen Prinzip unter Beteiligung der dritten BIR-Domäne (BIR3) von XIAP. Die Bindung der XIAP-BIR3 an die Interaktionsfläche von Caspase-9 verhindert deren Dimerisierung (Shiozaki et al., 2003). Da die Dimerisierung für Caspase-9 der kritische



**Abbildung 4. Die Proteine der BIRP Familie**

Abgebildet sind die humanen Vertreter der Familie der BIR-Domänen Proteine. Die anti-apoptotischen *inhibitor of apoptosis proteins* XIAP, cIAP1, cIAP2, ML-IAP und NAIP wirken mittels ihrer BIR-Domänen als direkte Caspase-Inhibitoren. Einige IAPs besitzen aufgrund ihrer RING-Domäne Ubiquitin-Ligase Aktivität. Ein zweiter Ast der BIRP Familie mit einer leicht abgewandelten BIR-Domäne wird durch Survivin und BRUCE gebildet. Survivin ist an der Regulation der Zellteilung beteiligt. Aufgrund seiner Größe von 528 kDa und seiner C-terminalen UBC-Domäne ist BRUCE ein äußerst ungewöhnlicher Vertreter der BIRP-Familie.

Aktivierungsschritt ist, wird sie hierdurch vollständig blockiert. Caspase-9 muss für eine effiziente Bindung an XIAP zwischen ihrer großen und kleinen Untereinheit prozessiert sein (Srinivasula et al., 2001). Durch die Spaltung nach Asp316 entsteht in der kleinen Untereinheit die N-terminale Tetrapeptidsequenz ATPF, die in eine Vertiefung auf der BIR3-Oberfläche bindet. Diese Vertiefung wird auch von den IAP-Antagonisten (siehe unten) angesteuert, um die Inhibition der Caspasen durch IAPs aufzuheben (Shi, 2002). Interessanterweise lassen die strukturellen Betrachtungen der Inhibition von Caspasen durch XIAP vermuten, dass eine Co-Evolution von IAPs und Caspasen stattgefunden hat, und dass bestimmte Strukturen der Caspasen nur entstanden sind, damit diese durch IAPs inhibiert werden können (Fuentes-Prior und Salvesen, 2004). Ein IAP, welches Caspase-8 inhibiert, wurde bis heute nicht gefunden. Die physiologische Funktion der IAPs bleibt bisher jedoch im Dunkeln. So haben Mäuse, in denen das *XIAP*-Gen zerstört wurde, keinen erkennbaren Phänotyp und ihre Zellen reagieren wie WT Zellen auf apoptotische Stimuli (Harlin et al., 2001).

Ein zweiter Ast der BIRP-Familie besteht aus den Säugerproteinen Survivin und BRUCE, *Drosophila* Deterin und dBRUCE, den *Caenorhabditis elegans* BIR-Proteinen und den BIR-Proteinen der Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* (Verhagen et al., 2001). Die Proteine dieses Asts der BIRP-Familie unterscheiden sich von den antiapoptotischen IAPs durch eine leicht unterschiedliche BIR-Domäne mit Insertionen einiger Aminosäuren an zwei

konservierten Stellen. Obwohl anfangs als antiapoptotisches Protein beschrieben (Ambrosini et al., 1997), zeigte sich, dass Survivin, aber auch seine Verwandten im Wurm und in der Hefe, eher als Regulatoren der Zellteilung fungieren (Li et al., 1998a; Reed und Bischoff, 2000; Verhagen et al., 2001). Sie assoziieren während der Mitose mit dem Spindelapparat und Kinetochoren und ihre Entfernung aus der Zelle führt zu großen Problemen bei der Chromosomensegregation und der Zytokinese (Uren et al., 2000). Möglicherweise ist Survivin die Urform der BIRPs in Säugern, welches zusätzlich zu seiner eigentlichen Funktion in der Zellteilung eine zweite antiapoptotische Funktion erlangt hat. Es stellt somit eine Verbindung zwischen Zellteilung und Zelltod her. Die antiapoptotischen IAPs könnten sich als perfektionierte Caspase-Inhibitoren aus der BIR-Domäne von Survivin entwickelt haben.

### **Mechanismen zur Inhibition von IAPs**

Damit es im Falle eines apoptotischen Signals zur vollen Aktivierung von Caspasen kommt, existieren mehrere Mechanismen, die den IAPs entgegen wirken, und somit die Inhibition der Caspase aufheben (Shi, 2002). In Säugern wurden mit dem homodimeren Smac/DIABLO (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000) und der trimeren Serinprotease HtrA2/Omi (Hegde et al., 2002; Martins et al., 2002; Suzuki et al., 2001a; Verhagen et al., 2002) zwei Faktoren identifiziert, die während der Apoptose aus dem Mitochondrium ausgeschüttet werden und die Caspase-inhibitorische Aktivität der IAPs blockieren. Beide Faktoren besitzen ein N-terminales Aminosäuremotiv, über welches sie an IAPs binden. Dieses sogenannte IAP-Bindemotiv (IBM) hat die Tetrapeptidsequenz AVPI (Smac) oder AVPS (HtrA2) und bindet in eine hydrophobe Vertiefung der BIR-Domänen (Liu et al., 2000; Wu et al., 2000). Die kritische Aminosäure des IBMs für diese Bindung ist das N-terminale Alanin, welches mit mehreren Aminosäuren der BIR-Domäne Wasserstoffbrücken bildet. Durch die Bindung dieser beiden Faktoren an die IAPs wird die Interaktion mit Caspasen verhindert, so dass diese nicht mehr inhibiert werden (Chai et al., 2000; Chai et al., 2001). Mit Smac $\beta$  existiert eine zytosolische Spleißvariante von Smac, die einen alternativen N-Terminus ohne IBM aufweist (Roberts et al., 2001;

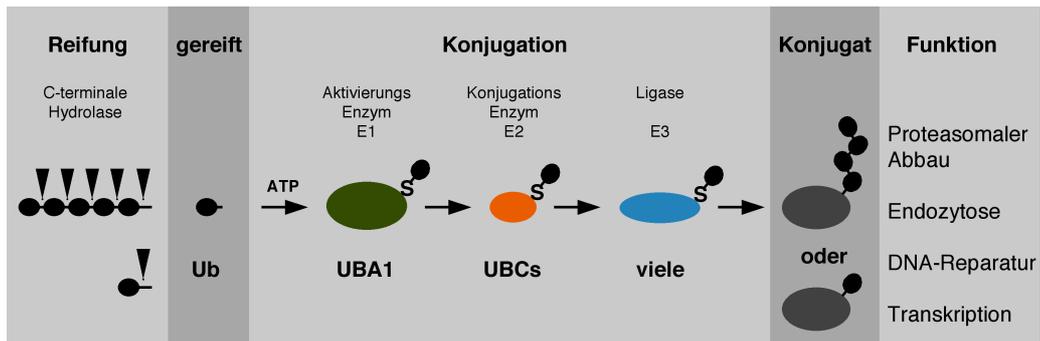
Srinivasula et al., 2000). Diese Variante kann die Caspase-inhibitorische Aktivität der IAPs *in vitro* nicht blockieren, wirkt *in vivo* aber genauso Apoptose-fördernd wie Smac. Strukturelle Untersuchungen haben gezeigt, dass zwischen Smac und XIAP eine weitere Interaktionsfläche existiert (Wu et al., 2000), die möglicherweise hierbei eine Rolle spielt und IBM-unabhängige Funktionen von Smac vermittelt.

IAP-bindende Proteine wurden auch in genetischen Screens in *Drosophila* entdeckt (Hay et al., 2004). Die vier Faktoren Reaper, Hid, Grim und Sickie erfüllen in der Fliege zum Teil redundante Aufgaben haben jedoch bis auf ihr N-terminales IAP-Bindemotiv weder untereinander noch zu Smac oder HtrA2 strukturelle Ähnlichkeit (Bergmann et al., 2003). Sie werden auch nicht aus dem Mitochondrium freigesetzt, sondern sind zytosolische Proteine und scheinen entwicklungsabhängig exprimiert zu werden. Diese Proteine wirken proapoptotisch und führen in Zellen, in denen sie exprimiert werden, durch die Herunterregulierung des *Drosophila* IAPs DIAP1 zum Tod (siehe unten).

Neben der reversiblen Inhibition der IAPs durch IAP-bindende Proteine existieren offensichtlich auch irreversible Mechanismen, die zu einer proteolytischen Inaktivierung führen. Zum Einen werden IAPs während der Apoptose wie oben erwähnt durch Caspasen gespalten. Zum Anderen wurde gezeigt, dass HtrA2, zusätzlich zu seiner Inhibition durch Verdrängung von Caspasen, IAPs durch seine Serinprotease-Aktivität proteolytisch inaktiviert (Srinivasula et al., 2003; Yang et al., 2003). Des Weiteren werden IAPs durch das Ubiquitin-Proteasom System abgebaut (siehe unten).

### **Regulation der Apoptose durch Ubiquitin**

In den letzten Jahren hat die Regulation der Apoptose durch Ubiquitin zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen. Ubiquitylierung von Substratproteinen durch das Ubiquitin-Konjugationssystem (Pickart, 2001) führt in den meisten Fällen zum Abbau im 26S-Proteasom, einem großen multikatalytischen Proteasekomplex. Ubiquitin wird über eine Enzymkaskade, bestehend aus dem Ubiquitin-Aktivierenden Enzym (E1), Ubiquitin-Konjugations Enzymen (E2) und Ubiquitin-Ligasen (E3) über eine Isopeptidbindung kovalent mit einem Lysinrest des Substratproteins verknüpft



**Abbildung 5. Das Ubiquitin-Konjugationssystem**

Die Markierung von Proteinen mit Ubiquitin erfolgt über das Ubiquitin-Konjugationssystem. Die Vorläuferformen von Ubiquitin werden am C-Terminus von einer Hydrolase prozessiert und freies Ubiquitin (Ub) durch ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) aktiviert. In einer ATP-abhängigen Reaktion bildet das E1 hierbei einen Thioester mit dem C-Terminus von Ubiquitin. Nachfolgend wird Ubiquitin auf eines mehrerer Ubiquitin-Konjugationsenzyme (E2) übertragen. Einige E2-Enzyme sind in der Lage Ubiquitin direkt auf Lysinreste der Substratproteine zu konjugieren. Die meisten E2-Enzyme benötigen hierfür jedoch zusätzlich eine Ubiquitin-Ligase (E3). Einige E3-Ligasen, wie die HECT-E3-Ligasen, wirken katalytisch und bilden selbst einen Thioester mit Ubiquitin. RING-Finger E3-Ligasen oder aus mehreren Proteinen aufgebaute E3-Komplexe, wie APC oder SCF, bilden keinen Thioester und wirken, indem sie Substrate an E2-Enzyme rekrutieren. Normalerweise werden mehrere Ubiquitin-Moleküle in Form von Ubiquitinketten auf das Substrat übertragen. Je nach Art der Verknüpfung dient die Ubiquitylierung als Signal für unterschiedliche Vorgänge.

(Abb. 5). Durch das wiederholte Durchlaufen dieser Reaktion (Multiubiquitylierung) können auf dem Substratprotein nach und nach lange Polyubiquitinketten aufgebaut werden. Dabei wird das C-terminale Glycin eines neuen Ubiquitinmoleküls an ein Lysin des letzten bereits verknüpften Ubiquitins der wachsenden Kette konjugiert. Für manche dieser Reaktionen wird zusätzlich ein Multiubiquitylierungsfaktor (E4) benötigt (Koegl et al., 1999). Je nach Art des für die Verknüpfung verwendeten Lysins kann die Ubiquitylierung unterschiedliche Funktionen erfüllen. Die Verknüpfungen über Lys29 und Lys48 führen üblicherweise zum Abbau des modifizierten Proteins durch das Proteasom (Hochstrasser, 1996). Lange Zeit dachte man, dass die Ubiquitin-Modifikation ausschließlich als Abbausignal dient. Mittlerweile ist aber erkannt geworden, dass Ubiquitylierung auch andere, Proteolyse-unabhängige, Funktionen signalisieren kann. So ist die Ubiquitylierung von Proteinen an so unterschiedlichen Prozessen wie der Endozytose (Hicke und Dunn, 2003), der DNA-Reparatur (Hoegel et al., 2002) oder der Kontrolle der Transkription (Muratani und Tansey, 2003) beteiligt. Diese Funktionen werden über alternative Arten der Ubiquitin-Modifikation, wie

Mono-Ubiquitylierung oder über Lys63-verknüpfte Ketten, vermittelt. Da die Ubiquitylierung selbst reversibel ist, eignet sie sich, wie die Phosphorylierung, hervorragend für regulatorische Mechanismen. Der Abbau von Proteinen im Proteasom ist hingegen irreversibel und kann somit Signalwege wie die Apoptose in eine bestimmte Richtung treiben. Spätestens seit der Entdeckung der Regulation des Tumorsuppressors p53 durch die Ubiquitin-Ligase Mdm2 (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997) ist klar, dass das Ubiquitin-Proteasom-System eine wichtige Rolle in der Apoptose spielt. Weitere Beispiele für die Beteiligung des Ubiquitin-Proteasom-Systems an der Regulation apoptotischer Prozesse sind der NF $\kappa$ B-Signalweg, bei dem mehrere Schritte durch Ubiquitin-abhängige Degradation gesteuert werden, und der Abbau von Proteinen der Bcl-2 Familie (Jesenberger und Jentsch, 2002).

Interessanterweise besitzen XIAP, cIAP1, cIAP2 und ML-IAP zusätzlich zu ihren BIR-Domänen, die ihre Caspase-inhibitorische Funktion vermitteln, noch eine C-terminale RING-Finger-Domäne. Diese Domäne ist ein charakteristisches Strukturmotiv für RING-Ubiquitin-Ligasen, und in der Tat konnte gezeigt werden, dass cIAP1, cIAP2 und XIAP Ubiquitin-Ligaseaktivität besitzen. So ubiquitylieren sich cIAP1 und XIAP infolge eines apoptotischen Stimulus in Abhängigkeit von ihrer RING-Domäne selbst und werden über das Proteasom abgebaut (Yang et al., 2000). Als weitere Ubiquitylierungs-Substrate wurden bisher noch die IAP-Interaktoren Caspase-3, Caspase-7 und Smac gefunden (Hu und Yang, 2003; Huang et al., 2000; MacFarlane et al., 2002; Suzuki et al., 2001b). Die cIAP1-vermittelte Ubiquitylierung und der nachfolgende proteasomale Abbau von TRAF2 am TNF-Rezeptor-2 ist außerdem ein erster Hinweis auf die Rolle von TNF-Rezeptor-gebundenen IAPs im TNF-Signalweg (Li et al., 2002). Eine Reihe von Studien in *Drosophila* haben einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der möglichen Rolle der Ubiquitin-Ligase Aktivität der IAPs bei der Regulation der Apoptose geleistet (Hays et al., 2002; Holley et al., 2002; Olson et al., 2003; Ryoo et al., 2002; Wilson et al., 2002; Wing et al., 2002; Yoo et al., 2002). Wie Säuger-IAPs hat auch *Drosophila* DIAP1 RING-Ubiquitin-Ligaseaktivität mit der es sich selbst, die *Drosophila* Initiatorcaspase Dronc und die IAP-Antagonisten Reaper, Hid und Grim

ubiquitylieren kann. Zusätzlich zur Inhibition der Caspase-inhibitorischen Aktivität bewirken Reaper, Grim und möglicherweise auch Hid mit Hilfe von UBCD1 und Morgue eine Verstärkung der Autoubiquitylierung von DIAP1, gefolgt von proteasomalem Abbau. Zusätzlich bewirken Reaper und Grim eine globale Suppression der Proteinsynthese. Die momentane Interpretation dieser Befunde ist, dass DIAP1 in normalen Zellen an geringe Mengen latent aktivierter Caspasen bindet und diese entweder direkt oder durch Ubiquitylierung inhibiert (Muro et al., 2002). Zugleich werden kleine Mengen der IAP-Antagonisten ebenfalls durch Ubiquitylierung und möglicherweise Co-Degradation (Ditzel et al., 2003) mit DIAP1 eliminiert, so dass ein apoptotisches Signal unterhalb eines wirksamen Schwellenwerts bleibt. Wird im Falle der Apoptose das Expressionsniveau der IAP-Antagonisten Reaper, Hid und Grim hochreguliert, inaktiviert dies DIAP1 auf mehreren Arten. Die Bindung der IAP-Antagonisten an DIAP1 führt zum einen zur Derepression von Caspasen und zum anderen zu verstärkter Autoubiquitylierung und zum Abbau von DIAP1. Außerdem bewirkt eine generell gedrosselte Proteinsynthese ein schnelles Verschwinden kurzlebiger Proteine wie DIAP1 (Bergmann et al., 2003; Ditzel und Meier, 2002). Wie gezeigt wurde, ist die Herunterregulation von DIAP1 zur Aktivierung von Caspasen und zur Induktion des Zelltods in *Drosophila* ausreichend (Wang et al., 1999). Auch in Säugern trägt die Ubiquitin-Ligasaktivität von IAPs zu deren antiapoptotischen Potential bei und wird durch Smac moduliert (Creagh et al., 2004; Fu et al., 2003). Außerdem wurde gezeigt, dass Smac den Abbau von IAPs beschleunigt (Yang und Du, 2004). Offensichtlich besteht zwischen IAPs, Caspasen und IAP-Antagonisten ein sehr fein austariertes Gleichgewicht, welches das Schicksal einer Zelle bestimmt oder zumindest deren Sensitivität gegenüber apoptotischen Reizen beeinflusst.

### **Das BRUCE-Protein**

BRUCE ist ein ungewöhnliches Mitglied der BIRP-Familie. Die cDNA von BRUCE wurde ursprünglich in einem Homologie-Screen nach Genen, die für Ubiquitin-konjugierende Enzyme (UBCs) codieren, in der Maus entdeckt (Hauser et al., 1998). Die ca. 16 kb lange mRNA des *BRUCE*-Gens codiert ein riesiges 528 kDa

Protein mit einer einzigen N-terminalen BIR-Domäne, die der von Survivin gleicht. Im Gegensatz zu Survivin und den anderen IAPs besitzt BRUCE jedoch zusätzlich eine, für Ubiquitin-Konjugations-Enzyme charakteristische, C-terminale UBC-Domäne. Ein weiteres ungewöhnliches Merkmal von BRUCE ist seine periphere Lokalisierung auf der zytosolischen Seite der Membranen des trans-Golgi Netzwerks (TGN) und anderer vesikulärer Strukturen (Hauser et al., 1998). BRUCE wird in fast allen Geweben der Maus exprimiert, wobei die Expression im Gehirn, in der Leber und in den Nieren am stärksten ist und offensichtlich entwicklungsabhängig gesteuert wird (Hauser et al., 1998). Das humane Homologe, Apollon, ist in manchen Tumoren stark überexprimiert (Chen et al., 1999). Obwohl BRUCE eine Survivin-ähnliche BIR-Domäne besitzt, die auf eine mögliche Beteiligung an Zellzyklus-Prozessen schließen lässt, wurde eine Beteiligung von BRUCE an apoptotischen Prozessen beobachtet. So reagieren Zellen, in denen die Expression von *BRUCE* durch Antisense-Oligonukleotide verringert wird, mit verstärkter Apoptose auf DNA-schädigende Substanzen (Chen et al., 1999). Außerdem führt der Abbau von BRUCE über das Ubiquitin-Proteasom System und die Herunterregulierung der *BRUCE*-Expression durch RNAi zur Apoptose (Qiu et al., 2004). In *Drosophila* kann die Überexpression des *Drosophila*-Homologen dBruce den durch die IAP-Antagonisten Reaper und Grim ausgelösten Zelltod verhindern. Der durch Hid induzierte Zelltod wird jedoch nicht durch dBruce beeinflusst (Vernooy et al., 2002). Obwohl dBruce hierfür offensichtlich seine Ubiquitin-Konjugationsaktivität benötigt, scheint es Reaper und Grim nicht durch deren Abbau zu inhibieren (Vernooy et al., 2002). Möglicherweise erfüllt dBruce spezialisierte Aufgaben bei der Regulation von Vorgängen, die auf nicht-apoptotischer Caspase-Aktivität beruhen, wie z.B. der Spermiendifferenzierung (Arama et al., 2003). Obgleich diese Befunde zeigen, dass BRUCE eine antiapoptotische Funktion erfüllt, bleiben die dahinterstehenden Mechanismen im Dunkeln.

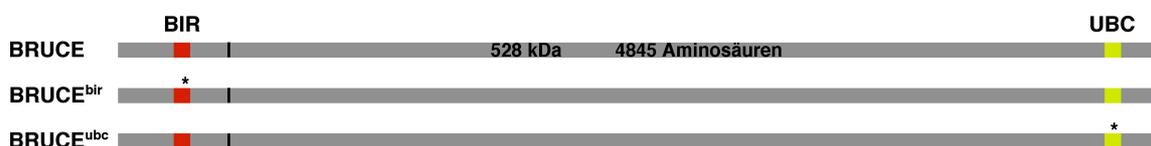
### **Zielsetzung der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des BRUCE-Proteins. Um BRUCE zellbiologisch und biochemisch untersuchen zu können, musste zuerst ein robustes System zur Überexpression von BRUCE und BRUCE-Mutanten in Säugerzellen etabliert werden. Ausgehend hiervon sollte eine Methode zur Aufreinigung des BRUCE-Proteins erarbeitet werden. Des Weiteren sollte eine Methode entwickelt werden, um BRUCE mittels RNAi *in vivo* aus Zellen zu entfernen. Da aufgrund der N-terminalen BIR-Domäne eine Funktion von BRUCE als Apoptose-Inhibitor wahrscheinlich war, sollte mit diesen Hilfsmitteln eine mögliche Beteiligung von BRUCE an apoptotischen Prozessen untersucht werden. Eine erste Eingrenzung der molekularen Abläufe, an denen BRUCE beteiligt sein könnte, sollte über die Identifizierung von interagierenden Faktoren erfolgen. Hierfür sollten in einer Immun-Affinitätsaufreinigung mitgereinigte Proteine massenspektrometrisch identifiziert werden. Es wurde aber auch gezielt nach interagierenden apoptotischen Faktoren gesucht. Nachfolgend sollte das funktionelle Zusammenspiel zwischen BRUCE und den zu identifizierenden Interaktoren mit geeigneten Experimenten *in vivo* und *in vitro* genauer untersucht werden.

### 3. Ergebnisse

#### Wildtyp und funktionelle Mutanten von BRUCE

Zu Beginn dieser Arbeit war nur wenig über die molekulare Funktionsweise des BRUCE-Moleküls in der Zelle bekannt. Um zellbiologische und biochemische Fragestellungen bearbeiten zu können, wurden daher Expressionkonstrukte für BRUCE hergestellt. Ursprünglich wurde die cDNA des *BRUCE*-Gens in einem Homologie-Screen nach Genen, die für Ubiquitin-konjugierende Enzyme (UBCs) kodieren, in der Maus entdeckt und durch  $\lambda$ -Phage cDNA-walking in 15 überlappenden Klonen isoliert (Hauser et al., 1998). Für die Expression von BRUCE in Säugerzellen wurde die zusammengesetzte cDNA mit einem offenen Leserahmen von 14538 bp letztendlich in den pCI-Expressionsvektor kloniert. Hierbei wurden zwei, durch stille Mutagenese eingefügte, seltene Restriktions-Schnittstellen verwendet. Diese Klonierungsstrategie erlaubte es, die Wildtyp (WT) DNA-Sequenzen der N-terminalen BIR-Domäne und der C-terminalen UBC-Domäne durch mutierte DNA-Kassetten zu ersetzen (Abb. 6). Zur Herstellung einer BRUCE-Mutante mit fehlender Ubiquitin-Konjugationsaktivität ( $BRUCE^{ubc}$ ) wurde das konservierte Cystein des aktiven Zentrums der UBC-Domäne durch ein Serin ersetzt. Zur Inaktivierung der BIR-Domäne ( $BRUCE^{bir}$ ) wurde das C-terminal konservierte Cystein dieser Domäne ebenfalls durch ein Serin ersetzt. Die Mutation dieses Cysteins, welches in der BIR-Domäne ein Zinkatom koordiniert, führt in Survivin zum Verlust der antiapoptotischen Aktivität (Li et al., 1998a). Die mutierten Domänen wurden in den *BRUCE*-Klon eingefügt und N- und/oder C-terminale



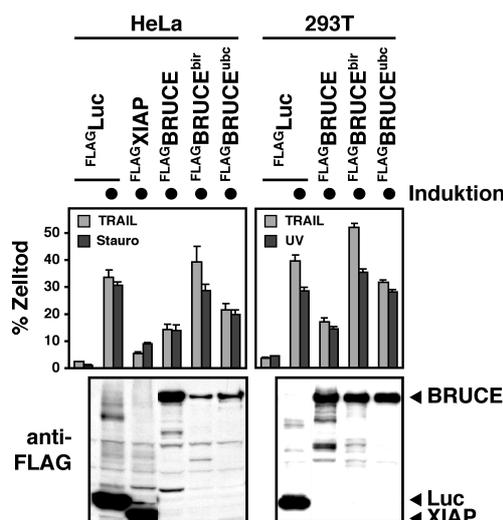
#### Abbildung 6. Schematische Darstellung von BRUCE WT und Mutanten

Das BRUCE-Protein hat eine Größe von 528 kDa. Die vollständige *BRUCE*-cDNA hat eine Länge von 14538 bp und codiert für 4845 Aminosäuren. Die BIR- bzw. UBC-Domänen wurden in den beiden Mutanten  $BRUCE^{bir}$  (C330S) und  $BRUCE^{ubc}$  (C4654S) jeweils durch den gezielten Austausch einer einzigen Aminosäure inaktiviert. Die Positionen dieser Mutationen sind jeweils durch einen Stern gekennzeichnet. Der schwarze Balken markiert die Position des Epitops des monoklonalen anti-BRUCE Antikörpers, der in den Experimenten verwendet wurde.

Epitop-markierte Varianten von allen Allelen hergestellt (<sup>FLAG</sup>BRUCE, <sup>myc</sup>BRUCE, <sup>myc</sup>BRUCE<sup>FLAG</sup>), um die Detektion mit Antikörpern zu ermöglichen.

### **BRUCE schützt Zellen gegen den programmierten Zelltod**

Aufgrund seiner N-terminalen BIR-Domäne kann BRUCE der Familie der *BIR-domain-containing proteins* (BIRPs) zugeordnet werden. Die BIRP-Familie besteht aus zwei Gruppen, den IAP-ähnlichen BIRPs, die Regulatoren der Apoptose sind, und den Survivin-ähnlichen BIRPs, die Funktionen im Zellzyklus und in der Zytokinese haben (Verhagen et al., 2001). Die genaue Analyse der BIR-Domäne von BRUCE zeigt, dass BRUCE zu den Survivin-ähnlichen BIRPs gehört. Man würde daher vermuten, dass BRUCE eher ein Zellzyklusregulator ist. Studien in Säugerzellen und in *Drosophila* deuteten jedoch auf eine mögliche Funktion von BRUCE als Apoptose-Inhibitor hin (Chen et al., 1999; Vernooy et al., 2002). Zur Untersuchung, ob BRUCE die Apoptose direkt inhibieren kann, wurden HeLa-Zellen mit den oben beschriebenen <sup>FLAG</sup>BRUCE-Expressionskonstrukten transfiziert. Zum Vergleich wurden FLAG-Epitop-markierte Luciferase (negative Kontrolle) oder XIAP (positive IAP-Kontrolle) exprimiert. Die transfizierten Zellen wurden anschließend entweder mit TRAIL/Cycloheximid (CHX) oder Staurosporin behandelt, um Apoptose zu induzieren. TRAIL (für *TNF-related death-inducing ligand*) löst über TRAIL-Rezeptoren den Todesrezeptor-vermittelten Apoptose-Signalweg aus. Staurosporin ist ein Proteinkinase-Hemmer und stimuliert den mitochondrialen Signalweg der Apoptose. In beiden Fällen löste die Stimulation in etwa 30% bis 35% der Luciferase-transfizierten Kontrollzellen Apoptose aus. Die Expression von WT <sup>FLAG</sup>BRUCE reduzierte die Apoptose im Vergleich zu den Kontrollzellen um etwa 50% (Abb. 7, links). Dies zeigt, dass BRUCE in der Lage ist, die Zellen vor Apoptose zu schützen. Die antiapoptotische Aktivität von BRUCE war in diesen Experimenten immer etwas schwächer als die von XIAP, dem stärksten bekannten IAP, aber ungefähr vergleichbar mit der von cIAP1 (nicht gezeigt). BRUCE benötigt für diese Aktivität unbedingt eine intakte BIR-Domäne, da die Expression der <sup>FLAG</sup>BRUCE<sup>bir</sup>-Mutante die Zellen nicht vor der Apoptose schützen konnte (Abb. 7). Interessanterweise trägt auch die UBC-Domäne einen Teil zum antiapoptotischen



### Abbildung 7. Überexpression von BRUCE schützt Zellen vor der Apoptose

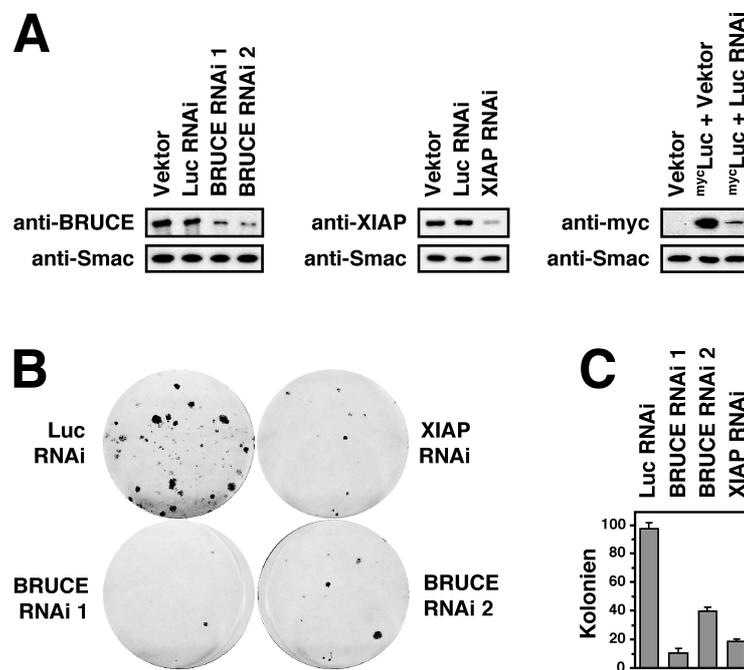
FLAG-Epitop-markierte Varianten von BRUCE, XIAP oder Luciferase wurden zusammen mit EGFP-F transient in HeLa- oder 293T-Zellen co-transfiziert. Apoptose wurde induziert, indem diese entweder 5 h (HeLa) oder 10 h (293T) mit TRAIL/CHX oder 20 h mit Staurosporin (Stauro) behandelt wurden, oder nach einer Bestrahlung mit UV-Licht für 6 h inkubiert wurden. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde durch Propidiumjodid-Färbung und Zählen von Zellen mit subdiploidem DNA-Gehalt im FACS bestimmt, wobei nur GFP-positive Zellen bewertet wurden. Es ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung von drei parallel durchgeführten Experimenten angegeben. Mit Luciferase transfizierte Zellen wurden für die nicht-induzierte Kontrolle mit CHX (bei TRAIL) oder DMSO (bei Staurosporin) behandelt oder blieben unbehandelt (bei UV-Licht). Die Expression der Proteine wurde nach der Auftrennung von Zelllysaten der transfizierten Zellen mittels SDS-PAGE durch anti-FLAG Immunblots kontrolliert (unten).

Potenzial von BRUCE bei. Sie scheint jedoch nicht so wichtig wie die BIR-Domäne zu sein, da ihre Inaktivierung in der  $\text{FLAG-BRUCE}^{\text{ubc}}$ -Mutante nicht zum vollständigen Verlust der antiapoptotischen Aktivität von BRUCE führte. Bei der Kontrolle der Expression der FLAG-markierten Proteine im Immunblot zeigte sich, dass die verschiedenen BRUCE-Formen in den HeLa-Zellen sehr unterschiedlich exprimiert wurden (Abb. 7, unten). Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte aufgrund der unterschiedlichen Expressionsniveaus zustande kamen, wurden die Experimente in 293T-Zellen wiederholt. Die Expression von WT BRUCE und den Mutanten ist in diesen Zellen gleich stark. Apoptose wurde in diesen Zellen entweder durch TRAIL/CHX-Behandlung oder durch UV-Bestrahlung ausgelöst. UV-Licht führt zu DNA-Schäden und löst somit, wie Staurosporin, den mitochondrialen Signalweg der Apoptose aus. Die Ergebnisse dieser Experimente bestätigten die für HeLa-Zellen erhaltenen Resultate. WT BRUCE konnte den Zelltod wiederum auf etwa 50% der Kontrolle senken. Die BIR-Domänen-Mutante

war vollständig inaktiv und die UBC-Domänen-Mutante zeigt eine reduzierte antiapoptotische Aktivität (Abb. 7, rechts).

### Bestimmte Säugerzellen benötigen BRUCE zum Überleben

Zur weiteren Untersuchung der Funktion von BRUCE in der Zelle wurde versucht, das Expressionsniveau des BRUCE-Proteins durch RNA-Interferenz zu senken. Hierfür wurden Zellen mit pSUPER-Vektoren transfiziert, die gegen die jeweiligen mRNAs gerichtete shRNAs exprimieren. Es wurden zwei unterschiedliche gegen BRUCE gerichtete shRNAs (BRUCE RNAi 1 + 2), sowie eine gegen XIAP (XIAP



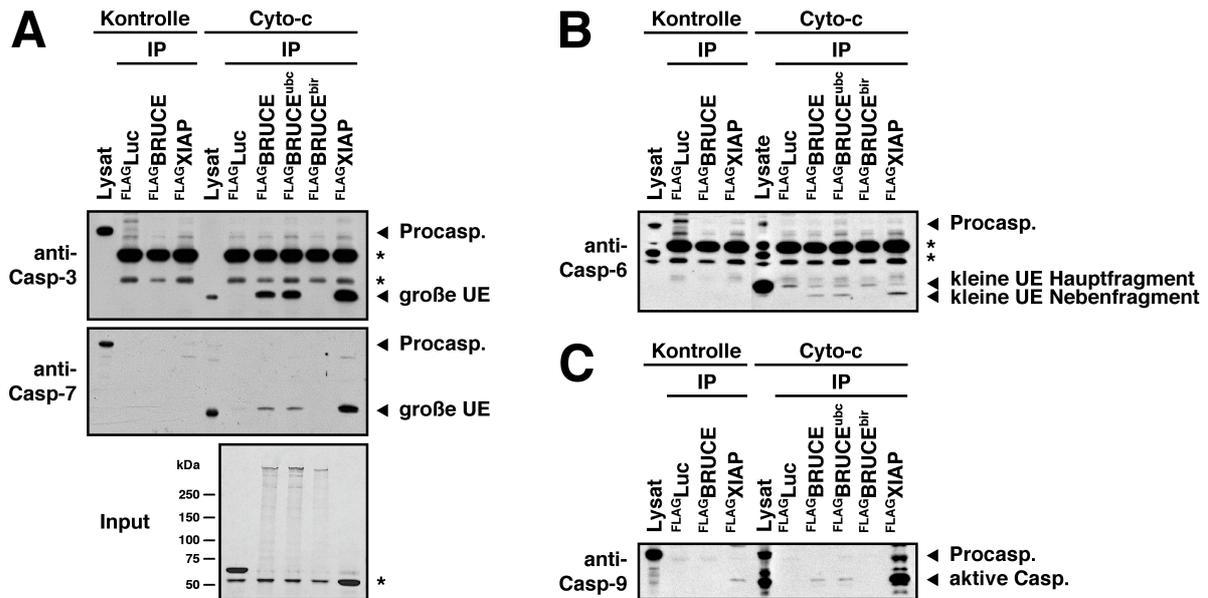
### Abbildung 8. Bestimmte Säugerzellen benötigen BRUCE zum Überleben

(A) Funktionalität der RNAi-Konstrukte. 293T-Zellen wurden transient mit den angegebenen shRNA-exprimierenden pSUPER-Vektoren transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen lysiert und die Expression von BRUCE, XIAP oder Luciferase im Immunblot untersucht. Smac diente hierbei als Ladekontrolle. (B) Zellen mit reduzierter BRUCE-Expression sind nicht lebensfähig. 293-Zellen wurden in 6-well-Platten mit den angegebenen pSUPER.Puro.GFP-Vektoren transfiziert. Nach zwei Tagen wurde eine Selektion mit 1.5 µg/ml Puromycin gestartet. Zwei Wochen später wurden die entstandenen Kolonien mit Kristallviolett angefärbt und fotografiert. (C) Quantifizierung der Koloniebildungsstudien. 293-Zellen wurden in 6-well-Platten mit den angegebenen pSUPER-Vektoren und einem Puromycin-Resistenzvektor co-transfiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen auf 10 cm-Platten neu ausgesät und einen Tag später eine zweiwöchige Puromycin-Selektion gestartet. Die entstandenen Kolonien wurden mit Kristallviolett angefärbt und ausgezählt. Es ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der Gesamtzahl der Kolonien aus drei parallel durchgeführten Experimenten angegeben. Unabhängig davon, ob die Puromycinresistenz von dem shRNA-exprimierenden Vektor (pSUPER.Puro.GFP) oder von einem getrennten Vektor (pBabe-Puro) exprimiert wurde, ergaben sich jeweils gleichwertige Resultate.

RNAi) und eine gegen Luciferase (Luc RNAi) gerichtete shRNA verwendet. Die Funktionalität dieser Konstrukte wurde durch Herunterregulation des endogenen BRUCE- bzw. XIAP-Proteins oder der co-transfizierten <sup>myc</sup>Luciferase nach transien-ter Transfektion in 293T-Zellen demonstriert (Abb. 8A). Das Expressionsniveau von BRUCE und XIAP wurde hierbei wiederholt auf 20 bis 30% des Kontrollwertes (Luc RNAi) reduziert. Dies entspricht bei einer durchschnittlichen Transfektionsrate von etwa 80% einer Reduktion des endogenen Proteins auf etwa 10% in den transfizierten Zellen. Bei dem Versuch 293-Zelllinien zu etablieren, die die gegen BRUCE gerichteten shRNAs stabil exprimierten, fiel auf, dass die Anzahl der gewachsenen Kolonien im Vergleich zu den negativen Kontrollen (Leervektor bzw. Luc RNAi) drastisch reduziert war. Dies konnte in mehreren weiteren Koloniebildungs-Experimenten bestätigt werden (Abb 8B und C). Offensichtlich führt die Absenkung des Expressionsniveaus des BRUCE-Proteins in stabil transfizierten Zellen dazu, dass diese Zellen eine Selektion auf den gegen BRUCE gerichteten shRNA-Expressionsvektor nicht überleben können. BRUCE scheint daher für das Überleben von zumindest 293-Zellen notwendig zu sein. Wie die Herunterregulation von BRUCE zum Zelltod führt, kann aus den Koloniebildungs-Experimenten leider nicht abgeleitet werden. Möglich ist, dass durch die Reduktion des Expressionsniveaus von BRUCE ein Zellzyklusarrest eintritt, in dessen Folge die Zellen sterben, oder dass hierdurch, wie für HeLa- und H460-Zellen gezeigt, direkt Apoptose eingeleitet wird und die Zellen aktiv eliminiert werden (Qiu et al., 2004; Ren et al., 2005). Bemerkenswert ist zudem, dass auch die Erniedrigung der Expression von XIAP in 293-Zellen zum Zelltod führt. Dies war nicht zu erwarten, da XIAP-*Knockout*-Mäuse keinen erkennbaren Phänotyp haben und sie offensichtlich auch ohne XIAP auskommen können (Harlin et al., 2001).

### **BRUCE bindet Caspasen**

Die Ergebnisse der Überexpressions-Experimente und der RNAi-Koloniebildungsstudien zeigten eindeutig, dass BRUCE ein Gegenspieler des programmierten Zelltods ist. Zum besseren Verständnis der antiapoptotischen Funktionsweise von BRUCE wurde daher ein zellfreies *in vitro*-Apoptose-System aufgebaut. Da die BIR-



### Abbildung 9. BRUCE bindet aktive Caspasen

(A) BRUCE bindet Caspase-3 und -7. Zytosolischer 293T-Extrakt wurde mit Cytochrom c/dATP (Cyto-c) aktiviert und mit immunaffinitätsgereinigtem, immobilisiertem <sup>FLAG</sup>BRUCE-Protein oder dessen Mutanten inkubiert. Als Kontrolle wurde unbehandelter Extrakt verwendet. Die Bindung an Caspase-3 und -7 wurde nach einer Immunpräzipitation (IP) durch Caspase-spezifische Immunblots nachgewiesen. Zur Markierung der Position der Proformen (Procasp.) und aktiven Formen (große UE) der Caspasen, wurden auf dem gleichen Gel 20 µg der Extrakte aufgetrennt. Das untere Gel (Input) zeigt 1/10 der für die Bindung eingesetzten immunaffinitätsgereinigten und immobilisierten Proteine in einer Coomassie-Färbung. Antikörperbanden sind durch einen Stern markiert. (B) BRUCE bindet Caspase-6. Die Bindung an Caspase-6 wurde wie in (A) beschrieben mit einem gegen die kleine Untereinheit von Caspase-6 gerichteten Antikörper nachgewiesen. BRUCE scheint, wie auch XIAP, ausschließlich an eine seltene, alternativ prozessierte Form von Caspase-6 zu binden (kleine UE Nebenfragment), die eine kleine Untereinheit enthält, die ein geringeres Molekulargewicht als die hauptsächlich vorkommende kleine Untereinheit aufweist (kleine UE Hauptfragment). (C) BRUCE bindet Caspase-9. Die Bindung an aktive Caspase-9 (aktive Casp.) wurde wie in (A) beschrieben nachgewiesen. Für den Immunblot wurde jedoch ein Caspase-9 spezifischer Antikörper verwendet.

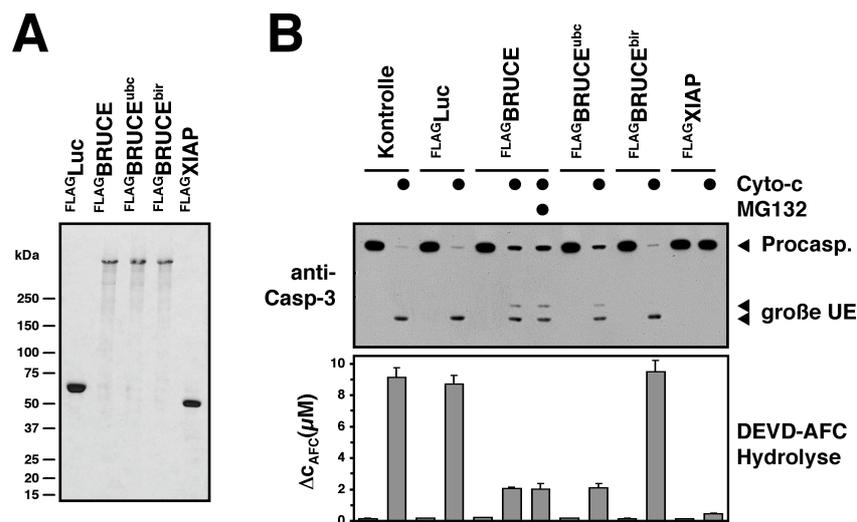
Domäne der IAP-Proteine ein Caspase-Bindemotiv darstellt, war es naheliegend zuerst die Bindung an Caspasen zu untersuchen. Hierfür wurde ein zellfreier Extrakt aus 293T-Zellen hergestellt, in dem durch Zugabe von Cytochrom c (Cyto-c) die Caspase-Kaskade aktiviert wurde. Zu diesem aktivierten Extrakt wurde auf einer anti-FLAG-Matrix immobilisiertes und gereinigtes <sup>FLAG</sup>BRUCE, <sup>FLAG</sup>XIAP oder <sup>FLAG</sup>Luciferase gegeben. Nach gemeinsamer Inkubation und Immunpräzipitation wurden gebundene Caspasen im Immunblot nachgewiesen. BRUCE interagiert stark mit der aktiven Form der Effektorcaspase-3 und etwas schwächer mit Caspase-7 (Abb. 9A). Schwache Bindung an BRUCE wurde für aktive Initiatorcaspase-9 (Abb. 9C) und für eine spezielle, seltene Spaltungsform von Caspase-6

festgestellt (Abb. 9B). BRUCE interagiert in nicht-apoptotischen Extrakten nicht mit den unprozessierten Proformen der Caspasen. Dies zeigt, dass BRUCE selektiv die aktiven, prozessierten Formen und nicht die inaktiven Vorläufer der Caspasen bindet. Da die Strukturmutante mit der Punktmutation in der BIR-Domäne (BRUCE<sup>bir</sup>) keinerlei Caspase-Bindungsaktivität aufwies, ist wahrscheinlich die BIR-Domäne die Bindestelle zwischen BRUCE und den Caspasen.

### **BRUCE inhibiert die Caspase-Kaskade**

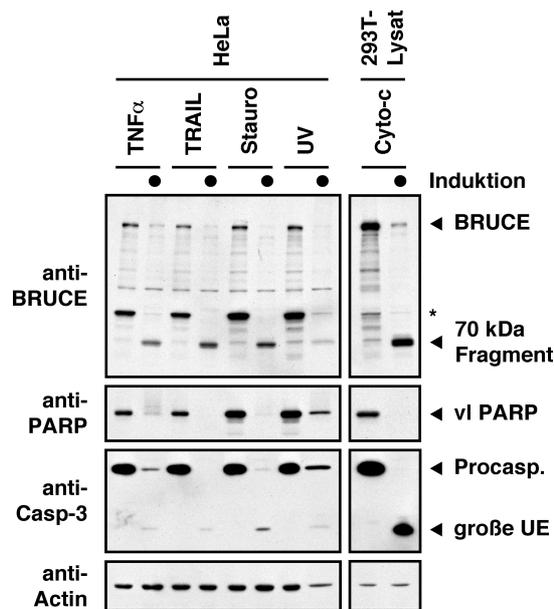
Natürlich war es nun interessant zu erfahren, ob die Bindung von BRUCE an aktive Caspasen auch zu einer Inhibition der Caspase-Aktivität führt. Zur Beantwortung dieser Frage wurden FLAG-Epitop-markierte WT und mutierte Formen von BRUCE transient in 293T-Zellen exprimiert und mittels des FLAG-Epitops isoliert (Abb. 10A). Die gereinigten Proteine wurden zu dem zellfreien *in vitro*-Apoptose-System gegeben, um zu ermitteln, ob diese die Cytochrom c-induzierte Aktivierung der Caspase-Kaskade blockieren konnten. Die Aktivierung von Caspasen wurde dabei über die Spaltung der Proform der Effektorcaspase-3 durch übergeordnete Caspasen in ein aktives Fragment verfolgt. Zusätzlich wurde die Caspase-Aktivität im Extrakt direkt bestimmt, indem die Freisetzung eines fluorogenen Spaltprodukts durch Hydrolyse eines Caspase-Substrats (DEVD-AFC) gemessen wurde. In den Kontrollproben und in den Proben, die mit Luciferase versetzt worden waren, führte die Zugabe von Cytochrom c zur Aktivierung von Caspasen, wie durch die vollständigen Prozessierung von Caspase-3 angezeigt wurde (Abb. 10B, oben). Damit einhergehend enthielten diese Proben DEVD-AFC Hydrolyse-Aktivität (Abb. 10B, unten). Im Fall der Zugabe von WT BRUCE-Protein zu den Proben war die Prozessierung von Procaspase-3 in die aktive Form teilweise unterdrückt und die DEVD-AFC Hydrolyse-Aktivität stark (auf 25% des Kontrollwertes) reduziert. Da Caspase-3 zum größten Teil in der aktiven Form vorliegt und BRUCE am stärksten an aktive Caspase-3 bindet (Abb. 9A), deuten diese Daten darauf hin, dass BRUCE die Caspase-Kaskade auf der Ebene der Effektorcaspasen blockiert, indem es an bereits aktivierte Caspasen bindet und diese inhibiert. Die Prozessierung von Procaspase-3 ist wahrscheinlich aufgrund der Störung der autokatalytischen

Aktivierung der Caspase durch BRUCE inhibiert. XIAP, welches die Aktivierung von Caspasen bereits auf der Ebene der Initiatorcaspase-9 blockiert, zeigte in diesem System eine deutlich stärkere Aktivität als BRUCE und inhibierte die Spaltung von Procaspase-3 und DEVD-AFC Hydrolyse vollständig. Ein wichtiger Befund war zudem, dass BRUCE<sup>bir</sup> in diesem Experiment völlig inaktiv war, während BRUCE<sup>ubc</sup> Caspasen in gleichem Maße wie WT BRUCE inhibierte. Auch änderte die Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132 zum Extrakt nichts an der Fähigkeit von BRUCE, Caspasen zu inhibieren (Abb. 10B). Der Mechanismus der Caspase-Inhibition durch BRUCE hängt demnach nicht von seiner UBC-Funktion oder der Aktivität des Proteasoms ab. BRUCE scheint vielmehr als ein IAP zu wirken, indem es direkt an Caspasen bindet und diese so inhibiert. Das zentrale Strukturmotiv für diese Aktivität ist hierbei offensichtlich die BIR-Domäne.



### Abbildung 10. BRUCE inhibiert die Caspase-Kaskade

(A) Aufreinigung von rekombinantem FLAG-BRUCEN. FLAG-Epitop-markierte Luciferase, XIAP und WT und mutierte Varianten von BRUCE wurden transient in 293T-Zellen überexprimiert und über eine anti-FLAG Affinitätsmatrix gereinigt. 2  $\mu$ g jeder Proteinpräparation wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. (B) BRUCE ist ein Caspase-Inhibitor. Die in (A) gezeigten, FLAG-gereinigten Proteine und MG132 (50  $\mu$ M) wurden wie angegeben (BRUCE, 2  $\mu$ M; XIAP, 0.2  $\mu$ M) einem zellfreien *in vitro*-Apoptose-System zugefügt und Caspasen durch Zugabe von Cytochrom *c*/dATP aktiviert. Die Aktivierung von Caspase-3 wurde durch Nachweis der Prozessierung im Immunblot (oben) und durch direkte Messung der DEVD-AFC Hydrolyseaktivität (unten) verfolgt. Luciferase wurde in der gleichen Proteinmenge wie BRUCE zugegeben. Es ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung von drei parallel durchgeführten Experimenten angegeben.

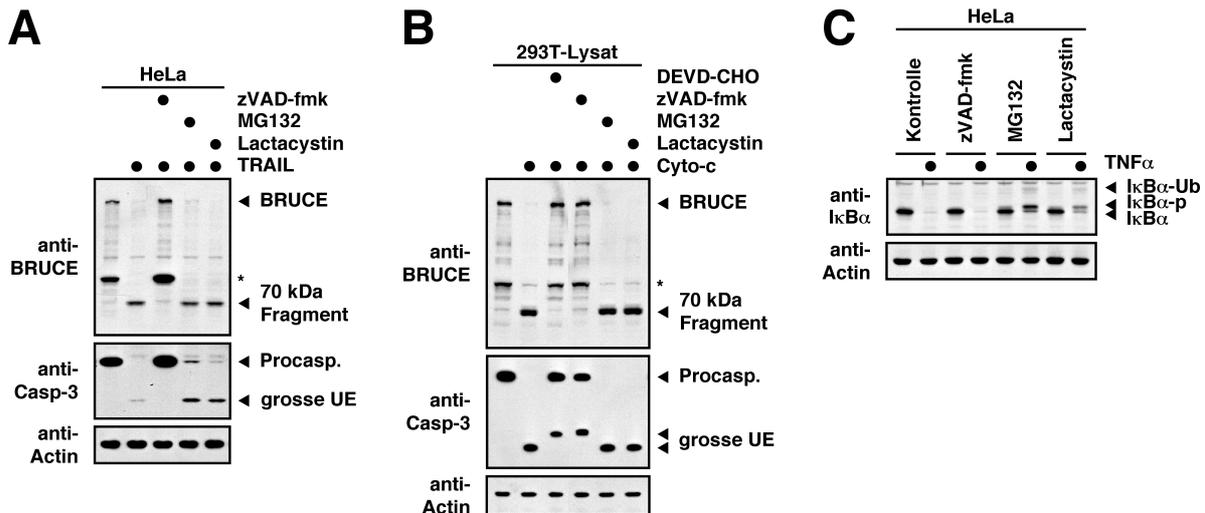


### Abbildung 11. BRUCE wird während der Apoptose prozessiert

Apoptose wurde in HeLa-Zellen *in vivo* induziert, indem diese entweder für 8 h mit  $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$ , 4 h mit  $\text{TRAIL}/\text{CHX}$  oder 4 h mit Staurosporin behandelt wurden, oder nach einer Betrachtung mit UV-Licht für 12 h inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Zur Kontrolle blieben die Zellen unbehandelt (bei UV-Licht) oder wurden nur mit CHX (bei  $\text{TNF}\alpha$  und TRAIL) oder DMSO (bei Staurosporin) behandelt. Alternativ wurden Caspasen *in vitro* aktiviert, indem zytosolischer 293T-Extrakt für 1 h mit Cytochrom c/dATP inkubiert wurde. Die Extrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die angegebenen Proteine mit spezifischen Antikörpern im Immunblot analysiert. Die Aktivierung von Caspasen wird durch die Prozessierung der Procaspase-3 und des Caspase-Substrats PARP angezeigt. Der Stern markiert ein unbekanntes Protein, welches von dem anti-BRUCE Antikörper erkannt wird.

### BRUCE ist ein Caspase-Substrat

Weitere Experimente zeigten, dass endogenes BRUCE in apoptotischen HeLa-Zellen fast vollständig abgebaut wurde und stattdessen ein 70 kDa großes Spaltprodukt entstand (Abb. 11). Diese Fragmentierung von BRUCE fand unabhängig vom verwendeten apoptotischen Stimulus statt und konnte auch in Cytochrom c-aktivierten 293T-Extrakten beobachtet werden (Abb. 11). Da unter diesen Umständen Caspasen aktiviert wurden, stellte sich natürlich die Frage, ob diese für die Spaltung von BRUCE verantwortlich waren. Tatsächlich konnte die Fragmentierung von BRUCE durch Zugabe des generellen Caspase-Inhibitors zVAD-fmk unterdrückt werden (Abb. 12A und B). Zudem verhinderte auch die Zugabe von DEVD-CHO, einem Inhibitor mit hoher Spezifität für Caspase-3 und -7, die Spaltung von BRUCE in 293T-Extrakten (Abb. 12B). Da kürzlich von einer Inaktivierung von BRUCE durch Abbau über das Proteasom berichtet wurde (Qiu et al., 2004), stellte



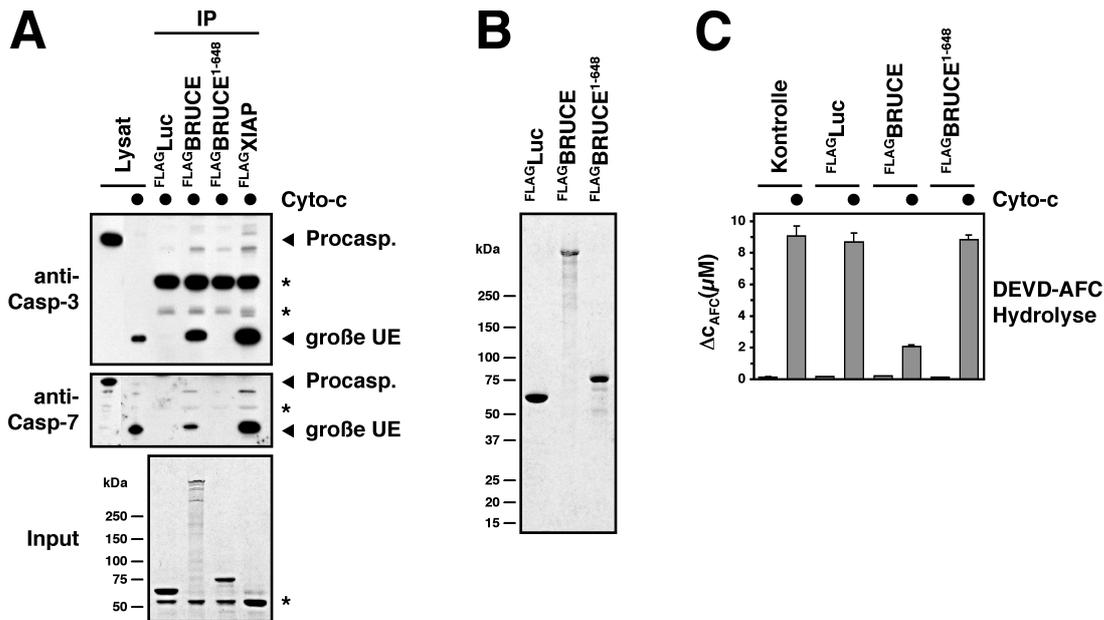
### Abbildung 12. BRUCE ist ein Caspase-Substrat

(A) Die Fragmentierung von BRUCE kann durch Inhibition von Caspasen, nicht aber durch Inhibition des Proteasoms *in vivo* blockiert werden. HeLa-Zellen wurden für 1 h mit CHX und entweder zVAD-fmk (20  $\mu$ M), MG132 oder Lactacystin (beide 50  $\mu$ M) vorinkubiert. Anschließend wurde in den Zellen durch Zugabe von TRAIL für 4 h Apoptose induziert. Die Analyse der Zellysate erfolgte durch SDS-PAGE und Immunblot mit den angegebenen Antikörpern. (B) Die Fragmentierung von BRUCE kann durch Inhibition von Caspasen, nicht aber durch Inhibition des Proteasoms *in vitro* blockiert werden. Die Spaltung von BRUCE wurde in zytosolischen 293T-Extrakten durch Zugabe von Cytochrom c/dATP für 1 h herbeigeführt, wobei zusätzlich jeweils 50  $\mu$ M Ac-DEVD-CHO, zVAD-fmk, MG132 oder Lactacystin zugesetzt wurden. Die Analyse der Zellysate erfolgte wie in (A) beschrieben. (C) Demonstration der Wirksamkeit der Proteasom-Inhibitoren. HeLa-Zellen wurden für 1 h mit je 50  $\mu$ M zVAD-fmk, MG132 oder Lactacystin und zur Kontrolle mit DMSO vorinkubiert und anschließend für 15 min mit 20 ng/ml TNF $\alpha$  stimuliert. Die Zellen wurden sofort danach lysiert und die Zellysate durch SDS-PAGE aufgetrennt. Der proteasomale Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  wurde durch Immunblot nachgewiesen. Die Zugabe der Proteasom-Inhibitoren MG132 und Lactacystin, nicht aber des Caspase-Inhibitors zVAD-fmk führt zu einer Anreicherung der phosphorylierten (I $\kappa$ B $\alpha$ -p) und ubiquitylierten (I $\kappa$ B $\alpha$ -Ub) Formen von I $\kappa$ B $\alpha$ .

sich des weiteren die Frage, ob auch in diesem Falle die Fragmentierung von BRUCE von der Aktivität des Proteasoms abhängig war. Die Zugabe von Proteasom-Inhibitoren konnte jedoch die Spaltung von BRUCE weder *in vitro* noch *in vivo* verhindern (Abb. 12A und B). Die Wirksamkeit der Proteasom-Inhibitoren wurde parallel anhand der Blockade des TNF $\alpha$ -induzierten I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbaus in HeLa-Zellen demonstriert (Abb. 12C). Die Spaltung von BRUCE während der Apoptose wird daher offensichtlich nicht vom Proteasom sondern von Caspasen vermittelt.

### Caspase-Spaltung inaktiviert die antiapoptotische Funktion von BRUCE

Der größte Teil des in der Zelle vorliegenden BRUCE-Proteins wurde mit Voranschreiten der Apoptose vollständig abgebaut. Einzig das durch Caspase-Spaltung

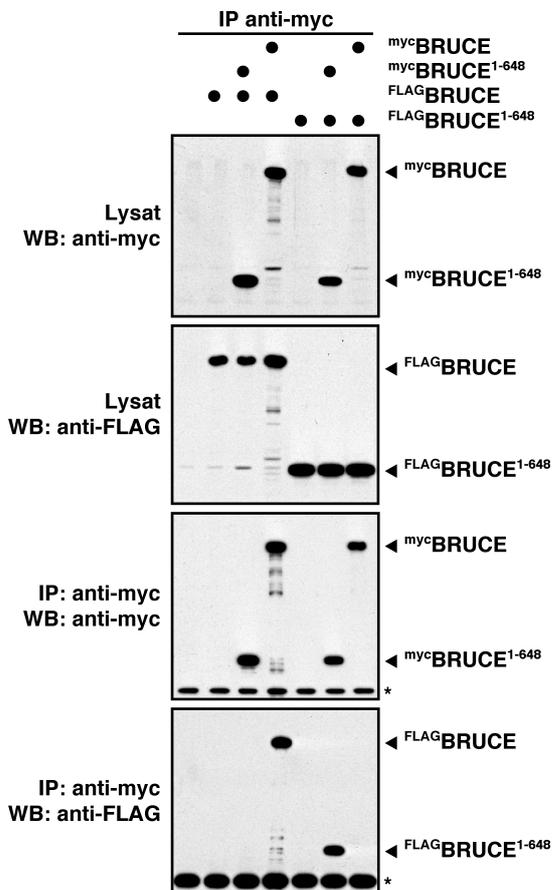


### Abbildung 13. Caspase-Spaltung inaktiviert BRUCE

(A) BRUCE<sup>1-648</sup> bindet nicht an aktive Caspasen. Zytosolischer 293T-Extrakt wurde mit Cytochrom c/dATP (Cyto-c) aktiviert und mit immunaffinitätsgereinigtem, immobilisiertem FLAG<sup>+</sup>BRUCE<sup>1-648</sup> Protein inkubiert. Die Bindung an Caspase-3 und -7 wurde nach einer Immunpräzipitation durch Caspase-spezifische Immunblots nachgewiesen. Zur Markierung der Position der Proformen (Procasp.) und aktiven Formen (große UE) der Caspasen, wurden auf dem gleichen Gel 20 μg der Extrakte aufgetrennt. Das untere Gel (Input) zeigt 1/10 der für die Bindung eingesetzten immunaffinitätsgereinigten und immobilisierten Proteine in einer Coomassie-Färbung. Antikörperbanden sind durch einen Stern markiert. (B) Aufreinigung von rekombinantem FLAG<sup>+</sup>BRUCE<sup>1-648</sup>. FLAG-Epitop-markierte Luciferase, BRUCE und BRUCE<sup>1-648</sup> wurden transient in 293T-Zellen überexprimiert und über eine anti-FLAG Affinitätsmatrix gereinigt. 2 μg jeder Proteinpräparation wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. (C) BRUCE<sup>1-648</sup> kann Caspasen nicht inhibieren. Die in (B) gezeigten, FLAG-gereinigten Proteine wurden wie angegeben (BRUCE, 2 μM; BRUCE<sup>1-648</sup>, 7.5 μM) einem zellfreien *in vitro*-Apoptose-System zugefügt und Caspasen durch Zugabe von Cytochrom c/dATP aktiviert. Die Aktivierung von Caspase-3 wurde durch direkte Bestimmung der DEVD-AFC Hydrolyseaktivität gemessen. Es ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung von drei parallel durchgeführten Experimenten angegeben.

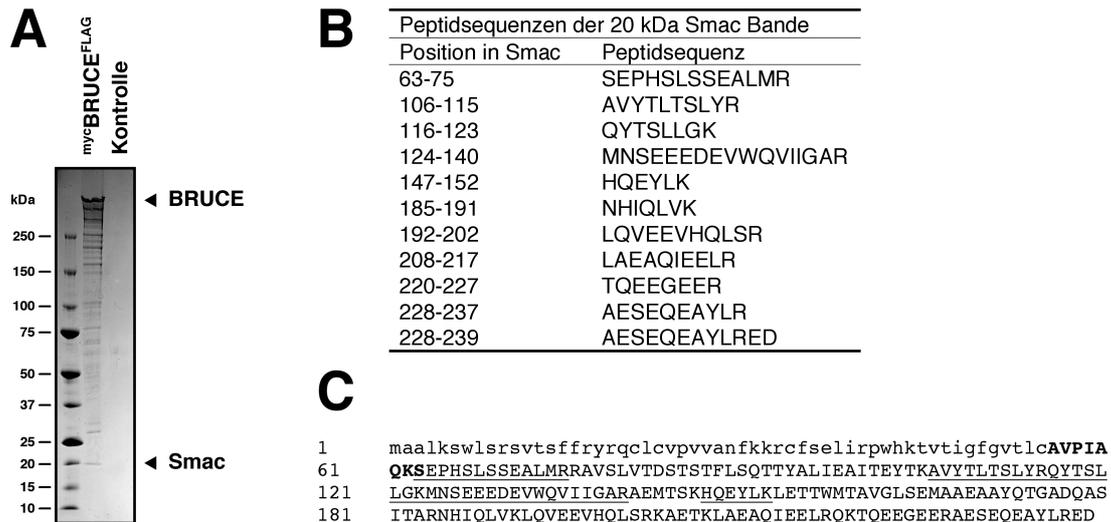
erzeugte 70 kDa Fragment blieb stabil erhalten (Abb. 11). Dieses Fragment wurde in weiteren Experimenten als der N-Terminus von BRUCE charakterisiert. Unter anderem wurde hierbei eine Schnittstelle für Caspase-3 an der Position Asp648 von BRUCE identifiziert (Diplomarbeit Christian Pohl; Bartke et al., 2004). Das theoretische Molekulargewicht dieses N-terminalen Fragments von BRUCE (Aminosäuren 1 bis 648) stimmte mit dem tatsächlich beobachteten Molekulargewicht von 70 kDa überein. Da dieses Fragment die vollständige BIR-Domäne enthält, stellte sich die Frage, ob es sich wie unprozessiertes BRUCE verhält und IAP-Aktivität besitzt. Hierzu wurde eine FLAG-markierte Variante der N-terminalen

648 Aminosäuren von BRUCE (<sup>FLAG</sup>BRUCE<sup>1-648</sup>) hergestellt und in 293T-Zellen exprimiert und gereinigt (Abb. 13A und B). Erstaunlicherweise interagierte dieses BIR-Fragment weder mit Caspasen, noch inhibierte es diese in dem zellfreien *in vitro*-Apoptose-System (Abb. 13A und C). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der Konformation des 70 kDa Fragments liegen. So wurde gefunden, dass BRUCE homodimerisiert und dass das N-terminale BIR-Fragment selbst ein getrenntes Homodimer bildet welches nicht mehr an BRUCE binden kann (Abb. 14). Es wäre daher möglich, dass nur homodimerisiertes, unprozessiertes BRUCE IAP-Aktivität besitzt. Die Spaltung von BRUCE durch Caspasen führt zu einer Abtrennung des N-terminalen 70 kDa Dimers, welches möglicherweise eine andere Konformation annimmt und hierdurch inaktiv wird. Ungeachtet des zugrundeliegenden Mechanismus wird die antiapoptotische Aktivität von BRUCE während der Apoptose durch Caspase-Spaltung aus der Zelle entfernt. BRUCE und Caspasen wirken daher negativ aufeinander ein, indem sie sich gegenseitig inaktivieren.



**Abbildung 14. BRUCE und BRUCE<sup>1-648</sup> bilden unterschiedliche Homodimere**

Myc- oder FLAG-Epitop-markierte Varianten von BRUCE und BRUCE<sup>1-648</sup> wurden wie angegeben in 293T-Zellen co-transfiziert und mit anti-myc Agarose immunpräzipitiert. Die Zelllysate und Immunpräzipitationen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen das myc- bzw. FLAG-Epitop im Immunblot analysiert. Antikörperbanden sind mit einem Stern markiert.



### Abbildung 15. Identifizierung von Smac als BRUCE-Interaktor

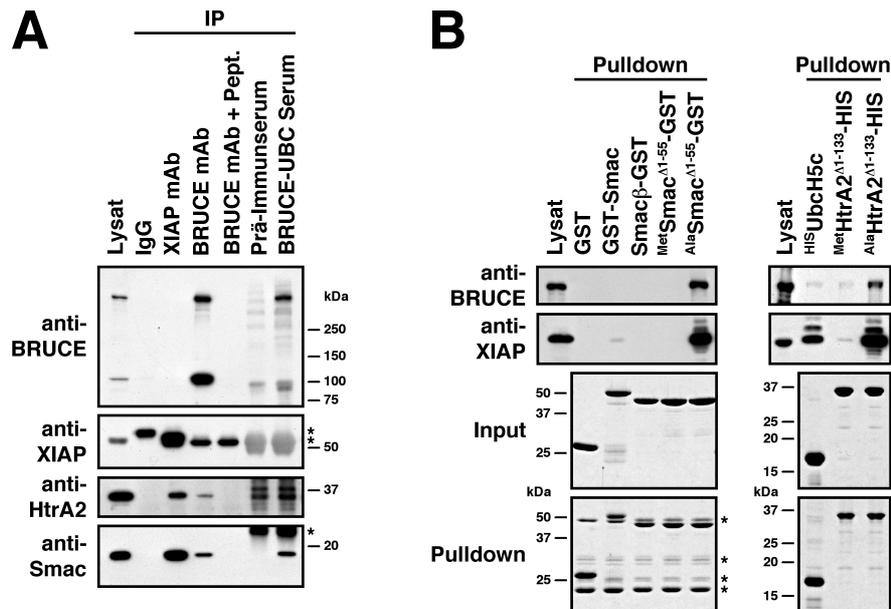
(A) Tandem-Affinitätsaufreinigung von BRUCE-Interaktoren.  $^{myc}$ BRUCE<sup>FLAG</sup> wurde transient in 293T-Zellen überexprimiert und in zwei Schritten über anti-FLAG (M2) und anti-myc (9E10) Affinitäts-Säulen gereinigt. Das Eluat wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Die 20 kDa Bande wurde nach tryptischem Verdau und massenspektrometrischer Analyse der Peptide als Smac identifiziert. (B) Auflistung der Peptide, die aus der 20 kDa Bande isoliert wurden und diese mit ihren Massen als Smac identifizieren. Es ist jeweils die Sequenz und die Position der Peptide in der Proteinsequenz von Smac angegeben. (C) Proteinsequenz von Smac. Die Position der Aminosäuren ist links angegeben. Die Aminosäuresequenz des reifen Smac Proteins ist durch Großbuchstaben, die des mitochondrialen Importsignals durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Sequenzen, die durch die in (B) aufgeführten tryptischen Peptide abgedeckt sind, sind unterstrichen. Die Sequenzabdeckung beträgt 55.4%. Die durch Edman-Abbau erhaltene N-terminale Peptidsequenz ist fett geschrieben.

### BRUCE bindet Smac und Htra2

Bei den ersten Versuchen, <sup>FLAG</sup>BRUCE aus transient überexprimierenden 293T-Zellen zu isolieren, wurden einige unbekannte Proteine zusammen mit BRUCE aufgereinigt. Zur Identifizierung dieser Proteine wurde eine doppelt Epitop-markierte Variante von BRUCE ( $^{myc}$ BRUCE<sup>FLAG</sup>) in einem großen Maßstab in 293T-Zellen überexprimiert und mittels eines Tandem-Affinitätsprotokolls gereinigt. Hierbei wurde  $^{myc}$ BRUCE<sup>FLAG</sup> zuerst über eine anti-FLAG Affinitätsmatrix isoliert, mit FLAG-Peptid eluiert und in einem zweiten Schritt mittels einer anti-myc Affinitätsmatrix gereinigt. Das Eluat des zweiten Aufreinigungsschritts wurde mittels SDS-PAGE fraktioniert und mitgereinigte Coomassie-gefärbte Proteine massenspektrometrisch identifiziert (Abb. 15A). Das bei einem Molekulargewicht von 20 kDa laufende Protein wurde anhand der erhaltenen Peptidmassen als der mitochondriale proapoptotische IAP-Inhibitor Smac/DIABLO (Du et al., 2000;

Verhagen et al., 2000) identifiziert (Abb. 15B und C). Die Sequenzierung der ersten acht Aminosäuren des Proteins durch Edman-Abbau zeigte zudem, dass es sich mit der Sequenz AVPIAQKS bei diesem Protein um die  $\alpha$ -Spleißvariante von Smac handelte (Abb. 15C). Die Interaktion von BRUCE mit Smac konnte in einer Immunpräzipitation gegen endogenes BRUCE bestätigt werden (Abb. 16A). Kurz nach der Identifizierung von Smac wurde mit der Serinprotease HtrA2 ein zweiter mitochondrialer IAP-Inhibitor mit einem ähnlichen proapoptotischen Mechanismus beschrieben (Hegde et al., 2002; Martins et al., 2002; Suzuki et al., 2001a; Verhagen et al., 2002). Bei der Untersuchung der BRUCE-Immunpräzipitation mit einem Immunblot gegen HtrA2 zeigte sich, dass auch HtrA2 mit endogenem BRUCE interagiert (Abb. 16A). Smac und HtrA2 werden im Zytosol mit N-terminalen Pro-Sequenzen synthetisiert. Diese dienen als mitochondriales Importsignal und werden beim Transport von Smac und HtrA2 in das Mitochondrion abgespalten (Chai et al., 2000; Du et al., 2000; Shi, 2002; Suzuki et al., 2001a). Nach einem apoptotischen Signal werden die gereiften Formen der beiden Proteine zusammen mit Cytochrom c und weiteren proapoptotischen Faktoren in das Zytosol ausgeschüttet. Dort interagieren sie mit IAP-Proteinen und verhindern deren Bindung an Caspasen, so dass diese nicht weiter inhibiert werden können (Du et al., 2000; Suzuki et al., 2001a; Verhagen et al., 2000). In GST-Pulldown-Experimenten, bei denen gereinigte, GST-fusionierte Varianten von Smac eingesetzt wurden, um endogenes BRUCE aus zytosolischen 293T-Extrakten zu isolieren, zeigte sich, dass BRUCE ausschließlich mit der reifen Form von Smac ( $^{\text{Ala}}\text{Smac}^{\Delta 1-55}$ -GST, siehe unten), nicht aber mit dessen Proform (GST-Smac) oder der alternativen zytosolischen  $\beta$ -Spleißvariante (Smac $\beta$ -GST) interagiert (Abb. 16B, links). Die Interaktion von BRUCE mit HtrA2 konnte ebenfalls durch His-Pulldown-Experimente bestätigt werden. Hierbei wurde endogenes BRUCE mit gereinigter, His-markierter reifer HtrA2 ( $^{\text{Ala}}\text{HtrA2}^{\Delta 1-133}$ -HIS, siehe unten) aus zytosolischen 293T-Extrakten isoliert (Abb. 16B, rechts).

Beim Import von Smac und HtrA2 in die Mitochondrien entstehen durch die Prozessierung die neuen N-terminalen Tetrapeptidsequenzen AVPI bzw. AVPS. Diese sind die zentralen Motive für die Bindung der beiden Moleküle an die BIR-



**Abbildung 16. BRUCE bindet Smac und HtrA2**

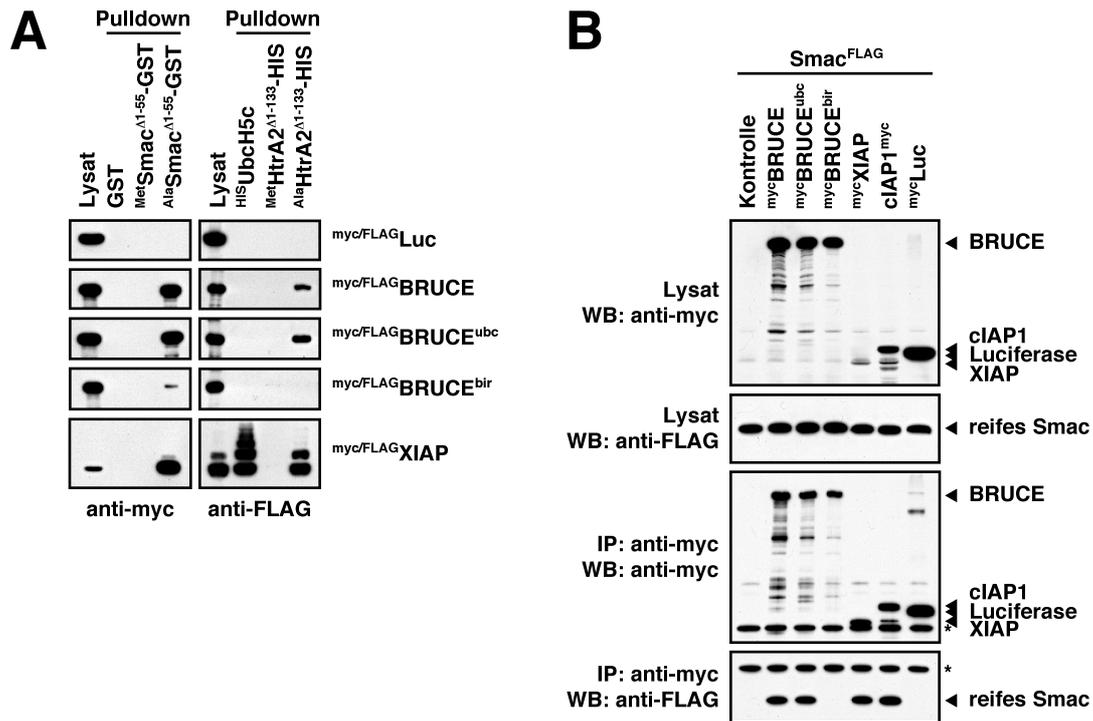
(A) Endogenes BRUCE bindet endogenes Smac und HtrA2. BRUCE und XIAP (als positive Kontrolle) wurden mit den angegebenen Antikörpern und einem, gegen den C-Terminus von BRUCE gerichteten Antiserum, aus 293T-Zellen immunpräzipitiert. Präzipitierte Proteine wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und mit den angegebenen Antikörpern im Immunblot nachgewiesen. Zu einer Probe (+Pept.) wurde ein Überschuss eines kurzen His-fusionierten Polypeptids, welches das Epitop des monoklonalen anti-BRUCE Antikörpers enthält, zugegeben, um BRUCE von dem Antikörper zu verdrängen. Antikörperbanden sind durch Sterne gekennzeichnet. (B) Endogenes BRUCE interagiert mit reifem Smac und HtrA2. N-terminal GST-fusioniertes Pro-Smac, C-terminal GST-fusionierte Varianten von reifem Smac oder Smac $\beta$  oder C-terminal His-fusionierte, reife HtrA2 wurden verwendet, um endogenes BRUCE aus zytosolischen 293T-Lysaten zu isolieren. Hierbei wurden GST-Fusionen über Glutathion-Sepharose und His-Fusionen über Ni-NTA-Agarose präzipitiert. Interagierendes BRUCE und XIAP wurden nach Auftrennung der präzipitierten Proteine mittels SDS-PAGE im Immunblot nachgewiesen. Gleiche Anteile der eingesetzten (Input) bzw. der präzipitierten (Pull-down) Fusionsproteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt (unten). Reifes Smac und HtrA2 wiesen an ihrem N-Terminus entweder ein WT Alanin oder ein mutiertes Methionin auf. Als negative Kontrollen wurden GST bzw. His-fusioniertes UbcH5c eingesetzt. Sterne markieren unspezifisch gebundene Proteine. UbcH5c interagiert nicht mit BRUCE, bindet jedoch sehr stark an XIAP.

Domänen der IAP Proteine und somit für deren Fähigkeit, Caspasen von IAPs zu verdrängen. Die N-terminalen Alanin Aminosäuren dieser Motive sind für diese Aktivität von besonderer Wichtigkeit (Chai et al., 2000; Shi, 2002; Suzuki et al., 2001a). Um zu untersuchen, ob diese Motive auch für die Bindung an BRUCE notwendig sind, wurden künstlich verkürzte, C-terminal GST- bzw. His-fusionierte Varianten von Smac und HtrA2 in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Diese Varianten wurden so konstruiert, dass sie *in vivo* die reifen Proteine bildeten, die entweder eine WT Alanin oder eine mutierte Methionin Aminosäure an ihrem N-

Terminus aufwiesen (<sup>Ala</sup>Smac<sup>Δ1-55</sup>-GST, <sup>Met</sup>Smac<sup>Δ1-55</sup>-GST, <sup>Ala</sup>HtrA2<sup>Δ1-133</sup>-HIS, <sup>Met</sup>HtrA2<sup>Δ1-133</sup>-HIS). Die Richtigkeit der N-terminalen Aminosäuren wurde durch Edman-Sequenzierung überprüft. Diese gereinigten Proteine wurden für GST- bzw. His-Pulldown-Experimente verwendet, um entweder endogenes BRUCE oder Epitop-markierte, überexprimierte BRUCE-Varianten (WT und Mutanten) aus zytosolischen 293T-Extrakten zu isolieren. Nur die WT Alanin- nicht aber die mutierten Methionin-Formen von Smac und HtrA2 waren hierbei in der Lage, mit BRUCE zu interagieren (Abb. 16B und 17A). In einem weiteren Experiment konnte überexprimiertes, myc-Epitop-markiertes BRUCE durch ein immobilisiertes Smac-Peptid (Smac10<sup>Ala</sup>), welches lediglich aus den zehn N-terminalen Aminosäuren von reifem Smac bestand, aus einem zytosolischen 293T-Extrakt isolieren werden (Abb. 18A und C). Ein Überschuss des selben Peptids war auch in der Lage, in einem GST-Pulldown-Experiment die Bindung von endogenem BRUCE an <sup>Ala</sup>Smac<sup>Δ1-55</sup>-GST zu verhindern (Abb. 18B). Ein mutiertes Peptid, bei dem das N-terminale Alanin gegen ein Methionin ausgetauscht war (Smac10<sup>Met</sup>), oder ein Smac-Peptid mit umgekehrter WT-Sequenz (Smac10<sup>rev</sup>) hatten in diesen Experimenten keine Aktivität. Der N-Terminus von Smac ist also notwendig und ausreichend für die Bindung an BRUCE. Die Bindung von Smac und HtrA2 an BRUCE benötigt außerdem eine intakte BIR-Domäne, da die BRUCE<sup>bir</sup>-Mutante weder in GST-Pulldown-Experimenten mit Smac-GST noch in His-Pulldown-Experimenten mit HtrA2-HIS interagierte (Abb. 17A). Außerdem war die BRUCE<sup>bir</sup> Mutante nicht in der Lage, in Co-Immunpräzipitationen aus transient transfizierten 293T-Zellen (Abb. 17B), reifes Smac zu binden. Die Interaktion von Smac und HtrA2 mit BRUCE folgt daher dem gleichen Muster, wie für andere IAPs beschrieben, indem die N-terminalen Tetrapeptidmotive der beiden proapoptotischen Faktoren und die BIR-Domäne von BRUCE an der Bindung beteiligt sind.

### **Smac und HtrA2 inaktivieren BRUCE**

Natürlich stellte sich nun die Frage, ob die Bindung der beiden proapoptotischen Faktoren Smac und HtrA2 an die BIR-Domäne von BRUCE auch einen funktionellen Einfluss auf die Aktivität von BRUCE hatte. Hierfür wurde die Caspase-

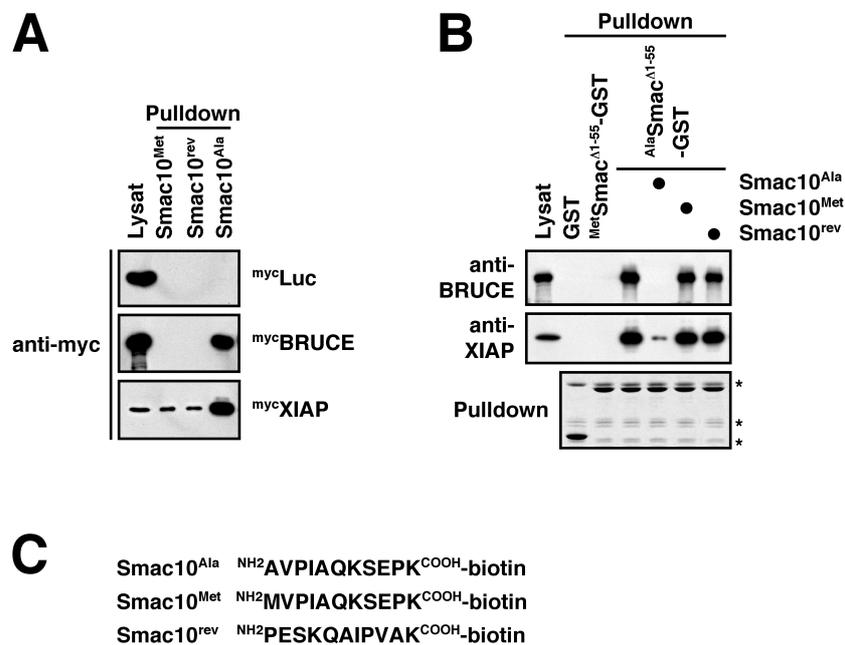


**Abbildung 17. BRUCE bindet mit seiner BIR-Domäne an die N-Termini von Smac und HtrA2**

(A) Smac-GST- bzw. HtrA2-His Pull-downs mit BRUCE WT und Mutanten. Myc- oder FLAG-Epitop-markierte Formen von BRUCE (WT oder mutiert) wurden transient in 293T-Zellen exprimiert und zytosolische Lysate hergestellt. BRUCE wurde mit C-terminal GST-fusioniertem, reifem Smac oder C-terminal His-fusionierter, reifer HtrA2 aus diesen Lysaten isoliert. Hierbei wurden GST-Fusionen über Glutathion-Sepharose und His-Fusionen über Ni-NTA-Agarose präzipitiert. Interaktion mit Smac oder HtrA2 wurde nach Auftrennung der präzipitierten Proteine mittels SDS-PAGE im Immunblot gegen das myc- bzw. das FLAG-Epitop nachgewiesen. Gleichmäßige Bindung der GST- oder His-Fusionsproteine an die Affinitätsmatrix wurde für jede Probe durch Coomassie-Färbung überprüft (nicht gezeigt). Reifes Smac und HtrA2 wiesen an ihrem N-Terminus entweder ein WT Alanin oder ein mutiertes Methionin auf. Als negative Kontrollen wurden GST bzw. His-fusioniertes UbcH5c eingesetzt. (B) Smac co-immunpräzipitiert mit BRUCE aber nicht mit BRUCE<sup>bir</sup>. 293T-Zellen wurden transient mit myc-Epitop-markierten cDNAs für WT BRUCE, mutierte BRUCE-Varianten, XIAP oder cIAP1 und einer C-terminal FLAG-Epitop-markierten Pro-Smac cDNA co-transfiziert und die Proteine mittels anti-myc Agarose immunpräzipitiert. Die Zelllysate und präzipitierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunblot gegen das myc- bzw. das FLAG-Epitop untersucht. Das FLAG-Epitop-markierte Pro-Smac wird in den Zellen vollständig in die reife 20 kDa Form umgewandelt. Antikörperbanden sind durch Sterne markiert.

inhibitorische Aktivität von BRUCE in dem oben genannten zellfreien *in vitro*-Apoptose-System in der Gegenwart von rekombinant gereinigtem Smac und HtrA2 (Abb. 19C) untersucht. Tatsächlich konnten reifes WT Smac und HtrA2, nicht aber Smac $\beta$  und die Methionin-Mutanten der beiden Proteine, die IAP-Aktivität von BRUCE neutralisieren (Abb 19A). Der molekulare Mechanismus der Aktivität von Smac beruht offensichtlich darauf, dass Smac Caspasen von BRUCE verdrängt. Dies wurde deutlich, als die Bindung von BRUCE an aktive Caspasen in einem mit

Cytochrom c aktivierten 293T-Extrakt untersucht wurde. In Abwesenheit von Smac interagiert BRUCE mit Caspase-3, -7 und -9. Diese Interaktion wurde durch die Zugabe eines Überschusses von reifem WT Smac ( $^{Ala}Smac^{\Delta 1-55}$ ) zerstört. Anstelle der Caspasen interagiert nun Smac mit BRUCE. Smac $\beta$  und die Methionin-Mutante ( $^{Met}Smac^{\Delta 1-55}$ ) beeinflussten diese Interaktion nicht (Abb. 19B). Der Mechanismus der Inhibition von BRUCE durch HtrA2 folgt einem anderen Prinzip. In Anwesenheit von HtrA2 verschwand zugegebenes BRUCE fast vollständig aus dem 293T-Extrakt (Abb 19A). Die Serinprotease HtrA2 scheint BRUCE daher eher durch proteolytischen Abbau zu inaktivieren.



**Abbildung 18. Der N-Terminus von Smac ist für eine Bindung an BRUCE ausreichend**

(A) BRUCE interagiert mit einem N-terminalen Smac-Peptid. Myc-Epitop-markiertes BRUCE wurde transient in 293T-Zellen überexprimiert und zytosolische Lysate hergestellt. Die Lysate wurden mit den in (C) gezeigten, biotinylierten Smac-Peptiden inkubiert und diese anschließend mit Straptavidin-Sepharose präzipitiert. Gebundene Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im anti-myc Immunblot nachgewiesen. (B) BRUCE wird durch ein N-terminales Smac-Peptid von Smac verdrängt. Endogenes BRUCE wurde wie in Abb. 16B beschrieben mit Hilfe von Smac-GST aus zytosolischen 293T Lysaten isoliert. Ein Überschuss der in (C) gezeigten Smac-Peptide (Endkonzentration 500  $\mu$ M) wurde zu den Lysaten gegeben, um die Bindung von BRUCE an Smac-GST zu blockieren. Gebundenes BRUCE und XIAP wurden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine im Immunblot nachgewiesen. Gleichmäßige Bindung der GST-Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose wurde für jede Probe durch Coomassie-Färbung überprüft (Pull-down). Sterne markieren unspezifisch gebundene Proteine. (C) Sequenzen der in (A) und (B) verwendeten Peptide. Smac10<sup>Ala</sup> besteht aus den zehn N-terminalen Aminosäuren des reifen Smac Proteins. Bei Smac10<sup>Met</sup> ist das N-terminale Alanin zu einem Methionin mutiert. Smac10<sup>rev</sup> besteht aus der invertierten Sequenz des WT Peptids. Alle Peptide besitzen am C-Terminus ein zusätzliches Lysin, welches an der  $\epsilon$ -Aminogruppe biotinyliert ist.



## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird BRUCE als ein *inhibitor of apoptosis protein* charakterisiert, welches Zellen vor dem programmierten Zelltod schützt und als Caspase-Inhibitor wirkt. BRUCE ist in ein enges regulatorisches Netzwerk eingebettet und seine Funktion wird während der Apoptose durch mehrere Mechanismen unterdrückt. Einerseits wird BRUCE durch proteolytische Spaltung durch Caspasen und durch die Serinprotease HtrA2 inaktiviert. Andererseits führt die direkte Bindung von Smac zur Inhibition von BRUCE, indem es dessen Caspase-inhibitorische Aktivität neutralisiert. Das zentrale Strukturmotiv für die IAP Funktion von BRUCE und für die Bindung an apoptotische Faktoren ist die BIR-Domäne. Obwohl BRUCE eine BIR-Domäne besitzt, die der des Zellzyklusregulators Survivin am ähnlichsten ist, verhält es sich in allen untersuchten Eigenschaften wie ein typisches antiapoptotisches IAP und kann daher dieser Untergruppe der IAP-Familie zugerechnet werden.

### **Der programmierte Zelltod ist streng reguliert**

Mehrzellige Organismen müssen in der Lage sein die Anzahl ihrer Zellen zeitlich und räumlich zu regulieren. Der programmierte Zelltod, oder Apoptose, ist ein physiologischer Vorgang, der es dem Organismus erlaubt, bestimmte Zellen gezielt zu eliminieren. Dies ist bei Entwicklungsvorgängen und bei der Homöostase von zentraler Bedeutung. Eine Fehlregulation in der Fähigkeit, den Zelltod einzuleiten kann zu Krebs, Autoimmunerkrankungen oder neuronalen Störungen wie Alzheimer oder Parkinson führen. Apoptose wird von zahlreichen intra- oder extrazellulären Signalen ausgelöst und führt zur Aktivierung von Caspasen. Dies sind Cysteinproteasen, die, sobald sie aktiviert werden, gezielte Substratproteine spalten und so die koordinierte Zerstörung der Zelle herbeiführen. Da das Voranschreiten der Apoptose, sobald sie einmal ausgelöst wurde, nicht mehr gestoppt werden kann, muss ihre Auslösung streng kontrolliert werden. Dies geschieht durch pro- und antiapoptotische Proteine, die sich gegenseitig beeinflussen und die die Aktivierung von Caspasen stimulieren bzw. unterdrücken. Das Schicksal einer Zelle, d.h. die

Entscheidung ob eine Zelle lebt oder stirbt, wird daher durch ein empfindliches Gleichgewicht der Aktivitäten pro- und antiapoptotischer Faktoren bestimmt.

### **BRUCE ist ein Inhibitor of Apoptosis Protein**

Eine wichtige Gruppe von Proteinen, die der Apoptose entgegenwirken, sind die *inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs). IAPs werden aufgrund ihrer charakteristischen BIR-Domänen, über die sie direkt an Caspasen binden und diese in ihrer Aktivität inhibieren können, den sogenannten BIR-Domänen Proteinen (BIRPs) zugerechnet (Verhagen et al., 2001). XIAP besitzt aufgrund seiner starken Affinität zu sowohl Effektor- als auch Initiatorcaspasen die stärkste antiapoptotische Aktivität aller bekannten IAPs. Die Proteine cIAP1 und cIAP2 scheinen hingegen speziellere Funktionen in der TNF-Signalkaskade zu haben. Sie assoziieren über TRAF-Proteine mit TNF-Rezeptoren (Rothe et al., 1995), und cIAP1 vermittelt über seine RING-Finger Ubiquitin-Ligaseaktivität den Abbau von TRAF2 (Li et al., 2002). ML-IAP/Livin (Kasof und Gomes, 2001; Vucic et al., 2000) ist in einigen Krebszelllinien stark überexprimiert, funktionell aber nur wenig charakterisiert. NAIP (Liston et al., 1996) besitzt anstelle eines RING-Fingers eine C-terminale Nukleotidbindestelle und scheint in seiner Funktion auf Neuronen beschränkt zu sein. Ein zweiter Ast der BIRP-Familie, mit Survivin als seinem wichtigsten Vertreter, ist offensichtlich weniger an apoptotischen Vorgängen beteiligt. Survivin und seine Homologen in Hefe und *C. elegans* besitzen eine leicht unterschiedliche BIR-Domäne und regulieren als *chromosomal passenger proteins* vornehmlich Zellzyklus und Zellteilung (Reed und Bischoff, 2000; Verhagen et al., 2001).

BRUCE ist ein außergewöhnliches Protein der BIRP-Familie. Zum einen aufgrund seiner enormen Größe von 530 kDa, und zum anderen wegen seiner C-terminalen UBC-Domäne. Seine N-terminale BIR-Domäne ist außerdem keine typische IAP-BIR-Domäne, sondern hat Ähnlichkeit zur BIR-Domäne von Survivin. Die Funktion von BRUCE blieb daher lange im Dunkeln. Neuere in *Drosophila* (Vernooy et al., 2002) und Säugierzellen (Chen et al., 1999; Qiu et al., 2004) gemachte Entdeckungen zeigten jedoch deutlich, dass BRUCE den Zelltod verhindert. Diese Studien konnten aber den durch BRUCE regulierten Signalweg

und den molekularen Mechanismus, der den beobachteten Effekten zugrunde liegt, nicht erklären. Die Arbeiten in *Drosophila*, bei denen C-terminale Deletionsmutanten verwendet wurden, deuten darauf hin, dass dBruce zur Inhibition der Reaper- und Grim-induzierten Apoptose seine Ubiquitin-Konjugationsaktivität benötigt (Vernooy et al., 2002). Des Weiteren wurde vermutet, dass dBruce nicht als Caspase-Inhibitor wirkt, da es nicht in der Lage war, den durch die *Drosophila*-Caspasen Dronc oder Strica induzierten Zelltod zu blockieren (Vernooy et al., 2002). Die hier, unter Verwendung von WT und Mutanten von BRUCE, durchgeführten Experimente zeigen jedoch eindeutig, dass BRUCE wie andere anti-apoptotische IAPs Caspasen binden und inhibieren kann. Außerdem schützt die Überexpression von BRUCE Zellen vor der Apoptose. Diese Befunde wurden inzwischen durch weitere Studien bestätigt (Hao et al., 2004; Qiu und Goldberg, 2004). Beide Aktivitäten benötigen hierfür eine intakte BIR-Domäne. Interessanterweise verstärkte die Überexpression der BRUCE<sup>bir</sup>-Mutante das Ausmaß der induzierten Apoptose (Abb. 7). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass BRUCE homodimerisiert, und sich die inaktive BRUCE<sup>bir</sup>-Mutante im Komplex dominant-negativ auswirkt. Im Gegensatz hierzu ist die Ubiquitin-Konjugationsaktivität an der Inhibition von Caspasen durch BRUCE *in vitro* nicht beteiligt. Sie scheint aber für das anti-apoptotische Potenzial von BRUCE *in vivo* wichtig zu sein, da die BRUCE<sup>ubc</sup>-Mutante Zellen nur begrenzt vor der Apoptose schützen kann. Es müssen daher Ubiquitylierungs-Substrate von BRUCE existieren, die entweder anti- oder proapoptotisch wirken und die durch Ubiquitylierung aktiviert bzw. inaktiviert werden. Obwohl BRUCE eine Survivin-ähnliche BIR-Domäne besitzt, verhält es sich in den untersuchten Eigenschaften wie ein antiapoptotisches IAP. BRUCE kann daher diesem Zweig der BIRP-Familie zugerechnet werden. Verglichen mit XIAP, dem stärksten aller bekannten IAPs, ist BRUCE aber ein relativ schwacher Apoptose-Inhibitor. Seine Caspase-inhibitorische Aktivität ist etwa zehnfach geringer als die von XIAP. BRUCE scheint außerdem vornehmlich Effektorcaspasen (Caspase-3 und -7) und nicht Initiatorcaspasen zu blockieren. Es ist daher wahrscheinlich, dass BRUCE den Ablauf der Apoptose eher moduliert, anstatt ihn komplett zu blockieren.

**BRUCE ist Überlebensfaktor**

Zusätzlich zum Schutz vor Apoptose durch Überexpression von BRUCE zeigten Säugerzellen, in denen die Expression von BRUCE durch Antisense-RNA reduziert wurde, eine höhere Empfindlichkeit gegenüber apoptotischen Stimuli (Chen et al., 1999). Die hier vorgestellten Experimente zeigen zudem, dass das Entfernen von BRUCE aus 293-Zellen mittels RNAi zu deren Tod führt. Dies heißt, dass BRUCE von den Zellen zum Überleben benötigt wird. Die molekularen Grundlagen dieser Beobachtung können mit diesen Experimenten leider noch nicht erklärt werden. Es ist aber naheliegend, dass in einer normale Zelle eine konstante Ubiquitylierung und ein evtl. damit verbundener Abbau bestimmter Substrate durch BRUCE für das Überleben notwendig ist. Ein Verlust dieser Ubiquitylierung würde dann zum Tod der Zelle führen. Ein möglicher Kandidat hierfür ist p53, da kürzlich gezeigt wurde, dass Zellen, in denen *BRUCE* durch *gene-trap*-Insertion zerstört oder durch RNAi herunterreguliert wurde, p53 hochregulieren und den mitochondrialen Signalweg der Apoptose aktivieren. Der durch BRUCE-RNAi verursachte Zelltod konnte hierbei teilweise verhindert werden, indem die Hochregulation von p53 mittels RNAi gegen p53 unterdrückt wurde (Ren et al., 2005). Ob diese Regulation von p53 über eine direkte Ubiquitylierung durch BRUCE verläuft, ist aber leider noch nicht bekannt. Außerdem könnte der Verlust der IAP-Funktion von BRUCE zu einer erhöhten Aktivität von Caspasen und somit unabhängig von p53 zum apoptotischen Zelltod führen (Qiu et al., 2004). Die in diesem Zusammenhang vorgestellten Studien waren jedoch in dieser Hinsicht nicht schlüssig, da der durch BRUCE-RNAi verursachte Zelltod zwar zur Aktivierung von Caspasen führte, deren Aktivität aber nicht benötigte (Qiu et al., 2004). Interessanterweise sind auch Mäuse, deren *BRUCE*-Gen durch homologe Rekombination zerstört wurde (*BRUCE*<sup>-/-</sup>), nicht lebensfähig (Hao et al., 2004; Lotz et al., 2004). *BRUCE*<sup>-/-</sup>-Mäuse weisen ein verzögertes Wachstum der Embryonen und perinatale Lethalität auf, wobei die Mäuse keine offensichtlichen anatomischen Anomalien zeigen und auch die Anzahl apoptotischer Zellen im Gewebe sich nicht vom Wildtyp unterscheidet. Die perinatale Lethalität wird wahrscheinlich durch eine gestörte Entwicklung der Plazenta hervorgerufen (Lotz et al., 2004). Erstaunlicherweise zeigen Mäuse, in

denen das *BRUCE*-Gen durch *gene-trap*-Insertion zerstört wurde und die nur noch die N-terminalen 2146 Aminosäuren von *BRUCE* exprimieren, im Vergleich mit den *BRUCE*<sup>-/-</sup>-Mäusen einen leicht abgewandelten Phänotyp. Sie zeichnen sich wie die *BRUCE*<sup>-/-</sup>-Mäuse durch eine gestörte Entwicklung der Placenta und ein hierdurch verursachtes verzögertes Wachstum und perinatale Lethalität aus. Zusätzlich haben die *gene-trap*-Mäuse aber eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen im Gewebe der Placenta und auch isolierte Zellen der *gene-trap*-Mäuse zeigen eine erhöhte Rate spontan auftretender Apoptose. Möglicherweise sind diese Beobachtungen die Folgen eines dominant-negativen Effekts des *gene-trap*-Produkts, welches aus einer Fusion der N-terminalen 2146 Aminosäuren von *BRUCE*, die die vollständige BIR-Domäne enthalten, und des  $\beta$ -Galaktosidase-Reporters besteht. Im Gegensatz zu Krebszellen, in denen *BRUCE* durch RNAi herunterreguliert wurde, sind die Zellen der *BRUCE*<sup>-/-</sup>-Mäuse selbst lebensfähig. Bezüglich einer erhöhten Sensitivität der *BRUCE*<sup>-/-</sup>-Zellen für apoptotische Stimuli gehen die Ergebnisse jedoch auseinander. Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Apoptose-Phänotyp in den *BRUCE*<sup>-/-</sup>-Mäusen und Zellen ist, dass andere IAPs den chronischen Mangel an *BRUCE* kompensieren könnten. Ein solcher Kompensationseffekt wurde bereits für XIAP diskutiert (Harlin et al., 2001), und da *BRUCE* nur ein schwacher Apoptose-Inhibitor ist, wäre dies nicht weiter verwunderlich. Außerdem könnte *BRUCE* auch ein lokal regulierter oder spezialisierter Inhibitor bestimmter Caspasen sein, die bei nicht-apoptotischen Prozessen aktiviert werden. So wurde gezeigt, dass *Drosophila* d*BRUCE* an der Differenzierung von Spermien beteiligt ist (Arama et al., 2003), und dass die Erythrozyten-Reifung in *BRUCE*<sup>-/-</sup>-Mäusen verlangsamt ist (Lotz et al., 2004). Beide Vorgänge beruhen auf nicht-apoptotischen Caspase-Aktivitäten.

### **BRUCE wird während der Apoptose inaktiviert**

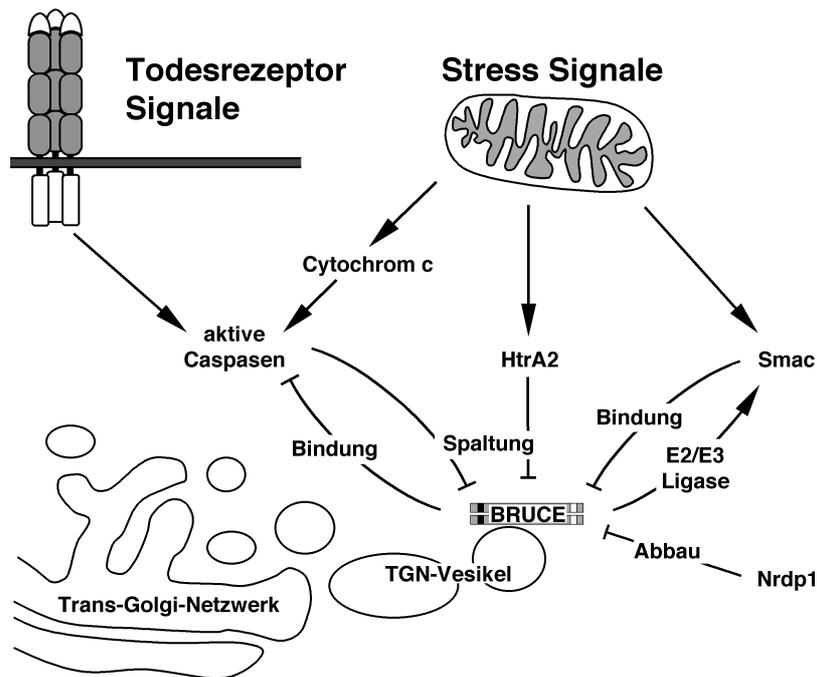
Obwohl *BRUCE* offensichtlich kein starker Apoptose-Inhibitor ist, existieren zahlreiche Mechanismen, um die Funktion von *BRUCE* zu eliminieren. Kürzlich wurde eine Ubiquitylierung von *BRUCE* durch die Ubiquitin-Ligase Nrdp1 und ein proteasomaler Abbau während der Apoptose gezeigt (Qiu et al., 2004). Da das

Proteasom selbst jedoch während der Apoptose inaktiviert wird (Sun et al., 2004), ist dies wahrscheinlich nicht der wichtigste Weg des BRUCE-Abbaus in apoptotischen Zellen. Tatsächlich wird BRUCE, wie in dieser Studie gezeigt, auf drei zusätzliche Arten inaktiviert. BRUCE ist, wie andere IAPs auch, ein Caspase-Substrat. Die Spaltung von BRUCE durch Caspasen führt zu einem BRUCE-Fragment bestehend aus den N-terminalen 648 Aminosäuren. Erstaunlicherweise besitzt dieses Fragment, obwohl es die vollständige BIR-Domäne enthält, keinerlei IAP-Aktivität. Ein möglicher Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass außer der BIR-Domäne noch andere Eigenschaften von BRUCE für die IAP-Funktion notwendig sind. So könnte BRUCE seine aktive Konformation erst als Homodimer ausbilden und die isolierte BIR-Domäne eine inaktive Faltung annehmen. Dies wäre auch eine Erklärung für die Beobachtung, dass ein N-terminales dBruce-Fragment nicht in der Lage ist, in *Drosophila* den Zelltod zu verhindern (Vernooy et al., 2002). Zusätzlich zu der Inaktivierung von BRUCE durch Caspase-Spaltung, wird seine IAP-Aktivität durch die beiden IAP-Antagonisten Smac und HtrA2 inhibiert. Smac und HtrA2 werden während der Apoptose aus den Mitochondrien ausgeschüttet und binden mit ihren N-terminalen IAP-Bindemotiven an die BIR-Domäne von BRUCE. Die Bindung von Smac an BRUCE führt dazu, dass Caspasen von BRUCE verdrängt werden oder nicht mehr an BRUCE binden können. Hierdurch wird die Caspase-inhibitorische Funktion von BRUCE ausgeschaltet. Im Gegensatz hierzu scheint die Serinprotease HtrA2 BRUCE durch proteolytische Spaltung zu inaktivieren. Die Spaltung von BRUCE durch Caspasen und HtrA2 wurde inzwischen in einer weiteren Studie bestätigt (Qiu und Goldberg, 2004). Die vielfältigen Mechanismen der Inhibition lassen vermuten, dass in Situationen, in denen Apoptose stattfinden soll, eine funktionelle Inaktivierung von BRUCE für die Zelle sehr wichtig ist. Interessanterweise wurde kürzlich gezeigt, dass zytosolisch exprimiertes reifes Smac in *BRUCE*<sup>-/-</sup>-MEFs und in 293T-Zellen, in denen BRUCE durch RNAi herunterreguliert wurde, Apoptose auslösen kann (Hao et al., 2004). Es scheint sich hier um einen spezifischen, durch BRUCE regulierten, apoptotischen Signalweg zu handeln, da die Expression von reifem Smac weder in WT MEFs noch in 293T-Zellen, in denen XIAP durch RNAi herunterreguliert wurde, zum

Zelltod führt. Die Entfernung von BRUCE aus der Zelle während der Apoptose führt daher zu einer Verstärkung des apoptotischen Signals.

### **BRUCE ist Teil eines regulatorischen Netzwerks**

Die Erkenntnisse der letzten Jahre haben ein erstaunlich komplexes Zusammenspiel pro- und antiapoptotischer Faktoren zutage gefördert. Hierbei sind zwei grundlegende Prinzipien erkennbar geworden: ein reversibler Mechanismus, bei dem die affinitätsgetriebene Bindung von Faktoren die Aktivität ihres Bindpartners entweder stimuliert oder erniedrigt, und ein irreversibler Mechanismus, bei dem Moleküle durch Proteolyse dauerhaft modifiziert werden. Der zweite Mechanismus führt offensichtlich nur in eine Richtung und kann den apoptotischen Signalweg über einen kritischen „point of no return“ hinausführen, ab dem eine Entscheidung für den Tod einer Zelle unumkehrbar ist. Beispiele für irreversible Vorgänge, die zur Auslösung der Apoptose führen sind die proteolytische Aktivierung der Caspase-Kaskade und die Eliminierung von BRUCE und anderen IAPs durch Caspase- oder HtrA2-vermittelte Spaltung. Unter manchen Umständen unterliegen IAPs auch einer, durch IAP-Antagonisten wie Smac stimulierten, Autoubiquitinierung gefolgt von proteasomalem Abbau. Hingegen wirkt der proteasomale Abbau proapoptotischer Moleküle wie Smac oder Caspasen durch die Ubiquitin-Ligaseaktivität der IAPs antiapoptotisch. In nicht-apoptotischen Zellen und in Zellen, die noch nicht vollständig apoptotisch determiniert sind, überwiegen wahrscheinlich reversible Mechanismen. Beispiele hierfür sind die Inhibition von Caspasen durch BRUCE und andere IAPs und die Neutralisierung dieser Moleküle durch die Bindung an IAP-Antagonisten wie Smac. Wie von Christian Pohl und in einer weiteren Studie gezeigt wurde besitzt auch BRUCE die Fähigkeit, Ubiquitin an seinen Bindepartner Smac zu konjugieren (Bartke et al., 2004; Hao et al., 2004). Es benötigt hierzu lediglich eine zusätzliche E1-Aktivität und keine weiteren E2- oder E3-Enzyme. BRUCE besitzt mit seiner BIR-Domäne eine Substratbindestelle und mit seiner UBC-Domäne eine katalytische Ubiquitin-Konjugationsdomäne. Es vereint somit in einer Polypeptidkette die Eigenschaften von E2 und E3-Enzymen und kann daher als eine kombinierte E2/E3-Ubiquitin-Ligase beschrieben werden



### Abbildung 20. Modell zur Funktionsweise von BRUCE

BRUCE ist durch vielfältige Interaktionen in ein regulatorisches Netzwerk eingebunden. Durch seine Lokalisierung am Trans-Golgi-Netzwerk ist eine räumlich begrenzte Inhibition von Caspasen an TGN-Vesikeln möglich. Während der Apoptose wird die Funktion von BRUCE durch eine Vielzahl von Mechanismen unterdrückt.

(Bartke et al., 2004). Ob die E2/E3-Aktivität zur Mono- oder Poly-Ubiquitylierung von Smac führt, und ob diese Ubiquitylierung regulatorisch ist oder den proteasomalen Abbau von Smac vermittelt ist zur Zeit noch strittig (Bartke et al., 2004; Hao et al., 2004). Da die UBC-Domäne zur antiapoptotischen Aktivität von BRUCE beiträgt, scheint seine E2/E3-Funktion an einem bisher noch nicht bekannten Punkt das Überleben der Zelle zu regulieren. Eine Möglichkeit wäre, dass BRUCE konstant proapoptotische Faktoren wie Caspasen, Smac oder HtrA2, die in nicht-apoptotischen Zellen in geringem Ausmaß produziert werden, ubiquityliert, und so deren Anhäufung verhindert. Dies wäre auch im Einklang mit den vorgestellten BRUCE RNAi-Experimenten und der Fähigkeit von Smac, in *BRUCE*-defizienten Zellen Apoptose auszulösen. In diesen Zellen führt offensichtlich die chronische bzw. induzierte Überproduktion proapoptotischer Faktoren zum Tod. Des Weiteren könnte die bereits beschriebene Regulation von p53 durch BRUCE eine Rolle spielen. Schließlich wäre es eine weitere faszinierende Möglichkeit, dass auch die Exekutionsphase der Apoptose durch Checkpoints reguliert ist. Da

BRUCE an TGN-Membranen lokalisiert ist, könnte es daher anstatt als genereller Caspase-Inhibitor eher als ein spezialisierter „TGN-Wächter“ wirken, der die lokale Caspase-Aktivität an den Membranen blockiert. Erst die Inaktivierung von BRUCE würde nachfolgende apoptotische Ereignisse, wie die Caspase-Spaltung von Golgi-Proteinen, ermöglichen, und so einen geordneten Abbau des Golgi-Apparates und seine Verpackung in apoptotische Vesikel ermöglichen. Tatsächlich existieren einige Caspase-Substrate am Golgi-Apparat, deren Spaltung zum Zerfall des Golgi-Apparates führt (Lane et al., 2002; Mancini et al., 2000). Da die Zentrale Aufgabe des TGN der Vesikeltransport und die Sortierung der Vesikel an die richtige Zielmembran ist, wird BRUCE sicherlich auch an diesen Prozessen beteiligt sein. Auf jeden Fall wird aus den vorgestellten Daten deutlich, dass BRUCE in ein enges Netzwerk reversibler und irreversibler Interaktionen eingebettet ist, dessen Gleichgewicht über Leben oder Tod einer Zelle entscheidet (Abb. 20).

## 5. Material und Methoden

### Computeranalysen

Datenbankrecherchen (Sequenzsuche und Sequenzvergleiche sowie Literaturrecherchen) wurden mit Hilfe des „National Center for Biotechnology Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt. Für Sequenzanalysen (Erstellen von Restriktionskarten, Auswertung von DNA-Sequenzierungen, Vergleiche von DNA- und Proteinsequenzen und Primerdesign) wurde das Programmpaket DNA-Star (DNA-Star Inc.) verwendet. Gelfilme wurden mit einem AGFA Scanner (Arcus II) digitalisiert und mit dem Programm Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.) bearbeitet. Die Erstellung von Texten, Tabellen, Graphiken und Abbildungen sowie die Auswertung von Messdaten erfolgte mit Hilfe des Microsoft Office Pakets (Microsoft Corp.).

### Mikrobiologische Methoden

#### *E. coli* Stämme

TG1	supE thi-1 $\Delta$ (lac-proAB) $\Delta$ (mcrB-hsdSM)5 (r <sub>K</sub> - m <sub>K</sub> -) [F' traD36 proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15]
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10(Tet <sup>r</sup> )]
XL10-Gold	Tet <sup>r</sup> $\Delta$ (mcrA)183 $\Delta$ (mcrB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10(Tet <sup>r</sup> ) Amy Cam <sup>r</sup> ] <sup>a</sup>
BL21(DE3)/RIL	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> ompT hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) dcm+ Tet <sup>r</sup> gal $\lambda$ (DE3) EndA Hte [argU ileY leuW Cam <sup>r</sup> ]

#### *E. coli* Vektoren

pBluescript SK II (+)	Stratagene
pUC19	NEB
pQE9	Qiagen
pQE31	Qiagen
pET21d(+)	Novagen
pET24b(+)	Novagen
pET28b(+)	Novagen
pGEX-4T-1	Amersham

#### Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Flüssigkulturen in LB-Medium (1% Trypton, 0.5% Hefeextrakt und 1% NaCl sterilisiert durch Autoklavieren) wurden bei 37°C geschüttelt (200 rpm) und Agarplatten (LB-Medium mit 1.5% Agar) bei 37°C inkubiert. Für die Selektion von transformierten Bakterien wurde dem Medium Antibiotika in einer Konzentration von

50  $\mu\text{g/ml}$  (Ampicillin), 30  $\mu\text{g/ml}$  (Kanamycin), 34  $\mu\text{g/ml}$  (Chloramphenicol) bzw. 10  $\mu\text{g/ml}$  (Tetracyclin) zugefügt. Die Dichte von *E. coli* Kulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) bestimmt. Kurzfristig wurden Bakterien in Flüssigkultur oder Ausstriche auf Agarplatten für ca. eine Woche bei 4°C aufbewahrt. Für die langfristige Lagerung wurden stationäre Flüssigkulturen mit Glycerin versetzt (Endkonzentration 17%) und bei -80°C eingefroren.

### **Herstellung elektrokompetenter Bakterien**

Für generelle Anwendungen wurden elektrokompetente XL1-blue Zellen verwendet. Hierfür wurde mit einer frisch ausgestrichenen Einzelkolonie eine Übernachtskultur in Flüssigmedium angesetzt und mit 10 ml dieser Kultur 1 l LB-Medium angeimpft und bei 37°C bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0.7 inkubiert. Nach Abkühlen der Kultur in Eiswasser für 1 h wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 5000g und 4°C geerntet. Alle weiteren Schritte wurden unter Verwendung von vorgekühlten Materialien und eiskalten sterilen Lösungen durchgeführt. Die sedimentierten Zellen wurden vorsichtig in 1 l Wasser resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und der letzte Schritt mit 0.5 l 10% Glycerin wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 20 ml 10% Glycerin aufgenommen und wieder sedimentiert. Schließlich wurden die Zellen in 3 ml 10% Glycerin resuspendiert, in 40  $\mu\text{l}$  Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien**

Für einfache Anwendungen und für die Expression von Proteinen in *E. coli* wurden chemisch kompetente TG1 bzw. BL21(DE3)/RIL Zellen verwendet. Hierfür wurde mit einer frisch ausgestrichenen Einzelkolonie eine Übernachtskultur in Flüssigmedium angesetzt und mit 3 ml dieser Kultur 300 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0.3 inkubiert. Nach Abkühlen der Kultur in Eiswasser für 10 min wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Alle weiteren Schritte wurden unter Verwendung von vorgekühlten Materialien und eiskalten sterilen Lösungen durchgeführt. Die sedimentierten Zellen wurden vorsichtig in 40 ml 100 mM  $\text{MgCl}_2$  resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 80 ml 100 mM  $\text{CaCl}_2$  aufgenommen. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen sedimentiert, in 4 ml 100 mM  $\text{CaCl}_2$ /15% Glycerin resuspendiert, in 100  $\mu\text{l}$  Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **Herstellung „ultra-kompetenter“ Bakterien**

Für die Klonierung von großen Plasmiden (BRUCE-Konstrukte) wurden nach dem Inoue Protokoll (Sambrook und Russel, 2001) hergestellte XL10-Gold Zellen verwendet. Hierfür wurde mit einer frisch ausgestrichenen Einzelkolonie eine 25 ml Flüssigkultur in SOB-Medium (2% Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 0.05% NaCl und 2.5 mM KCl sterilisiert durch Autoklavieren, kurz vor Gebrauch  $\text{MgCl}_2$  auf 10 mM zugeben) angesetzt und 6-8 h bei 37°C geschüttelt. mit 2.5 ml dieser Kultur wurden 250 ml SOB-Medium angeimpft und bei 18°C bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0.55 inkubiert. Nach Abkühlen der Kultur in Eiswasser für 10 min wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 2500g und 4°C geerntet. Alle weiteren Schritte wurden unter Verwendung von vorgekühlten Materialien und eiskalten sterilen Lösungen

durchgeführt. Nach kompletter Entfernung des Mediums wurden die Zellen vorsichtig in 80 ml Inoue Transformationspuffer (10 mM PIPES [pH 6.7], 250 mM KCl, 55 mM MnCl<sub>2</sub> und 15 mM CaCl<sub>2</sub>) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach wiederum kompletter Entfernung des Mediums wurden die Zellen vorsichtig in 20 ml Inoue Transformationspuffer aufgenommen, 1.5 ml DMSO zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen**

Kurz vor der Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Für eine Elektroporation wurden ca. 10 pg Plasmid DNA bzw. 2-4 µl eines gegen Wasser dialysierten Ligationsansatzes mit 40 µl der elektrokompenten Zellen gemischt. Diese Suspension wurde in einer Elektroporationsküvette (0.1 cm Spaltbreite) mit einem Puls von 1.8 kV und 25 µF bei einem Widerstand von 200 Ω elektroporiert. Nach dem elektrischen Puls wurden die Zellen sofort in 1 ml LB-Medium/20 mM Glukose aufgenommen, in ein Eppendorf-Gefäß transferiert und 1 h bei 37°C geschüttelt. Für die Transformation von chemisch kompetenten oder ultra-kompenten Zellen wurden ca. 0.1 bis 500 ng Plasmid-DNA bzw. 2 µl eines Ligationsansatzes mit 48 µl der kompetenten Zellen gemischt und die Suspension in Falcon 2059 Röhrchen 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 sec bei 42°C und einer anschließenden Inkubation für 90 sec auf Eis wurde 1 ml SOC-Medium (SOB-Medium mit 20 mM Glukose) zugegeben und 1 h bei 37°C geschüttelt. Transformierte Zellen wurden anschließend auf Selektionsplatten ausgestrichen und in der Regel über Nacht bei 37°C inkubiert.

## **Zellbiologische Methoden**

### **Zelllinien**

293	humane embryonale Nierenzellen transformiert mit Adenovirus 5 DNA
293T	humane embryonale Nierenzellen mit SV40 large T Antigen transformiertes Derivat der 293 Zelllinie
HeLa	humane Zervix-Adenokarzinomzellen

### **Expressionsvektoren für die Zellkultur**

pCI	Promega
pCI.FRThygro	für diese Studie hergestellt
pCMV Tag2	Stratagene
pCMV Tag3	Stratagene
pCMV Tag4	Stratagene
pcDNA3.1	Invitrogen
pcDNA5/FRT/TO	Invitrogen
pEGFP/pEGFP-F	BD Clontech
pSuper	Geschenk von Reuven Agami, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam

pSuperior.puro	Oligoengine
pSuper.puro.GFP	für diese Studie hergestellt
pBabePuro	Morgenstern, J. P., und Land, H. (1990), Nucleic Acids Research 18, 3587-3596

### **Kultivierung von Säugerzellen**

Alle verwendeten Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen (Falcon) bei 37°C, 7.5% CO<sub>2</sub> und 96% Luftfeuchtigkeit in Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO-BRL) kultiviert. Das Nährmedium wurde mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (Biochrom) supplementiert. Puromycin-resistente 293-Zellen wurden mit 1.5 µg/ml Puromycin (Sigma) selektioniert. Bei Erreichen einer Zelldichte von ca. 80-100% wurden die Zellen abgeerntet. Hierfür wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit sterilem PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH 7.4]) gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Trypsin/EDTA Lösung (GIBCO-BRL) pro 150 cm<sup>2</sup> Flasche zugegeben und bis zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden 1:1 mit Medium verdünnt und für 4 min bei 400g und RT abzentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in frischem Nährmedium resuspendiert und je nach Bedarf zur weiteren Kultivierung 1:5 bis 1:10 verdünnt in frischen Kulturflaschen angesetzt oder für Experimente in Kulturschalen oder Platten ausgesät. Die Ermittlung der Zellzahl der Zellsuspension erfolgte durch Auszählen in einer Neubauerzählkammer.

### **Lagerung von Säugerzellen**

Zur Langzeitlagerung wurden Säugerzellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierzu wurden exponentiell wachsende Zellen bei ca. 80% Konfluenz wie oben beschrieben abgeerntet, in vorgekühltem Einfriermedium (10% DMSO in FCS) resuspendiert und die Zellsuspension in Cryovials aliquotiert. Die Zellen wurden sofort in einem vorgekühlten Isopropanol-gefüllten Cryo-Einfriergefäß (Nalgene) bei -80°C langsam eingefroren. Nach ein bis zwei Tagen konnten die Zellen dann in flüssigen Stickstoff überführt werden. Zum Auftauen wurden die Zellen im Cryovials in einem Wasserbad schnell auf 37°C erwärmt und in 4 ml vorgewärmtes Medium überführt. Zum Entfernen des DMSO wurden die Zellen abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und wie oben beschrieben kultiviert.

### **Transfektion von Säugerzellen**

293- und 293T-Zellen wurden mittels der Calcium-Phosphat Methode transfiziert. Hierfür wurden 4x10<sup>6</sup> Zellen pro 10 cm Schale bzw. 5x10<sup>5</sup> Zellen pro Vertiefung einer 6-well Platte ausgesät und am folgenden Tag transfiziert. Für einen Transfektionsansatz wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß 12-15 µg Plasmid-DNA mit Wasser auf 450 µl aufgefüllt und mit 50 µl 2.5 M CaCl<sub>2</sub> Lösung gemischt. Dann wurden 500 µl 2xHBS Lösung (16.012 g NaCl, 0.744 g KCl, 9.532 g HEPES und 0.248 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pro Liter) langsam tropfenweise am Rand des Gefäßes zugegeben, kurz durch Schütteln gemischt und 3 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubation wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen mit 40 µM Chloroquine (Endkonzentration) supplementiert. Die Transfektionslösung wurde

nach kurzem Mischen tropfenweise gleichmässig zum Medium der vorbereiteten Zellen gegeben (1 ml Lösung pro 10 cm Schale bzw. 300  $\mu$ l pro Vertiefung einer 6-well Platte) und diese dann für 5 h im Brutschrank inkubiert. Nach Wechseln des Mediums wurden die Zellen zur Expression der transfizierten cDNAs für weitere 36-40 h inkubiert. HeLa-Zellen wurden nach einem modifizierten Calcium-Phosphat Protokoll transfiziert. Hierfür wurden am Tag vor der Transfektion  $3 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung einer 6-well Platte ausgesät. Für einen Transfektionsansatz wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß 20  $\mu$ g Plasmid-DNA in 450  $\mu$ l Wasser aufgenommen und mit 50  $\mu$ l 2.5 M  $\text{CaCl}_2$  Lösung gemischt. Es wurden 500  $\mu$ l 2xBES Lösung (50 mM BES, 280 mM NaCl und 1.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) langsam tropfenweise am Rand des Gefäßes zugegeben, kurz durch Schütteln gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen zwei mal mit PBS gewaschen und 3 ml Transfektionsmedium (DMEM mit 10% Pferdeserum und 2.5  $\mu$ g/ml 25-Hydroxy-Cholesterol) pro Vertiefung zugegeben. Die Transfektionslösung wurde nach kurzem Mischen tropfenweise gleichmäßig zum Medium der vorbereiteten Zellen gegeben (300  $\mu$ l pro Vertiefung einer 6-well Platte) und diese dann für 4 h im Brutschrank bei 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal mit dem normalen Medium gewaschen und 12-24 h in Medium inkubiert. Wichtig ist bei dieser Methode, dass während der Transfektion ein anderes Serum als FCS und 25-Hydroxy-Cholesterol im Transfektionsmedium verwendet werden. Mit diesem Protokoll können auch Zellen, die sich mit dem normalen Calcium-Phosphat-Protokoll nicht transfizieren lassen, transfiziert werden. Um eine möglichst hohe Transfektionseffizienz zu erreichen, mussten die optimalen Transfektionsbedingungen (Zellzahl, DNA-Menge, Inkubationszeit der Transfektionslösung usw.) ermittelt werden. Kritisch war dabei der pH-Wert der 2xHBS bzw. 2xBES Lösungen, es wurden daher immer mehrere Lösungen mit pH-Werten zwischen pH 6.90 und 7.15 getestet und nur die jeweils beste Lösung verwendet. Der optimale pH-Wert der 2xHBS Lösung liegt bei etwa 7.05 und der der 2xBES Lösung bei etwa 6.95.

### **RNA-Interferenz**

Zur gezielten Verminderung des zellulären Expressionsniveaus eines Proteins durch RNAi wurden Zellen mit shRNA-exprimierenden pSuper-Vektoren transfiziert. Es wurden folgende Sequenzen der jeweiligen mRNA für die shRNAs verwendet (BRUCE1 5'-GAACCAGAAGGACUUACUC-3', BRUCE2 5'-CUCAGGAGAGUACU-GCUCA-3', XIAP 5'-UAGUGCCACGCAGUCUACA-3', Luciferase 5'-CGUACGC-GGAAUACUUCGA-3'), wobei die shRNA-Konstrukte so gestaltet wurden, dass bei der Transkription je zwei 3' überhängende Uracil-Basen an die 19-Nukleotidduplex angehängt wurden ( $\text{N}_{19}$ -UU).

### **Koloniebildungsstudien**

Um die Auswirkung der Verminderung des Expressionsniveaus von BRUCE auf die Lebensfähigkeit von Zellen zu untersuchen, wurden  $5 \times 10^4$  293-Zellen pro Vertiefung in 6-well Platten mit shRNA-exprimierenden pSuper-Vektoren und pBabePuro im DNA-Massenverhältnis 20:1 cotransfiziert und nach 48 h auf 10 cm Schalen überführt. Stabile Integrianten wurden ab dem folgenden Tag über 2 Wochen mit 1.5  $\mu$ g/ml Puromycin selektioniert wobei alle 3-4 Tage das Medium gewechselt wurde. Die entstandenen Kolonien wurden mit Kristallviolett angefärbt,

indem das Medium entfernt und die Zellen 20 min mit Kristallviolettlösung (0.5% Kristallviolett in 20% Methanol) inkubiert wurden. Nach gründlichem Waschen der Platten wurden die angefärbten Kolonien ausgezählt. Alle Experimente wurden jeweils mit drei Werten gleichzeitig durchgeführt.

### **Stimulation und Messung der Apoptose**

Zur Stimulation der Apoptose wurden HeLa- oder 293T-Zellen entweder mit FLAG-Expressions-Konstrukten und pEGFP-F in einem DNA-Mengenverhältnis von 5:1 co-transfiziert oder blieben untransfiziert. 293T-Zellen wurden einen Tag nach der Transfektion in 6-well Platten neu ausgesät und am folgenden Tag stimuliert. HeLa-Zellen wurden einen Tag nach der Transfektion stimuliert. Untransfizierte HeLa-Zellen wurden in 6-well Platten ausgesät und bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80% stimuliert. Die Induktion der Apoptose erfolgte in Gegenwart von 2.5  $\mu\text{g/ml}$  Cycloheximid mit 100 ng/ml TNF $\alpha$  (R&D Systems) oder 100 ng/ml löslichem TRAIL (Biomol). Alternativ wurden die Zellen mit 2  $\mu\text{M}$  Staurosporine (Biomol) behandelt oder einer Bestrahlung durch einen UV-Puls von 100 mJ/cm $^2$  (HeLa) oder 300 mJ/cm $^2$  (293T) ausgesetzt. Zur Stimulation der Apoptose in Gegenwart von Inhibitoren wurden die Zellen jeweils für eine Stunde mit Cycloheximid und/oder den angegebenen Konzentrationen der jeweiligen Inhibitoren vorinkubiert und dann TRAIL oder TNF $\alpha$  zum Medium zugegeben. Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen nach der angegebenen Zeit durch Trypsinieren geerntet, mit dem Überstand (enthält apoptotische Zellen) vereint und abzentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden aus den Zellen die Lysate hergestellt, die mittels Immunblot untersucht wurden. Die Messung des Anteils apoptotischer Zellen mit subgenomischem DNA-Gehalt erfolgte durch FACS Analyse. Hierfür wurden die Zellen nach der angegebenen Zeit durch Trypsinieren geerntet und in 300  $\mu\text{l}$  PBS/5 mM EDTA pro well resuspendiert. Unter vorsichtigem Vortexen wurden langsam 700  $\mu\text{l}$  eiskaltes 100% Ethanol zu der Zellsuspension zugegeben. Die Zellen konnten dann entweder bei 4°C aufbewahrt oder nach einer Fixierung für ca. 1 h bei 4°C direkt für die Messung verwendet werden. Vor der Messung wurden die Zellen einmal mit PBS/1% BSA gewaschen und anschließend in 0.5 ml (HeLa) oder 1 ml (293T) PBS/5 mM EDTA resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in FACS-Röhrchen mit 100  $\mu\text{l}$  einer 100  $\mu\text{g/ml}$  Propidiumjodid-Lösung gemischt und mit einem FACSCalibur System unter Verwendung der CELLQuest Software (Becton Dickinson) untersucht. Das Messfenster wurde im FSC/SSC-Modus und FSC/FL1 (GFP)-Modus so eingestellt, dass nur intakte Zellen mit GFP-Floureszenz in die Messung mit einbezogen wurden. Die Messung des DNA-Gehalts der Zellen (Propidiumjodid-Floureszenz) erfolgte im FL2-Kanal. Zellen mit subdiploidem DNA-Gehalt wurden als apoptotisch gewertet.

## **Molekularbiologische Methoden: DNA**

### **Isolierung von Plasmid-DNA**

Plasmid-DNA wurde nach alkalischer Lyse von *E. coli* Zellen über Anionen-Austauscher Säulen der Firma Qiagen isoliert. Kleine DNA-Mengen (10-15  $\mu\text{g}$ ) wurden aus 4 ml Übernachtskultur und größere Mengen (500-800  $\mu\text{g}$ ) aus 250-ml-Kulturen isoliert. Sehr große Mengen DNA der BRUCE-Expressionsvektoren (ca. 2 mg)

wurden aus 6-Liter-Kulturen, die mit frisch transformierten XL10Gold-Zellen angeimpft und über Nacht (ca. 16 h) bei 30°C geschüttelt wurden, über Megaprep Tip2500-Säulen gereinigt. Die Reinigung der Plasmide mittels der Qiagen-Säulen erfolgte nach Angaben des Herstellers (Qiagen Plasmid-Handbuch).

### **Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Bestimmung der DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine optische Dichte von eins entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA.

### **Phenol/Chloroform Extraktion von DNA**

Um Verunreinigungen wie z.B. Proteine aus DNA-Lösungen zu entfernen, wurden diese 1- bis 3-mal (je nach Grad der Verunreinigung) mit 1 Vol TE-äquilibriertem Phenol/Chloroform extrahiert. Phenolreste wurden anschließend durch eine Chloroform-Extraktion beseitigt, die DNA durch eine Ethanol-Fällung präzipitiert und in einem geeigneten Volumen Wasser aufgenommen.

### **Präzipitation von DNA**

Für die Ethanol-Fällung wurden 1/10 Vol 3 M Na-Acetat [pH 5.2] und 2.5 Vol eiskaltes Ethanol zu der DNA-Lösung gegeben. Nach einer Inkubation des Ansatzes für >30 min bei -20°C wurde die gefällte DNA für 20 min bei 16000g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und die DNA durch Zugabe von 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das DNA-Pellet getrocknet und in einem geeigneten Volumen Wasser aufgenommen.

### **Restriktionsverdau von DNA**

Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsenzymen wurde nach den allgemein üblichen Vorschriften durchgeführt (Sambrook und Russel, 2001; Ausubel et al., 1987). Die Restriktionsbedingungen für die jeweiligen Enzyme wurden den Empfehlungen der Hersteller entsprechend gewählt, wobei die optimalen Salz-Konzentrationen und pH-Werte mit den 10x konzentrierten Puffern des Herstellers eingestellt wurden. Es wurden in der Regel 5 bis 10 U Enzym pro µg DNA eingesetzt. Die Restriktionsansätze wurden etwa 1 h für analytische und >2 h für präparative Zwecke bei der für das jeweilige Enzym geeigneten Temperatur inkubiert. Partialverdaue wurden wie in Ausubel et al. beschrieben durchgeführt, wobei die Restriktionsenzym-Konzentration bei gleichbleibender DNA-Konzentration variiert wurde. Nach 15 min Inkubation bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 5x DNA-Probenpuffer (siehe unten) oder durch Hitzeinaktivierung des Enzyms abgestoppt.

### **Dephosphorylierung von DNA**

Um die Rezirkularisierung des Vektors in Ligationsreaktionen zu verhindern, wurden die 5'-Enden der DNA dephosphoryliert. Dies erfolgte in der Regel direkt nach dem Restriktionsverdau durch Zugabe von 5-10 U Calf Intestine Phosphatase (NEB) pro µg DNA zum Restriktionsansatz und Inkubation bei 37°C für 1 h. Es wurde darauf geachtet, dass die Pufferbedingungen im Ansatz für die Phosphatase geeignet waren.

### **Phosphorylierung von DNA**

Die 5'-Phosphorylierung von hybridisierten Oligonukleotiden und PCR-Produkten erfolgte mittels der T4 Polynukleotid Kinase (NEB). Hierfür wurden etwa 500 ng Oligonukleotid oder PCR-Produkt mit 1 mM ATP und 10 U T4-PNK für 30 min bei 37°C in T4-PNK-Puffer inkubiert. Um zu verhindern, dass die T4-PNK nachfolgende Reaktionen stört, wurde sie anschließend für 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

### **Auffüllung von 5'-überhängenden DNA Enden**

Aus Restriktionsverdauen resultierende 5'-überhängende DNA Enden wurden mittels des großen Klenow Fragments der DNA Polymerase I (NEB) zu glatten Enden aufgefüllt. Die Reaktionen wurden in der Regel nach Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme direkt im Restriktionsansatz durchgeführt, wobei dieser mit jeweils 33  $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP (dNTPs) und mit 2 U Klenow-Fragment pro  $\mu$ g DNA supplementiert wurde. Nach einer Reaktionszeit von 15 min bei 25°C wurde die Polymerase für 10 min bei 75°C hitzeinaktiviert.

### **Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA**

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte über Gelelektrophorese, wobei je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente 0.7 bis 1.5%ige Agarosegele verwendet wurden. Die Agarose wurde in 1x TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA) aufgekocht, nach Abkühlung mit Ethidiumbromid (0.5  $\mu$ g/ml) versetzt und in Flachkammern mit Kämmen für die Geltaschen gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 5x DNA-Probenpuffer (0.5% SDS, 25% Glycerin, 25 mM EDTA und 0.25% OrangeG) versetzt und je nach Gelgröße bei 90 bis 180 V Spannung mit 1x TBE als Laufpuffer aufgetrennt. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid kann die DNA auf einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und photographiert werden. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte anhand eines parallel aufgetragenen Größenstandards (1 kb DNA-Ladder Invitrogen).

### **Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Das zu isolierende DNA-Fragment wurde unter langwelligem UV-Licht (324 nm) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die DNA wurde mit Hilfe des QiaExII Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus dem Gelstück isoliert und in einem geeigneten Volumen 10 mM Tris pH 8.5 aufgenommen.

### **Ligation von DNA**

Die Mengen der für die Ligation eingesetzten DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen abgeschätzt. Für die Ligation wurden Fragment und Vektor in einem molaren Verhältnis von etwa 4:1 (ca. 100 ng Vektor) eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde mit 1 bis 2  $\mu$ l T4 DNA-Ligase (NEB) in 20  $\mu$ l 1x Ligase-Puffer angesetzt und einige Stunden bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

### **Sequenzieren von DNA**

DNA-Sequenzierungen wurden mit einem AbiPrism 377 DNA-Sequenzierer (Perkin Elmer) in der Arbeitsgruppe oder durch Firmen durchgeführt. Die Sequenzier-

reaktion sowie die nachfolgende Probenaufbereitung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham-Pharmacia). Ein Sequenzieransatz enthielt ca. 0,5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA und 10 pmol Primer.

### **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Standard-PCR-Reaktionen fanden in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  einfach konzentriertem PCR-Puffer (NEB ThermoPol Puffer) mit 50 ng Plasmid-DNA als Matrize, jeweils 0.2 mM dNTPs, 0.6  $\mu\text{M}$  der entsprechenden Oligonukleotide (Primer) und 0.5 U Vent-Polymerase (NEB) statt. Die Amplifikation wurde in einem GeneAmp Thermocycler der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Das Profil der Reaktion richtete sich nach der Länge und dem G/C-Gehalt der verwendeten Oligonukleotide und nach der Länge des zu erwartenden PCR-Fragments. In der Regel wurden, falls notwendig, lediglich die Temperaturen für die Primerbindung oder die Anzahl der Amplifikationszyklen optimiert. Standard PCR-Reaktionen folgten dem

Programme:	Initiale Denaturierung	5 min	94°C
	25-40 Zyklen	30 sec	94°C
		30 sec	50°C bis 65°C
		1 min/1 kb	72°C
	Endverlängerung	7 min	72°C
	Lagerung	$\infty$	4°C

PCR-Reaktionen wurden für die nachfolgende Verwendung entweder über ein Agarose-Gel oder mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### **Zielgerichtete *in vitro* Punktmutagenese**

Gezielte Austausch einzelner Basen in Gensequenzen wurden über eine PCR-basierte Methode unter Verwendung des QuickChange Kit der Firma Stratagene vorgenommen. Hierfür wurden zwei komplementäre Oligonukleotide verwendet, die exakt in der Mitte eine Punktmutation gegenüber der Zielsequenz trugen und in die 5'- und 3'-Richtungen noch jeweils mindestens 15 bp der Zielsequenz aufwiesen, die vorzugsweise mit zwei G- oder C-Basenpaaren endete. Es wurden 50  $\mu\text{l}$ -Reaktionen mit 10 ng Matrizen Plasmid-DNA und je 125 ng der entsprechenden Oligonukleotide wie vom Hersteller angegeben angesetzt und im Thermocycler wie folgt inkubiert: 1 min 95°C; 18 Zyklen (50 sec 95°C, 50 sec 58°C, 2 min/1 kb 68°C); 7 min 68°C;  $\infty$  4°C. Bei der Reaktion wird das gesamte Plasmid amplifiziert. Die methylierte Plasmid-DNA der Matrize wurde anschließend durch einen DpnI-Verdau für 1 h bei 37°C beseitigt. Ein Aliquot dieses Ansatzes konnte anschließend direkt in *E. coli* transformiert werden. Die eingefügten Mutationen wurden über Sequenzierungen überprüft.

### **Einfügen von kurzen Oligonukleotide-Sequenzen**

Kurze DNA-Sequenzen, die für Epitop-Markierungen oder für shRNAs codierten, wurden über hybridisierte Oligonukleotide an bestimmten Restriktionsenzym-Schnittstellen in Expressionsplasmide eingefügt. Hierfür wurden jeweils zwei komplementäre Oligonukleotide hybridisiert, deren Sequenz das gewünschte

Antikörper-Epitop oder die shRNA codierte. Die Sequenzen am 5'- und 3'-Ende der zwei Oligonukleotide wurde so gewählt, dass bei der Hybridisierung zu den jeweiligen Restriktionsschnittstellen passende, überhängende Enden entstanden. Für die Hybridisierung wurden jeweils 3  $\mu\text{g}$  der beiden Oligonukleotide in 50  $\mu\text{l}$  Hybridisierungspuffer (30 mM HEPES/KOH [pH 7.4], 100 mM K-Acetat, 2 mM Mg-Acetat) gemischt und unter Verwendung eines Thermocyclers für 10 min auf 95°C erhitzt und langsam (1°C/4 min) auf 10°C abgekühlt. Die hybridisierten Oligonukleotide (500 ng) wurden wie oben beschrieben mit der T4-PNK phosphoryliert. Nach Hitzeinaktivierung der T4-PNK wurden 100 ng der phosphorylierten Oligonukleotide in 100 ng des entsprechend verdauten Expressionsplasmids ligiert. Die Richtigkeit der eingefügten Sequenzen wurde über Sequenzierungen überprüft.

## **Molekularbiologische Methoden: RNA**

Um Kontamination mit RNasen zu vermeiden, wurde bei allen Arbeiten mit RNA auf äußerste Sauberkeit am Arbeitsplatz geachtet. Für alle Arbeitsschritte wurden Latexhandschuhe, gefilterte Pipettenspitzen und RNase-freies (DEPC-behandeltes) Wasser verwendet.

### **Konzentrationsbestimmung von RNA**

Die Bestimmung der RNA-Konzentration in wässrigen Lösungen erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine optische Dichte von eins entspricht dabei einer Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA.

### **Isolierung von mRNA aus Säugerzellen**

Die Extraktion von polyadenylierter RNA (mRNA) aus Zellkulturen erfolgte mittels des QuickPrep *micro* mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia) wie vom Hersteller angegeben. Hierbei wurde gesamt RNA mit Guanidiniumthiocyanathaltigem Puffer aus den Zellen extrahiert und die polyadenylierte mRNA über Oligo(dT)-Zellulose isoliert. Nach mehreren Waschschritten mit Hoch- und Niedrigsalzpuffer wurde die mRNA bei 65°C eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **RT-PCR**

Die cDNAs für Smac und HtrA2 wurden über RT-PCR aus mRNA von 293T-Zellen isoliert. Hierbei wird mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden in einer reversen Transkriptions-Reaktion zuerst einzelsträngige mRNA in DNA umgeschrieben und diese dann über eine PCR-Reaktion amplifiziert. Hierfür wurde das One-Step RT-PCR Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Reaktionen wurden, wie vom Hersteller angegeben, in 50  $\mu\text{l}$  mit 100 ng 293T-mRNA als Matrize und jeweils 0.6  $\mu\text{M}$  der genspezifischen Oligonukleotide angesetzt. Zur Amplifikation im Thermocycler wurde folgendes Programm verwendet: 30 min 50°C (RT-Reaktion); 15 min 95°C (Inaktivierung der RT-Enzyme und Aktivierung der Taq-Polymerase); 35 Zyklen (30 sec 95°C, 30 sec 63°C, 1 min/1 kb 72°C); 10 min 72°C;  $\infty$  4°C. RT-PCR-Produkte wurden wie nach PCR-Reaktionen aufgereinigt, mit Restriktionsenzymen verdaut und in die entsprechenden Expressionsvektoren ligiert. Die Richtigkeit der RT-PCR Fragmente wurde durch Sequenzierungen überprüft.

## Proteinbiochemische Methoden

### Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinbestimmungen wurden mit dem BioRad-Proteinassay (Biorad, Bradford-Assay) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Standard wurde eine wässrige IgG-Lösung bekannter Konzentration verwendet.

### SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen über denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese erfolgte unter Verwendung des „mighty small“ Gelsystems der Firma Hoefer. Tris-Glycin Trenngele wurden wie in Sambrook et al. beschrieben gegossen. Die Prozentigkeit der Gele richtete sich nach dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine. Für die Auftrennung von BRUCE wurden 4-20% Gradientengele verwendet. Die zwei Gellösungen (für 50 ml 4%-Lösung: 6.7 ml 30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamid, 12.5 ml 1.5 M Tris [pH 8.8], 500  $\mu$ l 10% SDS und 29.8 ml Wasser; für 50 ml 20%-Lösung: 7.5 g Saccharose gelöst in 33.3 ml 30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamid, 12.5 ml 1.5 M Tris [pH 8.8], 500  $\mu$ l 10% SDS) wurden in zwei getrennte Kammern eines Gradientenmischers gegeben und mit 1/100 Vol 10% APS und 1/1000 Vol TEMED gemischt. Nach öffnen des Verbindungskanals wurden die Gele dann unter Rühren der vorderen (20%-) Kammer mit einer Peristaltikpumpe von oben in die Gelform gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde der Alkohol entfernt, die Geloberfläche mit Wasser gespült und ein 3.75%iges Sammelgel (für 10 ml: 1.25 ml 30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamid, 2.5 ml 0.5 M Tris [pH 6.8], 6 ml Wasser, 100  $\mu$ l 10% SDS, 100  $\mu$ l 10% APS und 10  $\mu$ l TEMED) auf das Trenngel gegossen, wobei die Geltaschen mit einem geeigneten Teflonkamm gesteckt wurden. Proteinproben wurden in Probenpuffer (5x SDS-Probenpuffer: 312 mM Tris [pH 6.8], 50% Glycerin, 10% SDS, 25%  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0.01% Bromphenolblau) aufgenommen, durch Erhitzen (5 min bei 95°C) denaturiert, auf das Gel aufgetragen und bei einer Stromstärke von 20-25 mA in Laufpuffer (50 mM Tris, 384 mM Glycin und 0.1% SDS) aufgetrennt (Molekulargewichtstandard: Precision Plus Protein Standard, Biomol).

### Coomassiefärbung von Proteingelen

Um Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden Polyacrylamid-Gele für 1 h bei RT in Coomassie-Lösung (0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 in 25% Methanol und 10% Essigsäure) gefärbt und anschließend durch wiederholtes Waschen mit Entfärbelösung (25% Methanol/8% Essigsäure) entfärbt, bis der Hintergrund klar wurde.

### Transfer auf PVDF Membranen zum Ansequenzieren des N-Terminus

Zur N-terminalen Sequenzierung von Proteinen durch Edman-Abbau wurden die zu sequenzierenden Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Laufpuffer der oberen Kammer (Anode) wurde hierbei mit 0.1 mM Thioglykolat versetzt. Das Gel wurde durch jeweils 5-minütiges Waschen einmal in Wasser und zweimal in CAPS-Puffer (10mM CAPS [pH 11], 10% Methanol,) äquilibriert. Anschließend wurden die Proteine in einer Tankblot-Apparatur (Hoefer) in CAPS-Puffer auf eine Poly-

vinylidenfluorid (PVDF)-Membran (ImmobilonP, Millipore) überführt. Der Transfer erfolgte bei RT für 30 min bei einem konstanten Strom von 300 mA. Die Membran wurde anschließend 5 min in Wasser gewaschen, 1 min in Coomassie-Färbelösung (0.1% CBB R-250 in 40% Methanol und 1% Essigsäure) gefärbt und zweimal mit 50% Methanol entfärbt. Nach 10 min Waschen in Wasser wurde die Membran getrocknet, die gefärbten Proteinbanden ausgeschnitten und bis zur Sequenzierung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **Immunblot**

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden in einer Tankblot-Apparatur (Hofer) aus dem Gel auf eine PVDF-Membran überführt. Der Transfer erfolgte bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 90 min oder über Nacht (für Transfer von BRUCE) in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.01% SDS und 20% Methanol) bei einem konstanten Strom von 250 mA. Zum immunologischen Nachweis der immobilisierten Proteine wurde die Membran für 1 h bei RT in 5% Magermilchpulver (w/v) in TBST (25 mM Tris [pH 7.5], 137 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 0.05% Tween-20) blockiert. Nach einmaligem kurzen Waschen in TBST erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 2 h bei RT bzw. über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  in 5% Magermilchpulver (w/v) in TBST. Die Membran wurde dreimal für 5 min mit TBST gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit einem HRP-konjugierten sekundären Antikörper in einer Verdünnung von 1:10 000 in 5% Magermilchpulver (w/v) in TBST inkubiert. Nach erneutem 6-maligem Waschen in TBST wurden gebundene Antikörper mittels Chemilumineszenz (ECL-Plus Westernblot Detection Kit, Amersham) nach Herstellerangaben nachgewiesen. In dieser Studie wurden folgende monoklonale Maus Antikörper verwendet: anti-FLAG M2 (Sigma), anti-myc 9E10 (Santa Cruz), IgG1 Kontroll mAb, anti-Caspase-6 (beide BD Pharmingen), anti-Caspase-3, anti-BRUCE, anti-PARP und anti-XIAP (alle BD Transduction Laboratories). Die verwendeten polyklonalen Antikörper waren Ziege anti-Actin (Santa Cruz), und Hase anti-Caspase-7 (Cell Signaling), anti-Caspase-9 (Biomol) und anti-HtrA2 (Alexis). Antiseren gegen die C-terminalen 406 Aminosäuren von BRUCE (BRUCE-UBC) und gegen reifes Smac wurden hergestellt, indem Kaninchen mit gereinigten His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen immunisiert wurden.

### **Herstellung von Zell-Lysaten und Immunpräzipitation**

Für Immunpräzipitationen wurden 293T-Zellen bis zu einer Konfluenz von etwa 80% kultiviert, einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und in PBS durch Abschaben von der Platte geerntet. Für die Herstellung von Lysaten aus apoptotischen HeLa-Zellen wurden die Zellen durch Trypsinieren geerntet und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die abzentrifugierten Zellen wurden in etwa fünffachem Pelletvolumen IP-Puffer (50 mM HEPES [pH 7.2], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% NP-40) mit 1 mM PMSF und Complete Proteaseinhibitoren (Roche) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer wurden für 10 min bei 10000g und  $4^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert. Der Überstand war das Zell-Lysat. Für Immunpräzipitationen aus transfizierten 293T-Zellen wurden 500  $\mu\text{l}$  Lysat (ca. 5 mg Gesamtprotein) mit 20  $\mu\text{l}$  anti-myc (9E10) Agarose für 4 h bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Für Immunpräzipitationen endogener Proteine wurden 1 ml Lysat (ca. 10 mg Gesamtprotein) mit 5  $\mu\text{g}$  der monoklonalen Antikörper oder mit 5  $\mu\text{l}$  Serum für 3 h bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die

Verdrängung von BRUCE von dem monoklonalen anti-BRUCE Antikörper erfolgte durch Zugabe von 100  $\mu\text{g}$  des Epitop-Peptids (siehe unten) zum Lysat. Monoklonale oder polyklonale Antikörper wurden mit 25  $\mu\text{l}$  einer 50% Aufschlammung von Protein G-Agarose (Roche) bzw. Protein A-Sepharose (Amersham) für weitere 2 h gebunden. Nach fünfmaligem Waschen mit IP-Puffer wurden die Proteine durch Kochen in 1x SDS-Probenpuffer von der Matrix eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunblot untersucht.

### **Identifikation von BRUCE-Interaktoren**

Zur Identifikation von BRUCE-Interaktoren wurden jeweils zehn 100 mm-Schalen 293T-Zellen transient mit pCI-<sup>myc</sup>BRUCE<sup>FLAG</sup> oder Leervektor transfiziert und durch Rotation in 5 ml Lysepuffer (50 mM Tris [pH 7.4], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton-X-100) mit 1 mM PMSF und Complete Proteaseinhibitoren für 30 min bei 4°C lysiert. Zelltrümmer wurden für 30 min bei 20000g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand (ca. 60 mg Gesamtprotein) auf eine anti-FLAG (M2) Agarose-Säule (Sigma) mit 300  $\mu\text{l}$  Bettvolumen geladen. Nach zwei Waschschritten mit je 5 ml Lysepuffer und Waschpuffer (50 mM Tris [pH 7.4], 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1% Triton-X-100) wurden gebundene Proteine mit 2 ml 0.1 mg/ml FLAG-Peptid in Waschpuffer eluiert und auf eine anti-myc (9E19) Agarose-Säule (Santa Cruz) mit 100  $\mu\text{l}$  Bettvolumen geladen. Nach zwei weiteren Waschschritten mit je 5 ml Waschpuffer und TBS (50 mM Tris [pH 7.4], 150 mM NaCl) wurden gebundene Proteine mit 1 ml 0.1 mM Glycin/HCl [pH 2.2] eluiert und durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  55% TCA für 20 min auf Eis gefällt. Die gefällten Proteine wurden für 20 min bei 20000g und 4 °C abzentrifugiert und einmal mit eiskaltem Aceton gewaschen. Die Proteine wurden getrocknet, in 1xSDS-Probenpuffer aufgenommen, durch Kochen denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Mit BRUCE aufgereinigte Proteinbanden wurden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht, ausgeschnitten und im Gel tryptisch verdaut. Die aus dem Gel eluierten Peptide wurden anschließend im MALDI-TOF Massenspektrometer analysiert. Die Identifikation der Proteine erfolgte über deren Peptidmassen unter Benutzung der Suchwerkzeuge PeptIdent, MS-Fit, Mascot und ProFound.

### **Reinigung von FLAG-Fusionsproteinen aus 293T-Zellen**

FLAG-Epitop-markierte Proteine wurden aus transient transfizierten 293T-Zellen durch anti-FLAG Affinitätschromatographie isoliert. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion in 100 mm Schalen durch Trypsinieren geerntet, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und zu ungefähr 40 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml (ca 500  $\mu\text{l}$  pro Platte) in Digitonin-Lysepuffer (Puffer A (20 mM HEPES [pH 7.5], 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA) mit 250 mM Saccharose, 0.05% Digitonin, 1 mM PMSF und Complete Proteaseinhibitoren) resuspendiert. Nach einer Permeabilisierung für 10 min auf Eis wurden Zelltrümmer für 5 min bei 20000g und 4°C abzentrifugiert und der zytosolische Extrakt auf 150 mM NaCl eingestellt. Für Bindungsstudien wurden die FLAG-Epitop-markierten Proteine im Batch-Verfahren gereinigt, indem pro eingesetzter 100 mm-Schale 30  $\mu\text{l}$  anti-FLAG (M2) Agarose zugegeben und für 4 h bei 4°C inkubiert wurde. Nach gründlichem Waschen mit PBS/1% Triton-X-100 gefolgt von PBS/0.1% Triton-X-100 und PBS wurden die Proteine bis zur weiteren Verwendung bei 4°C in PBS oder bei -20°C in PBS/50% Glycerin (für bis zu zwei

Wochen) gelagert. Für *in vitro*-Apoptose-Studien wurden die zytosolischen Extrakte in einem zweiten Zentrifugationsschritt für 1 h bei 100000g und 4°C geklärt und auf anti-FLAG (M2) Agarosesäulen geladen. Die Säulen wurden gründlich mit TBS (50 mM Tris [pH 7.4], 150 mM NaCl) gespült und gebundene Proteine mit 0.1 mg/ml FLAG-Peptid eluiert, gegen TBS dialysiert, einkonzentriert (Vivaspin, Vivascience) und in TBS/10% Glycerin in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proteine wurden bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

### **Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus *E. coli***

GST-Fusionsproteine wurden in *E. coli* BL21(DE3)/RIL Zellen (Stratagene) von pET-Vektoren (Novagen) exprimiert, wobei die Proteine bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 0.4 mit 1 mM IPTG induziert und über Nacht bei RT exprimiert wurden. Die abgeernteten Zellen wurden in etwa 5 ml GST-Lysepuffer (20 mM Tris [pH 7.5], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1mM DTT und 1 mg/ml Lysozym) pro Gramm Feuchtgewicht resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 2 minütigen Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung (Sonopuls HD2200, Bandelin) wurde die Zellsuspension auf 1% Triton-X-100 eingestellt und 30 min bei 4°C rotiert. Anschließend wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation für 40 min bei 20000g und 4°C entfernt und das Lysat auf eine Glutathion-Sepharose Säule (Amersham) geladen. Nach Waschen mit je 10fachem Bettvolumen von GST-Waschpuffer 1 (20 mM Tris [pH 7.5], 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton-X-100 und 1mM DTT), GST-Waschpuffer 2 (20 mM Tris [pH 7.5], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% Triton-X-100 und 1mM DTT) und GST-Waschpuffer 3 (20 mM Tris [pH 7.5], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA und 1mM DTT) wurden gebundene Proteine in GST-Elutionspuffer (10 mM Tris [pH 8.0], 10 mM Glutathion) eluiert, gegen PBS dialysiert, einkonzentriert und in PBS/10% Glycerin in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proteine wurden bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

### **Native Aufreinigung von His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen aus *E. coli***

His<sub>6</sub>-Fusionsproteine wurden in *E. coli* BL21(DE3)/RIL Zellen (Stratagene) von pET-Vektoren (Novagen) exprimiert, wobei die Proteine bei einer OD<sub>600</sub> von 0.4 mit 0.1 mM IPTG induziert und über Nacht bei RT exprimiert wurden. Die abgeernteten Zellen wurden in etwa 5 ml Ni-NTA-Reinigungspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH 8.0], 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) mit 2 mM PMSF, Complete Proteaseinhibitoren und 1 mg/ml Lysozym pro Gramm Feuchtgewicht resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und Zelltrümmer durch Zentrifugation für 40 min bei 20000g und 4°C entfernt. Das Lysat wurde auf eine Ni-NTA Agarose Säule (Qiagen) geladen und gebundene Proteine nach gründlichem Waschen mit Ni-NTA-Reinigungspuffer in Ni-NTA-Elutionspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH 8.0], 150 mM NaCl, 250 mM Imidazol) eluiert. Die Proteine wurden gegen PBS dialysiert, gegebenenfalls einkonzentriert, in PBS/10% Glycerin in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert. Smac-His<sub>6</sub> Fusionsproteine wurden zur weiteren Aufreinigung in ResourceQ-Puffer (50 mM Tris [pH 7.5], 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) dialysiert, auf eine ResourceQ-Säule (Amersham) geladen und unter Verwendung eines FPLC-Systems (Pharmacia) mit einem NaCl-Gradienten (100 mM bis 1 M) in ResourceQ-Puffer eluiert. Die Smac-Fraktionen wurden gegen PBS dialysiert und

in einem letzten Schritt mit PBS als Laufpuffer über eine Gelfiltration (Superdex 200-Säule, Amersham) gereinigt. Die Aufreinigung von HtrA2-His<sub>6</sub> erfolgte prinzipiell wie oben beschrieben. Für den Aufschluss und die Waschschriffe wurde jedoch HtrA2-Reinigungspuffer (25 mM Tris [pH 8.5], 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol) verwendet. Um die Serinproteaseaktivität von HtrA2 nicht zu inhibieren wurden als Protease-inhibitoren statt PMSF und Complete 5 µg/ml Pepstatin und 6 µg/ml Chymostatin verwendet. Bei der Anionenaustauscher-Chromatographie über die ResourceQ-Säule mit 80 mM NaCl im ResourceQ-Puffer war HtrA2 im Durchlauf. Die abschließende Reinigung über eine Gelfiltration erfolgte mit einer Superdex 75-Säule (Amersham) in PBS.

### **Reinigung von His<sub>6</sub>-BRUCE<sup>495-522</sup> (mAb Epitop) aus *E. coli***

Ein kurzes BRUCE-Peptid (Aminosäuren 495 bis 522), welches das Epitop des in dieser Studie verwendeten monoklonalen anti-BRUCe Antikörpers enthält, wurde von pQE31 (Qiagen) in *E. coli* BL21(DE3)/RIL Zellen exprimiert und mit Ni-NTA Agarose wie vom Hersteller angegeben (The Qiaexpressionist Handbuch) unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. In 8 M Harnstoff [pH 4.5] eluiertes Peptid wurde schrittweise auf PBS/0.1 mM EDTA dialysiert und in diesem Puffer durch Gelfiltration über eine Superdex 75-Säule gereinigt. Das Peptid wurde einkonzentriert, auf 10% Glycerin eingestellt und bei -80°C gelagert.

### **Induktion der Apoptose in zellfreien Extrakten**

Zytosolische Extrakte für *in vitro*-Apoptose-Studien wurden wie beschrieben hergestellt (Deveraux et al., 1998). 293T-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von etwa 80% inkubiert und durch Trypsinieren geerntet. Nach zweimal Waschen mit eiskaltem PBS und einmal Waschen in Puffer A mit 1 mM DTT wurden die Zellen in 1 Vol Puffer A mit 1 mM DTT, 1 mM PMSF und Complete Proteaseinhibitoren resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit 30 Zügen durch eine 23G-Kanüle aufgebrochen, Zelltrümmer für 30 min bei 16000g und 4°C abzentrifugiert und der Zellextrakt (etwa 25 mg/ml Protein) in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. *In vitro* Caspase-Aktivierungs-Studien mit rekombinanten Proteinen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl Puffer A mit 1 mM DTT und 100 µg 293T Zellextrakt durchgeführt. Die Aktivierung von Caspasen erfolgte durch Zugabe von 10 µM Pferdeherz-Cytochrom c (Sigma) und 1 mM dATP bei 30°C für 1 h. Für Caspase-Bindungs-Experimente und BRUCe-Fragmentierungs-Studien wurden Caspasen durch Zugabe von Cytochrom c/dATP direkt zum Extrakt und Inkubation bei 30°C für 1 h aktiviert. Hierbei wurden die Lysate wie angegeben mit Ac-DEVD-CHO (Biomol), zVAD-fmk (Bachem), MG132 oder Lactacystin (beide Sigma) versetzt.

### **Bestimmung der Caspase-Aktivität**

Die Aktivität von Caspasen in den *in vitro*-Apoptose-Studien wurde direkt durch Freisetzung von 7-Amino-4-Trifluoromethyl-Cumarin (AFC) von Ac-DEVD-AFC (Biomol) gemessen. Hierfür wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl Caspase-Reaktionspuffer (20 mM PIPES/HCl [pH 7.2], 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% CHAPS, 10% Saccharose, 10 mM DTT und 100 µM Ac-DEVD-AFC) 5 µl eines *in vitro* Caspase-Aktivierungsansatzes (entspricht 20 µg Zellextrakt) bei 37°C inkubiert

und die Freisetzung von AFC in einem kontinuierlichen Fluoreszenz-Messgerät (Fluoroskan Ascend FL, Thermo Labsystems) bei einer Anregungswellenlänge von 400 nm und einer Emissionswellenlänge von 510 nm gemessen. Die Caspase-Aktivität ist als die Konzentrationszunahme von freiem AFC nach 30 min Inkubation angegeben.

### **Caspase-Bindungs-Studien**

Für Caspase-Bindungs-Studien wurden FLAG-Epitop-markierte Proteine wie oben beschrieben aus transient transfizierten 293T-Zellen mit anti-FLAG M2 Agarose affinitätsgereinigt und auf der Matrix in Puffer A mit 125 mM NaCl äquilibriert. Die mit den Proteinen beladene Agarose-Matrix (ca. 10  $\mu$ l Bettvolumen) wurde in 100  $\mu$ l unbehandeltem oder Cytochrom c/dATP-aktiviertem 293T-Zellextrakt, der vor Zugabe der immobilisierten Proteine mit 62.5 mM NaCl und 50  $\mu$ M zVAD-fmk versetzt wurde, resuspendiert und 2 h bei 4°C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen in Puffer A mit 125 mM NaCl und 0.1% Triton-X-100 wurden gebundene Proteine durch Kochen in 1x SDS-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Immunblot analysiert.

### **Smac-GST-, HtrA2-His<sub>6</sub>- und Peptid-Bindungs-Studien (Pulldowns)**

Für GST-, Ni-NTA- und Peptid-Pulldowns wurden unbehandelte oder mit Epitop-markierten Expressionskonstrukten transfizierte 293T-Zellen durch Trypsinieren geerntet und nach zweimaligem Waschen in eiskaltem PBS für 10 min auf Eis in Digitonin-Lysepuffer lysiert. Zelltrümmer wurden für 5 min bei 20000g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand auf 125 mM NaCl und 1% Triton-X-100 eingestellt. Die zytosolischen Extrakte wurden für 2 h bei 4°C mit 0.5  $\mu$ M Smac <sup>$\Delta$ 1-55</sup>-GST, 1  $\mu$ M HtrA2 <sup>$\Delta$ 1-133</sup>-His oder 20  $\mu$ M biotinylierten Smac-Peptiden inkubiert. GST- oder His<sub>6</sub>-Fusionsproteine wurden anschließend durch Zugabe von Glutathion-Sepharose bzw. magnetischer Ni-NTA-Agarose (Qiagen) und biotinylierte Peptide durch Zugabe von Streptavidin-Sepharose (Amersham) und Inkubation für weitere 2 h bei 4°C gebunden. Nach fünfmaligem Waschen in Puffer A mit 125 mM NaCl, 250 mM Saccharose und 1% Triton-X-100 wurden gebundene Proteine durch Kochen in 1x SDS-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Immunblot analysiert. Lyse- und Waschpuffer für Ni-NTA-Pulldowns enthielten kein EDTA. Die Ni-NTA-Pulldownansätze wurden vor der Zugabe der Ni-NTA-Agarose mit 20 mM Imidazol versetzt. Ni-NTA Waschpuffer enthielten zur Reduzierung unpezifischer Bindungen 20 mM oder 40 mM (für die letzten zwei Waschschrte) Imidazol.

### **Herstellung von Antikörpern in Kaninchen**

Für die Herstellung von Seren wurden 500  $\mu$ g rekombinant gereinigte His<sub>6</sub>-Fusionsproteine in 500  $\mu$ l PBS durch Erhitzen auf 95°C für 10 min denaturiert und 1:1 mit Freund'scher Adjuvanz (complete, Sigma) gemischt. Das Gemisch wurde mit mehreren Zügen zwischen zwei Spritzen durch einen 3-Weg-Hahn in Emulsion gebracht und dem Kaninchen an mehreren Stellen subkutan gespritzt. Nach sechs bis acht Wochen erfolgte die erste Auffrischung (boost). Weitere Auffrischungen fanden dann im Abstand von vier Wochen statt. Für Auffrischungen wurden jeweils 150  $\mu$ g Protein mit Freund'scher Adjuvanz (incomplete, Sigma) emulgiert und gespritzt. Testblutungen wurde zehn Tage nach der dritten Auffrischung

vorgenommen. Nach Erreichen hoher Titer spezifischer Antikörper (in der Regel nach drei bis vier Auffrischungen) wurde zwei Wochen nach der Auffrischung das Blut entnommen. Das Blut wurde 1 h bei 37°C und anschließend über Nacht bei 4°C gelagert. Nach einer Zentrifugation bei 20000g wurde das Serum in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **Affinitätsaufreinigung von Antikörpern**

Hochaffine IgGs wurden über Immuno-Affinitätschromatographie aus Kaninchenserum angereichert. Hierfür wurden rekombinant gereinigte, GST-fusionierte Antigene verwendet. Die Aufreinigung erfolgte über zwei hintereinandergeschaltete Säulen. An die erste Säule (Vorsäule) wurde ein unspezifisches Lysat aus GST überexprimierenden *E. coli* Zellen gekoppelt, an die zweite Säule (Hauptsäule) das gereinigte Antigen. Beim Durchlaufen der Hauptsäule binden die spezifischen Antikörper des Serums an das Antigen und können danach spezifisch eluiert werden. Als Säulenmatrix wurde CNBr-aktivierte Sepharose CL4B (Amersham) verwendet, die in 1 mM HCl vorgequollen und gewaschen wurde. Die Kopplung der Proteine an die Matrix erfolgte über Nacht bei 4°C in Kopplungspuffer (100 mM NaHCO<sub>3</sub> [pH 8.3], 0.5 M NaCl), in den die Proteine vor der Kopplung dialysiert wurden. Freie Bindungsstellen wurden mit 0.2 M Glycin [pH 8.0] für 2 h bei RT blockiert. Anschließend wurde die Sepharose in Säulen überführt und mit verschiedenen Waschschritten vorbereitet (Vor- und Hauptsäule: 4 Vol 100 mM NaAcetat [pH 4.0], 0.5 M NaCl; 3 Vol PBS; 3 Vol PBS/1% SDS; nach einem Durchlauf Säulen 40 min bei 65°C denaturieren; 2 Vol PBS/1% SDS; Vorsäule: 6 Vol PBS/1% Triton-X-100; Hauptsäule: 3 Vol PBS/1% Triton-X-100; 3 Vol PBS/1% Triton-X-100/1% BSA). Die Vorsäule wurde über die Hauptsäule gehängt und beide Säulen wurden verbunden. Das Serum wurde für drei langsame Läufe auf die Säulen gegeben und mit 2 Vol PBS nachgespült. Nach Abhängen der Vorsäule wurde die Hauptsäule mit 5 Vol PBS/1% Triton-X-100 und 6 Vol PBS gewaschen. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C. Die gebundenen spezifischen Antikörper wurden mit saurem Glycin-Puffer (0.2 M Glycin [pH 2.5], 1 mM EGTA) in mehreren Fraktionen eluiert und sofort in 1 M Tris [pH 8.0] neutralisiert. Stark bindende Antikörper wurden mit 4 M Guanidiniumchlorid [pH 7.0] eluiert. Positive Eluate wurden vereinigt und bei 4°C gegen PBS dialysiert. Die gereinigten IgGs wurden in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert oder nach Zusatz von 50% Glycerin und 0.2% BSA bei -20°C aufbewahrt.

## 6. Literatur

Adams, J. M., und Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* *26*, 61-66.

Ambrosini, G., Adida, C., und Altieri, D. C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* *3*, 917-921.

Arama, E., Agapite, J., und Steller, H. (2003). Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Dev Cell* *4*, 687-697.

Ashkenazi, A., und Dixit, V. M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* *11*, 255-260.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., und Struhl, K. (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*. Green and Wiley, New York.

Bartke, T., Pohl, C., Pyrowolakis, G., und Jentsch, S. (2004). Dual Role of BRUCE as an Antiapoptotic IAP and a Chimeric E2/E3 Ubiquitin Ligase. *Mol Cell* *14*, 801-811.

Bergmann, A., Yang, A. Y., und Srivastava, M. (2003). Regulators of IAP function: coming to grips with the grim reaper. *Curr Opin Cell Biol* *15*, 717-724.

Boatright, K. M., Renatus, M., Scott, F. L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I. M., Ricci, J. E., Edris, W. A., Sutherlin, D. P., Green, D. R., und Salvesen, G. S. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* *11*, 529-541.

Breckenridge, D. G., Germain, M., Mathai, J. P., Nguyen, M., und Shore, G. C. (2003). Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* *22*, 8608-8618.

Chai, J., Du, C., Wu, J. W., Kyin, S., Wang, X., und Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* *406*, 855-862.

Chai, J., Shiozaki, E., Srinivasula, S. M., Wu, Q., Datta, P., Alnemri, E. S., Shi, Y., und Datta, P. (2001). Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* *104*, 769-780.

Chen, Z., Naito, M., Hori, S., Mashima, T., Yamori, T., und Tsuruo, T. (1999). A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* *264*, 847-854.

Clem, R. J., Fechheimer, M., und Miller, L. K. (1991). Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* 254, 1388-1390.

Clem, R. J., Sheu, T. T., Richter, B. W., He, W. W., Thornberry, N. A., Duckett, C. S., und Hardwick, J. M. (2001). c-IAP1 is cleaved by caspases to produce a proapoptotic C-terminal fragment. *J Biol Chem* 276, 7602-7608.

Creagh, E. M., Murphy, B. M., Duriez, P. J., Duckett, C. S., und Martin, S. J. (2004). Smac/Diablo antagonizes ubiquitin ligase activity of inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 279, 26906-26914.

Deveraux, Q. L., Leo, E., Stennicke, H. R., Welsh, K., Salvesen, G. S., und Reed, J. C. (1999). Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *Embo J* 18, 5242-5251.

Deveraux, Q. L., und Reed, J. C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13, 239-252.

Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S., und Reed, J. C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J* 17, 2215-2223.

Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., und Reed, J. C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388, 300-304.

Ditzel, M., und Meier, P. (2002). IAP degradation: decisive blow or altruistic sacrifice? *Trends Cell Biol* 12, 449-452.

Ditzel, M., Wilson, R., Tenev, T., Zachariou, A., Paul, A., Deas, E., und Meier, P. (2003). Degradation of DIAP1 by the N-end rule pathway is essential for regulating apoptosis. *Nat Cell Biol* 5, 467-473.

Donepudi, M., Mac Sweeney, A., Briand, C., und Grutter, M. G. (2003). Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell* 11, 543-549.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., und Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.

Duckett, C. S., Nava, V. E., Gedrich, R. W., Clem, R. J., Van Dongen, J. L., Gilfillan, M. C., Shiels, H., Hardwick, J. M., und Thompson, C. B. (1996). A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *Embo J* 15, 2685-2694.

Edinger, A. L., und Thompson, C. B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 16, 663-669.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* *391*, 43-50.

Fischer, U., Janicke, R. U., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* *10*, 76-100.

Fu, J., Jin, Y., and Arend, L. J. (2003). Smac3, a novel Smac/DIABLO splicing variant, attenuates the stability and apoptosis-inhibiting activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein. *J Biol Chem* *278*, 52660-52672.

Fuentes-Prior, P., and Salvesen, G. S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* *384*, 201-232.

Hao, Y., Sekine, K., Kawabata, A., Nakamura, H., Ishioka, T., Ohata, H., Katayama, R., Hashimoto, C., Zhang, X., Noda, T., *et al.* (2004). Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function. *Nat Cell Biol* *6*, 849-860.

Harlin, H., Reffey, S. B., Duckett, C. S., Lindsten, T., and Thompson, C. B. (2001). Characterization of XIAP-deficient mice. *Mol Cell Biol* *21*, 3604-3608.

Haupt, Y., Maya, R., Kazanietz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* *387*, 296-299.

Hauser, H. P., Bardroff, M., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (1998). A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J Cell Biol* *141*, 1415-1422.

Hay, B. A., Huh, J. R., and Guo, M. (2004). The genetics of cell death: approaches, insights and opportunities in *Drosophila*. *Nat Rev Genet* *5*, 911-922.

Hays, R., Wickline, L., and Cagan, R. (2002). Morgue mediates apoptosis in the *Drosophila melanogaster* retina by promoting degradation of DIAP1. *Nat Cell Biol* *4*, 425-431.

Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A. S., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* *277*, 432-438.

Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* *407*, 770-776.

Hicke, L., and Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* *19*, 141-172.

Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 30, 405-439.

Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G., und Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-141.

Holley, C. L., Olson, M. R., Colon-Ramos, D. A., und Kornbluth, S. (2002). Reaper eliminates IAP proteins through stimulated IAP degradation and generalized translational inhibition. *Nat Cell Biol* 4, 439-444.

Hu, S., und Yang, X. (2003). Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *J Biol Chem* 278, 10055-10060.

Huang, H., Joazeiro, C. A., Bonfoco, E., Kamada, S., Levenson, J. D., und Hunter, T. (2000). The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J Biol Chem* 275, 26661-26664.

Huang, Y., Park, Y. C., Rich, R. L., Segal, D., Myszka, D. G., und Wu, H. (2001). Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* 104, 781-790.

Jesenberger, V., und Jentsch, S. (2002). Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 112-121.

Johnson, D. E., Gastman, B. R., Wieckowski, E., Wang, G. Q., Amoscato, A., Delach, S. M., und Rabinowich, H. (2000). Inhibitor of apoptosis protein hIAP undergoes caspase-mediated cleavage during T lymphocyte apoptosis. *Cancer Res* 60, 1818-1823.

Kasof, G. M., und Gomes, B. C. (2001). Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 276, 3238-3246.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., und Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.

Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U., und Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96, 635-644.

Kubbutat, M. H., Jones, S. N., und Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303.

- Kuwana, T., und Newmeyer, D. D. (2003). Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 15, 691-699.
- Lane, J. D., Lucocq, J., Pryde, J., Barr, F. A., Woodman, P. G., Allan, V. J., und Lowe, M. (2002). Caspase-mediated cleavage of the stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis. *J Cell Biol* 156, 495-509.
- Lauber, K., Blumenthal, S. G., Waibel, M., und Wesselborg, S. (2004). Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* 14, 277-287.
- Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G., und Earnshaw, W. C. (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346-347.
- Levine, B., und Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6, 463-477.
- Li, F., Ambrosini, G., Chu, E. Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P. C., und Altieri, D. C. (1998a). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396, 580-584.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., und Yuan, J. (1998b). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Li, L. Y., Luo, X., und Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.
- Li, X., Yang, Y., und Ashwell, J. D. (2002). TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* 416, 345-347.
- Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J. E., MacKenzie, A., und Korneluk, R. G. (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379, 349-353.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., und Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175-184.
- Liu, Z., Sun, C., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Betz, S. F., Oost, T., Herrmann, J., Wu, J. C., und Fesik, S. W. (2000). Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* 408, 1004-1008.
- Locksley, R. M., Killeen, N., und Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.

Lotz, K., Pyrowolakis, G., und Jentsch, S. (2004). BRUCE, a giant E2/E3 ubiquitin ligase and inhibitor of apoptosis protein of the trans-Golgi network, is required for normal placenta development and mouse survival. *Mol Cell Biol* 24, 9339-9350.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., und Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.

MacFarlane, M., Merrison, W., Bratton, S. B., und Cohen, G. M. (2002). Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J Biol Chem* 277, 36611-36616.

Mancini, M., Machamer, C. E., Roy, S., Nicholson, D. W., Thornberry, N. A., Casciola-Rosen, L. A., und Rosen, A. (2000). Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol* 149, 603-612.

Martins, L. M., Iaccarino, I., Tenev, T., Gschmeissner, S., Totty, N. F., Lemoine, N. R., Savopoulos, J., Gray, C. W., Creasy, C. L., Dingwall, C., und Downward, J. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem* 277, 439-444.

Miller, L. K. (1999). An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol* 9, 323-328.

Muratani, M., und Tansey, W. P. (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 192-201.

Muro, I., Hay, B. A., und Clem, R. J. (2002). The Drosophila DIAP1 protein is required to prevent accumulation of a continuously generated, processed form of the apical caspase DRONC. *J Biol Chem* 277, 49644-49650.

Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., und Dixit, V. M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273, 2926-2930.

Olson, M. R., Holley, C. L., Yoo, S. J., Huh, J. R., Hay, B. A., und Kornbluth, S. (2003). Reaper is regulated by IAP-mediated ubiquitination. *J Biol Chem* 278, 4028-4034.

Peter, M. E., und Krammer, P. H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10, 26-35.

Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70, 503-533.

Qiu, X. B., und Goldberg, A. L. (2005). The membrane-associated inhibitor of apoptosis protein, BRUCE/Apollon, antagonizes both the precursor and mature forms of Smac and caspase-9. *J Biol Chem* *280*, 174-182.

Qiu, X. B., Markant, S. L., Yuan, J., und Goldberg, A. L. (2004). Nrdp1-mediated degradation of the gigantic IAP, BRUCE, is a novel pathway for triggering apoptosis. *Embo J* *23*, 800-810.

Rao, L., Perez, D., und White, E. (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* *135*, 1441-1455.

Ray, C. A., Black, R. A., Kronheim, S. R., Greenstreet, T. A., Sleath, P. R., Salvesen, G. S., und Pickup, D. J. (1992). Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* *69*, 597-604.

Reed, J. C., und Bischoff, J. R. (2000). BIRinging chromosomes through cell division--and survivin' the experience. *Cell* *102*, 545-548.

Ren, J., Shi, M., Liu, R., Yang, Q. H., Johnson, T., Skarnes, W. C., und Du, C. (2005). The Birc6 (Bruce) gene regulates p53 and the mitochondrial pathway of apoptosis and is essential for mouse embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Renatus, M., Stennicke, H. R., Scott, F. L., Liddington, R. C., und Salvesen, G. S. (2001). Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 14250-14255.

Riedl, S. J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S. W., Liddington, R. C., und Salvesen, G. S. (2001). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* *104*, 791-800.

Roberts, D. L., Merrison, W., MacFarlane, M., und Cohen, G. M. (2001). The inhibitor of apoptosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity. *J Cell Biol* *153*, 221-228.

Rodriguez, J., und Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* *13*, 3179-3184.

Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayres, T. M., und Goeddel, D. V. (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* *83*, 1243-1252.

Ryoo, H. D., Bergmann, A., Gonen, H., Ciechanover, A., und Steller, H. (2002). Regulation of Drosophila IAP1 degradation and apoptosis by reaper and ubcD1. *Nat Cell Biol* *4*, 432-438.

Sakahira, H., Enari, M., und Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* *391*, 96-99.

Salvesen, G. S., und Duckett, C. S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 401-410.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*. CSH Laboratory Press.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., und Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* *17*, 1675-1687.

Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* *9*, 459-470.

Shiozaki, E. N., Chai, J., Rigotti, D. J., Riedl, S. J., Li, P., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Fairman, R., und Shi, Y. (2003). Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell* *11*, 519-527.

Srinivasula, S. M., Datta, P., Fan, X. J., Fernandes-Alnemri, T., Huang, Z., und Alnemri, E. S. (2000). Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J Biol Chem* *275*, 36152-36157.

Srinivasula, S. M., Gupta, S., Datta, P., Zhang, Z., Hegde, R., Cheong, N., Fernandes-Alnemri, T., und Alnemri, E. S. (2003). Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2. *J Biol Chem* *278*, 31469-31472.

Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R. A., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., und Alnemri, E. S. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* *410*, 112-116.

Stennicke, H. R., Deveraux, Q. L., Humke, E. W., Reed, J. C., Dixit, V. M., und Salvesen, G. S. (1999). Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* *274*, 8359-8362.

Stennicke, H. R., und Salvesen, G. S. (1999). Catalytic properties of the caspases. *Cell Death Differ* *6*, 1054-1059.

Sun, X. M., Butterworth, M., MacFarlane, M., Dubiel, W., Ciechanover, A., und Cohen, G. M. (2004). Caspase activation inhibits proteasome function during apoptosis. *Mol Cell* *14*, 81-93.

Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., *et al.* (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* *397*, 441-446.

Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., und Takahashi, R. (2001a). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* *8*, 613-621.

Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., und Takahashi, R. (2001b). Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 8662-8667.

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* *267*, 1456-1462.

Uren, A. G., Pakusch, M., Hawkins, C. J., Puls, K. L., und Vaux, D. L. (1996). Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 4974-4978.

Uren, A. G., Wong, L., Pakusch, M., Fowler, K. J., Burrows, F. J., Vaux, D. L., und Choo, K. H. (2000). Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr Biol* *10*, 1319-1328.

Verhagen, A. M., Coulson, E. J., und Vaux, D. L. (2001). Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol* *2*, REVIEWS3009.

Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., und Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* *102*, 43-53.

Verhagen, A. M., Silke, J., Ekert, P. G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L. M., Day, C. L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., *et al.* (2002). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* *277*, 445-454.

Vernooy, S. Y., Chow, V., Su, J., Verbrugghe, K., Yang, J., Cole, S., Olson, M. R., und Hay, B. A. (2002). *Drosophila* Bruce can potently suppress Rpr- and Grim-dependent but not Hid-dependent cell death. *Curr Biol* *12*, 1164-1168.

Vucic, D., Stennicke, H. R., Pisabarro, M. T., Salvesen, G. S., und Dixit, V. M. (2000). ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr Biol* *10*, 1359-1366.

Wang, S. L., Hawkins, C. J., Yoo, S. J., Muller, H. A., und Hay, B. A. (1999). The *Drosophila* caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. *Cell* 98, 453-463.

Wilson, R., Goyal, L., Ditzel, M., Zachariou, A., Baker, D. A., Agapite, J., Steller, H., und Meier, P. (2002). The DIAP1 RING finger mediates ubiquitination of Dronc and is indispensable for regulating apoptosis. *Nat Cell Biol* 4, 445-450.

Wing, J. P., Schreader, B. A., Yokokura, T., Wang, Y., Andrews, P. S., Huseinovic, N., Dong, C. K., Ogdahl, J. L., Schwartz, L. M., White, K., und Nambu, J. R. (2002). *Drosophila* Morgue is an F box/ubiquitin conjugase domain protein important for grim-reaper mediated apoptosis. *Nat Cell Biol* 4, 451-456.

Wu, G., Chai, J., Suber, T. L., Wu, J. W., Du, C., Wang, X., und Shi, Y. (2000). Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 408, 1008-1012.

Yang, Q. H., Church-Hajduk, R., Ren, J., Newton, M. L., und Du, C. (2003). Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev* 17, 1487-1496.

Yang, Q. H., und Du, C. (2004). Smac/DIABLO selectively reduces the levels of c-IAP1 and c-IAP2 but not that of XIAP and livin in HeLa cells. *J Biol Chem* 279, 16963-16970.

Yang, Y., Fang, S., Jensen, J. P., Weissman, A. M., und Ashwell, J. D. (2000). Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 288, 874-877.

Yoo, S. J., Huh, J. R., Muro, I., Yu, H., Wang, L., Wang, S. L., Feldman, R. M., Clem, R. J., Muller, H. A., und Hay, B. A. (2002). Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nat Cell Biol* 4, 416-424.

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Stefan Jentsch für seine ständige Unterstützung und stete Bereitschaft zur Diskussion bedanken. Die gute Atmosphäre in seiner Abteilung und die große Freiheit, die er mir bei der Bearbeitung des Themas gelassen hat, waren die Grundlagen für das Gelingen dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Charles N. David aus der Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanke ich mich für die freundliche Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Ganz besonders danke ich auch meinem Kollegen Christian Pohl, ohne dessen Beitrag das BRUCE-Projekt nie dahin gekommen wäre, wo es jetzt ist.

Ein großes Dankeschön geht natürlich an alle Mitglieder der gesamten Abteilung für Molekulare Zellbiologie. Damit sich keiner benachteiligt fühlt, werde ich hier keine Namen nennen. Ihr wisst wer gemeint ist. Ohne eure Bereitwilligkeit, gute und schlechte Laune, Sinn und Unsinn, Wissen und Nichtwissen, usw. zu teilen, wäre das Alles nur der halbe Spaß gewesen.

Der größte Dank von allen gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt und alle meine Entscheidungen mitgetragen haben.



# LEBENS LAUF – TILL BARTKE

---

**Name** Till Bartke  
**Adresse** Badstr. 14a  
81379 München  
Tel.: 089/2170 9418  
**Geburtsdatum** 17. Juli 1973  
**Geburtsort** Ostfildern-Ruit

---

## Schulbildung

1980-1984 Grund- und Hauptschule Stuttgart-Heumaden  
1984-1993 Geschwister-Scholl-Gymnasium Stuttgart-Sillenbuch  
Abschluss mit Abitur im Juni 1993

## Zivildienst

1993-1994 Stadtjugendring Stuttgart e.V.

## Studium

1994-2000 Universität Stuttgart  
Studiengang: Technische Biologie  
Diplomarbeit über "Activation of caspases and transcriptional regulation of apoptosis-related Genes in p53-mediated apoptosis in DLD1 cells" am Institut für Zellbiologie und Immunologie (Arbeitsgruppe Wajant)  
Abschluss mit Diplom Biologie im Oktober 2000  
1997-1998 Austauschstudent an der University of Missouri-Kansas City, Kansas City, Missouri, USA  
Studienarbeit über "ER-associated degradation of Vph1p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*" (Arbeitsgruppe Cooper)

## Doktorarbeit

Seit Dez. 2000 Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried  
Abteilung für Molekulare Zellbiologie (Prof. Stefan Jentsch)



# Dual Role of BRUCE as an Antiapoptotic IAP and a Chimeric E2/E3 Ubiquitin Ligase

Till Bartke, Christian Pohl, George Pyrowolakis,<sup>1</sup> and Stefan Jentsch\*

Department of Molecular Cell Biology  
Max Planck Institute of Biochemistry  
Am Klopferspitz 18  
82152 Martinsried  
Germany

## Summary

Apoptotic cell death and survival is controlled by pro- and antiapoptotic proteins. Because these proteins act on each other, cell fate is dictated by the relative activity of pro- versus antiapoptotic proteins. Here we report that BRUCE, a conserved 528 kDa peripheral membrane protein of the trans-Golgi network, protects cells against apoptosis and functions as an inhibitor of apoptosis (IAP). By using wild-type and mutant forms we show that BRUCE inhibits caspase activity and apoptosis depending on its BIR domain. Upon apoptosis induction, BRUCE is antagonized by three mechanisms: first, through binding to Smac; second, by the protease HtrA2; and third, by caspase-mediated cleavage. In addition to its IAP activity BRUCE has the distinctive property of functioning as a chimeric E2/E3 ubiquitin ligase with Smac being a substrate. Our work suggests that, owing to its two activities and its localization, BRUCE may function as a specialized regulator of cell death pathways.

## Introduction

Apoptosis, or programmed cell death, is a physiological cellular process vital to the development, homeostasis, and survival of metazoan organisms. It is triggered by various extracellular and intracellular stimuli, and once initiated, members of a family of cysteine proteases known as caspases execute the coordinated process of cellular dismantling culminating in cell demise (Hengartner, 2000). Because active caspases process the dormant proforms of other caspases, thereby setting off a caspase cascade, and since proteolysis is irreversible, apoptosis must be kept under stringent control. Both pro- and antiapoptotic-acting factors have been discovered that either stimulate or repress the activation of caspases, respectively. Thus, the decision to initiate apoptosis depends on the delicate balance of these counteracting factors and their relative activities.

Key regulators of apoptosis are the inhibitor of apoptosis proteins (IAPs), which bind caspases and thereby inhibit their activities (Goyal, 2001; Shi, 2002; Verhagen et al., 2001). A hallmark of IAPs is the presence of one to three copies of a baculovirus IAP repeat (BIR) domain, which represents a zinc binding fold characterized by

conserved cysteines and a single histidine residue ordered in a CX<sub>2</sub>CX<sub>16</sub>HX<sub>6</sub>HC sequence. In some IAPs these domains constitute caspase binding sites. However, as shown for caspase-3 and -7, interaction can also involve a linker region between two BIR domains of an IAP. Importantly, BIR domains are also homing sites for proapoptotic proteins, such as the mitochondrial-derived proteins Smac/DIABLO and HtrA2/Omi, which counteract the antiapoptotic function of IAPs.

The mammalian proteins XIAP, cIAP1, cIAP2, and ML-IAP possess, in addition to their BIR domains, a C-terminal RING finger, which confers ubiquitin-ligase activity. In contrast to these canonical IAPs, proteins of the NAIP gene cluster do not possess RING fingers but contain nucleotide binding domains at their C termini (Verhagen et al., 2001). Recent findings indicated that IAPs belong to a larger group of so-called BIR-domain containing proteins, BIRPs (Verhagen et al., 2001). In addition to the IAPs mentioned above, the BIRP family includes the mammalian proteins survivin and BRUCE, *Drosophila* Deterin and dBruce, the *Caenorhabditis elegans* proteins BIR-1 and BIR-2, and the BIR-1 proteins from the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. Proteins of this BIRP branch are distinguished by their nonstandard BIR domains, which contain a few extra amino acid sequences at two conserved positions. Notably, although initially portrayed as an antiapoptotic molecule (Ambrosini et al., 1997), survivin but also the *C. elegans* and the yeast proteins of this BIRP group function mainly as regulators of cytokinesis (Li et al., 1998; Uren et al., 1999; Verhagen et al., 2001). In fact, mouse embryos deficient in survivin die early because of cytokinesis defects (Uren et al., 2000).

BRUCE is a giant 528 kDa, highly conserved BIRP, which bears a single BIR domain that is most strongly related to the BIR domain of survivin (Hauser et al., 1998). However, in contrast to survivin and different from the canonical IAPs, BRUCE carries additionally a C-terminal UBC domain (Jentsch, 1992) characteristic for ubiquitin-conjugating enzymes. Moreover, BRUCE is unique because it is peripherally bound to membranes of the trans-Golgi network (TGN) and other vesicular structures (Hauser et al., 1998). The BRUCE gene is broadly expressed in tissues, and its human counterpart (*Apollo*) is upregulated in certain tumors (Chen et al., 1999; Hauser et al., 1998). BRUCE has been linked to apoptosis recently since antisense oligonucleotides against BRUCE sensitize cells against apoptosis induced by DNA-damaging agents (Chen et al., 1999). Furthermore, ubiquitin/proteasome-dependent degradation of BRUCE or downregulation by RNA interference promotes apoptosis (Qiu et al., 2004). In *Drosophila*, dBruce can inhibit cell death induced by the proapoptotic Smac analogs Reaper and Grim, but not Hid (Vernooy et al., 2002). However, unlike canonical IAPs, which can counteract apoptosis by stimulating Smac degradation through their RING finger ubiquitin-ligase activity, dBruce does not seem to promote Reaper and Grim degradation directly (Vernooy et al., 2002). In fact,

\*Correspondence: jentsch@biochem.mpg.de

<sup>1</sup>Present address: Biozentrum, University of Basel, Department of Cell Biology, Klingelbergstrasse 70, CH-4056, Basel, Switzerland.

dBruce might serve more specialized functions as it mediates spermatid differentiation in flies, a process that depends on caspases (Arama et al., 2003).

In this study we unravel the mechanism by which BRUCE inhibits apoptosis in mammalian cells. We demonstrate that the BIR domain is essential for BRUCE's antiapoptotic function *in vivo* and that through this domain BRUCE binds and thereby inhibits caspases, in particular effector caspase-3. Upon apoptosis induction, BRUCE is not only degraded by proteasomes as reported recently (Qiu et al., 2004), but additionally its IAP activity is shut off by caspase and HtrA2-mediated cleavage and through Smac binding to BRUCE's BIR domain. Furthermore, BRUCE functions as an unusual chimeric E2/E3 ubiquitin ligase, i.e., an enzyme that combines in a single molecule ubiquitin-conjugating enzyme with ubiquitin ligase activity. Smac is monoubiquitylated by this E2/E3 activity, and we show that BRUCE's UBC domain contributes to the antiapoptotic function of BRUCE *in vivo*. Thus, BRUCE is a highly conserved, multifaceted antiapoptotic protein, which, due to its specific membrane localization, may be functionally restricted to the TGN, the sorting compartment of the cell.

## Results

### BRUCE Wild-Type and Mutant Forms

Murine *BRUCE* was originally identified by a homology-based strategy using DNA sequences for yeast ubiquitin-conjugating enzymes as a probe (Hauser et al., 1998). The corresponding cDNA was obtained by  $\lambda$ -phage cDNA walking that yielded 15 overlapping clones. We assembled the entire 14,535 bp open reading frame into a single full-length clone by making use of introduced rare restriction sites. Our cloning strategy permitted us to easily replace wild-type (WT) DNA sequences corresponding to the N-terminal BIR and the C-terminal UBC domain with mutant DNA cassettes (Figure 1A). To obtain a BRUCE mutant deficient in ubiquitin conjugation activity (*BRUCE<sup>ubc</sup>*) we replaced the conserved active-site cysteine residue of the UBC domain by a serine residue. To inactivate the single BIR domain of BRUCE (*BRUCE<sup>bir</sup>*) we replaced the C-terminal conserved cysteine residue of this domain by a serine residue. In survivin this alteration is known to inactivate this domain (Li et al., 1998). Subsequently, the respective mutant cassettes were introduced into the *BRUCE* clone, and N- and/or C-terminal epitope tags were added for antibody detection (*FLAG<sup>BRUCE</sup>*, *myc<sup>BRUCE</sup>*, *myc<sup>BRUCE<sup>FLAG</sup></sup>*).

### BRUCE Protects Cells against Apoptosis

Recently, it has been shown that downregulation of BRUCE by RNAi treatment promotes cell death and sensitizes cells against apoptotic stimuli (Qiu et al., 2004). To investigate whether this observation is directly linked to BRUCE function, we expressed in HeLa cells by transfection either BRUCE WT or mutant forms and induced apoptosis by TRAIL/cycloheximide (CHX) or by staurosporine treatment. For comparison, we also transfected FLAG-tagged XIAP or luciferase. In the control experiment (luciferase expression) these two treatments caused apoptosis in about 30% to 35% of cells (Figure 1B, left). When WT BRUCE (*FLAG<sup>BRUCE</sup>*) was expressed,

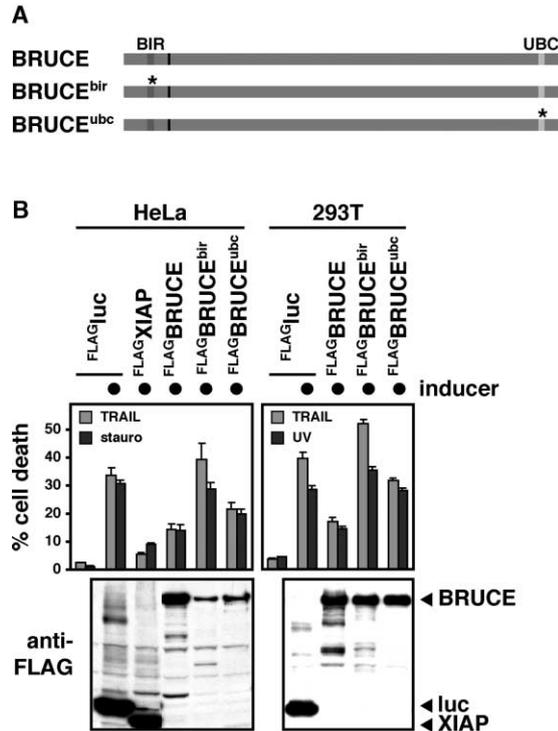


Figure 1. BRUCE Protects Cells against Apoptosis

(A) Scheme of BRUCE WT and mutant forms. The BIR and UBC domains are inactivated by single amino acid substitutions (marked by an asterisk) in the mutant variants *BRUCE<sup>bir</sup>* (C330S) and *BRUCE<sup>ubc</sup>* (C4654S), respectively. The black bar represents the position of the epitope for the anti-BRUCE monoclonal antibody.

(B) BRUCE overexpression protects cells from apoptosis. FLAG-tagged constructs of BRUCE and XIAP were transfected into either HeLa or 293T cells together with EGFP-F as indicated, and apoptosis was induced by treatment with TRAIL/CHX (TRAIL) for 5 hr (HeLa) or 10 hr (293T), staurosporine for 20 hr (stauro), or UV irradiation for 6 hr (UV). The percentage of apoptotic cells was assessed by propidium iodide staining and scoring for subdiploid DNA content of GFP-positive cells. Values are the mean and standard deviation of experiments done in triplicate. Luciferase-transfected cells (luc) were mock-treated with CHX (to control for TRAIL), DMSO (to control for staurosporine), or untreated (to control for UV). Expression levels of proteins were determined by anti-FLAG immunoblot of whole-cell lysates of transfected cells (bottom panel).

apoptosis was repressed by about 50%, indicating that BRUCE can protect HeLa cells against apoptosis. BRUCE was consistently less potent than XIAP in this assay but comparable to cIAP1 (Figure 1B and data not shown). Strikingly, this antiapoptotic activity was completely abolished (in fact, it slightly augmented apoptosis; see Discussion) when we expressed the mutant version *FLAG<sup>BRUCE<sup>bir</sup></sup>*, demonstrating that the BIR domain is essential for its antiapoptotic function (Figure 1B). Interestingly, the UBC domain is also important for the antiapoptotic effect. However, it appears not to be strictly required for this function since its inactivation did not completely inactivate the antiapoptotic activity. Since the expression levels differed greatly in HeLa cells, we confirmed these findings by using 293T cells, which expressed WT and mutant BRUCE constructs at identical levels. In these cells we induced apoptosis by either TRAIL/CHX or irradiation with UV light and found that

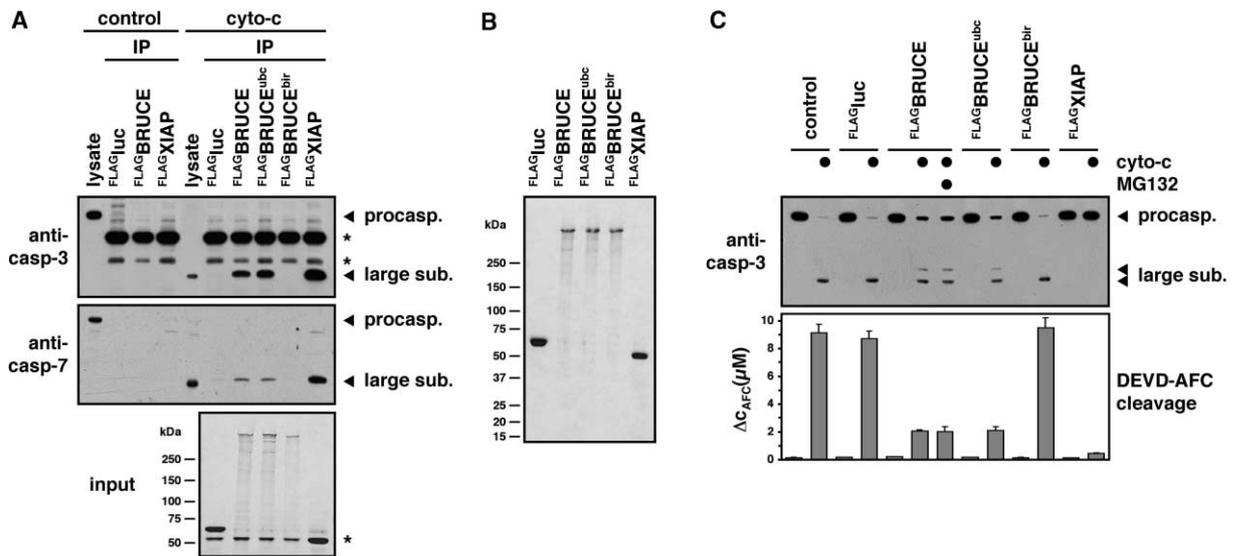


Figure 2. BRUCE Binds and Inhibits Caspases

(A) BRUCE binds caspases-3 and -7. Immunopurified WT or mutant forms of <sup>FLAG</sup>BRUCE were incubated with either untreated (control) 293T cytosolic extracts or extracts activated with cytochrome c/dATP (cyto-c). Binding to caspases-3 and -7 was assayed by FLAG-IP followed by caspase-specific immunoblotting. Twenty micrograms of extracts was run on the same gels to mark the positions of the proforms (procasp.) and processed forms (large sub.) of caspases. The panel below shows the Coomassie-stained immunoprecipitated proteins (1/10 of input) used for the binding assay. The asterisks denote bands derived from antibody light and heavy chains.

(B) Purification of recombinant <sup>FLAG</sup>BRUCE. FLAG-tagged luciferase, XIAP, and BRUCE variants were purified from transiently overexpressing 293T cells by anti-FLAG affinity purification. Two micrograms of each protein preparation was subjected to SDS-PAGE and stained with Coomassie.

(C) BRUCE is a caspase inhibitor. FLAG-purified proteins as shown in (B) and MG132 (50  $\mu$ M) were added (BRUCE, 2  $\mu$ M; XIAP, 0.2  $\mu$ M) to an in vitro apoptosis assay as indicated, and caspases were activated by addition of cytochrome c/dATP. Activation of caspase-3 was assayed by the appearance of the large subunit of the cleaved caspase and by measuring DEVD-AFC cleavage. Luciferase was added at the same amount of protein as BRUCE. Values are mean and standard deviation of experiments done in triplicate.

WT BRUCE again repressed apoptosis to about 50% of control cells (Figure 1B, right). <sup>FLAG</sup>BRUCE<sup>bir</sup> was again completely deficient, whereas the ubc mutant exhibited no or only a moderate antiapoptotic activity.

### BRUCE Binds Caspases

To understand the essential nature of the BIR domain for the antiapoptotic function of BRUCE, we sought to delineate its function in a cell-free system. Since the BIR domains of IAP proteins are known to bind caspases, we first examined caspase interaction. To this end, we prepared cell-free extracts of 293T cells depleted in mitochondria, induced the caspase cascade in vitro by adding cytochrome c, and incubated the samples with purified FLAG-tagged BRUCE, XIAP, or luciferase bound to beads. By immunoprecipitation against the FLAG tag followed by immunoblotting with caspase-specific antibodies, we observed weak but specific binding of BRUCE to activated initiator caspase-9 and to a special cleavage form of caspase-6 (see Supplemental Figure S1 at <http://www.molecule.org/cgi/content/full/14/6/801/DC1>). In comparison, robust interaction of BRUCE was observed with the active forms of effector caspase-3 and, somewhat weaker, caspase-7 (Figure 2A). Notably, no binding of BRUCE to the unprocessed proforms of the caspases was observed in nonapoptotic extracts, indicating that BRUCE selectively binds the activated, processed forms of the caspases. Because the point mutant of the BIR domain (BRUCE<sup>bir</sup>) was com-

pletely inactive in caspase binding (Figure 2A), we conclude that BRUCE interacts with caspases most likely via its single BIR domain.

### BRUCE Inhibits the Caspase Cascade

Next we asked whether binding of BRUCE inhibits caspase activity. To address this question in a quantifiable manner, we expressed epitope-tagged WT and mutant BRUCE in 293T cells, isolated the proteins via the affinity tag, and purified them to near homogeneity (Figure 2B). These proteins were then added to a caspase activation assay to determine whether they can inhibit the caspase cascade in vitro. In this assay, activation of the caspase cascade is indicated by the appearance of an active caspase-3 fragment, which is derived from its proform through cleavage by upstream caspases. In addition, we also measured caspase activity directly by assaying for the release of a fluorophore from a caspase peptide substrate (DEVD-AFC).

In control samples or reactions supplemented with purified luciferase, cytochrome c addition activated the caspase cascade and caused complete cleavage of procaspase-3 (Figure 2C, top). Concurrently, cleavage of DEVD-AFC occurred in the same samples (Figure 2C, bottom). When we added the WT BRUCE protein to the assay, processing of procaspase-3 was partially inhibited, and DEVD-AFC cleavage was strongly repressed to 25% of the value of cytochrome c-stimulated control extracts. Since BRUCE most specifically binds active

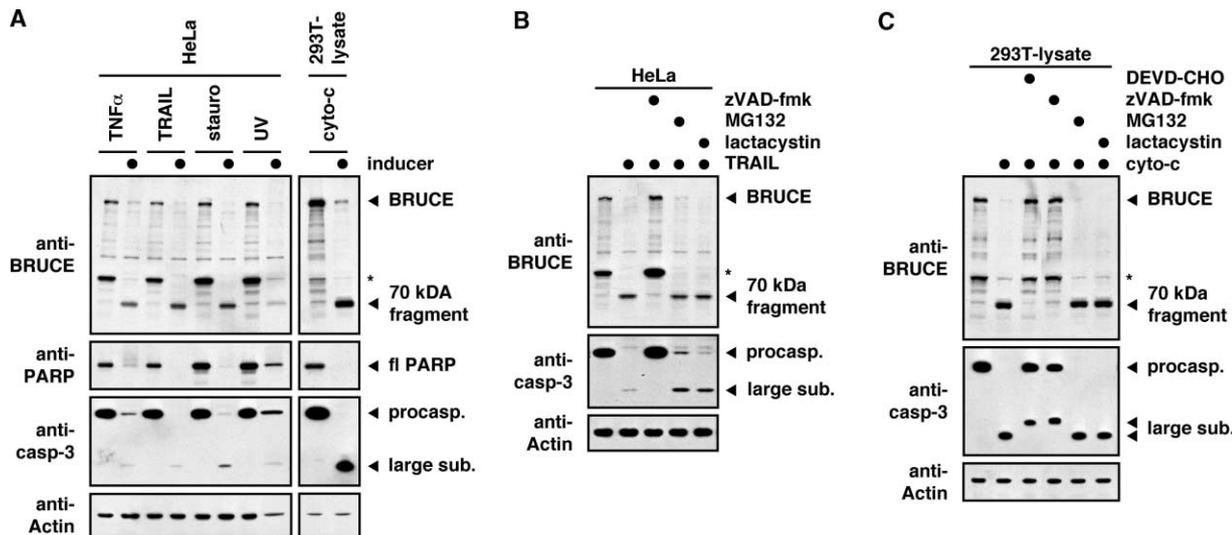


Figure 3. BRUCE Is a Caspase Substrate

(A) BRUCE is proteolytically processed during apoptosis *in vivo* and *in vitro*. HeLa cells were stimulated to undergo apoptosis by treatment with either TNF $\alpha$ /CHX for 8 hr, TRAIL/CHX for 4 hr, staurosporine for 4 hr, or UV irradiation for 12 hr, and whole-cell lysates were prepared. Controls were either left untreated (to control for UV) or mock-treated with CHX (to control for TNF $\alpha$  and TRAIL) or DMSO (to control for staurosporine). Alternatively, caspases were activated in 293T cytosolic extracts by addition of cytochrome *c*/dATP for 1 hr *in vitro*. Proteins were detected by immunoblotting using antibodies as indicated. The asterisk marks an unidentified band recognized by the BRUCE antibody. (B) BRUCE fragmentation can be blocked by caspase inhibition but not proteasome inhibition *in vivo*. HeLa cells were pretreated with CHX and either zVAD-fmk (20  $\mu$ M), MG132, or lactacystin (both 50  $\mu$ M) for 1 hr after which apoptosis was induced by addition of TRAIL for 4 hr. Analysis of cell lysates was carried out as in (A). (C) BRUCE fragmentation can be blocked by caspase inhibition but not proteasome inhibition *in vitro*. Cleavage of BRUCE was induced in 293T cytosolic extracts by addition of cytochrome *c*/dATP for 1 hr in the presence of 50  $\mu$ M of either Ac-DEVD-CHO, zVAD-fmk, MG132, or lactacystin. Lysates were analyzed as in (A).

effector caspases, these data suggest that BRUCE inhibits the caspase cascade at the execution level through binding and inhibiting activated caspases. Processing of procaspase-3 is probably inhibited because BRUCE most likely also interferes with the autocatalytic activation of the caspase. XIAP is significantly more potent than BRUCE in this assay, emphasizing the power of this broadly acting caspase inhibitor. When we added the proteasome inhibitor MG132 to the extract, BRUCE was still able to block caspase function, indicating that the observed effect is not mediated by a proteasome-dependent mechanism. Importantly, <sup>FLAG</sup>BRUCE<sup>bir</sup> was completely inactive, whereas <sup>FLAG</sup>BRUCE<sup>ubc</sup> inhibited caspases similar to the WT BRUCE protein. From these lines of evidence we conclude that BRUCE functions as an IAP through its ability to bind caspases and that this activity involves the BIR domain. Moreover, the data also indicate that neither the UBC domain of BRUCE nor proteasomes are required for this activity.

#### Caspases Inactivate the IAP Function of BRUCE

We observed that when we induced apoptosis in HeLa cells endogenous full-length BRUCE was almost completely eliminated, giving rise to a prominent 70 kDa fragment (Figure 3A). BRUCE fragmentation occurred independently of the apoptotic stimuli used and also took place in a 293T cell lysate upon cytochrome *c* addition (Figure 3A). Since caspases were activated under these conditions, we wondered whether they are responsible for BRUCE cleavage. In fact, addition of the pan caspase inhibitor zVAD-fmk completely blocked

BRUCE fragmentation (Figures 3B and 3C and Supplemental Figure S2A). Also, DEVD-CHO, an inhibitor with marked specificity toward caspase-3, prevented BRUCE cleavage in a cell-free system (Figure 3C). By studying caspase-mediated fragmentation of BRUCE *in vitro*, we found that BRUCE was a substrate of caspases-3, -6, -7, and -9, and more weakly caspase-8 (Supplemental Figure S2B). Because it was recently reported that BRUCE is inactivated by proteasomal degradation (Qiu et al., 2004), we additionally asked whether the proteasome is required for BRUCE fragmentation. However, addition of proteasome inhibitors (which blocked TNF-stimulated I $\kappa$ B degradation in parallel experiments; data not shown) did not prevent BRUCE fragmentation *in vivo* and *in vitro* (Figures 3B and 3C).

Whereas the bulk of the BRUCE protein was apparently degraded upon apoptosis induction, the 70 kDa caspase-generated fragment seemed stable and accumulated in cells (Figures 3A–3C). We mapped this (probably caspase-3 catalyzed) fragment and found that it corresponds to the N-terminal 648 amino acid region of BRUCE (Supplemental Figure S2). Because this N-terminal BRUCE fragment encompasses the complete BIR domain plus additional C-terminal sequences, we asked whether this fragment, similar to full-length BRUCE, possesses IAP activity. We expressed and purified (Figure 4A) a FLAG-tagged polypeptide representing the N-terminal 648 amino acids of BRUCE (<sup>FLAG</sup>BRUCE<sup>1–648</sup>) and added it to the caspase activation assay mentioned above. Surprisingly, despite the presence of a BIR domain, it was completely devoid of IAP activity, lacked

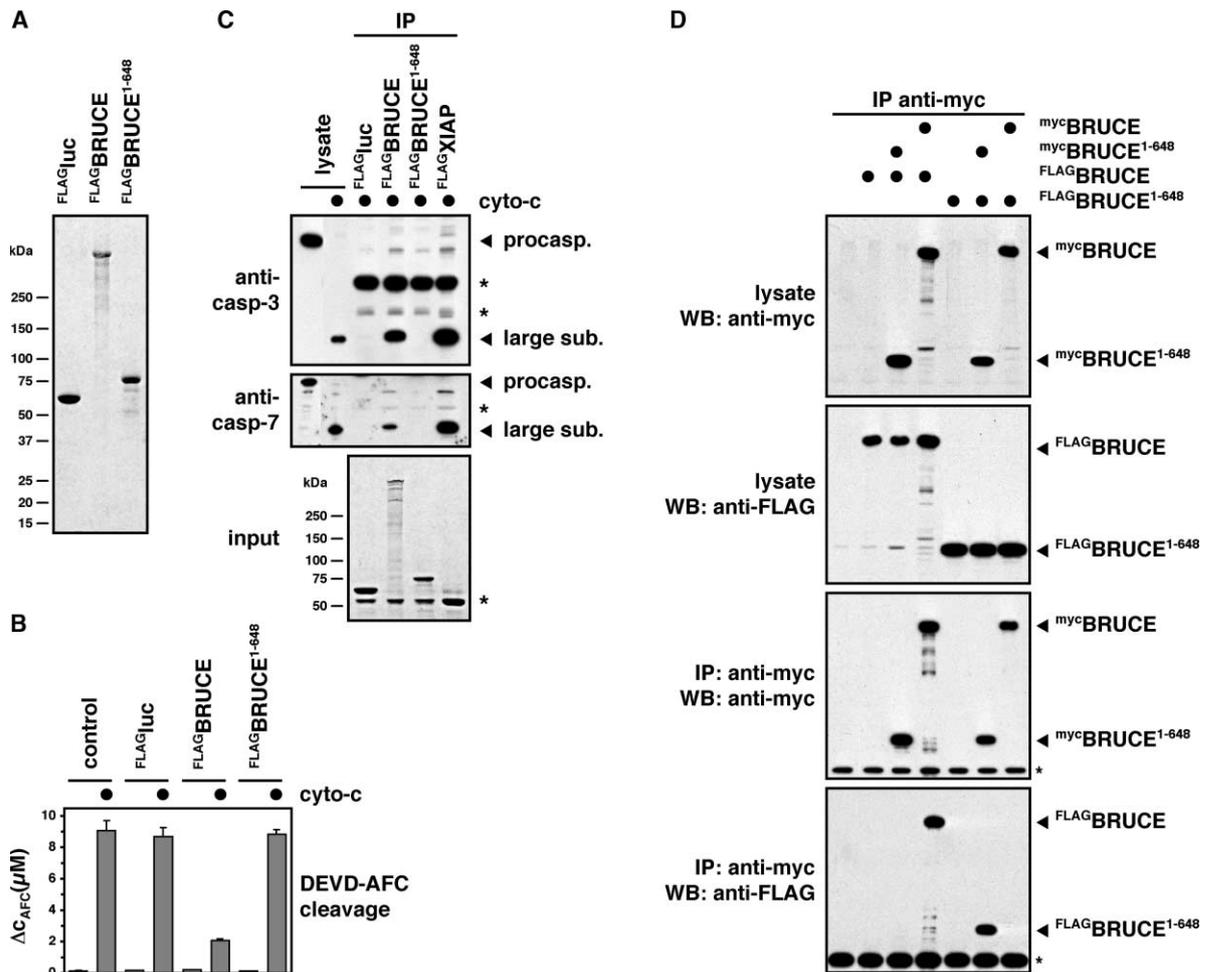


Figure 4. The BRUCE BIR Fragment Lacks IAP Activity

(A) Purification of recombinant FLAG-BRUCE<sup>1-648</sup>. FLAG-tagged luciferase, BRUCE, and BRUCE<sup>1-648</sup> were purified from transiently overexpressing 293T cells by anti-FLAG affinity purification. Two micrograms of each protein preparation stained with Coomassie is shown.

(B) BRUCE<sup>1-648</sup> does not inhibit caspases. FLAG-purified proteins as shown in (A) were added (BRUCE, 2  $\mu M$ ; BRUCE<sup>1-648</sup>, 7.5  $\mu M$ ) to an in vitro apoptosis assay as indicated, and caspases were activated by addition of cytochrome *c*/dATP. Activation of caspase-3 was determined by measuring DEVD-AFC hydrolysis. Values are mean and standard deviation of experiments done in triplicate.

(C) BRUCE<sup>1-648</sup> does not bind to active caspases-3 and -7. Immunopurified FLAG-BRUCE and FLAG-BRUCE<sup>1-648</sup> were incubated with cytochrome *c*/dATP-activated 293T cytosolic extracts. Binding to caspases-3 and -7 was assayed by FLAG-IP followed by immunoblotting. Twenty micrograms of lysates was run on the same gels to mark the position of proforms and cleavage products of caspases. The bottom gel shows the Coomassie-stained immunoprecipitated proteins (1/10 of input) used for the binding assay. The asterisks denote bands derived from antibody light and heavy chains.

(D) BRUCE and BRUCE<sup>1-648</sup> form distinct homodimers. Myc- or FLAG-tagged versions of BRUCE and BRUCE<sup>1-648</sup> were cotransfected into 293T cells as indicated, and proteins were immunoprecipitated using anti-myc agarose. Cell lysates and immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting against myc- or FLAG-epitopes. Asterisks mark bands derived from antibody heavy chains.

caspase-3 binding activity, and was virtually inactive as compared to BRUCE in vivo when overexpressed (Figures 4B and 4C and data not shown). Notably, full-length BRUCE can form homodimers, and caspase cleavage liberates the 70 kDa BIR-containing fragment, which forms a different homodimer by itself (Figure 4D). Thus, it seems possible that only homodimerized full-length BRUCE possesses IAP activity and that the conformation of the 70 kDa dimer renders it inactive. In any event, our data demonstrate that the IAP function of endogenous BRUCE is lost upon apoptosis induction through caspase-mediated cleavage. BRUCE and caspases thus counteract each other through reciprocal inactivation.

#### Smac and HtrA2 Inactivate the IAP Function of BRUCE

We detected several copurifying proteins in immunoprecipitates of BRUCE. To identify these proteins, we overexpressed doubly tagged BRUCE (myc-BRUCE<sup>FLAG</sup>) in 293T cells and purified the protein at a large scale from a cell extract by a sequential immunoaffinity protocol using antibodies directed against the N-terminal myc and the C-terminal FLAG tags (Figure 5A). By this and a related strategy, we identified by mass spectrometric analysis as BRUCE binding partners the mitochondrial-derived, proapoptotic IAP inhibitors Smac (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000) and HtrA2 (Suzuki et al., 2001), a serine protease (Supplemental Data and data not shown). Importantly, we found that endogenous BRUCE also binds

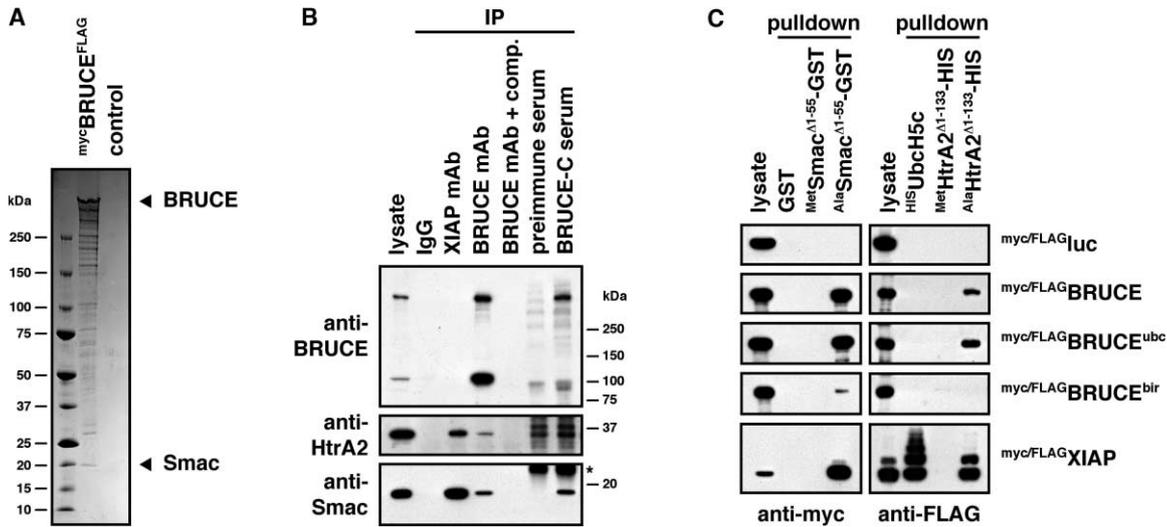


Figure 5. BRUCE Interacts with Smac and HtrA2

(A) Identification of Smac as a BRUCE-interacting protein.  $mycBRUCE^{FLAG}$  was sequentially purified from transiently transfected 293T cells using anti-FLAG (M2) and anti-myc (9E10) columns. The eluate was subjected to SDS-PAGE and stained with Coomassie. The 20 kDa band was identified as Smac after tryptic digestion and analysis of peptides by mass spectrometry.

(B) Endogenous BRUCE interacts with endogenous Smac and HtrA2. BRUCE and XIAP (as positive control) were immunoprecipitated (IP) from 293T cells using antibodies and an antiserum recognizing BRUCE's C terminus as indicated. Precipitated proteins were analyzed by immunoblotting using antibodies as indicated. To one sample (+comp.) a short His-tagged polypeptide containing the epitope of the anti-BRUCE mAb was added in excess to compete for binding of BRUCE to the antibody. The asterisk marks bands derived from antibody light chains.

(C) BRUCE binds to the N termini of mature Smac and HtrA2 via the BIR domain. Myc- or FLAG-tagged variants of BRUCE WT and mutant forms were pulled down from cytosolic lysates of transiently transfected 293T cells by either C-terminal GST-fusions of mature Smac using glutathione-Sepharose or by C-terminally His-tagged mature HtrA2 using Ni-NTA agarose. Binding was detected by immunoblotting against myc- or FLAG-tags as indicated. Equal pull-down of GST- or His-tagged proteins was verified by Coomassie-staining for each sample (not shown). Smac and HtrA2 proteins carried N-terminal WT alanine or mutant methionine residues as indicated. As negative controls GST or His-tagged Ubch5c were used. Ubch5c does not bind BRUCE but interacts strongly with XIAP.

Smac and HtrA2 efficiently (Figure 5B). Smac and HtrA2 are synthesized with N-terminal prosequences that are removed during import into mitochondria (Chai et al., 2000; Du et al., 2000; Shi, 2002; Suzuki et al., 2001). Upon apoptosis induction, the matured forms of both proteins are released from mitochondria into the cytosol along with cytochrome c and other proapoptotic factors (Du et al., 2000; Suzuki et al., 2001; Verhagen et al., 2000). Processing of Smac and HtrA2 exposes the N-terminal tetrapeptide sequences AVPI or AVPS, respectively, which are crucial for binding the BIR domains of IAP proteins. Specifically, the N-terminal alanine residues of these sequences are known to be essential for this activity (Chai et al., 2000; Shi, 2002; Suzuki et al., 2001). To investigate whether this element is also crucial for BRUCE binding, we expressed and purified synthetic truncations of Smac and HtrA2 (as C-terminally GST- or His-tagged variants) that give rise in vivo to the mature proteins that possess at their N termini either WT alanine or mutant methionine residues ( $^{Ala}Smac^{\Delta 1-55}$ -GST,  $^{Met}Smac^{\Delta 1-55}$ -GST,  $^{Ala}HtrA2^{\Delta 1-133}$ -HIS,  $^{Met}HtrA2^{\Delta 1-133}$ -HIS), as confirmed by Edman degradation (data not shown). In pull-down assays using the GST or His tags, respectively, we found that only the WT alanine but not the methionine versions of the Smac and HtrA2 proteins bound BRUCE (and XIAP) (Figure 5C and Supplemental Figure S3A). Moreover, we found that binding of Smac to BRUCE (and XIAP) could be blocked by competition with an AVPI- but not an MVPI-bearing Smac peptide and that neither the unprocessed form of Smac nor

Smac $\beta$ , a cytosolically located product of an alternative splice variant, had affinities for BRUCE (Supplemental Figures S3A and S3B). Binding of Smac and HtrA2 was mediated by the BIR domain of BRUCE as indicated by the inability of  $BRUCE^{bir}$  to bind these two proteins (Figure 5C and Supplemental Figure S3C). Thus, binding of Smac and HtrA2 to BRUCE follows the same principle as for XIAP interaction, as it involves the BIR domain and the N-terminal tetrapeptide sequences of the two proapoptotic proteins.

To investigate whether Smac and HtrA2 influence BRUCE function, we monitored the IAP activity of BRUCE in vitro in the presence of Smac and HtrA2. Indeed, mature WT Smac and HtrA2 (but not Smac $\beta$  and the methionine mutants) strongly repressed the ability of BRUCE to inhibit caspases in vitro (Figure 6A). The molecular basis for the inhibitory effect of Smac became clear when we monitored binding of BRUCE to caspase-3, -7, and -9 in a cell extract. We stimulated caspase activation in a 293T cell lysate by cytochrome c and added affinity-purified FLAG-tagged BRUCE and Smac to the lysate. In the absence of Smac, immunoprecipitation of BRUCE from this extract coisolated processed caspases (Figure 6B). However, when Smac ( $^{Ala}Smac^{\Delta 1-55}$  but not  $^{Met}Smac^{\Delta 1-55}$  or Smac $\beta$ ) was present, BRUCE completely lost its activity to bind active caspases. Thus, Smac inactivates the IAP function of BRUCE by its ability to block BRUCE-caspase binding. In contrast, HtrA2, a serine protease, seems to inactivate BRUCE proteolytically, as indicated by almost complete

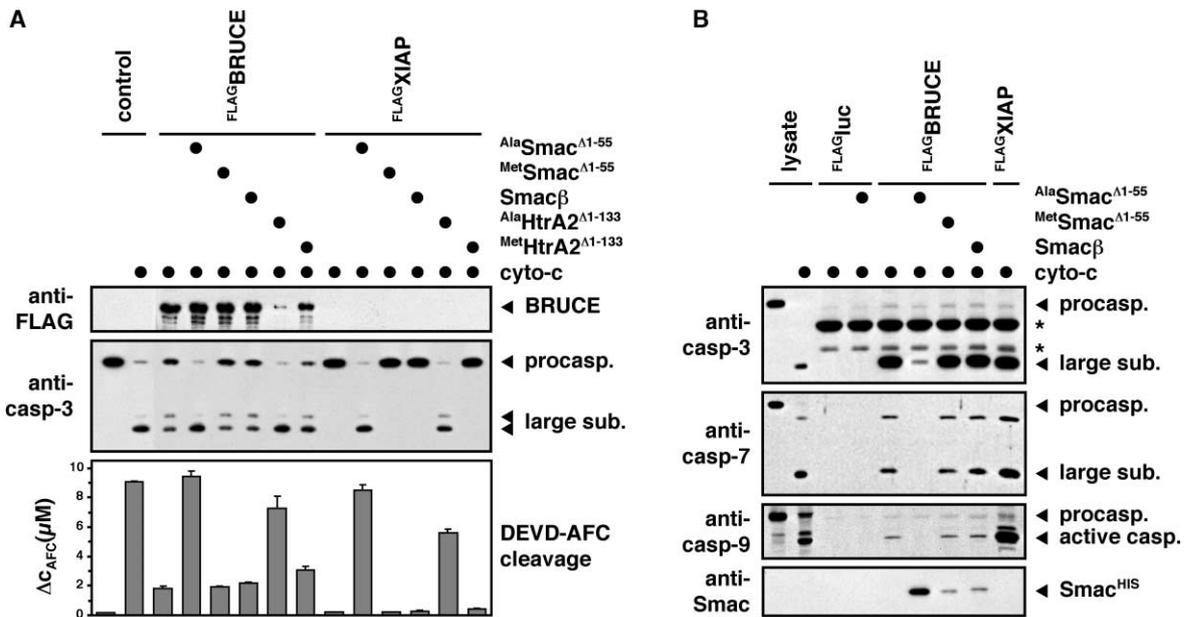


Figure 6. BRUCE Is Inhibited by Smac and HtrA2

(A) Inactivation of BRUCE by Smac and HtrA2 in vitro. Recombinant purified mature Smac (2.5 μM), Smac<sup>β</sup> (2.5 μM), or mature HtrA2 (4 μM) was added to an in vitro apoptosis assay with FLAG-purified BRUCE (2 μM) or XIAP (0.2 μM) as indicated, and caspases were activated by addition of cytochrome c/dATP. Activation of caspase-3 was determined as in Figure 2. Mature Smac and HtrA2 carried either WT alanine or mutant methionine N-terminal amino acid residues as indicated.

(B) Smac blocks binding of caspases to BRUCE. Immunopurified FLAG-BRUCE was incubated with cytochrome c/dATP-activated 293T cytosolic lysates in the presence of purified WT or mutant mature Smac or Smac<sup>β</sup>. Binding to caspases-3, -7, and -9 or Smac was assayed by IP followed by immunoblotting. Twenty micrograms of extracts was run on the same gels to mark the position of proforms and cleavage products of caspases. The asterisks denote bands derived from antibody light chains.

loss of the BRUCE protein in the presence of mature HtrA2 (Figure 6A, top).

### BRUCE Is a Chimeric E2/E3 Ubiquitin Ligase

The aforementioned experiments showed that the BIR domain is strictly required for both the IAP activity of BRUCE and its antiapoptotic activity in vivo. This correlation strongly suggests that the ability of BRUCE to inhibit apoptosis is linked to its IAP activity. Yet our in vivo data additionally indicated that the UBC domain of BRUCE contributes to the antiapoptotic function of BRUCE (Figure 1B). As we found significant levels of Smac bound to BRUCE (Figure 5A), we wondered whether Smac might be a substrate of the ubiquitin-conjugation activity of BRUCE. To test this idea, we incubated affinity-purified BRUCE with ubiquitin-activating enzyme E1, radio-labeled ubiquitin, and Smac (Ala<sup>Smac</sup><sup>Δ1-55</sup>). Indeed, we observed that Smac was ubiquitylated in vitro by BRUCE (Figure 7). Notably, the BRUCE mutant lacking the active-site cysteine residue of the UBC domain (FLAG-BRUCE<sup>ubc</sup>) was totally devoid of this activity, and also the BIR mutant protein (FLAG-BRUCE<sup>bir</sup>) was almost inactive. Strikingly, whereas ubiquitylation of Smac by XIAP requires in addition to E1 an E2 ubiquitin-conjugating enzyme (Hu and Yang, 2003; MacFarlane et al., 2002), BRUCE did not show any requirement for any additional enzyme besides E1 for ubiquitylation of Smac. We therefore conclude that BRUCE is a highly unusual enzyme of the ubiquitin conjugation system as it combines in a single polypeptide ubiquitin-conjugating

(E2) with ubiquitin ligase (E3) activity, forming a chimeric E2/E3 ubiquitin ligase. In this enzyme the N-terminal BIR domain mediates substrate (Smac) binding (analogous

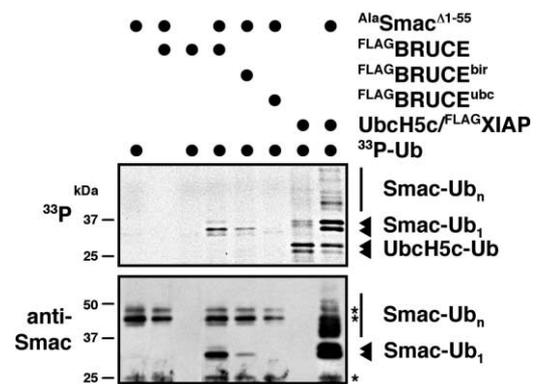


Figure 7. BRUCE Is a Chimeric E2/E3 Ubiquitin Ligase

Monoubiquitylation of Smac by BRUCE in vitro. Recombinant mature Smac was incubated with immunopurified WT and mutant forms of FLAG-BRUCE in a reaction containing ATP, E1, and <sup>33</sup>P-labeled ubiquitin. Ubiquitylated Smac (Smac-Ub<sub>n</sub>) was detected after SDS-PAGE by either autoradiography or immunoblot using anti-Smac antibodies. Equal amounts of BRUCE WT and mutants were used. As control Smac was incubated with immunopurified FLAG-XIAP and recombinant UbcH5c, which yielded multiubiquitylated Smac (Smac-Ub<sub>n</sub>). The asterisks mark contaminating bands derived from the Smac preparation, which are recognized by the anti-Smac antibody.

to E3 enzymes), whereas the UBC domain at the C-terminal end of the BRUCE protein provides the catalytic ubiquitin-conjugation activity.

In striking contrast to XIAP, which in conjunction with an E2 (UbcH5c) can multiubiquitylate Smac, BRUCE catalyzed exclusively the attachment of only a single ubiquitin moiety. Addition of XIAP (without UbcH5c) to the BRUCE-dependent ubiquitylation reaction did not stimulate Smac multiubiquitylation (data not shown), suggesting that BRUCE and XIAP-dependent ubiquitylation reactions may be independent and possibly functionally distinct. Notably, multi- but not monoubiquitylation of substrates promotes proteasomal degradation, and thus BRUCE's special ubiquitylation activity may play a nonproteolytic role. Although the consequence of this activity at the TGN is currently not clear, our data indicate that it contributes to the antiapoptotic potency of BRUCE.

## Discussion

### BRUCE Is an Inhibitor of Apoptosis Protein

BIR domain-containing proteins have received much attention recently (Goyal, 2001; Verhagen et al., 2001). One branch of this protein family, the canonical IAPs, have emerged as crucial regulators of apoptosis. A prominent member of this family is XIAP, which apparently exhibits the strongest antiapoptotic potential of all known IAPs due to its ubiquitous cellular distribution and high affinity to initiator and effector caspases. In contrast, the proteins cIAP1 and cIAP2 may be more specialized and have been linked to TNF-induced apoptosis. Both proteins associate with TNF receptors through direct interaction with TNF-receptor associated factors (TRAFs), and cIAP1 uses its RING finger ubiquitin ligase activity to promote TRAF degradation (Li et al., 2002; Rothe et al., 1995). NAIP does not possess a RING finger, and its antiapoptotic function seems to be restricted to neuronal cells (Verhagen et al., 2001). The second branch of BIRPs, with survivin being its foremost member, seems to play only a minor role in preventing apoptosis. Instead, survivin and its yeast relatives regulate cytokinesis and directly associate with chromosomes and spindles (Li et al., 1998; Uren et al., 1999; Verhagen et al., 2001).

BRUCE is peculiar because of its enormous size, its localization to TGN membranes, and its UBC domain. In addition, since BRUCE does not harbor a canonical but a survivin-like BIR domain, the function of BRUCE has remained enigmatic. Recent findings in *Drosophila* (Vernooy et al., 2002) and in mammalian cells (Chen et al., 1999; Qiu et al., 2004), however, clearly showed that BRUCE is a cell-death suppressor. Yet the apoptotic pathway it regulates and the molecular mechanisms by which it exerts these effects remained elusive. Studies in *Drosophila* using C-terminal dBruce deletion mutants suggested that the ubiquitin-conjugating activity of dBruce may be required for its antiapoptotic activity (Vernooy et al., 2002). Because dBruce was unable to block the *Drosophila* caspase Dronc, it has been suggested that dBruce might not act to inhibit caspases (Vernooy et al., 2002). However, we showed here that mammalian BRUCE is able to inhibit caspases in an

IAP-like manner and that when overexpressed BRUCE inhibits apoptosis. Both the IAP activity and the antiapoptotic activity of BRUCE require the integrity of the BIR domain. In fact, overexpression of BRUCE lacking a functional BIR domain slightly augmented induced apoptosis (Figure 1B), which may be linked to a dominant-negative effect of the mutant protein as BRUCE can form homodimers (Figure 4D). In contrast, the ubiquitin-conjugating activity is not involved in the caspase inactivation function in vitro, but it is important (though not essential) for the antiapoptotic function in vivo. Compared to XIAP, the strongest IAP identified so far, BRUCE's caspase-inhibitory activity is about 10-fold lower. BRUCE also seems to act primarily on effector caspases (caspase-3 and -7), suggesting that it may modulate rather than block the apoptotic program.

Although BRUCE does not seem to be the general and foremost inhibitor of apoptosis, the apoptotic machinery evidently takes special care to eliminate BRUCE when apoptosis is desirable. A recent report has shown that upon apoptosis induction BRUCE is ubiquitylated involving the ubiquitin-ligase Nrdp1 and degraded by proteasomes (Qiu et al., 2004). However, since proteasomes are functionally compromised during apoptosis (Sun et al., 2004), proteasomal degradation may not be the standard way to eliminate BRUCE function if the cell initiates apoptosis. Indeed, in this study we showed that BRUCE is inactivated by three additional independent mechanisms. Like other IAPs, BRUCE was found to be a caspase substrate. Caspase-mediated cleavage results in a BRUCE fragment that encompasses the complete BIR domain. Surprisingly, however, this BRUCE fragment was entirely devoid of IAP activity, suggesting that other properties of BRUCE, e.g., BRUCE homodimerization, are required in addition to the BIR domain for proper IAP function. This observation might also explain why overexpression of an N-terminal fragment of *Drosophila* dBruce fails to inhibit cell death (Vernooy et al., 2002). In addition to inhibition through caspase cleavage, BRUCE is counteracted by interaction with the two mammalian, mitochondrial-derived IAP antagonists, Smac and HtrA2. Smac binding obviously eliminates the caspase-inhibitory function of BRUCE by dislodging bound caspases from the BIR domain or by preventing them to bind. In contrast, HtrA2 appears to inhibit BRUCE by proteolytic cleavage owing to its serine protease activity. Thus, despite the presence of a survivin-like BIR domain, BRUCE behaves similar to IAPs in many aspects examined and can therefore be placed to the typical branch of the IAP family.

### BRUCE Is a Chimeric E2/E3 Ubiquitin Ligase

Structurally, in particular because of its extraordinary size, BRUCE is an atypical member of the large family of UBC enzymes (Jentsch, 1992). Such proteins are usually molecules of the range of 14–40 kDa and are thought to function as mediators between the E1 ubiquitin-activating enzyme and an E3 ubiquitin-ligase that recognizes the substrate. Specifically, ubiquitin-conjugating enzymes have been suggested to function as “ubiquitin carrier proteins,” which get charged with ubiquitin by E1 and carry ubiquitin to the E3 enzyme and its bound substrate. Similar to E1 enzymes, E2 enzymes possess

an "active site" cysteine residue, which forms a thioester-linked complex with the C-terminal glycine residue of ubiquitin. Only a subset of E3s, the hect-domain enzymes, can also form thioester-linked complexes with ubiquitin, and these enzymes receive ubiquitin from the E2 (Scheffner et al., 1995). In this study we showed that BRUCE possesses the unusual activity of ubiquitylating a substrate just with the help of E1, without any further requirements for additional E2 or E3 enzymes. Moreover, BRUCE's activity to ubiquitylate Smac depends on the catalytically active UBC domain and the correctly folded BIR domain, which binds the substrate Smac. With these two domains at hand BRUCE combines in a single polypeptide key properties of E2 and E3 enzymes, namely the ability to receive ubiquitin directly from E1, resulting in a BRUCE-ubiquitin thioester complex (Hauser et al., 1998), and to bind a substrate directly. We suggest the term E2/E3 ligase for chimeric enzymes of this type.

Intriguingly, BRUCE catalyzed apparently monoubiquitylation of Smac, as opposed to XIAP, which (in conjunction with an E2) is able to multiubiquitylate the protein (MacFarlane et al., 2002). Since we did not observe any alterations in steady-state Smac levels, neither upon *BRUCE* overexpression, nor *BRUCE* depletion by RNAi in 293T cells, nor in *BRUCE* knockout embryonic fibroblasts (data not shown and our unpublished data), BRUCE may not promote Smac degradation, and its monoubiquitylation activity might be regulatory. Alternatively, given XIAP's potency in Smac degradation (MacFarlane et al., 2002), a possible contribution of a BRUCE-dependent degradation pathway might be low. However, since the UBC domain contributes to the anti-apoptotic potential of BRUCE it is likely that BRUCE regulates cell survival at a yet unidentified point. A possible scenario is that BRUCE may constitutively ubiquitylate and thereby prevent accumulation of proapoptotic factors (e.g., caspases, Smac, HtrA2), which might be produced at low levels (e.g., by leaking out of mitochondria) in nonapoptotic cells.

**BRUCE Is Part of an Apoptosis Regulatory Network**  
Recent studies have revealed a surprisingly complex interplay between pro- and antiapoptotic factors. Two basic principles of regulation have emerged: a reversible mechanism, which is mediated by affinity-driven binding of factors that either stimulate or antagonize their binding partners, and an irreversible mechanism, which involves proteolysis. Evidently, the latter mechanism promotes unidirectionality and may be decisive to drive the apoptotic pathway beyond a point of no return. Examples for irreversible measures that lead to apoptosis are the proteolytic activation of the caspase cascade and the elimination of BRUCE and canonical IAPs by caspase and HtrA2-induced cleavage or proteasomal degradation. Proteolysis is also employed to inactivate proapoptotic molecules like Smac and caspases (MacFarlane et al., 2002; Wilson et al., 2002). The reversible mechanism, e.g., the inhibition of caspases by BRUCE or canonical IAPs, and the counteracting inhibition of these molecules by Smac, may be typical for cells that should survive or that are not fully committed to die.

Because of its localization at the TGN, BRUCE may not act as a general caspase inhibitor but as a special-

ized TGN safeguard that blocks local caspase activity at membranes. An intriguing possibility is that BRUCE inactivation may ease downstream apoptotic events like the ordered disassembly of the Golgi apparatus and packaging into apoptotic bodies. Finally, it can be anticipated that further studies may reveal additional BRUCE functions, which may be linked to vesicle sorting, the central function of the TGN.

#### Experimental Procedures

##### Plasmids

The full-length murine *BRUCE* cDNA was assembled from 15 overlapping clones (Hauser et al., 1998) using standard cloning techniques. Single amino acid substitutions were introduced to generate *BRUCE*<sup>Emr</sup> and *BRUCE*<sup>Abc</sup> mutants, and N- or C-terminal FLAG- or myc epitope tags were added by PCR or linker tailing. *BRUCE* cDNAs were expressed from pCI (Promega) as were FLAG-tagged cDNAs of luciferase, human XIAP, and *BRUCE*<sup>1-648</sup>. myc-Luciferase was expressed from pCMV-Tag3-control (Stratagene) and myc-XIAP from pcDNA3 (Invitrogen).

##### Cell Culture and Transfections

HeLa and 293T cells were maintained at 37°C at 7.5% CO<sub>2</sub> in DMEM (GIBCO-BRL) supplemented with 10% FCS. Transient transfections (TF) were performed in 10 cm dishes (293T) or 6-well plates (HeLa) using calcium phosphate protocols. In general 4 × 10<sup>6</sup> 293T cells per dish or 3 × 10<sup>5</sup> HeLa cells per well were seeded and transfected the next day using 12 μg or 20 μg total DNA, respectively. 293T cells were incubated with HEPES-buffered TF mix in growth medium supplemented with 40 μM chloroquine for 5 hr. HeLa cells were incubated with BES-buffered TF mix in medium containing 10% horse serum and 2.5 μg/ml 25-hydroxy cholesterol for 4 hr at 5% CO<sub>2</sub>. After incubation the TF medium was replaced with fresh growth medium, and cells were cultured for another 36–40 hr (293T) or 18–20 hr (HeLa).

##### Induction and Quantification of Apoptosis

For induction of apoptosis, cells were either left untransfected or were cotransfected with FLAG-tagged expression constructs and pEGFP-F (BD Clontech) at a DNA mass ratio of 5:1. 293T cells were split into 6-well plates 1 day after TF and induced to undergo apoptosis the following day. HeLa cells were stimulated 1 day after TF. Induction of apoptosis was achieved by incubating cells with 100 ng/ml TNF $\alpha$  (R&D Systems) or 100 ng/ml soluble TRAIL (Biomol) in the presence of 2.5 μg/ml cycloheximide, by treatment with 2 μM staurosporine (Biomol) or by UV irradiation at 100 mJ/cm<sup>2</sup> (HeLa) or 300 mJ/cm<sup>2</sup> (293T). The DNA content of GFP-positive cells was determined by FACS analysis of PI-stained ethanol-fixed cells using a FACSCalibur system and CELLQuest software (Becton Dickinson), and the extent of apoptotic cell death was quantified by the percentage of cells showing subdiploid DNA content.

##### Coimmunoprecipitations and Immunoblot Analysis

293T cells were grown to about 80% confluency, washed with PBS, harvested by scraping and lysed on ice for 30 min in lysis buffer (50 mM HEPES [pH 7.2], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% NP-40) containing 1 mM PMSF and Complete Protease Inhibitors (Roche). Cellular debris was removed by centrifugation at 10,000 × g for 10 min, and the supernatant (~10 mg total protein) was incubated with 5 μg of monoclonal antibodies or 5 μl serum for 3 hr at 4°C. Antibodies were precipitated using protein G agarose (Roche) or protein A Sepharose (Amersham), respectively, for another 2 hr. After washing five times in lysis buffer proteins were eluted from the beads by boiling in sample buffer, separated by SDS-PAGE, and transferred to PVDF membranes (ImmobilonP, Millipore). Membranes were probed with antibodies as indicated. Bound antibodies were detected using an enhanced chemiluminescence kit (Amersham). Antibodies used in this study were monoclonal mouse anti-FLAG M2 (Sigma), anti-myc 9E10 (Santa Cruz), IgG1 control mAb, anti-caspase-6 (both BD Pharmingen), anti-caspase-3, anti-BRUCE, anti-PARP, and anti-XIAP (all BD Transduction Laboratories), polyclonal goat anti-actin

(Santa Cruz), polyclonal rabbit anti-caspase-7 (Cell Signaling), anti-caspase-9 (Biomol), and anti-HtrA2 (Alexis). Antisera recognizing the BRUCE C terminus were described (Hauser et al., 1998). Smac-specific antisera were prepared by immunizing rabbits with purified His-tagged mature Smac.

#### Expression and Purification of Proteins

FLAG-tagged proteins were purified from transiently transfected 293T cells by anti-FLAG affinity chromatography. In brief, cells were harvested by trypsinase, washed twice in PBS, and lysed at  $\sim 40 \times 10^6$  cells/ml in digitonin lysis buffer (buffer A [20 mM HEPES (pH 7.5), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA] containing 250 mM sucrose, 0.05% digitonin, 1 mM PMSF and Complete Protease Inhibitors) for 10 min on ice. Cytosolic extracts were clarified by centrifugation at  $20,000 \times g$  for 5 min, and NaCl was added at 150 mM final concentration. For binding or ubiquitylation assays, FLAG-tagged proteins were batch-purified directly from cytosolic extracts by adding anti-FLAG M2 agarose, incubating for 2 hr at 4°C, and washing the beads extensively with PBS/1% Triton-X-100 followed by PBS/0.1% Triton-X-100 and PBS. For in vitro apoptosis assays, lysates were passed over anti-FLAG M2 agarose columns after clearing by centrifugation at  $100,000 \times g$  for 1 hr. Columns were washed with TBS, and proteins were eluted in TBS containing 0.1 mg/ml FLAG peptide, dialyzed against TBS, and frozen in TBS/10% glycerol. All GST- and His-tagged proteins were amplified from 293T mRNA by RT-PCR and expressed from pET vectors (Novagen) in *E. coli* BL21(DE3)/RIL (Stratagene). Expression and purification of mature forms of C-terminally His-tagged Smac and HtrA2 bearing N-terminal alanine or methionine residues and of Smac $\beta$  was done essentially as described (Chai et al., 2000; Savopoulos et al., 2000; Suzuki et al., 2001). HtrA2 was further purified by anion-exchange (Resource-Q, Amersham) and gel-filtration chromatography (Superdex-75, Amersham). N-terminally GST-tagged pro-Smac and C-terminally GST-tagged mature Smac and Smac $\beta$  were purified using glutathione-Sepharose (Amersham) chromatography. His-tagged Ubch5c was purified via Ni-NTA agarose, and E1 was purified by ubiquitin-Sepharose (Ciechanover et al., 1982).

#### Caspase Activation and Activity Assays

293T cell extracts were prepared essentially as described (Deveraux et al., 1998). In vitro caspase activation assays were performed in buffer A supplemented with 1 mM DTT containing 100  $\mu$ g of 293T cytosolic extract and purified proteins as indicated in a final volume of 20  $\mu$ l. Caspase activation was initiated by addition of 10  $\mu$ M horse heart cytochrome c (Sigma) and 1 mM dATP at 30°C for 1 hr. Caspase activity was measured directly by release of 7-amino-4-trifluoromethyl coumarin (AFC) from Ac-DEVD-AFC (Biomol) at 37°C in assay buffer (20 mM PIPES/HCl [pH 7.2], 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% CHAPS, 10% sucrose, 10 mM DTT, 100  $\mu$ M DEVD-AFC) using a continuous fluorescence reader (Fluoroskan Ascend FL/Thermo Labsystems) and is expressed as the increase in concentration of free AFC after 30 min. For caspase interaction and BRUCE fragmentation assays, caspases were activated in lysates by adding cytochrome c/dATP directly and incubating at 30°C for 1 hr. Lysates were supplemented with Ac-DEVD-CHO (Biomol), zVAD-fmk (Bachem), MG132, or lactacystin (Sigma) where indicated.

#### Protein Binding Assays

For caspase interaction assays, FLAG-tagged proteins were immunopurified from transiently transfected 293T cells using anti-FLAG M2 agarose and equilibrated on beads in buffer A containing 125 mM NaCl. Protein-loaded beads ( $\sim 10 \mu$ l bed volume) were resuspended in 100  $\mu$ l of control or cytochrome c/dATP-activated 293T cytosolic extracts supplemented with 62.5 mM NaCl and 50  $\mu$ M zVAD-fmk prior to pull down and incubated at 4°C for 2 hr. Beads were washed five times in buffer A containing 125 mM NaCl and 0.1% Triton-X-100 and boiled in SDS-sample buffer. For GST- and Ni-NTA pull-downs, 293T cells were transiently transfected with myc- or FLAG-tagged expression constructs and harvested by trypsinase. Cells were washed twice in PBS and lysed for 10 min on ice in digitonin lysis buffer. Cytosolic extracts were clarified by centrifugation at  $20,000 \times g$  for 5 min, and NaCl and Triton-X-100 were added at 125 mM and 1% final concentrations, respectively.

Extracts were incubated with 0.5  $\mu$ M Smac<sup>Δ1-55</sup>-GST or 1  $\mu$ M HtrA2<sup>Δ1-133</sup>-His at 4°C for 2 hr after which GST- or His tagged proteins were captured by glutathione-Sepharose or magnetic Ni-NTA agarose (Qiagen) for another 2 hr, respectively. Beads were washed five times in buffer A containing 125 mM NaCl, 250 mM sucrose, and 1% Triton-X-100 and boiled in SDS-sample buffer. EDTA was omitted from Ni-NTA lysis and wash buffers. Ni-NTA pull-down samples were supplemented with 20 mM imidazole upon addition of beads. Ni-NTA-wash buffers contained 20 mM or 40 mM (final two washes) imidazole to reduce background binding.

#### In Vitro Ubiquitylation Assay

In vitro ubiquitylation reactions were performed by incubating 10  $\mu$ M <sup>33</sup>P-ubiquitin, 100 nM recombinant E1, 20  $\mu$ M mature recombinant Smac, and  $\sim 0.7 \mu$ M immunopurified WT or mutant <sup>FLAG</sup>BRUCE on beads in a final volume of 25  $\mu$ l of ubiquitylation buffer (10 mM HEPES [pH 7.4], 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, and 0.1 mM DTT) at 30°C for 1 hr. Alternatively, 2  $\mu$ M recombinant Ubch5c and  $\sim 1.7 \mu$ M immunopurified <sup>FLAG</sup>XIAP on beads were used instead of BRUCE. Reactions were terminated by adding 5 $\times$  SDS-sample buffer, resolved by SDS-PAGE, and analyzed by autoradiography or immunoblotting. <sup>33</sup>P-labeled ubiquitin was prepared as described (Hauser et al., 1998).

#### Acknowledgments

We thank Veronika Jesenberger for early contributions to this work, Jochen Rech for mass spectrometric analysis, Karl-Heinz Mann for Edman degradation, Luis Moroder for peptides, Claudius Vincenz, Peter Krammer, and Harald Wajant for reagents, and Kristina Lotz for discussions. S.J. was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft and Fonds der Chemischen Industrie.

Received: April 19, 2004

Revised: May 14, 2004

Accepted: May 19, 2004

Published: June 17, 2004

#### References

- Ambrosini, G., Adida, C., and Altieri, D.C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* **3**, 917–921.
- Arama, E., Agapite, J., and Steller, H. (2003). Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Dev. Cell* **4**, 687–697.
- Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* **406**, 855–862.
- Chen, Z., Naito, M., Hori, S., Mashima, T., Yamori, T., and Tsuruo, T. (1999). A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264**, 847–854.
- Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H., and Hershko, A. (1982). "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme. *J. Biol. Chem.* **257**, 2537–2542.
- Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* **17**, 2215–2223.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33–42.
- Goyal, L. (2001). Cell death inhibition: keeping caspases in check. *Cell* **104**, 805–808.
- Hauser, H.P., Bardroff, M., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (1998). A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J. Cell Biol.* **141**, 1415–1422.
- Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770–776.
- Hu, S., and Yang, X. (2003). Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2

- are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *J. Biol. Chem.* **278**, 10055–10060.
- Jentsch, S. (1992). The ubiquitin-conjugation system. *Annu. Rev. Genet.* **26**, 179–207.
- Li, F., Ambrosini, G., Chu, E.Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P.C., and Altieri, D.C. (1998). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* **396**, 580–584.
- Li, X., Yang, Y., and Ashwell, J.D. (2002). TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* **416**, 345–347.
- MacFarlane, M., Merrison, W., Bratton, S.B., and Cohen, G.M. (2002). Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J. Biol. Chem.* **277**, 36611–36616.
- Qiu, X.B., Markant, S.L., Yuan, J., and Goldberg, A.L. (2004). Nrdp1-mediated degradation of the gigantic IAP, BRUCE, is a novel pathway for triggering apoptosis. *EMBO J.* **23**, 800–810.
- Rothe, M., Pan, M.G., Henzel, W.J., Ayres, T.M., and Goeddel, D.V. (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* **83**, 1243–1252.
- Savopoulos, J.W., Carter, P.S., Turconi, S., Pettman, G.R., Karran, E.H., Gray, C.W., Ward, R.V., Jenkins, O., and Creasy, C.L. (2000). Expression, purification, and functional analysis of the human serine protease HtrA2. *Protein Expr. Purif.* **19**, 227–234.
- Scheffner, M., Nuber, U., and Huibregtse, J.M. (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme thioester cascade. *Nature* **373**, 81–83.
- Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell* **9**, 459–470.
- Sun, X.M., Butterworth, M., MacFarlane, M., Dubiel, W., Ciechanover, A., and Cohen, G.M. (2004). Caspase activation inhibits proteasome function during apoptosis. *Mol. Cell* **14**, 81–93.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell* **8**, 613–621.
- Uren, A.G., Beilharz, T., O'Connell, M.J., Bugg, S.J., van Driel, R., Vaux, D.L., and Lithgow, T. (1999). Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10170–10175.
- Uren, A.G., Wong, L., Pakusch, M., Fowler, K.J., Burrows, F.J., Vaux, D.L., and Choo, K.H. (2000). Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr. Biol.* **10**, 1319–1328.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., and Vaux, D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43–53.
- Verhagen, A.M., Coulson, E.J., and Vaux, D.L. (2001). Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol* **2**, REVIEWS3009, <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=11516343>.
- Vernooy, S.Y., Chow, V., Su, J., Verbrugghe, K., Yang, J., Cole, S., Olson, M.R., and Hay, B.A. (2002). *Drosophila* Bruce can potently suppress Rpr- and Grim-dependent but not Hid-dependent cell death. *Curr. Biol.* **12**, 1164–1168.
- Wilson, R., Goyal, L., Ditzel, M., Zachariou, A., Baker, D.A., Agapite, J., Steller, H., and Meier, P. (2002). The DIAP1 RING finger mediates ubiquitination of Dronc and is indispensable for regulating apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **4**, 445–450.





