

Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität
München

DISSERTATION

**Die Rolle des Adenin-Nukleotid-Translokators-1 (ANT-1)
und des Chaperons Cyclophilin D (CypD) bei der
Regulation der mitochondrial vermittelten Apoptose**

Vorgelegt von

Alexis Schubert
aus Marburg

Tag der mündlichen Prüfung: 29.07.2003

Erstberichterstatter: PD Dr. Stefan Grimm

Zweitberichterstatter: Prof. Charles David

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von September 1998 bis Mai 2003 in der selbständigen Nachwuchsgruppe "Programmierter Zelltod" (Leiter: Dr. Stefan Grimm) am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried durchgeführt.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. Stefan Grimm, für die Möglichkeit in seinem Labor eine Doktorarbeit anzufertigen, die Überlassung des Themas, seine ständige Gesprächsbereitschaft und die vielfältigen Anregungen und Ideen.

Mein Dank geht an Herrn Prof. Charles David für seine Bereitschaft, diese Dissertation vor der Fakultät für Biologie der Ludwigs-Maximilian-Universität München zu vertreten.

Ein herzlicher Dank auch der gesamten Arbeitsgruppe Grimm; die vielen angeregten Diskussion und Gespräche und nicht zuletzt die gute Atmosphäre waren ein grosser Gewinn für mich und haben so manchen 'Laborfrust' relativiert.

Vielen Dank an Sigurd, Georg, Holger und der gesamten Arbeitsgruppe Jentsch für unzählige Tassen Espresso, Balkonnutzung und nicht zuletzt die Möglichkeit ihren CCD/Phosphoimager und ihre FACS benutzen zu dürfen.

Vielen Dank auch an die Arbeitsgruppe Ullrich für die Nutzung ihres FACS-Gerätes.

1	EINLEITUNG.....	4
1.1	DIE NEKROSE.....	4
1.2	DIE APOPTOSE.....	5
1.2.1	Die Rolle der Apoptose bei der Entwicklung und Homöostase.....	5
1.2.2	Apoptose und Krankheiten.....	8
1.2.3	Die Caspasen.....	9
1.2.4	Caspasen und ihre Substrate.....	11
1.2.5	Induktion von Apoptose durch die TNF-Rezeptor-Superfamilie.....	13
1.2.6	Mitochondrien und die "intrinsische" Apoptose-Induktion.....	15
1.2.6.1	Cytochrom c wirkt als Kofaktor bei der mitochondrial induzierten Caspase-Aktivierung.....	15
1.2.7	Caspase-Inhibition durch Mitglieder der IAP-Familie.....	16
1.2.8	AIF und EndoG induzieren Apoptose unabhängig von Caspasen.....	17
1.2.9	Die Bcl-2-Genfamilie.....	18
1.2.9.1	Bcl-2-Proteine und mitochondriale Apoptose-Induktion.....	18
1.2.9.2	BH3-only-Proteine als Vermittler apoptotischer Signale.....	20
1.2.10	Die "permeability transition pore" (PTP).....	21
1.2.10.1	Vermutete, strukturelle Komponenten der PTP.....	23
1.2.10.1.1	Der Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT).....	23
1.2.10.1.2	Der "Voltage dependent anion channel" (VDAC).....	24
1.2.10.1.3	Cyclophilin D (CypD).....	24
1.2.10.2	Ein Modell der PTP.....	25
1.2.10.3	Regulation der PTP.....	27
1.3	ZIELE DER ARBEIT.....	29
2	MATERIALIEN.....	31
2.1	CHEMIKALIEN.....	31
2.2	OLIGONUKLEOTIDE.....	32
2.3	ENZYME UND „KITS“.....	34
2.3.1	Restriktionsenzyme.....	34
2.3.2	Weitere Enzyme.....	34
2.3.3	„Kits“.....	34
2.4	DNA-LÄNGENSTANDARDS.....	34
2.5	ANTIKÖRPER.....	35
2.6	PROTEINASE-INHIBITOREN.....	35
2.7	PLASMIDE.....	35
2.8	PUFFER UND SONSTIGES.....	36
2.8.1	Gebräuchliche Puffer und Lösungen.....	36
2.8.2	Sonstiges.....	37
3	METHODEN.....	38
3.1	METHODEN DER PROKARYOTISCHEN ZELLKULTUR.....	38
3.1.1	Prokaryotische Zellkulturbedingungen.....	38
3.1.2	Lagerung von Zellen.....	38
3.1.3	Bakterienstämme.....	38
3.1.4	Herstellung kompetenter Bakterienzellen.....	39
3.1.5	Transformation von Bakterienzellen.....	39
3.1.5.1	Transformation von chemokompetenten Zellen.....	39
3.1.5.2	Transformation von elektrokompetenten Zellen.....	40
3.2	METHODEN DER EUKARYOTISCHEN ZELLKULTUR.....	41
3.2.1	Eukaryotische Zellkulturbedingungen.....	41
3.2.2	Lagerung von Zellen.....	41

3.3	METHODEN DER ZELLKULTUR FÜR HEFEN	42
3.3.1	Zellkulturbedingungen	42
3.3.2	Lagerung der Zellen	44
3.3.3	Chemotransformation von Hefezellen.....	44
3.4	DNA- ARBEITSMETHODEN.....	45
3.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA	45
3.4.2	Präzipitation von Nukleinsäuren.....	46
3.4.3	Extraktion von Nukleinsäuren durch Phenol und Chloroform	47
3.4.4	Enzymatische Restriktionsspaltung von DNA	47
3.4.5	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	48
3.4.6	Ligation von DNA-Fragmenten.....	48
3.4.7	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentration und -Reinheit.....	48
3.4.8	Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	49
3.4.9	Präparative Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	49
3.4.10	Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	49
3.4.10.1	Reverse Transkription	49
3.4.10.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50
3.4.11	Isolierung und elektrophoretische Auftrennung niedermolekularer DNA ("DNA-Leiter")	51
3.4.12	Isolierung von Total-RNA aus Säugerzellen.....	52
3.4.13	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA.....	52
3.4.14	Kapillartransfer und autoradiographischer Nachweis von RNA auf Membranen ("Northern Blot").....	53
3.5	PROTEINANALYTISCHE UND - IMMUNOLOGISCHE METHODEN	55
3.5.1	Präparation von Gesamtzellextrakten aus Säugerzellen	55
3.5.2	Präparation von mitochondrialen Proteinextrakten aus Säugerzellen	56
3.5.3	Präparation von nukleären Proteinextrakten aus Säugerzellen.....	57
3.5.4	Präparation von Gesamtzellextrakten aus <i>S. cerevisiae</i>	57
3.5.5	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration.....	58
3.5.6	Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE.....	59
3.5.7	Elektrotransfer und immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen ("Western-Blot").....	59
3.5.8	ECL-Detektion von Proteinen.....	60
3.6	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	60
3.6.1	Transiente Transfektion von Säugerzellen	61
3.6.2	Nachweis von Zellen mit hypoploidem DNA-Gehalt im Durchflusszytometer (FACS).....	62
3.6.3	Nachweis von Zellen mit hypoploidem DNA-Gehalt durch das "Cell Death Detection ELISA-Kit"	63
3.6.4	Fluoreszenzfärbung von aktiv respirierenden Mitochondrien in Säugerzellen.....	63
4	ERGEBNISSE.....	64
4.1	CHARAKTERISIERUNG VON ANT-1 ALS PROAPOPTOTISCHER FAKTOR	64
4.1.1	Die Überexpression des Adenin-Nukleotid-Translokators-1 (ANT-1) induziert einen apoptotischen Phänotyp in HEK 293T-Zellen	64
4.1.2	Die Apoptose-Induktion durch ANT-1 korreliert mit der Expression und dem mitochondrialen Import des Proteins.....	65
4.1.3	Die Überexpression von ANT-1 führt zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und der Freisetzung von Cytochrom c.....	67
4.1.4	ANT-1-Überexpression führt zur Aktivierung von Caspasen	69
4.1.5	ANT-1-Punktmutanten, die defizient für ADP/ATP-Transport sind, induzieren Apoptose ..	70
4.1.6	Die N-terminale Hälfte von ANT-1 ist ausreichend für die Induktion von Apoptose	72
4.1.7	ANT-1 induziert Apoptose in HeLa-Zellen ohne mitochondriale DNA (p0-Zellen).....	73
4.1.8	Die Überexpression des Adenin-Nukleotid-Translokators-2 (ANT-2) induziert keine Apoptose	75
4.1.9	Die Überexpression von ANT-1 in <i>S. cerevisiae</i> beeinflusst nicht die Zellproliferation	76

4.1.10	ANT-1 induziert Apoptose in der Myoblasten-Zelllinie H9c2.....	77
4.1.11	Die ANT-1-induzierte Apoptose kann durch den PTP-Inhibitor Bomgkreksäure gehemmt werden.....	79
4.1.12	Die Kotransfektion der Peptidyl-prolyl-Isomerase Cyclophilin D (CypD) hemmt die ANT-1-induzierte Apoptose	80
4.1.13	Durch ANT-2/ANT-1-"Austausch-Mutanten" lassen sich Domänen identifizieren, die für die Apoptose-Induktion durch ANT-1 wichtig sind	82
4.2	CYPD ALS REPRESSOR DER MITOCHONDRIAL VERMITTELTEN APOPTOSE	84
4.2.1	Die Hemmung der ANT-1-induzierten Apoptose durch Kotransfektion von CypD ist dosisabhängig und interferiert nicht mit der Expression des Proteins	84
4.2.2	Die PPIase-defiziente CypD-Mutante R96A/H167Q hemmt Apoptose	86
4.2.3	Die transiente Transfektion von CypD desensitiviert Zellen gegenüber verschiedenen Apoptose-Signalen	86
4.2.4	Apoptose-Induktion durch Caspase-8 wird durch CypD-Kotransfektion signifikant gehemmt	87
4.2.5	Die proapoptischen Proteine Bax und ANT-1 werden verschieden stark durch CypD-Kotransfektion inhibiert	91
4.2.6	Das proapoptische Bcl-2-Gen Bid wird durch CypD-Kotransfektion gehemmt.....	93
4.2.7	Die CypD-mRNA ist in Gewebeproben aus Krebsformen der weiblichen Reproduktionsorgane signifikant hochreguliert.....	94
5	DISKUSSION	97
5.1	“SCREENING” NACH DOMINANTEN, APOPTOSE-INDUZIERENDEN GENEN.....	97
5.2	ANT-1 ALS INDUKTOR VON APOPTOSE	100
5.2.1	ANT ist Bestandteil der PTP und Mitglied der mitochondrialen Carrier-Familie	100
5.2.2	Bildet überexprimiertes ANT-1 eine unspezifische Pore in der inneren Mitochondrienmembran?.....	101
5.2.3	ANT-1 induziert Apoptose in Zellen ohne mitochondriale DNA	102
5.2.4	Apoptose-Induktion durch vermehrten ADP/ATP-Transport?	103
5.2.5	Überexprimiertes ANT-1 induziert die Aktivierung der endogenen PTP durch "Inhibitor-Kompetition"	104
5.2.6	ANT-1 und ANT-2 haben offensichtlich verschiedene Aufgaben bezüglich Proliferation und Apoptose.....	106
5.2.7	ANT-1 und seine mögliche Beteiligung an der degenerativen Herzerkrankung DCM	108
5.3	DIE ROLLE VON CYPD IN DER MITOCHONDRIAL VERMITTELTEN APOPTOSE	109
5.3.1	Molekulare Chaperone regulieren Apoptose	109
5.3.2	Die PPIase-Aktivität von CypD und die PTP-Aktivierung	110
5.3.3	Cyclophilin D ist ein spezifischer Repressor der PTP	112
5.3.4	Multi-BH-Domänen-Proteine, CypD und die PTP	114
5.3.5	Die PTP und ihre Rolle in der Apoptose-Induktion	117
5.3.5	CypD und Krebs	119
6	ZUSAMMENFASSUNG	120
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	122
8	LITERATUR	124
9	VERÖFFENTLICHUNGEN	145

1 Einleitung

Die Zelle ist die kleinste individuelle Regulationseinheit innerhalb der biologischen Organismenwelt. Die Ausformung und Aufrechterhaltung sämtlicher physiologischer und anatomischer Charakteristika von Lebewesen wird in erster Linie durch zelluläre Entscheidungsprozesse reguliert. Krankheiten und Noxen wirken durch die (Zer-)Störung von Zellen bzw. ihres vorgesehenen, individuellen Beitrags zur Homöostase des Organismus. Innerhalb dieses hochkomplexen Informationsnetzwerkes sind Zellen Empfänger, Vermittler und Absender einer Vielzahl verschiedener Signale. Auf ankommende Stimuli reagieren Zellen mit definierten, genetisch-determinierten Antworten, der physiologischen Umsetzung der Botschaft. Die daraus resultierenden, möglichen Schicksale einer Zelle sind sehr vielfältig und unterliegen einer restriktiven Kontrolle und komplizierten Regulation. Abhängig von ihrer individuellen Situation kann eine Zelle proliferieren, sich ausdifferenzieren oder den Vorgängen des Zelltods oder der Seneszenz anheim fallen. Als Proliferation bezeichnet man die Vermehrung von Zellen, welche durch die Vorgänge des Zellzyklus kontrolliert wird. Differenzierung bedeutet eine Spezialisierung der Zelle, z.B. in eine bestimmte Gewebeart. So kann aus einer omnipotenten Stammzelle durch Differenzierung jeder beliebige Zelltyp entstehen. Als Seneszenz wird der natürliche Alterungsprozess der Zelle bezeichnet, ein schleichender, allmählicher Vorgang bei dem noch unklar ist, ob ein genetisches Programm dafür verantwortlich ist. Der Zelltod tritt in zwei grundsätzlich verschiedenen Formen auf, die im Folgenden näher beschrieben werden.

1.1 Die Nekrose

Die Nekrose bezeichnet die passive Form des Zelltodes. Sie tritt als Folge einer irreversiblen Noxe, z.B. einer Verletzung, der Einwirkung von Toxinen oder als Folge eines Infarktes auf (Borgers *et al.*, 1987; Lockshin & Beaulaton, 1981; Trump & Bulger, 1967). Ein primäres Ereignis der Nekrose ist die Hemmung von Ionenpumpen der Plasmamembran. Dadurch erhöht sich die Membranpermeabilität und als Folge schwellen

Zytoplasma und die Zellorganellen an (Hawkins *et al.*, 1972). Der Anstieg an freiem Ca^{2+} im Zytosol führt zu einer Aktivierung membrangebundener Phospholipasen, welche daraufhin die Phospholipide der Plasmamembran degradieren. Die Freisetzung von Hydrolasen aus Lysosomen beschleunigt die zelluläre Desintegration, da sie Proteine, Nukleinsäuren und andere zelluläre Kompartimente rasch degradieren (Afanas'ev *et al.*, 1986). Schließlich platzt die Zelle und der Zellinhalt wird freigesetzt, was oft zu Entzündungsreaktionen im umliegenden Gewebe führt.

1.2 Die Apoptose

Von der Nekrose unterscheidet sich der „programmierte Zelltod“ (Lockshin and Williams, 1965), auch „Apoptose“ (Kerr *et al.*, 1972) genannt, sehr deutlich (Abb. 1.1). Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose ein aktiver, Energie verbrauchender Prozess, der im Allgemeinen nicht von Entzündungsreaktionen begleitet wird, da keine Zellinhalte in die Umgebung freigesetzt werden (Voll *et al.*, 1997). Auch morphologisch bestehen Unterschiede zur Nekrose. Eine apoptotische Zelle schrumpft, rundet sich ab und löst sich von der extrazellulären Matrix. Das Zytoskelett degradiert, die Plasmamembran wird ausgestülpt, das Chromatin kondensiert und der Zellkern fragmentiert, gefolgt von der biochemisch charakteristischen, internukleosomalen Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen (Arends & Wyllie, 1991; Raff, 1992; Peitsch *et al.*, 1994). Anschließend erfolgt die Desintegration der Plasmamembran, die zur Bildung membranumschlossener Vesikel, sogenannter apoptotischer Körperchen, führt. Makrophagen phagozytieren diese apoptotischen Körperchen und spalten deren makromolekularen Bestandteile während einer Lysosomen-Passage, so dass die resultierenden biochemischen Grundbausteine zum Recycling zur Verfügung stehen.

1.2.1 Die Rolle der Apoptose bei der Entwicklung und Homöostase

Generell wird der programmierte Tod einer Zelle als altruistischer Prozess interpretiert - im Dienste der Ontogenese und der physiologischen Homöostase des Gesamtorganismus. Während der verschiedenen Entwicklungsabschnitte von Vielzellern ist das kontrollierte

Absterben von Zellen ein wichtiges Korrektiv. Der Nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) verfügt zu Beginn seiner Ontogenese zunächst über 1090 somatischer Zellen. Im

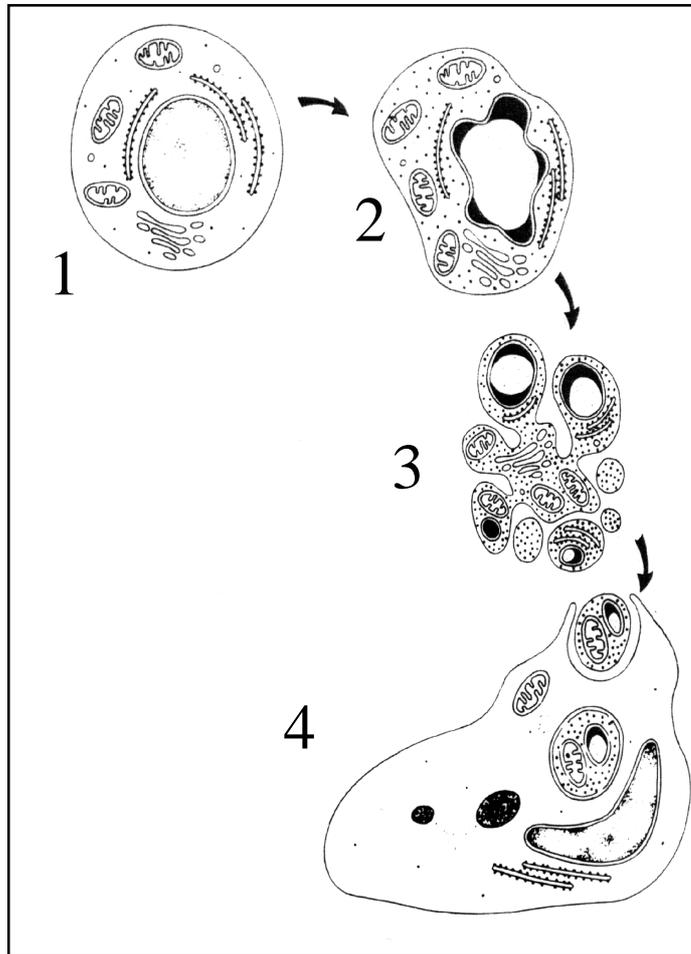


Abb.1.1: Schematische Darstellung der Apoptose.

Die Abbildung zeigt die morphologischen Veränderungen der Zelle während der Apoptose (1-4). Oben links ist eine normale Zelle (1) dargestellt. Charakteristisch für die frühe Apoptose (2) ist das Schrumpfen der Zelle, die Kondensation des Zytoplasmas und des Chromatins und die Einstülpung des Zellkerns. In der späteren Phase (3) erfolgt eine Fragmentierung des Zellkerns, und die Desintegration der Plasmamembran führt zur Bildung apoptotischer Körperchen, die (4) durch Makrophagen phagocytiert und in Lysosomen verdaut werden (nach Kerr *et al.*, 1972, Kerr, 1994).

Rahmen der Entwicklung zum adulten Tier werden 131 Zellen durch Apoptose entfernt. Dieser programmierten Zelltod eröffnet die Möglichkeit definierte Strukturen zu konstruieren oder zu entfernen, so auch wie bei der Entwicklung der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*): Während der Metamorphose von der Larve zum adulten Tier werden die Speicheldrüsen apoptotisch entfernt (Jiang *et al.*, 1997). In der

humanen Entwicklung wird bei männlichen Embryonen der Müllersche Gang, aus dem später Uterus und Ovidukt hervorgehen, zunächst angelegt und im Laufe der Entwicklung wieder durch programmierten Zelltod eliminiert. Im Gegensatz zum zeitlich und räumlich definierten, programmierten Tod, können Zellen auch individuell auf Stressbedingungen wie etwa die Schädigung der DNA mit der Induktion der Apoptose reagieren. In diesem Fall wird eine Zelle durch kontrollierten Tod beseitigt, um die Integrität des betreffenden Gewebe bzw. des Gesamtorganismus zu gewährleisten (s.u.).

C.elegans-Mutanten mit Defekten in der Regulation des Zelltodes waren die ersten Werkzeuge um die verantwortlichen Gene zu isolieren. Der Verlust der Funktion der Gene *ced-3*, *ced-4* und *egl-1* führt jeweils zum Überleben aller 131 Zellen, die eigentlich apoptotisch eliminiert werden sollten. Tiere, in denen das *ced-9*-Gen nicht funktional ist, sterben früh in der Entwicklung, begleitet von einer signifikant erhöhten Rate apoptotischer Zellen. Für diese prinzipiellen anti- und proapoptotischen Regulatoren gibt es konservierte Homologa in Säugetieren. Das Zelltod-vermittelnde *ced-3*-Gen kodiert für eine Protease deren Homologa auch in Säugetieren nachgewiesen wurden (vgl.1.2.3). Das *ced-9*-Homolog in Säugern, *bcl-2*, ist ein genereller Inhibitor der Apoptose. Das apoptotische Programm zwischen Invertebraten und Vertebraten ist dabei erstaunlich gut konserviert: Das humane Bcl-2-Protein verhindert auch Apoptose in *C. elegans*-Zellen (Vaux *et al.*, 1992). Mittlerweile konnte in murinen und humanen Systemen bereits eine ganze Genfamilie von Bcl-2-ähnlichen Genen beschrieben werden, darunter auch solche Mitglieder die den Zelltod nicht verhindern sondern auslösen. So hat sich bei Säugern durch Genduplikation und Diversifikation eine beträchtliche Vielfalt von Apoptose-Regulatoren entwickelt. Neben der elementaren Rolle des programmierten Zelltodes bei der Entwicklung spielt die Apoptose bei Säugetieren auch im adulten Tier eine zentrale Rolle. Im Rahmen eines dynamischen Gleichgewichts wird die beständige Proliferation von Zellen durch Apoptose ausbalanciert. Die Evolution von hochdynamischen, proliferativen Geweben wie etwa der Haut oder der Leber ebenso wie die Etablierung eines komplexen zellulären Immunsystems oder der synaptischen Plastizität sind ohne das kontrollierte Absterben von unerwünschten oder potentiell gefährlichen Zellen nicht denkbar. Während der Entwicklung sterben mehr als 80% der Ganglionzellen in der Retina der Katze, beim Versuch den Kontakt zu den zu innervierenden Zellen herzustellen, die überlebenswichtige

neurotrophische Faktoren zur Verfügung stellen (Barres *et al.*, 1999). Ebenso werden autoreaktive T-Zellen des Immunsystems durch Auslösen des Todesprogramms entfernt. Der induzierte Tod von Zellen kann so auch als permanente ‚Qualitätskontrolle‘ verstanden werden.

Jede Zelle hat folgerichtig permanent die Option, durch Apoptose zu sterben. Die Tatsache, dass die Hemmung der Proteinsynthese durch den generellen Translationsinhibitor Actinomycin D Apoptose auslöst, zeigt, dass wahrscheinlich alle dafür benötigten Faktoren intrinsisch bereits in Zellen vorhanden sind. Dies zeigt die Bedeutung einer extrem präzisen und zuverlässigen Kontrolle der Apoptose-Induktion. Eine Misregulation dieses essentiellen Prozesses löst schwerwiegende Folgen für den Organismus aus, wie im nächsten Abschnitt besprochen werden soll.

1.2.2 Apoptose und Krankheiten

Störungen der Apoptose-Regulation verursachen oder begünstigen die Entstehung einer Vielzahl schwerwiegender Erkrankungen. Insbesondere die Entstehung von Krebs wird vermehrt mit der Unfähigkeit von Zellen in Zusammenhang gebracht, das apoptotische Programm zu aktivieren.

Das Protein p53 löst Apoptose als Antwort auf DNA-Schädigung, z.B. durch UV-Strahlung, und viele weitere Parameter von intrazellulärem Stress aus. Ein Verlust dieser proapoptischen Funktion, etwa durch Mutationen im p53-Gen, konnte in ca. 50% aller Tumorarten der festen Gewebe nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 2002). Apoptose-auslösende Gene, deren Funktionsverlust mit der Entstehung von Krebserkrankungen in Zusammenhang gebracht wird, werden als *Tumorsuppressoren* bezeichnet. Eine erniedrigte Apoptose-Rate kann jedoch auch auf die Überaktivierung von antiapoptischen Genen zurückzuführen sein, welche somit zu den *Onkogenen* gerechnet werden. Kommt beispielsweise das antiapoptische bcl-2-Gen durch Translokation unter die Kontrolle des sehr starken Immunglobulin-Promoters, so führt dies zur Immortalisierung der Zellen (Vaux *et al.*, 1988). Zellen, die in solcher Weise ‚unsterblich‘ geworden sind, können nicht länger durch zelluläre Todessignale entfernt werden und stellen potenzielle Tumorherde dar. Eine unnatürlich erniedrigte Apoptoserate kann auch zu schweren Störungen des

Immunsystems führen, da beispielsweise unerwünschte autoreaktive T-Zellen nicht mehr eliminiert werden können.

Die durch Mutationen bedingte Erhöhung der Zelltodrate ist an der Entstehung von degenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson beteiligt (Thompson, 1995). Auch bei muskulären Dystrophien wie der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) führt wahrscheinlich überschüssige Apoptose-Induktion - evtl. ausgelöst durch die Überexpression des Gens für den Adenin-Nukleotid-Translokator-1 (ANT-1, vgl. 1.2.10, 1.3) - zum Absterben gesunden Gewebes und in diesem Fall zu Herzinsuffizienz (Narula *et al.*, 1998). Erhöhte Apoptoseraten bei Zellen des Immunsystems bewirken offensichtlich ein Aufweichen des Schutzes vor bestimmten viralen Infektionen etwa mit Herpes- oder Adenoviren (Thompson, 1995).

Die Apoptose als wichtiges Werkzeug und Stellglied innerhalb der physiologischen Homöostase erweist sich hier als potenzieller Gefahrenherd für den Organismus. Eine Fülle verschiedener Signale kann die Aktivierung dieses Programms auslösen: Zelluläre Stressbedingungen wie erhöhte zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration oder ATP-Mangel, aber auch Ligandbindung an Plasmamembranrezeptoren oder physikalische Schädigung der DNA. Die letztlich entscheidenden biochemischen und morphologischen Veränderungen innerhalb einer sterbenden Zelle werden durch die enzymatische Aktivität einer hochkonservierten Familie von Proteasen katalysiert.

1.2.3 Die Caspasen

Der Verlust des *C.elegans*-Gens *ced-3* führt in den jeweiligen Tieren zum Überleben aller 131 Zellen, die normalerweise im Laufe der Entwicklung durch Apoptose entfernt werden (Ellis & Horvitz, 1986). Interessanterweise stellte sich heraus, dass *ced-3* homolog zu einer humanen Protease ist, dem Interleukin-1 β -converting enzyme (ICE). Mittlerweile umfasst die Familie der ICE/Ced-3-Homologa 14 Mitglieder in Säugern. Es handelt sich um Cysteinproteasen die ihre Substrate C-terminal von **A**spartatresten schneiden, weshalb sie auch unter dem Namen Caspasen zusammengefasst werden (Alnemri *et al.*, 1996). Einige Caspasen (Caspase 1, 4, 5, und 11-14) scheinen hauptsächlich an der proteolytischen Prozessierung von Cytokinen bei Entzündungsreaktionen beteiligt zu sein. Die Caspasen-2, -3, -6, -7, -8, -9 und -10 vermitteln hingegen Apoptose-Signale durch Spaltung zellulärer

Substrate. Die Enzyme werden als schwach aktive Proformen synthetisiert, die erst durch Spaltung ihre volle proteolytische Aktivität entfalten. Charakteristischerweise verfügen Caspasen über drei Domänen: Eine variable N-terminale Domäne, sowie eine grosse (ca. 20 kD) und eine kleine (ca. 10 kD) Untereinheit. Die Aktivierung von Caspasen erfolgt durch proteolytische Prozessierung, so dass die drei Domänen physikalisch getrennt werden. Die grossen und kleinen Domänen assoziieren anschliessend zu Heterodimeren mit zwei unabhängigen katalytischen Zentren.

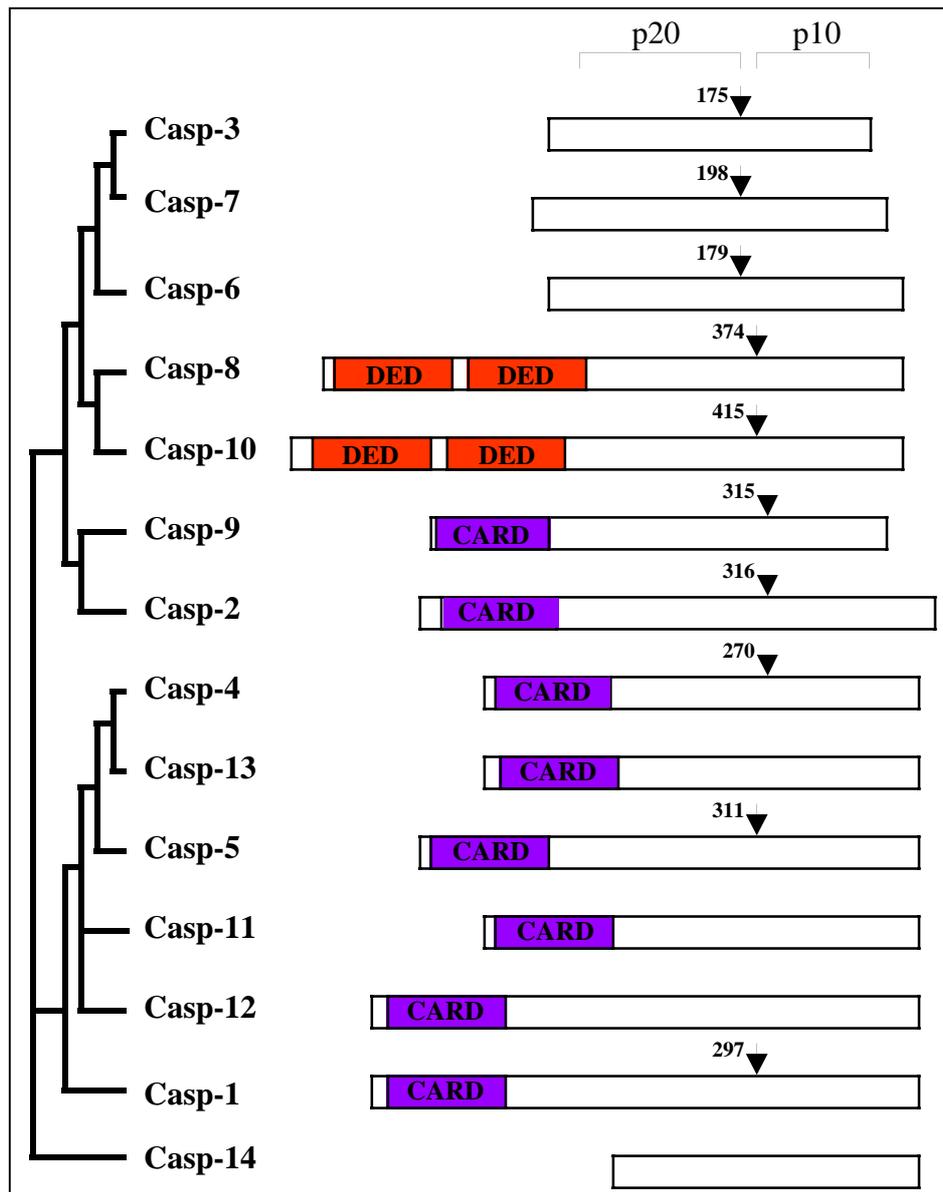


Abb 1.2 Schematische Darstellung der bisher bekannten Caspasen in Säugern. Bis auf Caspase-11 (Maus), -12 (Maus) und -14 (Rind) kommen alle gezeigten Caspasen im Menschen vor. Ihre phylogenetische Verwandtschaft scheint mit ihrer Funktion in Zelltod und/oder Entzündungsreaktionen zu korrelieren (s.Text). DED (death effector domain) sind rot dargestellt, CARD (Caspase recruitment domain) lila. Die Aufspaltung in p20 und p10, sowie die Aminosäureposition an der die Prozessierung stattfindet ist angezeigt. Nach Shi, 2002.

Innerhalb der apoptotischen Caspasen unterscheidet man Initiator- und Effektorcaspasen. Initiatorcaspasen besitzen gegenüber den Effektorcaspasen verlängerte N-terminale Prodomänen mit Proteininteraktionsmodulen wie DED (Death effector domain) und CARD (Caspase recruitment domain) (Abb. 1.2), die sie befähigen, verschiedene Zelltodsignale aufzunehmen und an Effektorcaspasen weiterzuleiten. Über homotypische DED::DED-Interaktionen interagiert beispielweise Procaspase 8 mit Adaptorproteinen von Zelltod-vermittelnden Rezeptoren der Tumor-Nekrose-Superfamilie (TNF-R) (vgl.1.2.5) und vermittelt ‚extrinsische‘ (extrazelluläre) Todessignale durch autokatalytische Aktivierung und sukzessive Spaltung von Effektorcaspasen. *In vitro* wurde gezeigt, dass Caspase-8 die Caspasen-3, -4, -7, -9 und -10 direkt spalten kann. Die Caspasen-2 und -6 werden bei diesem Signalweg zwar auch gespalten und aktiviert, jedoch nicht direkt durch Caspase-8, sondern durch andere, später aktivierte Caspasen (Muzio *et al.*, 1996). Vielfältige "intrinsische" (zellautonome) Todessignale werden durch Autoaktivierung von Procaspase-9 am sog. "Apoptosom" initiiert und durch nachgeschaltete Aktivierung von Effektorcaspasen vermittelt (s. 1.2.6.1).

Aktiviert Effektorcaspasen greifen durch gezielte Spaltung verschiedenster Substrate in zelluläre Prozesse ein und katalysieren die Durchführung des apoptotischen Programms

1.2.4 Caspasen und ihre Substrate

Zellen die durch Apoptose sterben weisen Veränderungen wie Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung und das Abschnüren apoptotischer Körperchen auf. Diese massive Reorganisation der zellulären Architektur wird vermutlich grösstenteils durch die Aktivität von Caspasen katalysiert, von denen bereits über 100 Substrate beschrieben wurden (Kaufmann & Hengartner, 2001). Elemente des Zytoskeletts wie Aktin und Gelsolin und auch Proteine, die an der Zelladhäsion beteiligt sind, wie β -Catenin und Plakoglobin, werden durch Caspasen proteolytisch modifiziert (Stroh & Schulze-Osthoff, 1998). Die Spaltung letzterer ermöglicht wahrscheinlich die Dissoziation sterbender Zellen aus dem Gewebeverband. Die Membran des Zellkerns wird im wesentlichen durch vernetzte Lamin-Filamente stabilisiert. Die Spaltung von Laminen während der Apoptose führt zum Zusammenbruch der Kernmembran und trägt zur Chromatinkondensation bei (Thornberry & Lazebnik, 1998). Caspasen trennen durch Proteolyse oftmals die Regulations- und

Effektordomänen ihrer Substrate (in Klammern) und inhibieren oder deregulieren so lebenswichtige Prozesse wie DNA-Reperatur (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase, PARP, DNA-abhängige Proteinkinase, DNA-PK), mRNA-Spleissen (U1-70 snRNP) und DNA-Replikation (DNA-Replikationskomplex C) (Lazebnik *et al.*, 1994, Cryns *et al.*, 1998; Rheaume *et al.*, 1997). Ein weiteres Merkmal der Wirkung von Caspasen ist die Inaktivierung von Molekülen, die die Zelle vor Apoptose schützen: Die Endonuklease CAD wird in nicht-apoptotischen Zellen durch Komplexierung mit dem Inhibitor ICAD/DF45 inaktiv gehalten. Die Caspase-abhängige Spaltung von ICAD entlässt CAD, die nun als Nuklease die genomische DNA zwischen den Nukleosomen schneidet und Apoptose-typische DNA-Fragmente (Vielfache von 180 bp) generiert (Enari *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 1997).

Beispiele für Proteine, die durch Spaltung aktiviert werden, sind: Die Proteinkinase C δ , die durch Caspasen induziert wird und vermutlich an der Chromatin-Kondensation beteiligt ist (Ghayur *et al.*, 1996; Emoto *et al.*, 1995). Die p21-aktivierte Kinase PAK2, welche durch Spaltung zu einer konstitutiv aktiven Kinase wird und an der Bildung der apoptotischen Körperchen beteiligt ist (Rudel, 1997).

Procaspasen werden in allen Zellen des Organismus konstitutiv exprimiert und können bei Aktivierung Todessignale exponentiell verstärken. Die Signaltransduktion durch Proteolyse ist dazu irreversibel, was bedeutet, dass auch der Ablauf des apoptotischen Programms nach hinreichender Aktivierung von Effektorcaspasen kaum noch gestoppt werden kann. Die Signaltransduktion, die in die Aktivierung von Caspasen mündet, muss deswegen präzise reguliert sein. Bisher sind zwei prinzipielle Wege bekannt: Der "extrinsische" Aktivierungsweg über Plasmamembranrezeptoren und der "intrinsische" oder mitochondriale Weg.

1.2.5 Induktion von Apoptose durch die TNF-Rezeptor-Superfamilie

Die "extrinsische" Apoptose-Signaltransduktion wird durch plasmamembranständige Rezeptoren vermittelt. Dazu gehören unter anderem TNF-R1 (Loetscher *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1990), der FAS-Rezeptor (Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992) sowie die Rezeptoren für TRAIL, DR4 und 5 (Scaffidi *et al.*, 1999). Die Liganden der Rezeptoren FAS, TNF- α

und TRAIL, führen nach der Bindung zu deren Trimerisierung und zur Rekrutierung weiterer Proteine aus dem Zytosol. Diese Apoptose-spezifischen Rezeptoren verfügen über ein Protein-Protein-Interaktionsmotiv im zytoplasmatischen Anteil, die sog. "death domain" (DD) (Kaufmann & Hengartner, 2001). An die aktivierten Rezeptoren werden über die DD verschiedene DD-enhaltende Adaptorproteine rekrutiert, an die wiederum weitere zytoplasmatische Faktoren binden können, so dass ein Todes-induzierender Signalkomplex (Death inducing signaling complex, DISC) entsteht. Rezeptoren ohne DD, sogenannte Decoy-Rezeptoren (DcR) modulieren die Apoptose-Antwort indem sie die Todes-Liganden binden aber keinen Zelltod auslösen. Der FAS-Ligand-bindende DcR-3 ist in ca. 50% der primären Lungen- und Darmtumoren überexprimiert und desensitiviert wahrscheinlich die Krebszellen gegenüber FAS-induzierter Apoptose (Pitti *et al.*, 1998). Die DD-enhaltenden Rezeptoren sind in der Lage durch homotypische Interaktionen Apaptormoleküle wie TRADD (TNF-R-associated death domain) und FADD (FAS-associated death domain) zu rekrutieren (Boldin *et al.*, 1995; Chinnaiyan *et al.*, 1996). Die DISC-Zusammensetzung ist variabel und dabei abhängig von Rezeptor- und Zelltyp (Scaffidi *et al.*, 1999).

Die Apoptose-Signaltransduktion beruht offensichtlich auf einer DED-abhängigen Assemblierung von Procaspase 8-Molekülen, die sich autokatalytisch aktivieren und sukzessive die Caspasen-Kaskade aktivieren (Ashkenazi & Dixit, 1999). Diese entscheidende Umschaltstation zwischen aktivierten Todes-Rezeptoren und der Aktivität von Effektorcaspasen wird durch Inhibitoren reguliert. Die FLICE (FLICE = Caspase-8)-inhibitorischen Proteine, FLIPs, können aufgrund einer verwandten dreidimensionalen Struktur und vorhandener DEDs mit Procaspase-8 um die Bindung an DED-Adaptormoleküle kompetieren. Sie werden, wie Caspase-8, in grosse und kleine Untereinheit prozessiert, besitzen jedoch keine Caspase-Aktivität und blockieren so effektiv die Rezeptor-vermittelte Apoptose (Zörnig *et al.*, 2001).

Die innerhalb des DISC aktivierte Caspase-8 ist der Ausgangspunkt für die weitere Zelltod-Signaltransduktion. Interessanterweise finden sich in Abhängigkeit vom Zelltyp differierende Apoptosewege. In den sog. 'Typ I'-Zellen (vor allem lymphoide Zellen) kann Caspase-8 direkt Procaspase-3 prozessieren und aktivieren. In allen anderen Zellen (Typ II) finden sich im DISC nur geringe Mengen Caspase-8, die nicht ausreichen, um Procaspase-3

zu spalten. In diesen Zellen prozessiert Caspase-8 offensichtlich das proapoptische Bcl-2-Familienmitglied Bid. Das 15 kD C-terminale Fragment tBid (truncated Bid) transloziert zur äusseren Mitochondrienmembran und stimuliert dort die Freisetzung apoptotischer Signalmoleküle, die z.T. als Kofaktoren für weitere Caspase-Aktivierung dienen (Li *et al.*, 1998, Luo *et al.*, 1998, Gross *et al.*, 1999). Wie wichtig die durch Bid geleistete Verbindung des extrinsischen, Rezeptor-vermittelten und intrinsischen, Mitochondrien-vermittelten Apoptoseweges ist, zeigen Experimente mit Bid-knockout-Mäusen: Zellen ohne funktionales Bid sind resistent gegenüber Todes-Rezeptor-Liganden wie TNF- α und FAS-Ligand (Wang *et al.*, 2001).

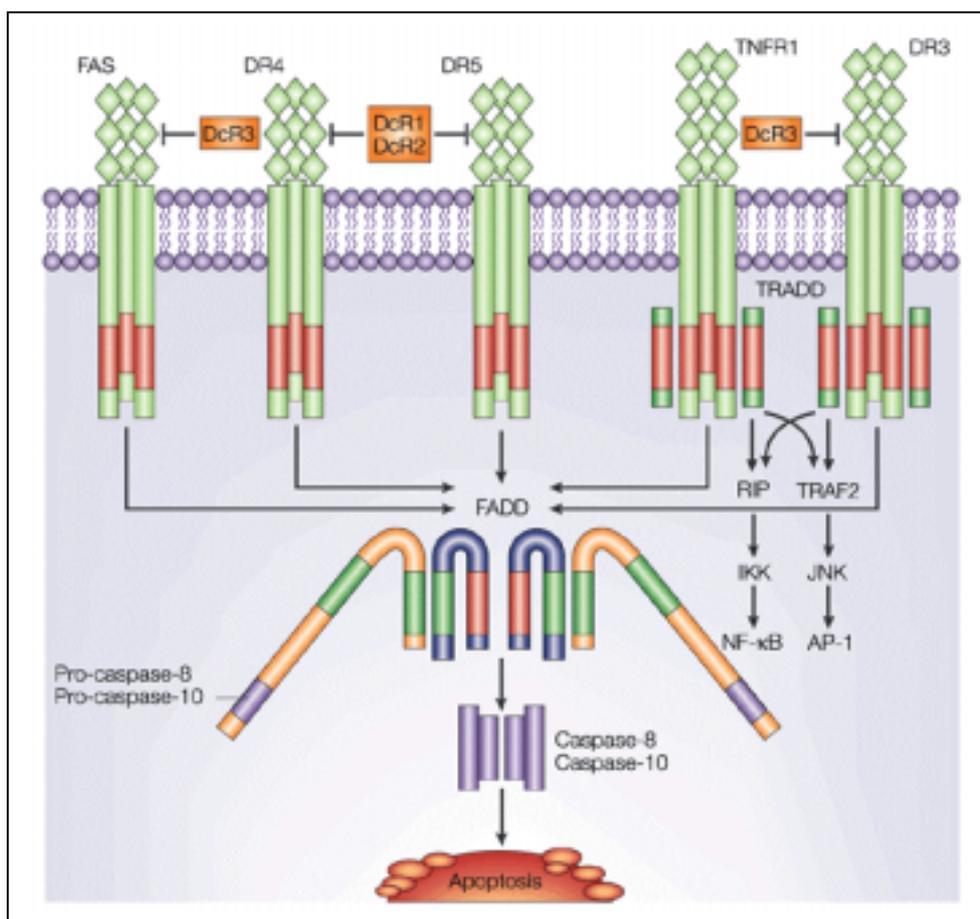


Abb. 1.3 Die Signaltransduktion durch Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie. Nach der Bindung des FAS-Liganden (FAS-L) oder des Liganden TRAIL assemblieren der FAS-Rezeptor, DR4 oder 5 (DR, *death receptor*) jeweils einen DISC durch das Adaptorprotein FADD. Durch homotypische DED-Interaktion mit Caspase-8 und/oder -10 werden Initiatorcaspasen aufkonzentriert und so zur Autoaktivierung gebracht, was eine sukzessive Aktivierung der Caspase-Kaskade zur Folge hat. Die Rezeptoren TNF-R-1 und DR3 werden durch den Liganden TNF- α aktiviert und vermitteln durch den Adaptor TRADD sowohl Caspase-8-Aktivierung via FADD als auch die Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-1. DD sind in rot dargestellt, DED in dunkelgrün, Caspasedomänen in graublau. Aus Ashkenazi, 2002.

1.2.6 Mitochondrien und die „intrinsische“ Apoptose-Induktion

Die erste Verbindung zwischen Zelltod und Mitochondrien war die Entdeckung, dass in einem *in vitro*-System angereicherte Mitochondrien-Fractionen für die Auslösung des Apoptose-Programms benötigt wurden (Newmeyer *et al.*, 1994).

Es zeigte sich, dass die Freisetzung von Proteinen aus dem Intermembranraum Voraussetzung für die Induktion verschiedener Apoptose-Signalwege ist. Mittlerweile sind eine Reihe von Intermembranraum-Proteinen bekannt, die im Rahmen der mitochondrial induzierten Apoptose ins Zytoplasma translozieren oder transloziert werden.

1.2.6.1 Cytochrom c wirkt als Kofaktor bei der mitochondrial induzierten Caspase-Aktivierung

Cytochrom c, ein Bestandteil der mitochondrialen Elektronentransportkette, initiiert nach Verlassen des Mitochondrions einen Zelltod-Signalweg. Im Zytoplasma bindet das Protein an Apaf-1 (apoptotic protease activating protein-1) und erhöht durch eine Konformationsänderung die Affinität der Apaf-1-Nukleotidbinde-Domäne gegenüber ATP bzw. dATP. Unter dATP-Bindung oligomerisieren Cytochrom c und Apaf-1 zu einem heptameren Komplex, dem *Apoptosom* (Zou *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997). Durch homotypische CARD-Interaktionen werden nun Procaspase-9-Moleküle an das Apoptosom rekrutiert und es kommt, vergleichbar der DISC-abhängigen Aktivierung von Procaspase-8, zu einer Autoaktivierung der Initiatorcaspase-9. Die prominente Rolle von Cytochrom c bei der Apoptosom-Aktivierung wird durch Experimente belegt, in denen durch Mikroinjektion des Proteins in gesunde Zellen Apoptose ausgelöst wird (Zhivotovsky *et al.*, 1998).

Die aktive Caspase-9 prozessiert Procaspase-3, welche wiederum die Procaspasen-2 und -6 aktiviert (Thornberry & Lazebnik, 1998). Marzo *et al.* konnten zeigen, dass die Caspasen-2, -6 und -9 in der Lage sind, die Cytochrom c-Freisetzung aus isolierten Mitochondrien zu induzieren, was einen selbstverstärkenden mitochondrialen Apoptose-Induktions-Mechanismus nahelegt (Marzo *et al.*, 1998a). Die zentrale Rolle der Apoptosom-induzierten Caspase-Aktivierung lässt sich an Mäusen ohne funktionales Apaf-1 (Apaf-1 „knockout“ Mäuse) demonstrieren: Die Tiere sterben am Tag 16 der Embryonalentwicklung und zeigen schwere Defekte bei der Gehirn- und Schädelentwicklung.

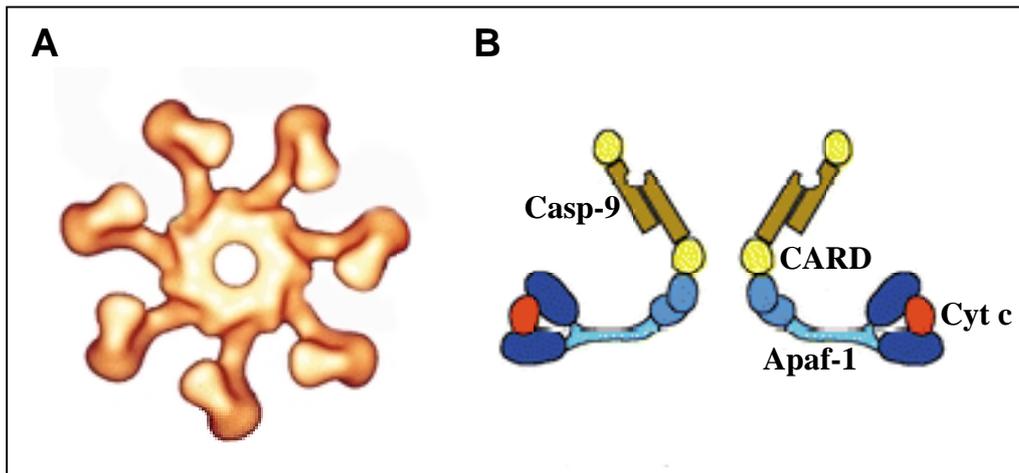


Abb. 1.4 Struktur des Apoptosoms. (A) Aufsicht auf das heptamere Apoptosom bestehend aus Apaf-1, Cytochrom c und dATP. (B) Modell des apoptosomalen Holoenzym und Mechanismus der Caspase-9-Rekrutierung und -Aktivierung. Der zentrale Ring des heptameren Modells (A) wird von den CARD-Domänen von Apaf-1 gebildet, Cytochrom c und Teile von Apaf-1 (WD40 repeats) bilden die „Speichen“. Aus Shi, 2002.

Vergleichbare Phänotypen zeigen Caspase-9 "knockout" Mäuse (Kuida *et al.*, 1998, Cecconi *et al.*, 1998, Hornapour *et al.*, 2001). Die Caspase-Aktivierung durch Adaptor-induzierte Oligomerisierung findet sich bereits bei *Drosophila*: Dort vermittelt dApaf-1 (*Drosophila* Apaf-1) die Cytochrom c-abhängige Aktivierung von Dronc, einer Caspase, der eine Initiatorrolle zugeschrieben wird (Kanuka *et al.*, 1999). Dieser hochkonservierte Signalweg zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade wird durch eine Familie inhibitorischer Proteine reguliert.

1.2.7 Caspase-Inhibition durch Mitglieder der IAP-Familie

Die Inhibitor der Apoptose-Proteine (IAPs) bilden eine konservierte Proteinfamilie mit bisher acht bekannten Mitgliedern bei Säugern (z.B. XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2), sowie einem Homolog in *Drosophila* (Deveraux *et al.*, 1997, Deveraux & Reed, 1999, Hawkins *et al.*, 1999). Alle bisher bekannten IAPs verfügen über ein Zinkfinger-ähnliches Strukturmotiv, die BIR-Domäne. XIAP verfügt über drei BIR-Domänen, die verschiedene Aufgaben besitzen: Aminosäurereste, die zwischen den BIR-Domänen 1 und 2 liegen, binden an das aktive Zentrum von Caspase-3, während die BIR-Domäne 3 Caspase-9 binden kann. Die IAPs können durch Caspasen nicht gespalten werden und hemmen so die Proteasen durch

Blockade der katalytischen Zentren (Roy et al., 1997). IAPs verfügen zusätzlich über eine RING-Finger-Domäne mit Ubiquitin-Ligaseaktivität, so dass gebundene Caspasen durch eine Proteasom-Passage degradiert werden könnten (Yang *et al.*, 2000, Suzuki *et al.*, 2001a). Die IAP-Aktivität wird wiederum durch zwei Proteine moduliert, die während der Apoptose aus dem mitochondrialen Intermembranraum entlassen werden: Smac/Diablo und HtrA2/Omi. Beide Proteine binden über ein N-terminales Tetrapeptid direkt an IAP-Proteine und inhibieren so deren Funktion (Verhagen et al., 2000, Suzuki *et al.*, 2001b).

Im Gegensatz zu den bisher genannten mitochondrialen Proteinen, die nach Translokation ins Zytoplasma die Aktivierung von Caspasen auslösen, gibt es auch Beispiele für Proteine, die eine Protease-unabhängige Durchführung des Zelltodprogramms bewirken.

1.2.8 AIF und EndoG induzieren Apoptose unabhängig von Caspasen

Der Apoptose-induzierende Faktor AIF ist ein 57 kD Flavoprotein mit Homologien zu bakteriellen Oxidoreduktasen. AIF wird nach Apoptose-Induktion aus dem Mitochondrion entlassen, transloziert in den Zellkern und katalysiert dort Caspase-unabhängig Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung (Susin *et al.*, 1999).

EndoG ist eine mitochondriale Nuklease mit einem Molekulargewicht von 30 kD. Eine Rolle von EndoG bei der Replikation der mitochondrialen DNA wurde vermutet, ist jedoch kaum mit der quantitativen Translokation des Proteins, parallel mit bekannten apoptogenen Intermembranraum-Proteinen, zu vereinbaren. Auch EndoG transloziert in den Nukleus und induziert dort die Fragmentierung der DNA, unabhängig von der Aktivität von Caspasen (Cote & Ruiz-Carrillo, 1993, Li *et al.*, 2001).

Von einer Reihe weiterer Proteine, u.a. metabolische Enzyme wie Arginase und Sulfitoxidase, wird angenommen, dass sie während des Apoptose-Programms aus den Mitochondrien entlassen werden. Allerdings konnte in diesen Fällen bisher keine eindeutige Beteiligung der Faktoren am induzierten Zelltod nachgewiesen werden (Kroemer & Reed, 2000).

Mitochondrien verfügen über ‚tödliche‘ Proteine in ihrem Intermembranraum, die, wenn sie ins Zytoplasma entlassen werden, verschiedene Apoptose-Signalwege auslösen können. Die Integrität der äusseren Mitochondrienmembran ist demnach ein höchst kritischer, zellulärer Parameter, und wie es zu ihrer Permeabilisierung kommt, ist bisher nicht

eindeutig geklärt. Die meist diskutierten Theorien favorisieren die Bildung von Kanälen in den mitochondrialen Membranen. Im Falle der inneren Membran würde ein solcher Kanal die Ionenverteilung und das osmotische Gleichgewicht so verändern, dass sich die mitochondriale Matrix ausdehnt und schliesslich die äussere Membran zerstört (s. 1.2.10). Ein alternatives Modell favorisiert die Kanal-Bildung in der äusseren Membran durch Mitglieder einer für die Apoptose-Regulation wichtigen Gen-Familie.

1.2.9 Die Bcl-2 Genfamilie

Bcl-2 wurde ursprünglich als Onkogen am chromosomalen Bruchpunkt t(14:18) in B-Zell-Lymphomen entdeckt (Vaux *et al.*, 1988). Die Bcl-2 Genfamilie enthält sowohl antiapoptotische als auch proapoptotische Mitglieder (s. Abb. 1.5). Bezüglich ihrer Struktur und ihrer biochemischen Funktion können die proapoptotischen Mitglieder in zwei Gruppen unterteilt werden: Die Multi-BH-Domänenproteine Bax, Bak und Bok verfügen über die Bcl-2-Homologiedomänen BH1, -2 und -3, während die Familie der 'BH3-only'-Proteine ausschliesslich Sequenzhomologien in der BH-3-Domäne besitzen. Die meisten Mitglieder der Bcl-2-Genfamilie verfügen über eine Transmembrandomäne am C-Terminus und können in den Membranen der Mitochondrien, des endoplasmatischen Retikulums und des Nukleus lokalisieren.

1.2.9.1 Bcl-2-Proteine und mitochondriale Apoptose-Induktion

Die Aufgabe der Bcl-2-Familienmitglieder scheint hauptsächlich in der Kontrolle der Freisetzung mitochondrialer Intermembranraumproteine zu liegen. Entscheidend für die Wirkung der Mitglieder als pro- und antiapoptotischer Faktoren scheint ihre Fähigkeit zu sein, miteinander zu interagieren und Hetero- bzw. Homodimere zu bilden, deren Zusammensetzung Zelltod oder Überleben signalisiert: Bcl-2/Bcl-2-Homo- und Bcl-2/Bax-Heterodimere wirken wahrscheinlich antiapoptotisch, während Bax/Bax-Dimere und -Oligomere als proapoptotisch gelten. Zelltodsignale beeinflussen in diesem Modell die Verfügbarkeit und Aktivierung von Familienmitgliedern und so die Zusammensetzung der Dimere.

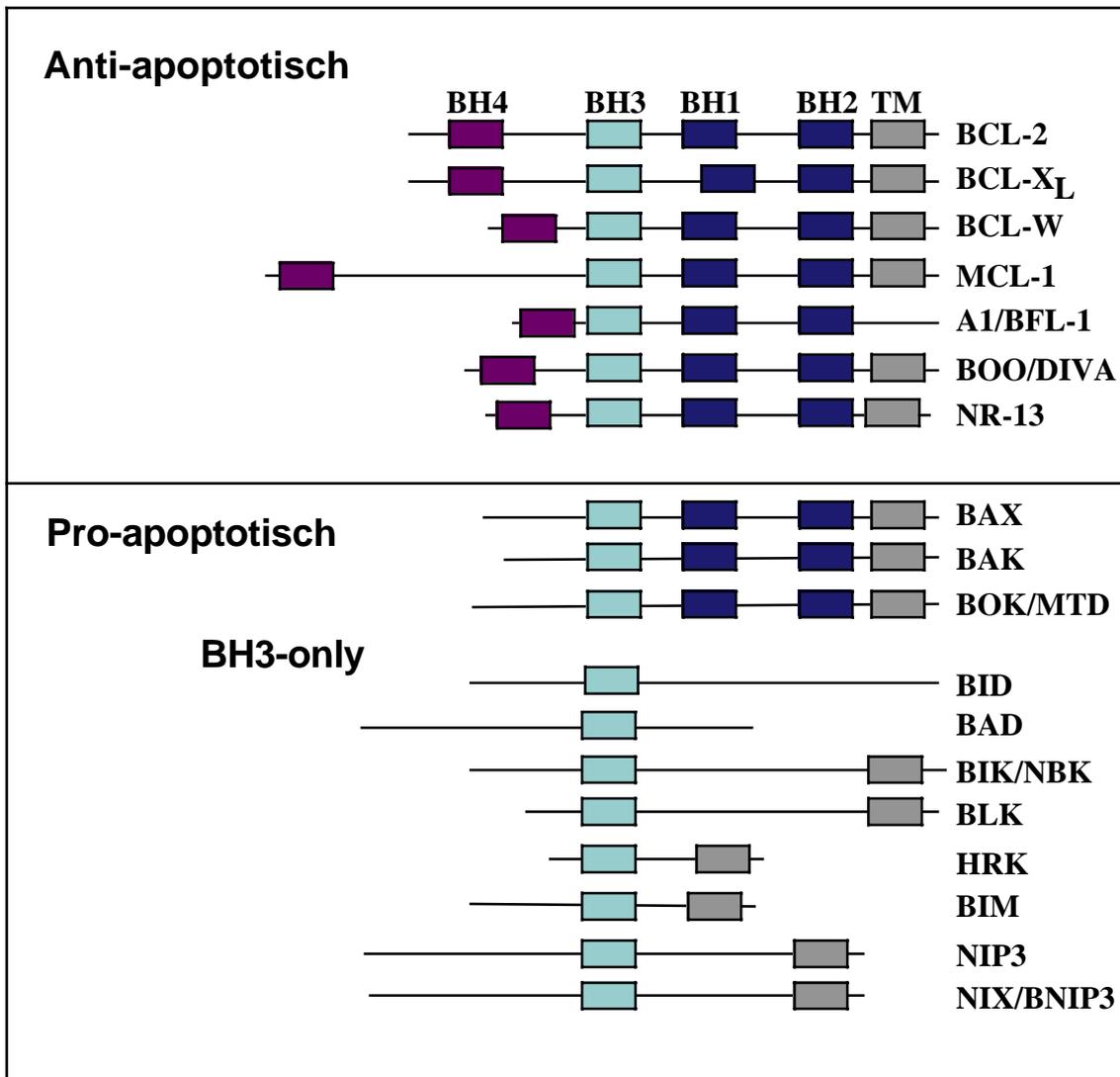


Abb 1.5 Übersicht der Mitglieder der Bcl-2-Familie. Die Bcl-2-Proteine enthalten bis zu vier Bcl-2-Homologie-Domänen (BH1-4), einige verfügen über eine hydrophobe Transmembrandomäne (TM). Die Bcl-2-Familie besteht aus anti- und proapoptotischen Mitgliedern, wobei die proapoptotischen Proteine in Multi-BH-Domänen-Proteine und BH3-only-Proteine unterteilt werden. Nach Gross *et al.*, 1999.

Bcl-2-Proteine weisen auffällige strukturelle Ähnlichkeiten zu kanalbildenden, bakteriellen Proteinen wie Diphtherietoxin und Colicinen auf. Sowohl pro- als auch antiapoptotische Bcl-2-Mitglieder können in synthetischen Lipidmembranen Kanäle bilden (Muchmore *et al.*, 1996, Suzuki *et al.*, 2000). Unter physiologischen Bedingungen hingegen scheinen nur die proapoptotischen Mitglieder, z.B. Bax und Bak, dazu in der Lage zu sein (Antonsson *et al.*, 2001). Auf bisher noch nicht bekannte Weise könnten solche Kanäle die äussere

Mitochondrienmembran im Rahmen der Apoptoseinduktion permeabel für Cytochrom c und andere Intermembranraumproteine machen und so die Caspasen-Kaskade aktivieren. Gibt man bakteriell exprimiertes Bax zu isolierten Mitochondrien, so führt dies zur Freisetzung von Cytochrom c, während Bcl-2 und Bcl-xL dieses Phänomen verhindern. Diese prinzipiellen pro- bzw. antiapoptotischen Funktionen lassen sich sogar demonstrieren, wenn die entsprechenden Proteine in Hefezellen exprimiert werden (Jürgensmeier *et al.*, 1994, Yang *et al.*, 1997, Manon *et al.*, 1997). In liposomalen Membranen kann rekombinant hergestelltes Bax-Protein einen Homotetramer bilden und so für die Freisetzung von Cytochrom c sorgen (Saito *et al.*, 2000). In normalen Zellen liegt Bax grösstenteils als Monomer im Zytoplasma vor. Nach einem Apoptosestimulus transloziert das Protein in die äussere Mitochondrienmembran und bildet dort Dimere bzw. Oligomere, evtl. unter Beteiligung von Bak; ein Hinweis auf eine mögliche Kanalbildung *in vivo* (Wolter *et al.*, 1997, Antonsson *et al.*, 2001, Nechushtan *et al.*, 2001). Die zentrale Rolle dieser beiden Proteine für die Apoptoseregulation wird durch ‘knockout’-Experimente belegt: Mäuse, denen Bax und Bak fehlen, sind gekennzeichnet durch schwere Entwicklungsdefekte und die Ansammlung überschüssiger Zellen im hämatopoietischen System und im Gehirn. Zellen aus diesen Tieren sind insensitiv gegenüber apoptotischer Stimuli wie Staurosporin und UV-Strahlung, und auch die Überexpression proapoptotischer BH3-only Proteine löst keine Apoptose-Antwort aus – ein Hinweis auf ihre Rolle ‘upstream’ von Bax/Bak in der Signalkaskade des Bcl-2-vermittelten Zelltodes (Lindsten *et al.*, 2000, Wei *et al.*, 2001).

1.2.9.2 BH3-only Proteine als Vermittler apoptotischer Signale

Die Aktivierung der zentralen Multi-BH-Domänenproteine Bax und Bak wird von den ‘BH3-only’-Proteinen geleistet. BH3-only Proteine lokalisieren aufgrund apoptotischer Stimuli zu den Mitochondrien und verändern dort wahrscheinlich durch direkte Interaktion mit antiapoptotischen Mitgliedern wie Bcl-2 oder Bcl-x_L die Zusammensetzung von Dimer- bzw. Oligomerkomplexen (vgl. 1.2.9) (Gross *et al.*, 1999, Wang, 2001). Die daraus resultierende Verfügbarkeit von Bax und/oder Bak in mitochondrialen Membranen könnte dann die Kanalbildung ermöglichen. Alternativ zu diesem ‘Kompetitionsmodell’ kann tBid

offensichtlich eine proapoptotische Konformationsänderung von Bax auslösen (Eskes *et al.*, 2000, Antonsson *et al.*, 2001).

Die BH3-only Proteine spielen eine essentielle Rolle bei der Vermittlung verschiedenster apoptotischer Signale. Bad wird beispielsweise während des IL-3-induzierten Signalwegs durch die Proteinkinase Akt phosphoryliert und anschliessend durch Assoziation mit 14-3-3 Proteinen inaktiviert. Der Entzug des z.B. für viele hämatopietische Zellen wichtigen Wachstumsfaktors IL-3 führt zur Freisetzung von Bad und zur Assoziation mit Bcl-2 und mitochondrialer Apoptoseinduktion (Datta *et al.*, 1997, Del Peso *et al.*, 1997). Die Zelltodsignaltransduktion durch DISC-gekoppelte Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie resultiert in der proteolytischen Aktivierung von Bid durch Caspase-8 und der sukzessiven Aktivierung von Bax (s.o.). Andere BH3-only-Mitglieder wie Bmf und Bim sind über Adaptoren mit Komponenten des Zytoskeletts wie Mikrotubuli und Aktin verbunden. Apoptosesignale, wie der Verlust der Substratadhäsion der Zelle, führen z.B. zur Freisetzung von Bmf und zur apoptotischen Aktivierung von Mitochondrien (Puthalakath *et al.*, 1999, Puthalakath *et al.*, 2001). Die Mitglieder Noxa und Puma wurden als p53-induzierbare Gene beschrieben, was eine Rolle bei der Zelltodinduktion durch DNA-Schädigung nahelegt (Oda *et al.*, 2000, Nakano & Wousden, 2001). Die BH3-only Proteine werden heute als zelluläre Sensoren für eine Vielzahl von Todessignalen angesehen, die ihre Rolle vor allem durch Interaktion mit pro- und antiapoptotischen Multidomänen-Bcl-2-Mitgliedern erfüllen.

Die molekulare Wirkungsweise solcher Familienmitglieder, etwa Bax und Bcl-2, bei der Beeinflussung der mitochondrialen Apoptoseinduktion ist noch nicht verstanden. Diese beiden positiven und negativen Modulatoren des Zelltodprogramms scheinen jedoch auch aktivierend und inhibitorisch auf einen mitochondrialen Proteinkomplex zu wirken, der in den letzten Jahren ein Schwerpunkt der mitochondrialen Apoptoseforschung geworden ist.

1.2.10 Die "permeability transition pore" (PTP)

Ein auffälliges Charakteristikum apoptotischer Zellen ist der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, $\Delta\Psi_m$. Haworth und Hunter konnten in einem *in vitro*-Modell für Zellschädigung durch Sauerstoffmangel zeigen, dass isolierte Mitochondrien durch einen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration ($> 1\mu\text{M}$) und einem Absinken des ATP/ADP-Quotienten permeabel für Moleküle bis 1,5 kD werden ("permeability transition", PT), also die zentrale

Barrierefunktion der inneren Membran zerstört wird (Haworth & Hunter, 1979). Importexperimente legen die Existenz einer Pore mit einem Durchmesser von 1,5-2 nm nahe, die sich offensichtlich unter zellulären Stressbedingungen öffnet und dadurch das Potenzial über die innere Mitochondrienmembran zerstört. Mittlerweile ist klar, dass der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials durch vielfältige Zelltod-Stimuli ausgelöst wird (s. Tabelle 1.1.10). Im Zusammenhang mit dieser postulierten ‚permeability transition pore‘ wurde häufig das Anschwellen von Mitochondrien beobachtet. Da die innere Membran mit ihrer Cristae-Struktur eine grosse Oberfläche besitzt, führt die Ausdehnung der Matrix so zur Ruptur der äusseren Membran und dem Entlassen von Intermembranproteinen in das Zytoplasma. Die PTP-Aktivierung und der Verlust von $\Delta\Psi_m$ leiten ausserdem den Verlust der biochemischen Homöostase der Zelle ein: Die ATP-Herstellung wird gestoppt, Redox-Moleküle wie NADH, NADPH und Gluthathion werden oxidiert, radikale Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) vermehrt gebildet (Kroemer *et al.*, 1997, Kroemer & Reed, 2000, Boya *et al.*, 2001). Hohe Konzentrationen von ROS wiederum führen zur direkten Oxidation von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren und können im Rahmen eines positiven Feedbacks ihrerseits zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führen. (Marchetti *et al.*, 1997; Mirkovic *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1995; Guénael *et al.*, 1997).

Die Expression von Bcl-2 und/oder Bcl-x_L verhindert die ROS-Produktion, stabilisiert $\Delta\Psi_m$, evtl. durch Regulation des Protonenflusses, und ermöglicht ATP-Produktion. Diese Inhibition der PTP-Induktion wurde in vielen Apoptosemodellen beobachtet. Bax scheint mit Komponenten der PTP wie ANT und VDAC zu interagieren und ist teilweise durch PTP-Inhibitoren hemmbar (Kane *et al.*, 1993, Hockenberry *et al.*, 1997, Pastorino *et al.*, 1998, Shimizu *et al.*, 1998, Vander Heiden *et al.*, 1999). Die Kontrolle der PTP durch Bcl-2 gilt gemeinhin als gesichert, während der aktivierende Einfluss proapoptotischer Bcl-2-Gene eher schwach belegt ist (vgl. 1.2.13).

Zelltyp	Stimulus
Neuronen	Entzug von Nerve growth factor (NGF) Glutamat
Fibroblasten	p53-Aktivierung durch SV-40 large T-Antigen
T-Zellen	Dexamethason
Hepatozyten	TNF- α
Thymozyten	anti-FAS γ -Strahlung Positive und negative Selektion

Tabelle 1.1.10 Ausgewählte Apoptose-Modelle in denen das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi_m$ zerstört wird, bevor es zur Fragmentierung der nukleären DNA kommt, verändert nach Kroemer *et al.*, 1997.

1.2.10.1 Vermutete, strukturelle Komponenten der PTP

1.2.10.1.1 Der Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT)

Der Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) ist das häufigste Protein der inneren Mitochondrienmembran, verantwortlich für den Export von ATP im Antiport gegen ADP. ANT funktioniert nach dem "gated pore"-Mechanismus und wechselt dabei zwischen zwei verschiedenen Konformationen, die durch Substratbindung auf der zytoplasmatischen ("c-state") und der Matrix-zugewandten Seite ("m-state") gekennzeichnet sind (Klingenberg *et al.*, 1984).

Bereits die initialen Untersuchungen der PT-Pore legten eine Verbindung von ANT mit der Permeabilisierung der inneren Mitochondrienmembran nahe, da die Ca^{2+} -induzierte PT *in vitro* durch ATP revertiert werden kann. ANT-Liganden, die den "c-state" stabilisieren, wie Pyridoxalphosphat und Atractylosid induzieren PT in isolierten Mitochondrien. Bongkrekssäure, ein Exotoxin aus *Pseudomonas cocovenenans*, stabilisiert den "m-state" von ANT und verhindert PT in vielen mitochondrialen Apoptose-Modellen (Le Quoc & Le Quoc, 1988, Kroemer & Reed, 2000, Belzacq *et al.*, 2002). Es scheint somit zwei verschiedene ANT-Konformationen zu geben: Eine 'metabolische' ADP/ATP-Transport-Konformation und eine 'apoptotische' Poren-Konformation, die die freie Diffusion von Kationen durch die innere Mitochondrienmembran ermöglicht (s. Abb. 1.6). In Liposomen

rekonstituiertes ANT-Protein kann durch die Kombination von Ca^{2+} und Atractylosid reversibel in eine Kationen-spezifische Pore umgewandelt werden, deren Aktivität offensichtlich *in vitro* durch die Bcl-2-Gene Bax und Bcl-2 moduliert werden kann (Brustovetsky *et al.*, 1996, Ruck *et al.*, 1998, Brenner *et al.*, 2000). ANT könnte somit die prinzipielle Porenkomponente der PTP darstellen, die bei Öffnung den Einstrom von Protonen in die mitochondriale Matrix ermöglicht und so den Verlust des Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ auslöst. Die Isoform ANT-1 ist im apoptotisch geschädigten Myokard von DCM-Patienten überexprimiert, ein Hinweis auf eine mögliche pathophysiologische Rolle einer PTP-Komponente (vgl. 1.2.2).

1.2.10.1.2 Der "Voltage Dependent Anion Channel" (VDAC)

Die klassische Aufreinigung von ANT erfolgt durch Hydroxyapatit-Säulen-Chromatographie solubilisierter Mitochondrien. Analysiert man die so isolierten Proteinfractionen, so lässt sich typischerweise VDAC, auch Porin genannt, nachweisen (Block *et al.*, 1986a, Knirsch *et al.*, 1989). VDAC stellt eine unselektive, wässrige Pore in der äusseren Mitochondrienmembran dar, durch die gelöste Metabolite und Ionen Zugang zu den spezialisierten Transportsystemen der inneren Mitochondrienmembran erhalten. VDAC-ANT-Komplexe verbinden so wahrscheinlich die innere und äussere Mitochondrienmembran zu sog. "contact sites". Diese im EM-Bild sichtbaren Strukturen zeigen eine enge Annäherung der beiden mitochondrialen Membranen. Bisher ist noch ungeklärt, inwieweit sie mit der PT-Pore identisch sind. In Liposomen oder planaren Lipidschichten rekonstituierte Proteinkomplexe, die VDAC und ANT beinhalten, zeigen die Charakteristika der PT-Pore bezüglich Ca^{2+} /Atractylosid (Beutner *et al.*, 1996).

1.2.10.1.3 Cyclophilin D (CypD)

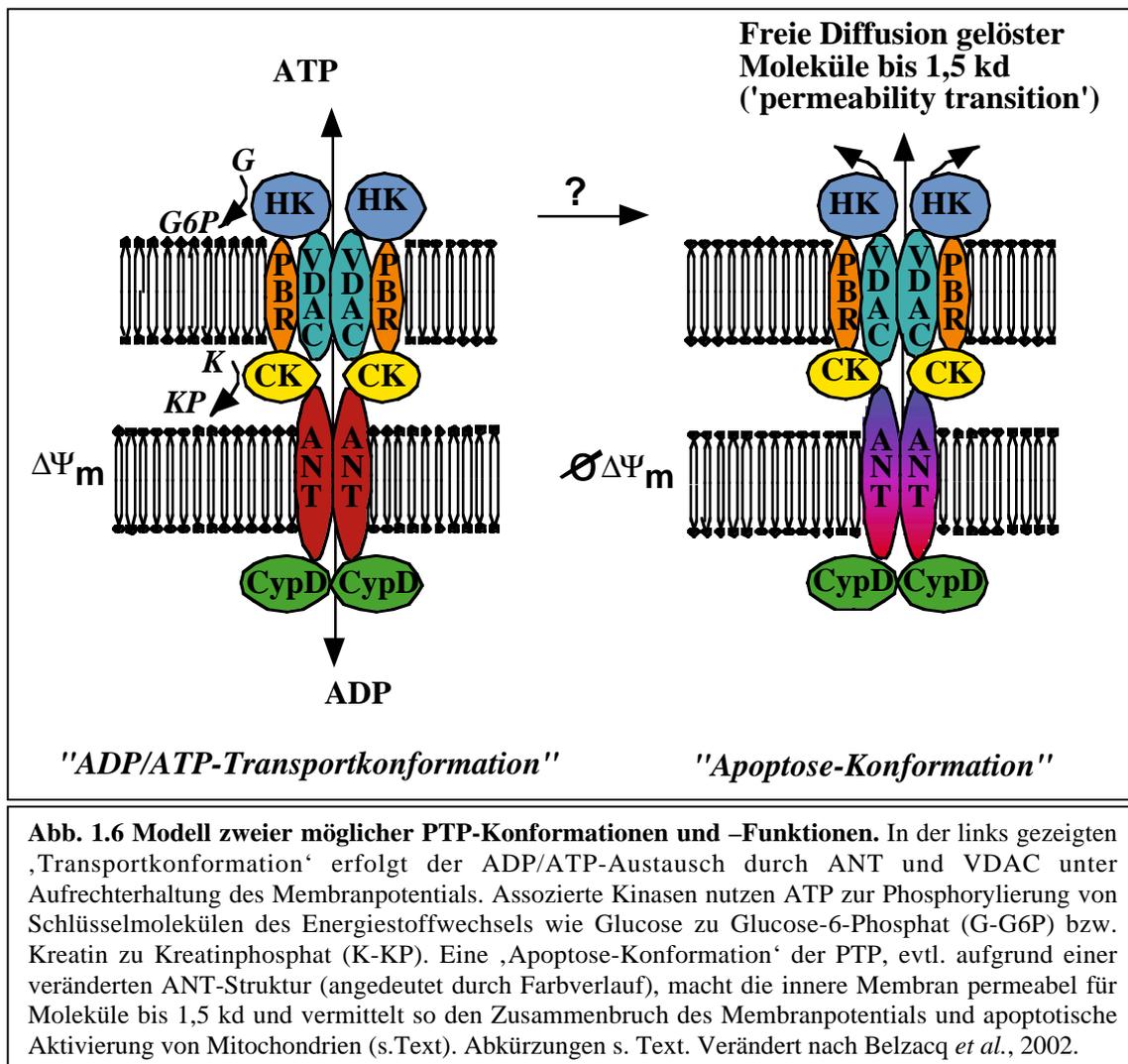
Cyclophilin D ist ein Chaperon, das in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist. Die Cyclophiline sind eine Proteinfamilie, die die cis-trans-Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen in Proteinen katalysieren (PPIasen) und so wahrscheinlich deren dreidimensionale Struktur beeinflussen. PPIasen existieren auch im Zytoplasma (CypA), und dem ER (CypB und C). Cyclophiline haben ihren Namen, weil sie an Cyclosporin A (CsA) binden, ein Undekapeptid aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* (Galat & Metcalfe,

1995). Die Bindung von CsA inhibiert die PPIase-Aktivität von Cyclophilinen. In Versuchen mit isolierten Mitochondrien konnten Crompton und Kollegen zeigen, dass die durch Ca^{2+} und oxidativen Stress ausgelöste PT durch CsA gehemmt werden konnte. Dies wurde mittlerweile für zahlreiche Modelle mitochondrial initiiertes Apoptose bestätigt und rückte das mitochondriale CypD als CsA-Rezeptor in den Blickpunkt der PTP-Forschung (Crompton *et al.*, 1988, Kroemer & Reed, 2000, Halestrap *et al.*, 2002).

Experimente mit solubilisierten Mitochondrien und GST-CypD-Affinitätssäulen zeigten, dass Cyclophilin D einen Komplex aus zwei Proteinen, ANT und VDAC band. Cyclophilin D bindet dabei offensichtlich an ANT, wie vergleichbare GST-CypD-"Pull-down"-Experimente mit solubilisierten inneren Mitochondrienmembranen vermuten liessen. Diese Interaktion konnte durch oxidative Stressbedingungen wie Diamid-Behandlung verstärkt werden und erwies sich als inhibierbar durch CsA (Woodfield *et al.*, 1998). Ein in Liposomen rekonstituiertes, ternäres Komplex aus VDAC, ANT und CypD zeigte die typischen Charakteristika der PT-Pore bezüglich Ca^{2+} -Sensitivität und BA- bzw. CsA-Hemmbarkeit und wird von einigen Autoren als ‚Kernkomplex‘ der PTP angesehen (Crompton *et al.*, 1998). Weitere Proteine scheinen eine Rolle bei der molekularen Zusammensetzung der PT-Pore zu spielen.

1.2.10.2 Ein Modell der PT-Pore

Für verschiedene Proteine wurde gezeigt, dass sie mit dem VDAC/ANT-Komplex aufgereinigt werden, bzw. direkte Protein:Protein-Interaktionen eingehen. In Abhängigkeit von ihrer enzymatischen Aktivität bindet die zytoplasmatische *Hexokinase* (HK) an VDAC/ANT-Komplexe, und Immunogold-EM-Experimente zeigen eine starke Anreicherung der Kinase in ‚contact sites‘. Das Hexokinase-Substrat Glucose verhindert die PT-Induktion in Liposomen-Modellen mit rekonstituierten PTP-Komplexen (Wilson 1995, Beutner *et al.*, 1998). Die mitochondriale *Kreatinkinase* (mtCK) wiederum wurde zusammen mit VDAC/ANT/HK-Komplexen aus mitochondrialen Membranen aufgereinigt, und ihr Substrat Kreatin kann Ca^{2+} /Atractylosid-induzierte PT in isolierten Mitochondrien inhibieren (O’Gorman *et al.*, 1997, Beutner *et al.*, 1998). Durch Immunpräzipitation konnten Marzo *et al.* mit einem Antikörper gegen die Hexokinase einen Komplex aus solu-



bilisierten Mitochondrien isolieren, der neben VDAC, ANT und CK auch den peripheren Benzodiazepin-Rezeptor (PBR) enthält (Marzo *et al.*, 1998b). Liganden des PBR wie Protoporphyrin IX sind in der Lage PT auszulösen (Kroemer *et al.*, 1997). Die PTP setzt sich also möglicherweise aus Proteinen des Zytoplasmas, der äusseren mitochondrialen Membran, des Intermembranraums, der inneren mitochondrialen Membran sowie der Matrix zusammen. Interessanterweise sind viele der möglichen PTP-Komponenten wichtige Faktoren des zellulären Energiehaushalts: Die Kreatinkinase kann das durch ANT verfügbar gemachte ATP nutzen, um Kreatin zu phosphorylieren. Phosphokreatin wird durch VDAC ins Zytoplasma transportiert und ist dort leichter diffusibel als Adeninnukleotide. Zytoplasmatische CK-Isoformen können Phosphokreatin nutzen um z.B. lokale ATP-Konzentration in Mikrokompartmenten mit hohem Energieverbrauch

aufrechtzuerhalten (Rossi *et al.*, 1990, Korge *et al.*, 1993). VDAC transportiert von ANT angeliefertes ATP ins Zytoplasma, wo es von der Hexokinase zur Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat genutzt wird, dem Beginn der Glykolyse (Rostovtseva & Colombini 1997). Spiegelbildlich zu dieser vitalen Nukleotidtransport-Aufgabe scheint der Komplex auch eine ‚Apoptose-Konformation‘ einnehmen zu können, die verantwortlich für den Zusammenbruch des Membranpotentials und für die sukzessive Freisetzung mitochondrialer Proteine und die Caspase-Aktivierung ist. Vielfache Hinweise auf eine mögliche Rolle von ANT-1 als prinzipielle Porenkomponente der PTP in der inneren Mitochondrien-Membran beruhen meist auf vermuteten Konformations-änderungen des Transporters (vgl. Abb. 4.6).

1.2.10.3 Regulation der PTP

Offensichtlich spielt die PTP eine zentrale Rolle als Ca^{2+} -Sensor für die Versorgungs- und Energiesituation der individuellen Zelle, da z.B. die Oxidation von Reduktionsequivalenten, die ATP-Hydrolyse sowie der Mangel an Glucose und Kreatin zur PTP-Aktivierung führen (s.o.). Beeinträchtigungen der mitochondrialen Energiegewinnung, etwa die Hemmung des Komplex I der Atmungskette, eine Reduktion von $\Delta\Psi_m$ und die damit verbundene Alkalisierung der mitochondrialen Matrix aktivieren ebenfalls die PTP und sind ein weiterer Beleg für eine ‚Wächter‘-Rolle dieses Proteinkomplexes im Rahmen des Metabolismus von Zellen (Higuchi *et al.*, 1998, Kroemer & Reed, 2000). Die Sensitivität der PTP gegenüber Ca^{2+} weist auf das ER als möglichen Ausgangspunkt apoptotischer Stimuli hin. Auch andere durch zytotoxischen Stress aktivierte, "second messenger" wie ROS (s.o.) und Stickstoffmonoxid (NO) induzieren PT. Unabhängig von Ca^{2+} aktivieren Moleküle des Lipidstoffwechsels wie Palmitat, Ceramide und Gangliosid GD3 auf bisher unbekannte Weise die PTP, evtl. durch unspezifische Permeabilisierung der inneren Mitochondrienmembran. Eine Reihe verschiedener Proteine ist in der Lage den Zusammenbruch von $\Delta\Psi_m$ und die Freisetzung von Cytochrom c zu induzieren. Neben Bax und Bak (s.o.) wird eine direkte PTP-Aktivierung auch für tBid vermutet (Li *et al.*, 1998). Antiapoptotische Familienmitglieder wie Bcl-2 und Bcl-xL scheinen in der Lage zu sein, die PTP-Aktivierung in vielen Apoptosemodellen zu hemmen, wobei vermutet wird, das

Bcl-2 - und auch Bax - direkt mit ANT interagieren (Marzo *et al.*, 1998, Jacotot *et al.*, 2001).

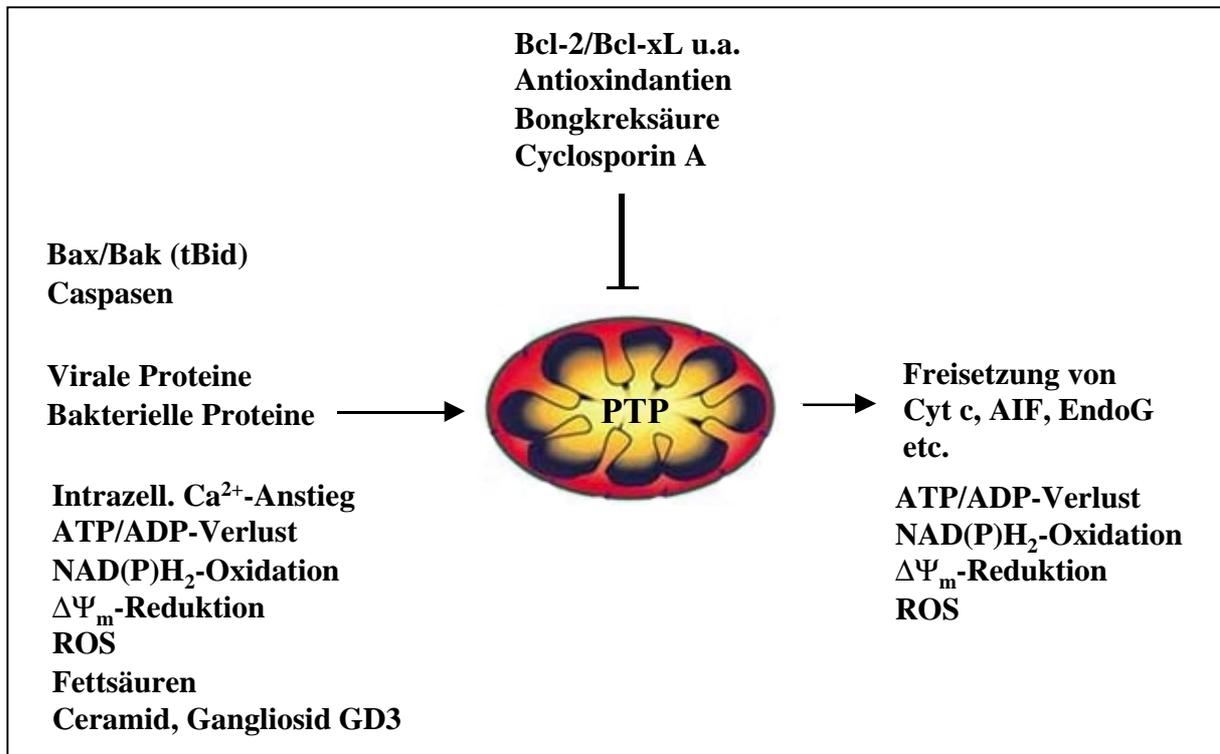


Abb 1.7 Modulation der PTP durch vielfältige Stimuli. Modifiziert nach Kroemer & Reed, 2000.

Pathogene aus Viren und Bakterien modulieren die PTP-Aktivität als Bestandteil ihrer parasitären Strategie. Das PorinB-Protein aus *Neisseria meningitidis* induziert das Anschwellen isolierter Mitochondrien und Cytochrom c-Freisetzung, was ebenso für das VacA-Protein aus *Helicobacter pylori* gilt. Weil Viren auf den Metabolismus ihrer jeweiligen Wirtszelle angewiesen sind, profitieren sie von der Vermeidung der Apoptose-Induktion. Das M11L-Protein des Myxoma-Virus und das vMIA-Protein des Cytomegalie-Virus verhindern PT, im letzteren Fall wahrscheinlich durch Interaktion mit ANT (Jacotot *et al.*, 2000, Boya *et al.*, 2001). Virale Proteine können jedoch durchaus auch PT auslösen, wie beispielsweise das viral protein R (Vpr) aus HIV-1, von dem ebenfalls angenommen wird, dass es mit ANT interagieren kann. Weiterhin moduliert eine Vielzahl von Naturstoffen, (z.B. Betulinsäure) und Chemikalien, (z.B. Thiolreagenzien) die Aktivität der PTP auf grösstenteils noch unbekanntem Art (Belzacq *et al.*, 2002).

Die vielfältigen Signale, die die PTP aktivieren und so Zelltod auslösen positionieren diesen Proteinkomplex als elementaren intrazellulären Schalter für Leben/Tod-Entscheidungen. Dies gilt insbesondere, als die PT innerhalb der Zelltod-Signaltransduktion oftmals als ‚point of no return‘ angesehen wird (Kroemer & Reed, 2000).

1.3 Ziele der Arbeit

Da erst ein Teil der Proteine bekannt sein dürfte, die unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen an der Apoptoseinduktion beteiligt sind, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, neue Komponenten von Apoptosewegen zu identifizieren und zu beschreiben. Hierzu sollte ein von Grimm und Leder entwickelter genetischer Expressions*screen* angewendet werden, der die rasche Untersuchung ganzer cDNA-Bibliotheken erlaubt. Er beruht auf der transienten Transfektion von Einzelplasmiden einer normalisierten Maus-cDNA-Bibliothek in humane Nierenzellen (HEK 293T) mit anschließender phänotypischer Analyse apoptotischer Veränderungen. Dieses halbautomatisierte Verfahren erlaubt die vergleichsweise zeitsparende Analyse vieler cDNAs und nutzt den Umstand aus, dass zahlreiche an der Zelltodregulation beteiligte Proteine in der Lage sind, bei Überexpression dominant Apoptose zu induzieren (z.B. Caspase-2 oder Bax) (Grimm & Leder, 1997).

Von den aus diesem *screen* erhaltenen Klonen, die bei Überexpression proapoptotisch wirkten, wurde eine cDNA ausgewählt, die extrem schnell und effizient Zelltod auslöste. Die Sequenzierung ergab, dass die cDNA für den Adenin-Nukleotid-Translokator-1 (ANT-1) kodiert, eine Komponente der "permeability transition pore" (PTP). Zahlreiche Untersuchungen in den letzten Jahren haben gezeigt, dass verschiedenste Stimuli auf diesen Proteinkomplex wirken, was zur sukzessiven, apoptotischen Aktivierung von Mitochondrien und der Initiation verschiedener intrazellulärer Zelltod-Signalwege, wie z.B. der Caspasen-Kaskade, führt. Zum einen scheinen viele bekannte Zelltodsignale, z.B. Liganden von Todesrezeptoren, die PTP zu aktivieren. Andererseits wurde mehrfach gezeigt, dass Zelltod ausgelöst durch virale und bakterielle Genprodukte und andere pathogene Stimuli

ebenfalls auf der Aktivierung dieses wichtigen, mitochondrialen Proteinkomplexes beruhen.

Die molekulare Zusammensetzung und die Aktivierung der PTP ist bisher nur wenig verstanden. In dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, wie die Überexpression der PTP-Komponente ANT-1 Apoptose auslöst. Eine Fragestellung, die vor dem Hintergrund von ANT-1-Überexpression im Myokard von DCM-Patienten evtl. auch klinische Relevanz hat. Zum einen sollten so neue Erkenntnisse über die Zusammensetzung der PTP gewonnen werden, insbesondere inwieweit vermutete Faktoren der PTP an diesem Phänomen beteiligt sind und/oder es beeinflussen können. Zum anderen sollten so Grundlagen für ein besseres Verständnis der PTP-Aktivierung erarbeitet werden, was ein Ausgangspunkt für weiterführende Studien über die Rolle des Proteinkomplexes in verschiedenen Zelltod-Signalwegen sein könnte.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, München
Bacto Agar	Roth, Karlsruhe
Bacto Trypton	Roth, Karlsruhe
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bongkrexsäure	Prof. Duine, Gent, B
Borsäure	Sigma, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Riedel-de Haen, Seelze
Chloroquin	Sigma, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, München
Doxorubicin	Sigma, München
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, München
Ethanol	Sigma, München
Ethidiumbromid	Riedel-de Haen, Seelze
Etoposid	Sigma, München
Formaldehyd	Riedel-de Haen, Seelze
Glycin	Sigma, München
Glycerin	Sigma, München
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Sigma, München
β -Mercaptoethanol	Sigma, München
Methanol	Roth, Karlsruhe
MOPS	Sigma, München

Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Nonidet P-40	Sigma, München
Phenol	Gibco BRL, Eggenstein
Ponceau S	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma, München
Siliziumdioxid	Roth, Karlsruhe
Streptomycin	Sigma, München
TEMED	Sigma, München
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, München

2.2 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')
ANT-1 HA	TCAGGATCCTTTCAGCATGGGGGATCAG TAGTGCATGCGGCCGCCACATATTTTTTGATCTCATC
ANT-2 HA	TCAGGATCCTTTC AACATGACAGATGC TAGTGCATGCGGCCGCCTGTGTATTTCTTGATCTCATC
ANT-1 wt	TCAGGATCCTTTCAGCATGGGGGATCAG TAGTGCATGCGGCCGCTTACACATATTTTTTGATCTCAT
ANT-1 K23A	GCCGTCTCCGCGACGGCGGTC GACCGCCGTCGCGGAGACGGC
ANT-1 K33A	AGAGGGTCGCCCTGCTGCTG CAGCAGCAGGGCGACCCTCT
ANT-1 R80A	ACGTGATCGCGTACTTCCCC GGGGAAGTACGCGATCACGT
ANT-1 D135S	ACCCGCTGTCCCTTGCTAG CTAGCAAGGGACAGCGGGT
ANT-1 R236I	ACTGTTTCGTATTAGGATGATG CATCATCCTAATACGAACAGT
ANT-1 R237I	GTTCGTCGTATCATGATGATG CATCATCATGATACGACGAAC
ANT-1 del 201	TCAGGATCCTTTCAGCATGGGGGATCAG

Name	Sequenz (5' → 3')
ANT-1 del 142	TCAGGATCCTTTCAGCATGGGGGATCAG
ANT-1 del 102	TCAGGATCCTTTCAGCATGGGGGATCAG
ANT-1-248	TCAGGATCCTTTCAGCATGGGGGATCAG TAGTGCATGCGGCCGCCTACAGCCCCTTCCGGCCAG
ANT-2-248	TCAGGATCCTTTCACATGACAGATGC TAGTGCATGCGGCCGCCTACAGTTCCTTTGCGTCCA
ANT-1 ex 15 ANT-2	GGCGGCGGGGATTCCACCGGCCAA ATCGCCGCGCCGT
ANT-1 ex 67 ANT-2	CCCTCCAGAAAGAGAGGACTCCCTGTTCCCT CTCTCTTTCTGGAGGG
ANT-1 ex 105 ANT-2	AGTAGCGCCAGAAGTGGGTCCTCTTGTCACAC CAGTTCTGGCGCTACT
ANT-1 ex 151 ANT-2	CCCAGCCCATTGAATTCTCGTTCAGC CGAGAATTCAATGGGCTGGG
ANT-1 ex 170 ANT-2	CCTGGTAGAGACCCTTAATCCCTACAGATTTGTAG AAGGGTCTCTACCAGG
ANT-1 ex 227 ANT-2	GTGTCAAACGGATAGGAAGTCAGGCCAGCGAC TCCTATCCGTTTGACAC
CYP-D wt	GCGGATCCC CGCATGCTGGCGCTGGCGTGCGGC AAGAATGCGGCCCGCTCAACTGGCCACAGTCTGTGATGAC
CYP-D HA	GCGGATCCC CGCATGCTGGCGCTGGCGTGCGGC AAGAATGCGGCCCGCTCAACTGGCCACAGTCTGTGATGAC
M-EYFP-CYP-D 1-35	TCAGGATCCGCCCGCATGCTGGCG AGGAGCGGGAACGAGTGGCCGGAGCCCTTGCTG
M-EYFP-CYP-D 31-207	GCGGCCTCGGGAACGACTTGTACAGCTCGTCCATG TAGTGCATGCGGCCGCCTTAGCTCAACTGGCCACAG
ECFP/EYFP	CCGCTCGAGAGTGAGCAAGGGCGAGGA GCTCTAGACTACTTGTACAGCTCGTCCAT
CYP-D R97A	ACCTTCCACGCGGTGATCCCT AGGGATCACCGCGTGAAGGT
CYP-D H168Q	GATGGCAAGCAGGTTGTGTTC GAACACAACCTGCTTGCCATC
GST-CYP-D	TAGGGATCCAGCAAGGGCTCCGGC ATAAGAATGCGGCCGCTTAGCTCAACTGGCCAC
BDR	ATCGGATCCAATCACCATGCCTGAATC TAGTCGGTGCGGCCGCCCTCTGGGAGCCGG
VDAC I	TCAGGATCCGAGAACATGGCCGTG TAGTGCATGCGGCCGCCTGCTTGAAATTCCAGTCC
CK	TCAGGATCCCAAGCCATGGCTGGT TAGTGCATGCGGCCGCCTGTTTGCTGTGGACAA
tBID	CGGGATCCTTGTGCCATGGGCAGCCAGGCCAGCC TAGTGCATGCGGCCGCCGTCATCTCGTTTCTAACC
COX I-Sonde	TCTAAGCCTCCTTATTCCG CTCAGAGCACTGCAGCAG
β-Actin-Sonde	GGCGGACTATGACTTAGT TAAGGTGTGCACTTTTATTCA

2.3 Enzyme und „Kits“

2.3.1 Restriktionsenzyme

Bam HI	Roche, Mannheim
Not I	Roche, Mannheim
Xho I	New England Biolabs, Schwalbach
Hind III	New England Biolabs, Schwalbach
Eco RI	Roche, Mannheim

2.3.2 Weitere Enzyme

DNase, RNase frei	Roche, Mannheim
Lysozym	Serva, Heidelberg
T ₄ -DNA Ligase	Pharmacia, Freiburg
RNase A	Qiagen, Hilden
Polynukleotidkinase	New England Biolabs, Schwalbach
Zymolyase	Seikagaku Kogyo, Tokio

2.3.3 „Kits“

BioRad Protein Microassay	BioRad, München
ECL-Kit „Femto“	Perbio, Heidelberg
Superscript II cDNA-Synthese Kit	Roche, Mannheim
Qiagen Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Gel-Extraktions-Kit	Qiagen, Hilden
Long Template PCR Kit	Roche, Mannheim
Rediprime labeling kit	Roche, Mannheim
Cell Death Detection ELISA	Roche, Mannheim

2.4 DNA-Längenstandards

100 bp DNA-Leiter	Gibco BRL, Eggenstein
1 kb DNA-Leiter	Gibco BRL, Eggenstein

2.5 Antikörper

Anti-HA	Roche, Mannheim
Anti-HA High affinity	Roche, Mannheim
Anti-myc	Roche, Mannheim
Anti-COX I (Cytochrom Oxidase I)	Research Diagnostics, NJ, USA
Anti-Tim 23	BD Transduction, Heidelberg
Anti-Cyclophilin D	Dianova, Hamburg
Anti mouse IgG, HRP-gekoppelt	Pharmacia, Freiburg
Anti rat IgG, HRP-gekoppelt	Pharmacia, Freiburg
Anti rabbit IgG, HRP-gekoppelt	Pharmacia, Freiburg

2.6 Proteinase-Inhibitoren

Proteaseinhibitor-Cocktail „Complete“	Roche, Mannheim
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, München

2.7 Plasmide

Die für die Arbeit verwendeten Vektoren sind im folgenden aufgelistet:

pcDNA3	Expressionsplasmid für Säugerzellen. DNA-Fragmente können in eine Multiple Klonierungsstelle inseriert werden und stehen dadurch unter der Kontrolle eines Blumenkohl Mosaik Virus-Promoters (CMV). Größe: 4,2 kb (Invitrogen, Heidelberg)
pcDNA3Δ	Wie pcDNA3, das Neomycin-Resistenzvermittelnde Gen wurde durch Retriktionsverdau deletiert.

pHA	Vektor zur Klonierung von C-terminalen HA-Fusionsproteinen. Hergestellt durch NotI/XbaI Insertion eines Oligonukleotides, kodierend für des immunogene Epitop des Häm-agglutinin-Proteins des Influenza-Virus (YPYDVPDYA).
pMyc	Wie pHA, hier zur Herstellung von C-terminalen Myc-Epitop-Fusionsproteinen (EQKLISEEDL).

2.8 Puffer und sonstiges

2.8.1 Gebräuchliche Puffer und Lösungen

5x TAE-Puffer: für die Agarose-Gelelektrophorese	450 mM Tris pH 8.0 10 mM EDTA
10xLaufpuffer für SDS-PAGE	250 mM Tris pH 6,8 1,9 M Glycin 1% SDS
20xSSC	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat mit 10 N NaOH auf pH 7,0
10x PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄

10xTBS	150 mM NaCl 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
10xTBST	TBS mit 0,5% Tween 20

Weitere in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sind an entsprechender Stelle angegeben.

2.8.2 Sonstiges

Geräte	Hersteller
Brutschränke & Inkubatoren, Inkubationsschüttler: Elektrophoresekammern: Power-Supply f. d. Gelelektrophorese: Electrophoresis Power Supplie EPS 600	Heraeus, Hanau (Eigenbau) MPI-Werkstatt
Mikroskope: Axiovert 25	Pharmacia Biotech Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop: Axiohot IM-35	Zeiss, Oberkochen
Kühlzentrifugen: 5417 R, 4K15,RC 5B Plus	Eppendorf, Sigma, Sorvall
Pipetten:	Gilson (USA)
Tischzentrifugen: 5417 C	Eppendorf
UV-Tisch: UVT-14L, Eagle Eye	Herolab, Stratagene
Vakuumentrifuge: Concentrator 5301	Eppendorf
Spektrophotometer: DU 530	Beckman
PCR: Mastercycler Gradient, Mastercycler Personal	Eppendorf Eppendorf
Röntgenfilme: Biomax MR-1	Kodak
Whatman-Papier: 3 MM Filterpapier	Whatman
Ultraschallgerät: Cell Disruptor B15	Branson
Glasdouncer: Glas Col 009CS38	Cole-Parmer Instrument Co

3 Methoden

3.1 Methoden der prokaryotischen Zellkultur

3.1.1 Prokaryotische Zellkulturbedingungen

Sämtliche Arbeiten mit rekombinanten Bakterien wurden in den dafür vorgesehenen Einrichtungen (Bakteriensterilbank, 37°C Brutschrank und Schüttler) durchgeführt. Die Bakterien wurden, sofern nicht anders angegeben, in LB-Medium oder auf LB-Agar-Platten mit 50 µg/ml Ampicillin bei 37°C gezüchtet.

LB-Medium:

1% Bacto-Trypton
0,5% Hefeextrakt
0,5% NaCl

LB-Agar:

1% Bacto-Trypton
0,5% Hefeextrakt
1,5% Agar

3.1.2 Lagerung von Zellen

Von jedem Bakterienklon wurde 0,85 ml Über-Nacht-Kultur mit 0,15 ml einer autoklavierten Glycerinlösung (87%) in einem 1,5 ml Eppendorf-Cup gemischt und bei -80°C gelagert.

3.1.3 Bakterienstämme

Für die Arbeiten wurden die Stämme *E. coli* Sure (Stratagene) und *E. coli* XL-1B (Stratagene) benutzt.

Genotyp *E. coli* Sure:

BF⁻ dcm ompT hsdS (r_B-m_B⁻) gal

Genotyp *E. coli* BL21:

e 14⁻ (McrA⁻) Δ (merCB-hsdS^{MR}-mrr) 171
end A1supE44thi-1gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC
umuC::Tn5 (Kan^r) uvrC (F⁻ proAB lacI^q_z Δ M15
Tn10 (Tet^r)^c

3.1.4 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

3.1.4.1 Chemokompetente Zellen

Für die Herstellung chemokompetenter *E.coli* wurden die Bakterien in 100 ml LB-Medium angeimpft. Dem Medium wurde Tetracyclin bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt. Die Suspension wurde bei 37°C und 300 rpm über Nacht wachsen gelassen. Bei einer OD_{600nm} von ca. 1 wurden je 50 ml der Suspension in vorgekühlte 50 ml Sorvall-Röhrchen gefüllt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 10 min bei 1500xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in je 10 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erneut bei 1500xg und 4°C für 10 min zentrifugiert. Die Pellets wurden dann in je 2 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert. Von der Suspension wurden je 828 µl Bakterien mit 172 µl autoklaviertem Glycerin (87%) gemischt und bei –80°C gelagert.

3.1.4.2 Elektrokompente Zellen

Für die Herstellung elektrokompenter Zellen wurde nach der Vorschrift von Stratagene verfahren. 100 ml einer Über-Nacht-Kultur wurden mit 900 ml frischem LB-Medium versetzt und bei 37°C und 300 rpm solange wachsen gelassen, bis die OD_{600nm} zwischen 0,5 und 0,7 lag. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 2500xg 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Pellets wurden in einem Liter eiskaltem Glycerin (10% in H₂O) resuspendiert und anschließend erneut 15 min bei 2500xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut in 500 ml eiskaltem Glycerin (10%) resuspendiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in 250 ml eiskaltem Glycerin (10%) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml eiskaltem Glycerin (10%) resuspendiert, zu je 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Anschließend wurden die Zellen bei –80°C aufbewahrt.

3.1.5 Transformation von Bakterienzellen

3.1.5.1 Transformation von chemokompetenten Zellen

Chemokompetente Zellen der Stämme *E.coli* Sure und BL21 wurden auf Eis aufgetaut und zu 50 µl Bakteriensuspension ca. 20 ng des zu transformierenden Plasmids gegeben.

Anschließend folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis, gefolgt von einem 1,5-minütigen Hitzeschock bei 42°C. Die Bakteriensuspension wurde 1 min auf Eis gehalten und anschließend wurde 1 ml SOC-Medium zugesetzt. Die so erhaltene Suspension wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 5 sec bei 10.000xg zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde in 50 µl LB_{Amp} aufgenommen und auf ampicillinhaltigen (25 µg/ml) LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

SOC-Medium:

- 20 g Bacto Trypton
- 5 g Hefe-Extrakt
- 0,5 g NaCl
- ad 1 l H₂O, autoklavieren
- im Anschluß sterile Zugabe:
- 10 ml 1M MgCl₂
- 10 ml 1M MgSO₄
- 20 ml 20% (w/v) Glucose

3.1.5.2 Transformation von elektrokompenten Zellen

Elektrokompente Zellen des Stammes *E.coli* Sure wurden auf Eis aufgetaut und zu 100 µl Bakteriensuspension ca. 20 ng des zu transformierenden Plasmids gegeben. Anschließend folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Die Suspension wurde in Elektroporationsküvetten gegeben und in der Elektroporationskammer (Bio Rad) für ca. 5 sec einer Stromspannung von 1,8 kV ausgesetzt. Sofort anschließend wurden die Zellen mit 1 ml SOC-Medium versetzt und für 30 min bei 37°C inkubieren gelassen. Anschließend wurden die Zellen für 5 sec bei 10.000xg zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 50 µl LB_{Amp} resuspendiert und anschließend auf ampicillinhaltigen (25 µg/ml) LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2 Methoden der eukaryotischen Zellkultur

1.1.1 Eukaryotische Zellkulturbedingungen

Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank (Heraeus, Hanau) mit sterilen Lösungen, autoklavierten Glaswaren und sterilem Kunststoffmaterial durchgeführt. Die Zellen wurden in DMEM bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau) gehalten. Das Medium wurde mit 5% (HEK 293T) bzw. 10% (HeLa, H9c2) fötalem Kälberserum (FCS), 1 mM Na-Pyruvat, 2 mM Glutamin sowie 50 U/ml Penicillin und 50 U/ml Streptomycin supplementiert. Für die Kultur von HeLap0-Zellen wurde zusätzlich 50 µg/ml Uridin in das Wachstumsmedium gegeben. Wenn die Zelldichte eine Konfluenz von ca. 80 % erreichte wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Inkubation in 5ml 0,25 % Trypsin für ca. 5 min. bei 37°C abgelöst. Sobald die Zellen sich in Suspension befanden wurden sie in ein 50 ml Falcontube mit 15 ml DMEM überführt. Anschließend wurden die Zellen 2 min bei 180xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml frischem DMEM mit 10% FCS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf Zellkulturschalen in einer Verdünnung von 1:5 (HEK 293T, HeLap0, H9c2) bzw 1:7 (HeLa) wieder ausgebracht.

3.2.2 Lagerung von Zellen

Zum Einfrieren wurden Zellen in Suspension gebracht, durch Abzentrifugation bei 1000xg für 2 min sedimentiert und mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml DMEM mit 10% FCS resuspendiert und mit 1 ml 2x Einfriermedium versetzt. Die Suspension wurde in 2 ml Cryo-Röhrchen (Eppendorf) eingebracht und durch Lagerung im Tiefkühlschrank langsam auf -80°C abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt. Gelagerte Zellen wurden durch rasche Erwärmung in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und sofort mit frische Medium 1:10 verdünnt. Anschließend wurden die Zellen auf Zellkulturschalen ausgebracht.

*10x PBS:*100 mM Na₂HPO₄50 mM NaH₂PO₄

54 mM KCl

137 mM NaCl

2x Einfriermedium:

20% FCS

20% DMSO

in DMEM

3.3 Methoden der Zellkultur für Hefen**3.3.1 Zellkulturbedingungen**

Es wurden Hefezellen des Stamms EGY 48 (*MATa trp1 ura3 his3 leu2::plexAop₆-leu2*) verwendet. Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank (Heraeus, Hanau) mit sterilen Lösungen, autoklavierten Glaswaren und sterilem Kunststoffmaterial durchgeführt. Folgende Medien und Lösungen wurden verwendet.

YC Ura⁻/Trp⁻Medium

1,2 g Yeast Nitrogen Base

5 g (NH₄)₂SO₄

10 g Succinat

6 g NaOH

0,1 g Cystein

0,05 g Prolin

0,05 g Serin

0,75 g Ura⁻/Trp⁻-Mediensupplement

(Clontech, Heidelberg)

ad 900 ml Bidest

autoklavieren, sterile Zugabe von

100 ml 20% Glucose bzw.

50 ml 20% Galactose+50 ml 20% Raffinose

für Platten: Zusatz von 20 g Agar

<i>YPD-Vollmedium</i>	10 g Hefeextrakt 20 g Pepton 20 g Glucose ad 1 l Bidest autoklavieren
<i>1M Lithiumacetat</i>	10,2 g Lithiumacetat ad 100 ml Bidest pH zwischen 8,4 und 8,9 autoklaviert oder sterilfiltriert
<i>50% PEG</i>	50 g PEG 3350 wurde mit 35 ml Bidest versetzt. Die Lösung wurde auf 100 ml mit Bidest aufgefüllt und anschließend autoklaviert.
<i>Yeast Lysis Solution:</i>	2% Triton X-100 1% SDS 100 mM NaCl 10 mM Tris pH 8,0 1,0 mM EDTA
<i>Carrier-DNA:</i>	1,184 ml Salmon Testis DNA (9,5 mg/ml) 1,316 ml Bidest 20 min bei 100°C denaturieren und anschließend sofort auf Eis abkühlen

3.3.2 Lagerung der Zellen

Für die Lagerung der Hefezellen wurden 0,85 ml einer Über-Nacht-Kultur mit 0,15 ml einer autoklavierten Glycerinlösung (87%) versetzt und bei -80°C gelagert.

3.3.3 Chemotransformation von Hefezellen

Für die Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA wurde nach eine Kolonie in 25 ml YPD aufgenommen und in einem 200 ml Erlenmeyerkolben bei 250 rpm und 30°C bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von ca. 1,2 wachsen gelassen. Anschließend wurde die Kultur mit frischem YPD verdünnt bis sich eine OD von 0,2 einstellte. Die Kultur wurde nochmals für 3–6 h zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,5–0,6 wachsen gelassen. Anschließend wurde die Zellsuspension in 50 ml Falcontubes überführt und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 25 ml sterilem Bidest resuspendiert. Anschließend wurde nochmals für 5 min bei 100xg zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellpellet in insgesamt 0,75 ml 1 M Lithiumacetat resuspendiert. Anschließend wurden 1µg Plasmid-DNA, 50 µg Carrier-DNA und 50 µl kompetente Zellen in einem 1,5 ml Eppendorf-Cup gemischt. Zu dem Gemisch wurden 300 µl 1M Lithiumacetat gegeben und gevortext. Das Gemisch wurde anschließend 30 min bei 30°C geschüttelt. Anschließend wurden 35µl DMSO zugesetzt und nochmals kurz gevortext. Das Gemisch wurde für 15 min auf 42°C erwärmt und anschließend auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde die Suspension 5 sec bei 20.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µl Bidest resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 2-3 µl/cm² auf entsprechendem Selektivmedium ausplattiert. Die Kolonien wurden 2-3 Tage bei 30°C wachsen gelassen.

3.4 DNA-Arbeitsmethoden

3.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Lösungen:

Puffer P1: 100 µg/ml RNase A, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA,

Puffer P2: 200 mM NaOH, 1% SDS

Puffer P3: 3,0 M Kaliumacetat, pH 5,0

Puffer P4: 2,5% SDS in Isopropanol

Puffer QBT: 750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% EtOH, pH 7,0
0,15% Triton X-100

Silica-Suspension: 50 mg/ml Silica in Bidest, 300 µl HCl/l, 1 h bei 121 °C
autoklaviert

3.4.1.1 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

Das Protokoll des „Qiagen Plasmid Kit“ basiert auf der modifizierten alkalischen Lyse nach Birnboim welche auf drei Schritte komprimiert und mit der Qiagen-Säulen-Reinigung kombiniert wurde (Birnboim, 1971). An diese Anionen-Austauscher-Säule bindet selektiv doppelsträngige DNA und kann somit von RNA, Proteinen und anderen Zellkomponenten befreit werden. Bei der präparativen Plasmidisolierung wurde nach der Vorschrift des Herstellers verfahren. Eine 250 ml Über-Nacht-Bakterienkultur wurde pelletiert. Dem in Puffer P1 mit RNase A resuspendierten Pellet wurde Puffer P2 zugesetzt. Nach vorsichtigem Invertieren wurde 5 min bei RT inkubiert. Der Puffer P2 lysierte die Zellen in NaOH/SDS. Dabei wurden die Proteine durch SDS, die chromosomale wie auch die Plasmid-DNA durch die alkalischen Bedingungen denaturiert und die RNA im Verlauf der

Reinigung durch die RNase verdaut. Die Zeit für die Lyse war so gewählt, dass ein Maximum an Plasmid-DNA ohne komplette Zell-Lyse und ein Minimum an chromosomaler DNA freigesetzt wurde ohne dabei die Plasmid-DNA den denaturierenden Bedingungen zu lange auszusetzen. Danach wurde gekühlter Puffer P3 zugegeben, invertiert und auf Eis inkubiert. Dabei kam es durch die hohe Salzkonzentration zu einem Präzipitat aus denaturierten Proteinen, chromosomaler DNA, Zelltrümmern und SDS und so zur Trennung von chromosomaler und Plasmid-DNA. Die Plasmid-DNA renaturierte wieder und blieb in Lösung. Nach Zentrifugation und Präzipitation wurde der klare Überstand auf eine QIAGEN-tip 500 Säule gegeben, die vorher mit Puffer QBT äquilibriert wurde. Die Anionen-Austauscher-Säule selektiv die Plasmid-DNA. Die Säule wurde gewaschen und die Plasmid-DNA anschließend eluiert. Durch Zusatz von Isopropanol und Zentrifugation wurde die Plamid-DNA gefällt und anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung des Pellets bei RT wurde die DNA mit Bidest eluiert.

3.4.2 Präzipitation von Nukleinsäuren

3.4.2.1 Ethanol/Natriumacetat-Präzipitation

Bei der Präzipitation wurde nach der Vorschrift von (Sambrook *et al.*, 1989) gearbeitet. In Lösung befindliche DNA wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Cup durch Zugabe von 3 M Natriumacetat, pH 4,8 auf eine Endkonzentration von 0,3 M gebracht. Anschließend wurde das 2,5-fache Volumen Ethanol p.a. zugesetzt und durch Inkubation bei -80°C für 30 min ausgefällt. Die Suspension wurde 15 min bei 20.000xg zentrifugiert und das Pellet anschließend zweimal mit je 200 μl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung des Pellets wurde die DNA in Bidest resuspendiert.

3.4.2.2 Ethanol/Ammoniumacetat-Präzipitation

Um das Mitfällen von Oligosacchariden oder Nukleotidtriphosphaten zu vermeiden, wurden der gelösten DNA 1/10 Vol. 5 M sterilfiltriertes Ammoniumacetat und 2 Vol. Ethanol zugesetzt. Eine Kälteinkubation ist dabei nicht nötig. Pelletiert wurde durch 30 min Zentrifugation bei 20.000xg. Zur Entfernung der Salze wurde das Pellet zweimal mit je 500 μl 70%igem Ethanol gewaschen.

3.4.2.3 Isopropanol/Natriumacetat-Präzipitation

Nach der Phenol/Chloroformextraktion (s. 3.4.3) wurde zur besseren Trennung der DNA von Oligo- und Mononukleotiden 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 1 Vol. Isopropanol zugesetzt. Anschließend wurde die Lösung für 30 min bei -80°C inkubiert. Die anschließende Zentrifugation wurde wie unter 3.4.2.1 beschrieben ausgeführt.

3.4.3 Extraktion von Nukleinsäuren durch Phenol und Chloroform

Lösungen: Phenol für DNA-Extraktion (äquilibriert mit TE, pH 8)
 Chloroform / Isoamylalkohol (24:1)

DNA-Lösungen wurden mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und gut durchmischt. Dabei werden DNasen, RNasen, Ligasen und andere Proteine denaturiert und in der Interphase zwischen wässriger und organischer Phase konzentriert. Zur besseren Phasentrennung wurden die Proben 5 min bei $20.000\times g$ zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde dekantiert und in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Zur Entfernung von Phenolresten wurde 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt, durchmischt und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Nach erneuter Phasentrennung wurde die DNA mit EtOH/NaAc oder Isopropanol/NaAc (siehe 3.4.2.1 und 3.4.2.3) gefällt.

3.4.4 Enzymatische Restriktionsspaltung von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Basensequenzen der DNA und hydrolysieren bestimmte Phosphodiesterbindungen innerhalb dieser Oligonukleotide. Dies ermöglicht eine gezielte Fragmentierung der DNA. Für die jeweiligen Enzyme wurden die vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer unter den entsprechend angegebenen Inkubationsbedingungen verwendet. Wenn für einen Mehrfach-Verdau unterschiedliche Restriktionspuffer angegeben waren, wurde ein alternativer Reaktionspuffer ausgewählt, bei dem eine möglichst hohe Aktivität beider Restriktionsenzyme gewährleistet war. Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug in der Regel $10\ \mu\text{l}/\mu\text{g}$ DNA und es wurden 2 Einheiten (U) eines jeden Enzyms pro μg DNA eingesetzt. Das Gemisch wurde fünf Stunden bei 37°C inkubiert.

3.4.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

1-20 pmol DNA wurden in 100 µl Dephosphorylierungspuffer (Boehringer, Mannheim) mit einer Einheit alkalischer Phosphatase für 30 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Zugabe von 5 mM EDTA und 30 min Erhitzen auf 75°C inaktiviert. Die dephosphorylierte DNA wurde anschließend durch Extraktion mit Phenol gereinigt und mit Ethanol/Natriumacetat präzipitiert (s. 3.4.2.1).

3.4.6 Ligation von DNA-Fragmenten

50-200 ng eines linearisierten Vektors, dessen 5'-Enden dephosphoryliert worden waren, wurden mit einem zwei- bis dreifachen molaren Überschuss eines zu ligierenden Fragments in 20 µl Ligationspuffer mit 1-40 Einheiten T₄-DNA-Ligase über Nacht bei 16°C inkubiert. 10 µl des Ligationsvolumens wurden zur Transformation eingesetzt, der Rest wurde bei -20°C gelagert.

Ligationspuffer:

60 mM Tris-HCl pH 7,5
6 mM MgCl ₂
1 mM DTT

3.4.7 Spektrometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentration und Reinheit

Zur Mengenbestimmung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurde deren optische Dichte bei 260 nm (OD_{260nm}) bestimmt. Da der molare Extinktionswert für DNA 50 beträgt, betrug eine OD_{260} -Einheit 50 µg/ml DNA. Da aromatische Aminosäuren aus Proteinen ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm haben, konnte die Reinheit der DNA über das Verhältnis OD_{260nm}/OD_{280nm} bestimmt werden. Dieses Verhältnis sollte zwischen 1,65 und 1,85 liegen. Für die Messung wurde frisch isolierte Plasmid-DNA mit Bidest 1:30 verdünnt und direkt im Photometer vermessen. Die erhaltenen Werte wurden aufgrund der Verdünnung mit dem Faktor 30 multipliziert.

3.4.8 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Agarose-Gelelektrophorese nach (Sambrook *et al.*, 1989) ist eine Standardmethode zur Reinigung, Trennung und Identifizierung von Nukleinsäuren. Die Nukleinsäuren lagen im neutralen und schwach alkalischen Bereich als Polyanionen vor und wanderten im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit war von der Agarosekonzentration, den Pufferbedingungen, der Molekülgröße, der Konfiguration der Nukleinsäuren sowie der angelegten Stromstärke und der Temperatur abhängig. Sichtbar gemacht wurden die Nukleinsäuren durch Ethidiumbromid welches der heißen, flüssigen Agarose vor dem Abkühlen zugesetzt wurde.

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA für analytische und präparative Zwecke erfolgte auf 1-2%igen Agarose-Gelen. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1x TAE verwendet. Die Gele wurden durch Mischen von fester, kristalliner Agarose mit TAE und anschließendem Aufkochen im Mikrowellenofen präpariert. Anschließend wurde die noch heiße Agaroselösung in eine Gelelektrophoresekammer eingebracht, wo sie abkühlte und ein festes Gel formte.

3.4.9 Präparative Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Reinigung von DNA aus Agarosegelen wurden diese auf einem UV-Tisch mit langwelligem UV-Licht (356 nm) gelegt und die so sichtbare DNA mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Cup überführt. Anschließend wurde die DNA mit dem „Qiagen Quick Spin“-Kit nach den Angaben des Herstellers eluiert.

3.4.10 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

3.4.10.1 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wurde RNA mit Hilfe des Enzyms „Reverse Transkriptase“ in cDNA umgeschrieben. Die Reaktion wurde nach den Angaben des Herstellers (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt.

Folgender Reaktionsansatz wurde vorbereitet:

PCR-Master-Mix: 8 µl dNTP-Gemisch (je 2 µl 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
 4 µl MgCl₂ Lösung (25 mM)
 2 µl 10x PCR-Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl)
 1 µl RNase Inhibitor (20 U/µl)
 1 µl Random Hexamer Primer (50 µM)
 1 µl reverse Transkriptase

Dieser Ansatz von 17 µl wurde jeweils zu 1 µg (10 ng/µl) zytoplasmatischer RNA, welche vorher bei 60°C für 5 min inkubiert wurde, in einem Gesamtvolumen von 20 µl gegeben. Die Reaktion erfolgte bei 23 °C für 10 min, bei 42°C für 60 min und bei 95°C für 5 min. Parallel wurden als Negativkontrolle Ansätze ohne „Reverse Transkriptase“ angesetzt, um eine eventuelle DNA-Kontamination auszuschließen.

3.4.10.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der spezifischen exponentiellen Amplifikation von cDNA zwischen zwei Primern. Alle PCR-Reaktionen wurden mit dem „Long Template PCR System“ von Boehringer (Mannheim) durchgeführt. Für die PCR-Reaktion wurde der folgende Reaktionsansatz gewählt:

 5 µl PCR-Puffer
 2,5 µl 25 mM MgCl₂
 0,5 µl downstream Primer (10 µM)
 0,5 µl upstream Primer (10 µM)
 1 µl dNTP-Gemisch (25 mM)
 39,5 µl Bidest
 200 ng DNA-Template (Plasmid-DNA bzw. cDNA)

Das folgende Standard-PCR Programm wurde für alle PCR-Reaktionen genommen, wobei die Zeiten für die Kettenelongation dem zu amplifizierenden PCR-Fragment (1 min/1000bp) und die Annealingtemperaturen den Anforderungen der Primer angepasst wurden. Die Anzahl der Zyklen richtete sich in erster Linie nach dem Template. Für

Amplifikationen von Plasmid-DNA wurden i.d.R. 28 Cyclen verwendet, für RT-PCR wurden bis zu 35 Cyclen verwendet.

Beispielhaftes Standardprogramm:

Denaturierung	95°C, 30s
Primer-Annealing	60°C, 30s
Elongation	68°C, 1,5 min
Zyklen	26-35

3.4.11 Isolierung und elektrophoretische Auftrennung niedermolekularer DNA ("DNA-Leiter")

Eine 10 cm Schale 293T Zellen wurde mit Expressionsplasmiden transfiziert. Nachdem die Apoptose eingetreten war, wurden die Zellen abgeschabt, für 10 min bei 800g und 4°C zentrifugiert und einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl hypotoner Lysepuffer aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 20.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Es wurden 500 µl Phenol zugesetzt und 1 min gevortext. Anschliessend wurde 10 min bei 20.000xg zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt und es wurden 500 µl Phenol/Chloroform (1:1) zugesetzt. Nachdem 1 min gevortext worden war, wurde für 10 min bei 20.000xg zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt und es wurden 30 µl 5 M NaCl und 1 ml kaltem Ethanol zugesetzt. Die Lösung wurde gevortext und für mindestens 2 h bei -20°C gelagert. Anschließend wurde für 20 min bei 20.000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 300 µl kaltem, 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei RT getrocknet. Das Pellet wurde in 15 µl TE-Puffer aufgenommen und 5 h bei 50°C inkubiert. Dann wurden 3 µl RNase A (10 mg/ml) zugesetzt und 90 min bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde im gleichen Volumen Ladepuffer aufgenommen und auf einem 2%igen Agarose-Gel bei 60 V für 2,5 h aufgetrennt.

3.4.12 Isolierung von Total-RNA aus Säugerzellen

Für die Extraktion von Ribonukleinsäuren wurde die Methode der Phasentrennung gewählt (Chomczynski & Sacchi, 1987). Hierfür wurde eine kommerziell erhältliche Lösung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat („Tripure“, Roth, Karlsruhe) verwendet. Alle Glaswaren und Pipettenspitzen wurden vor dem Gebrauch autoklaviert. Zur Inaktivierung von RNAsen wurde das verwendete H_2O_{Bidest} mit 0,1% DEPC versetzt, ÜN bei 37°C inkubiert und anschliessend zweimal autoklaviert.

Zellen wurden mit einem Gummischaber von der Kulturschale abgelöst und 5 min bei 1000xg pelletiert. Pro 100 mg Pellet wurde 1 ml Tripure zugesetzt und 5 min gevortext. Anschliessend wurden pro ml Tripure 0,2 ml Chloroform dazupipettiert, gevortext und für 10 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 12.000xg und 4°C wurde die wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und pro ml Tripure mit 0,5 ml Isopropanol versetzt. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte für 10 min bei RT. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 12.000xg und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 75% Ethanol gewaschen (10 min, 12.000xg, 4°C). Anschliessend wurde das Pellet 2 h luftgetrocknet und in H_2O_{Bidest} aufgenommen. Die Reinheit und Konzentration der RNA-Präparationen wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 bzw. 280nm Wellenlänge bestimmt.

3.4.13 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Für die Auftrennung von RNA wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet. Da RNAs oftmals Sekundärstrukturen ausbilden, die die elektrophoretische Mobilität signifikant verändern, sollten bei der Auftrennung denaturierende Bedingungen eingestellt werden. Hier wurde als Gel- und Laufpuffer 1xMOPS mit 6,6% Formaldehyd verwendet. Die RNA-Proben wurden mit einem Volumen 2x RNA-Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen pipettiert und bei 40 mA für 1,5 h aufgetrennt.

<i>2x RNA-Ladepuffer</i>	2x MOPS
	50% Formamid
	13,3% Formaldehyd
	0,7 mg/ml Ethidiumbromid
	4% Glycerin
	5% Bromphenolblau (gesättigte Lösung in H_2O_{Bidest})

Nach dem Lauf wurde das Gel auf einem UV-Tisch betrachtet, um die prominenten Banden der verschiedenen ribosomalen RNAs (rRNAs) als Marker für Konzentration und Zustand der eingesetzten Proben verwenden zu können.

3.4.14 Kapillartransfer und autoradiographischer Nachweis von RNA auf Membranen ("Northern Blot")

3.4.14.1 Kapillartransfer

Die aufgetrennten RNAs werden zunächst auf eine Nylonmembran (Pall, Dreieich) transferiert, um anschließend definierte RNA-Spezies detektieren zu können. Hierbei wird das Prinzip des Kapillartransfers verwendet: Ein Stück Nylonmembran wird auf das Gel gelegt und beides in einen Stapel aus Filterpapier eingefügt. Das unterste Stück Filterpapier hängt an zwei Seiten in ein Reservoir mit Transferpuffer (0,05 N NaOH). Oben werden auf den Filterpapierstapel weiteres Küchenpapier und Einmal-Handtücher in passender Größe gelegt. Abschließend wird eine Glasplatte auf das 'Sandwich' gelegt und mit einem Gewicht (ca. 2 kg) beschwert. Während des ca. 18stündigen Transfers wird nun der Puffer in den Filterstapel gesogen und somit werden auch die RNAs bei der Gelpassage des Puffers auf die aufliegende Membran transferiert.

Der Nachweis definierter RNA-Spezies wird durch Hybridisierung mit einem komplementären DNA-Fragment ('Sonde') erreicht. Diese Sonde ist radioaktiv markiert und kann anschliessend autoradiographisch nachgewiesen werden. Alle Arbeiten mit radioaktivem Material wurden in den dafür vorgesehenen Räumlichkeiten (Isotopenlabor) durchgeführt. Geeignete Sonden wurden durch PCR oder Restriktionsverdau generiert und mittels Qiagen Gel-Extraktions-Kit nach der elektrophoretischen Auftrennung isoliert. Jeweils ca. 100 ng Sonde wurden im Markierungsassay eingesetzt:

100 ng DNA-Sonde
1 µl Polynukleotidkinase (PNK)
3 µl 10x PNK-Puffer
1 µl ^[32]P- γ-ATP

Die Markierung erfolgte für 1 h bei 37°C. Alternativ erfolgte die Markierung mit ^{32}P - α -ATP und dem 'rediprime kit' (Amersham). Anschliessend wurden die freien ATP-Moleküle mittels einer Säule aus dem Qiagen Gel-Extraktionskit abgetrennt (30 sec, 20.000xg). Die an die Säulenmatrix gebundene, radioaktiv markierte DNA wurde durch Zugabe von 30 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ und anschliessende Zentrifugation bei 20.000xg für 30 sec eluiert. Währenddessen wurde die Membran bei 65°C für 1 h auf dem Drehrad in Prähybridisierungspuffer äquilibriert.

Prähybridisierungspuffer: 6xSSC
5xDenhardt's-Lösung
0,5% SDS
2 mg/ml hitzedenaturierte Lachssperma DNA
(5 min 95°C)

Für die Hybridisierungsreaktion wurde die Sonde hitzedenaturiert (vgl. o.) und in die Prähybridisierungslösung pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 6 h bei 65°C. Anschliessend erfolgten vier Waschschrte für jeweils 15 min bei 65°C, bei denen durch abnehmende Salzkonzentrationen der Puffer sukzessive die Stringenz erhöht wurde:

Waschpuffer 1: 4xSSC; 0,1% SDS
Waschpuffer 2: 2xSSC; 0,1% SDS
Waschpuffer 3: 1xSSC; 0,1% SDS
Waschpuffer 4: 0,1xSSC; 0,1% SDS

Die Membran wurde nun in Lebensmittelfolie eingeschlagen und in eine Metallkassette gebracht. Ein Röntgenfilm wurde aufgelegt, für eine Woche bei -80°C exponiert und anschliessend entwickelt.

3.5 Proteinanalytische und –immunologische Methoden

Bei allen Präparationen von Proteinextrakten wurde den jeweiligen Puffern der Proteaseinhibitor-Cocktail „Complete“ (Roche, Mannheim) zugesetzt (1 Tablette pro 10 ml Puffer). Sämtliche Zentrifugationsschritte wurden in Kühlzentrifugen bei 4°C durchgeführt.

3.5.1 Präparation von Gesamtzellextrakten aus Säugerzellen

Für die Herstellung von Gesamtzellextrakten wurde nach dem Prinzip der hypotonen Lyse vorgegangen. Durch Inkubation der Zellen in einem salzarmen Puffer schwellen diese an und können anschliessend leicht physikalisch zerstört werden. Der Kulturüberstand einer 10 cm-Kulturschale HEK 293T-Zellen wurde abgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt (Im Falle von Apoptoseinduktion befinden sich viele tote Zellen im Medium). Die adhärennten Zellen wurden in PBS mit einem Gummischaber von der Zellkulturplatte abgelöst und mit dem Kulturüberstand vereinigt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 1000 xg wurden die Zellen in 500 µl Puffer A /10⁶ Zellen resuspendiert und 15 min auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Zellen mittels einer zehnmaligen Passage durch eine 22G-Nadel lysiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 20.000 xg wurde der resultierende Überstand bis zur Analyse bei –80°C gelagert.

Puffer A

10 mM HEPES pH 7,9

10 mM KCl

0,1 mM EDTA

0,1 mM EGTA

1 mM DTT

0,1 mM PMSF

3.5.2 Präparation von mitochondrialen Proteinextrakten aus Säugerzellen

Die Präparation von mitochondrialen Proteinextrakten erfolgte nach einem Protokoll das das Prinzip der differentiellen Zentrifugation nutzt (Gawaz *et al.*, 1990). Zellen werden zunächst nativ lysiert, anschliessend werden die einzelnen subzellulären Fraktionen durch Zentrifugation bei variierenden Geschwindigkeiten getrennt. Die mitochondriale Fraktion (bzw. „schwere Membranfraktion“, mit ER-Anteilen u.a.) pelletiert bei 10.000xg.

Kulturüberstand und adhärente Zellen (vgl. 3.5.1) einer 10 cm-Kulturschale HEK 293T-Zellen wurden geerntet und für 5 min bei 1000xg pelletiert. Die Zellen wurden in 5 Pelletvolumen Mito-Puffer I resuspendiert und 15 mal mit einem Glasdouncer homogenisiert. Anschliessend wurden die Lysate 15 min auf Eis gehalten und alle 2-3 min sanft gevortext. Die Proben wurden in 2 ml Eppendorfgefäße gebracht und für 10 min bei 1000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut für 10 min bei 1000xg zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde für 10 min bei 10.000xg zentrifugiert und das Pellet anschliessend in 5 Vol. Puffer Mito II aufgenommen. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis wurde erneut für 10 min bei 1000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde für 10 min bei 10.000xg zentrifugiert und das resultierende Pellet in 50 µl Puffer Mito II pro 10 cm-Schale resuspendiert. Die Suspension wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und anschliessend im 37°C Wasserbad getaut. Diese Prozedur wurde insgesamt 3 mal durchgeführt. Nach Zugabe von 5 µl einer 10%igen Triton X-100 Lösung (Endkonzentration 1%) wurden die Lysate für 5 min im Kühlraum bei 4°C auf einem Vortexer geschüttelt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 20.000xg wurden die resultierenden Überstände bis zur Analyse bei –80°C gelagert.

Puffer Mito I

10 mM Tris pH 7,4

0,6 M Mannitol

0,1% BSA

1 mM PMSF

Puffer Mito II

10 mM Tris pH 7,4

0,5 M Mannitol

0,1% BSA

1 mM PMSF

3.5.3 Präparation von nukleären Proteinextrakten aus Säugerzellen

Die Herstellung nukleärer Proteinextrakte erfolgte nach dem Protokoll von Schreiber und Kollegen (Schreiber *et al.*, 1989). Adhärente HEK 293T-Zellen einer 10 cm-Kulturschale wurden in PBS mit einem Gummischaber von der Zellkulturplatte abgelöst und mit dem Kulturüberstand in einem 50 ml Zentrifugengefäß vereinigt (vgl.3.5.2). Nach einer Zentrifugation bei 500xg wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und erneut pelletiert. Das Pellet wurde in 200 µl Puffer A pro 10 cm-Schale resuspendiert und für 15 min auf Eis gehalten. Anschliessend wurden die Zellen durch Zugabe von 10 µl einer 10% NP-40-Lösung und kräftiges Vortexen lysiert. Das Lysat wurde für 5 min bei 1300xg zentrifugiert und das resultierende Pellet in 60 µl Puffer C resuspendiert. Die Suspension wurde 15 min auf Eis gehalten und dabei alle 3 min sanft gevortext. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 11.000xg wurde der Überstand in ein frisches Eppendorfggefäß überführt und bis zur Analyse bei -80°C aufbewahrt.

Puffer C

20 mM HEPES pH 7,0

400 mM NaCl

1 mM EDTA

1 mM DTT

0,1 mM PMSF

3.5.4 Präparation von Gesamtzellextrakten aus *S. cerevisiae*

Hefezellen aus Flüssigkulturen in der mittleren Log-Phase ($A_{578\text{nm}} = 5$) wurden für 5 min bei 3000xg geerntet und in 0,1 M Tris pH 9,4, 10 mM DTT (2ml pro g Pelletgewicht) für 10 min bei 32°C resuspendiert. Die Zellen wurden zweimal mit 1,2 M Sorbitol gewaschen. Anschliessend wurden die Zellen in 1,2 M Sorbitol, 20 mM KH_2PO_4 pH 7,4 (7 ml pro g Pelletgewicht) resuspendiert. Nach Zugabe von Zymolyase (1 mg pro g Pelletgewicht) erfolgte die Protoplastierung für 90 min bei 35°C auf dem Schüttelinkubator. Eine Verringerung der $\text{OD}_{600\text{nm}}$ um mindestens 50%, wurde als erfolgreiche Protoplastierung angesehen. Die Protoplasten wurden durch eine Zentrifugation für 5 min bei 3000xg

<i>SDS-Ladepuffer:</i>	1 mM Saccharose 200 mM Tris/HCl, pH 6,8 5% SDS 5 mM EDTA, pH 8,0 0,05% Bromphenolblau
<i>4x Sammelgelpuffer:</i>	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 0,4% SDS
<i>4x Trenngelpuffer:</i>	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,4% SDS
<i>Laufpuffer:</i>	0,25 M Tris 1,9 M Glycin

Komponenten	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid	5%	10 – 15%
Tris/HCl, pH 6,8	250 mM	-
Tris/HCl, pH 8,8	-	375 mM
SDS	0,1%	0,1%
Ammoniumperoxodisulfat	0,1%	0,025%

3.5.7 Elektrotransfer und immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen ("Western-Blot")

Zum Transfer von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen auf Membranen wurde das „Semidry“-Verfahren angewendet. Die dafür eingesetzte Blotkammer (Eigenbau, Werkstatt MPI f. Biochemie, Martinsried) verfügt über zwei Metallplatten, die als Anode und Kathode fungieren. Auf die Anode wurden luftblasenfrei drei Lagen mit Transferpuffer befeuchtete „Whatman“-Filterpapiere gelegt sowie die befeuchtete Hybond ECL Membran

3.6 Zellbiologische Methoden

3.6.1 Transiente Transfektion von Säugerzellen

Alle Transfektionen von HEK 293T-Zellen wurden mit der Calciumphosphat-Copräzipitations-Methode durchgeführt. Die DNA wird dabei im Reaktionsansatz durch Zugabe von Calciumchlorid ausgefällt. Dieses ‚Präzipitat‘ wird direkt auf Zellen in Kultur gebracht und kann von diesen aufgenommen werden. Die Anwesenheit von Chloroquin, einer Substanz, die den sauren pH der Endosomen abpuffern kann, verstärkt die Effizienz der Transfektion.

Die Zellen wurden durch Trypsinzugabe von der Kulturschale abgelöst und in neue Zellkulturschalen ausgesät. Nach einer Inkubation ÜN bei 37°C und 5% CO₂ erreichten die Zellen typischerweise eine Konfluenz von ca. 70%. Direkt vor der Transfektion wurde das Medium mit Chloroquin versetzt (Endkonzentration 20 µM). Für das Präzipitat wurde jeweils DNA in Bidest vorgelegt, mit 2,5 M CaCl₂ versetzt und das gleiche Volumen 2x HBS pH 6,95 tropfenweise zugesetzt. Ca. 10 min nach dem Mischen der Komponenten wurde das gebildete Präzipitat auf die Zellen gegeben.

Für folgende Zellkulturformate wurde jeweils eingesetzt:

Format	DNA (µg) in Bidest (µl)		CaCl ₂ (µl)	2x HBS (µl)
24 well	1	20	5	25
6 well	2	90	20	110
10 cm	10	450	50	500

Fünf Stunden nach der Transfektion wurde das Medium erneut gewechselt.

HeLa- und Helap0-Zellen wurden mit Effecten (Qiagen) nach Angaben des Herstellers transfiziert.

H9c2-Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz FuGENE (Roche) nach Angaben des Herstellers transfiziert.

3.6.2 Nachweis von Zellen mit hypodiploidem DNA-Gehalt im Durchflußcytometer (FACS)

Die Fragmentierung nukleosomaler DNA ist ein biochemisches Charakteristikum der Apoptose. Nach einer entsprechenden Fluoreszenzfärbung kann mit einem Durchflußcytometer (FACS) der DNA-Gehalt einzelner Zellen gemessen werden. In einer Zellsuspension lässt sich so der Anteil apoptotischer Zellen, also solcher mit geringerem oder 'hypodiploidem' DNA-Gehalt, quantitativ bestimmen.

Die FACS-Analyse wurde mit dem Programm „Cellquest“ in einem FACS-Calibur (Becton-Dickinson, Heidelberg) durchgeführt. Die Fluoreszenzfärbung der zellulären DNA erfolgte mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI). Jeweils 10.000 Zellen wurden im entsprechenden Fluoreszenzkanal gemessen.

In sämtlichen FACS-Experimenten wurde Apoptose durch die transiente Transfektion von proapoptotischen Genen induziert. Zur Messung der Transfektionseffizienz, d.h. des Anteils transfizierter Zellen, wurde bei jeder Transfektion ein GFP Expressionsplasmid (pLantern, Stratagene) cotransfiziert. Für jede Probe wurde parallel zur PI-Messung im entsprechenden Fluoreszenzkanal (GFP) auch die Transfektionseffizienz bestimmt. Die Transfektionsrate betrug zwischen 40 und 70%. Obwohl also der DNA-Gehalt von 10.000 Zellen bei jeder Messung erfasst wurde, waren jeweils nur zwischen 4000 und 7000 dieser Zellen überhaupt mit einem proapoptotischen Gen transfiziert. Es erschien daher sinnvoll, in jeder Messung den Anteil der Zellen mit hypodiploidem DNA-Gehalt auf die Transfektionsrate zu beziehen. D.h. bei einem Anteil von 10% Zellen mit hypodiploidem DNA-Gehalt und einer Transfektionseffizienz von 50% ergibt dies eine *spezifische Apoptoserate* von 20%. Die Behandlung von transfizierten Zellen mit dem PTP-Inhibitor Bongkreksäure (BA) führte zu einer starken Abschwächung der GFP-Fluoreszenz. Deshalb wurde in diesen Hemmexperimenten nur der Anteil der Zellen mit hyploidem DNA-Gehalt bestimmt und in der Auswertung graphisch dargestellt (vgl. 4.1.11, 4.2.4. ff.).

Für die Messungen wurde der Kulturüberstand der adhärennten Zellen abgenommen und in 15 ml Falcon-Tubes überführt. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert und zu dem vorher abgenommenen Medium gegeben. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 1000xg wurden die Zellen einmal mit 1 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und die Zellen in je 200 µl PBS resuspendiert. Ein Aliquot

von 100 µl wurde in 300 µl PI-Lysepuffer (PI-Fluoreszenz-Messung) aufgenommen, das andere Aliquot in 300 µl PBS (GFP-Messung). Sämtliche Messungen wurden als Triplikate bestimmt. Ansätze, in denen ein proapoptotisches Gen durch ein Expressionsplasmid für Luciferase ersetzt wurde, und solche ohne GFP (als ‚0-Wert‘ für die Bestimmung der Transfektionseffizienz) wurden in allen FACS-Analysen eingesetzt. Der Mittelwert aus drei unabhängigen Luciferase-Ansätzen wurde in den FACS-Analysen als Apoptose-Hintergrund von allen Messwerten abgezogen.

3.6.3 Nachweis von hypoploider DNA durch das Cell Death Detection ELISA-Kit
Eine weitere Möglichkeit die für die Apoptose typische DNA-Fragmentierung in Zell-Lysaten nachzuweisen eröffnet das Cell Death Detection ELISA-Kit (Roche, Mannheim). Auf eine mit einem monoklonalen Antikörper gegen Histone (1-4) beschichtete Zellkulturplatte werden dabei Extrakte aus apoptotischen Zellen gebracht. Die gebundenen Histon/DNA-Komplexe werden anschliessend mit einem enzymgekoppelten Antikörper gegen DNA nachgewiesen. Die Durchführung des Tests erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.6.4 Fluoreszenzfärbung von aktiv respirierenden Mitochondrien in Säugerzellen
Chloromethyl-X-Rosamin (CMX-Ros, Mitotracker) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der selektiv Mitochondrien anfärbt, die über ein Membranpotential verfügen (Macho *et al.*, 1996). Für diesen Versuch wurden HeLa-Zellen auf Deckgläschen (15 mm Kantenlänge) in 12-Loch-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit frischem Wachstumsmedium überschichtet, dem Mitotracker in einer Konzentration von 40 nM zugesetzt war. Nach einer Inkubation für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen und anschliessend bei RT für 15 min in 3,7% Formaldehyd-Lösung fixiert. Nach einem Waschschrift mit PBS erfolgte eine Inkubation bei -20°C für 10 min in Aceton. Die Deckgläschen wurden nun umgedreht auf Glyceroltropfen aufgebracht (so dass die Zellen im Glycerol eingebettet sind), und so auf Objektträgern fixiert. Bis zur Untersuchung am Mikroskop wurden die Zellen trocken und dunkel gelagert.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von ANT-1 als propapoptotischer Faktor

4.1.1 Die Überexpression des Adenin-Nukleotid-Translokators-1 (ANT-1) induziert einen apoptotischen Phänotyp in HEK 293T-Zellen

Das Überexpressions-Screening nach Apoptose-induzierenden Genen in HEK 293T-Zellen resultierte in der Isolierung von ca. 80 potentiell interessanten cDNAs. Aufgrund starker und schneller Induktion erschien ein Klon besonders interessant. Diese cDNA kodiert für den Adenin-Nukleotid-Translokator-1, ein Protein der inneren Mitochondrienmembran, zuständig für den Antiport von ATP (in das Zytosol) gegen ADP (in die mitochondriale Matrix) und Bestandteil der für mitochondriale Apoptose-Induktion wichtigen PT-Pore. Die Überexpression dieses Gens führt bereits nach ca. 14 h zu einem deutlich apoptotischen Phänotyp der transfizierten Zellen (Abb. 4.1) mit den charakteristischen apoptotischen Körperchen, die im Lichtmikroskop als schwach lichtbrechend erscheinen.

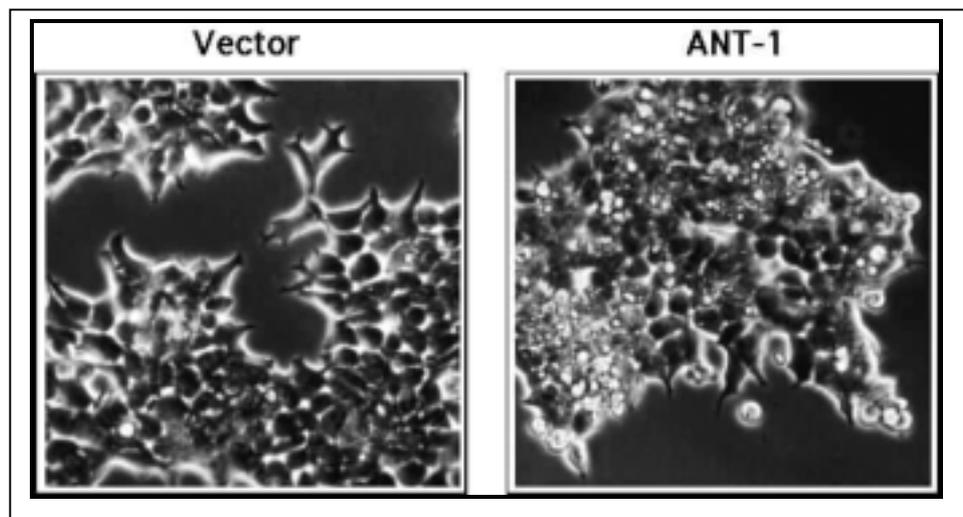


Abb. 4.1 Apoptose-Phänotyp von HEK 293T-Zellen nach transienter Transfektion mit einem Expressionsplasmid für ANT-1. Die Zellen wurden jeweils mit 1 µg leerem Vektor (pcDNA3) bzw. Expressionsplasmid sowie 1 µg GFP transfiziert. Die Dokumentation erfolgte 20 h nach Transfektion mit einem Zeiss Axiovert-Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung.

Das ANT-1-Protein verfügt über 298 Aminosäuren und hat sechs Durchgänge durch die innere Mitochondrienmembran. ANT-1 gehört zur Familie der mitochondrialen

Carrierproteine, deren Primärstruktur durch drei sich wiederholende Domänen von ca. 100 Aminosäuren gekennzeichnet ist (Nelson, 1992). Für die Isoform aus *S. cerevisiae*, AAC1, wurde bereits eine zweidimensionale Struktur vorgeschlagen (s.u.). Danach reichen N- und C-Terminus des Proteins in den Intermembranraum, während drei „Schlaufen“ mit 40-50 Aminosäuren Kontakt mit der mitochondrialen Matrix haben. Die cytosolischen Anteile des Proteins sind mit 15-25 Aminosäuren deutlich kleiner.

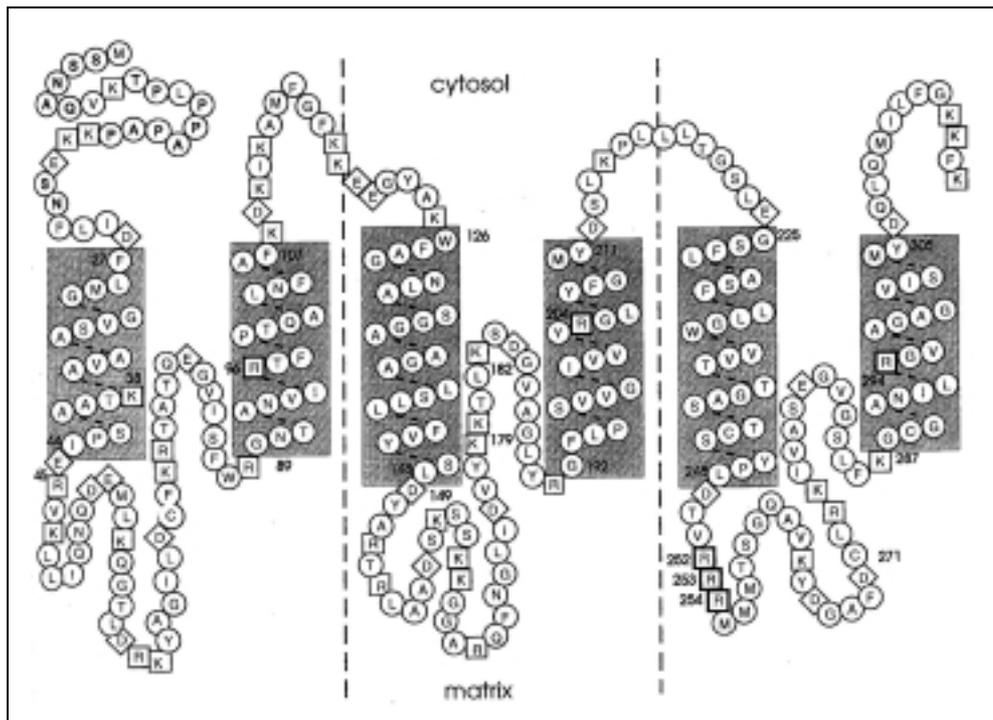


Abb. 4.2. Schematische Darstellung der Insertion des Adenin-Nukleotid-Translokators-1 (AAC-1) von *S. cerevisiae* in die innere Mitochondrienmembran. Die Transmembrandurchgänge sind als graue Boxen dargestellt. Geladene Aminosäurereste sind von Quadraten umgeben. Reste, deren Mutation einen Verlust der ADP/ATP-Transportaktivität zur Folge haben, sind durch fett gedruckte Quadrate gekennzeichnet. Die „3-Domänen-Struktur“ ist durch gestrichelte Linien angedeutet. Aus Müller *et al.*, 1996.

4.1.2 Die Apoptose-Induktion durch ANT-1 korreliert mit der Expression und dem mitochondrialen Import des Proteins

Die Überexpression einer cDNA in Zellen bedeutet einen gewichtigen Eingriff in deren biochemische Homöostase, und es ist nicht auszuschliessen, dass sekundäre Effekte, etwa eine Akkumulation von ANT-1-mRNA, für den beobachteten Zelltod verantwortlich sein könnten. Es erschien daher von Bedeutung, zu untersuchen, ob es einen zeitlichen

Zusammenhang zwischen ANT-1-Expression und Apoptose-Induktion gibt. Nach Transfektion von HEK 293T-Zellen mit einem Expressionsplasmid für ANT-1, das C-terminal über ein antigenes Epitop des Influenza-Proteins Hämagglutinin (HA) verfügte (ANT-1-HA), wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Apoptose-Rate durch FACS-Analyse bestimmt.

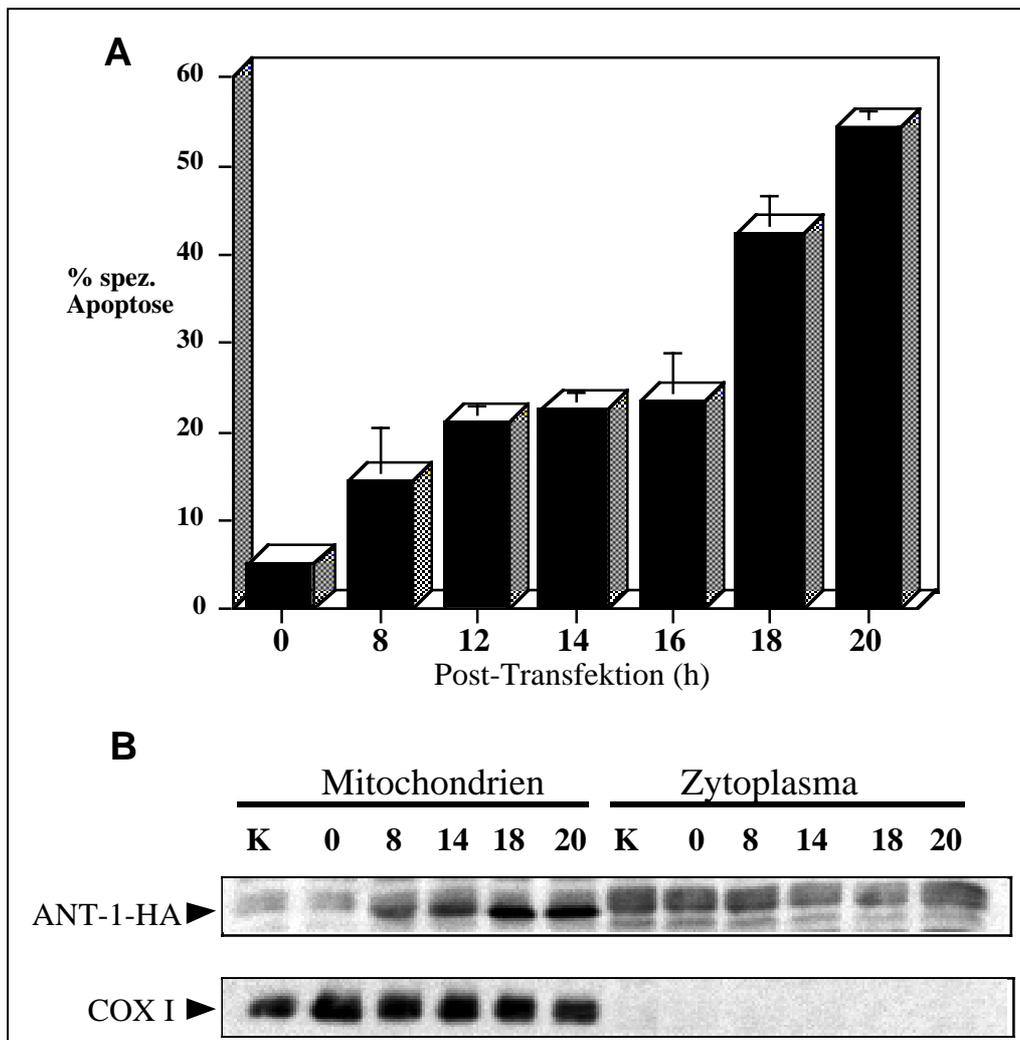


Abb. 4.3 Zeitverlauf von Apoptose-Induktion und Proteinexpression nach Transfektion von ANT-1-HA. (A) HEK 293T-Zellen in 10 cm-Kulturschalen wurden mit 8 μ g ANT-1-Expressionsplasmid und 2 μ g GFP-Expressionsplasmid transfiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und der Anteil von Zellen mit hypodiploidem DNA-Gehalt durch quantitative FACS-Analyse bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Transfektionen.

(B) Mitochondriale und zytoplasmatische Extrakte wurden aus den für (A) genommenen Proben isoliert. Jeweils 35 μ g Protein wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunblot mit einem anti-HA Antikörper untersucht. Nach Entfernen der Antikörper („Stripping“) erfolgte eine zweite Antikörper-Detektion mit einem Antikörper gegen die Untereinheit I der Cytochrom-Oxidase (COX I).

Wie in Fig 4.3 zu sehen, nahm der Anteil an apoptotischen Zellen über einen Zeitraum von 0 bis 20 h post-Transfektion kontinuierlich zu. Gleichzeitig konnte eine signifikante Akkumulation des überexprimierten ANT-1-HA in der mitochondrialen Fraktion der Zellen nachgewiesen werden, während in zytoplasmatischen Extrakten kein ANT-1-HA detektierbar war. Als Kontrolle für die mitochondriale Fraktion wurde ein Antikörper gegen die Untereinheit I der Cytochrom-Oxidase eingesetzt (Fig. 4.3).

1.1.3 Die Überexpression von ANT-1 führt zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und der Freisetzung von Cytochrom c

ANT-1 ist Bestandteil der PT-Pore, deren Aktivierung zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) führt. Um zu testen, inwieweit die ANT-1-induzierte Apoptose dieses biochemische Charakteristikum aufweist, wurden HeLa-Zellen mit Expressionsplasmiden für ANT-1 und GFP transfiziert und am darauffolgenden Tag mit dem Fluoreszenzfarbstoff CMXRos (“Mitotracker”) behandelt. Mitotracker färbt exklusiv nur Mitochondrien an, die über ein Membranpotential verfügen. Deutlich ist zu sehen, dass Zellen, die mit ANT-1 transfiziert wurden (Kotransfektion mit GFP), eine schwache Mitotracker-Fluoreszenz zeigen, verglichen mit Zellen, die mit dem leeren Kontrollvektor transfiziert wurden (Abb. 4.4. A). Da die Zellen keine morphologischen Veränderungen zeigen, die auf Apoptose hindeuten, scheint der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ein frühes Ereignis im ANT-1-vermittelten Zelltod zu sein. Eine unmittelbare Folge des Verlustes von $\Delta\Psi_m$ ist die Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Zytoplasmatische Extrakte aus ANT-1-transfizierten HEK 293T-Zellen wurden deshalb in einem Immunblot mit einem Antikörper gegen Cytochrom c untersucht. Eine prominente Bande bei ca. 14 kD konnte spezifisch in den Extrakten aus ANT-1-transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.4 B).

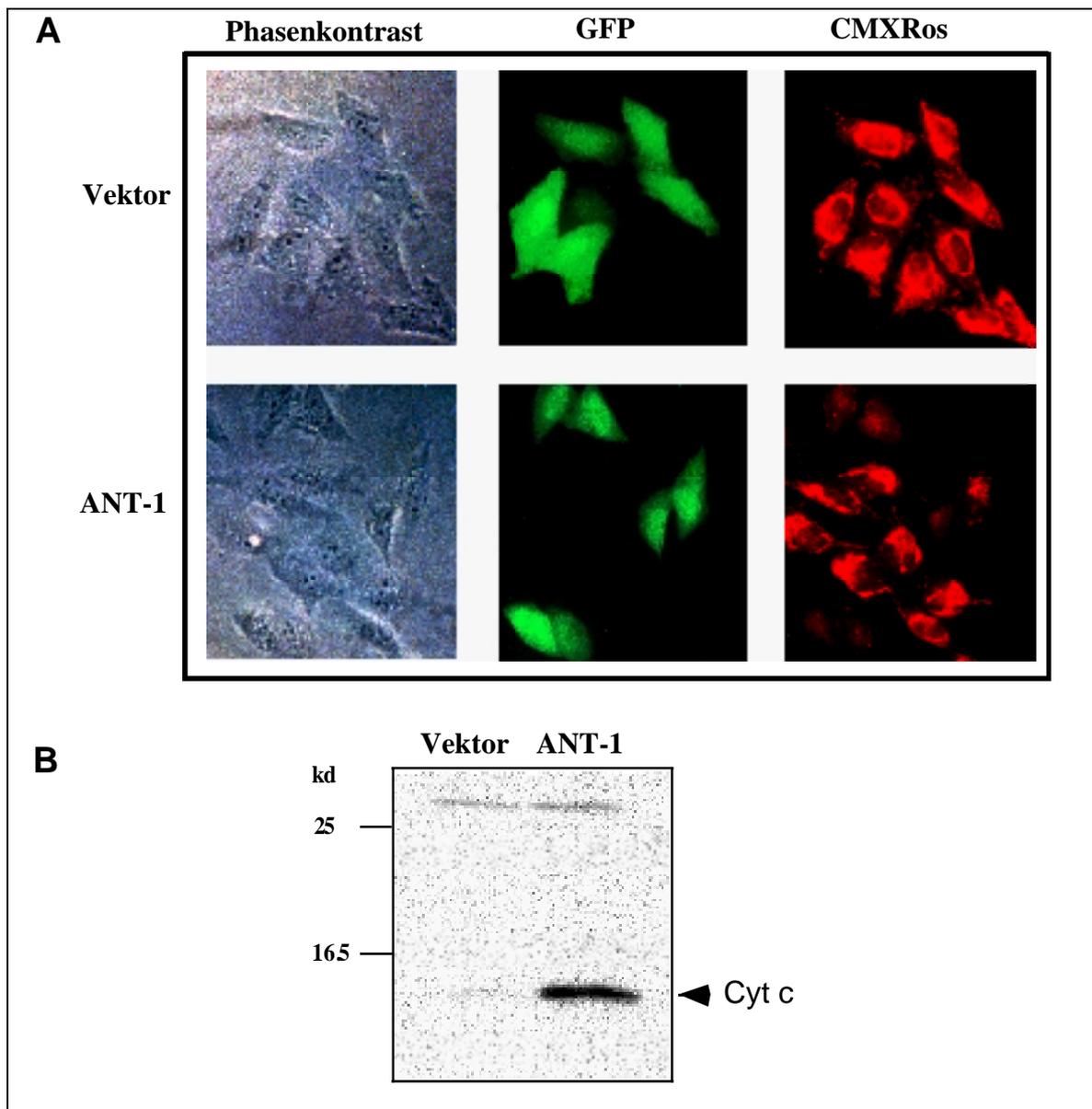


Abb. 4.4 Einfluss von ANT-1-Expression auf die Integrität von Mitochondrien.

(A) Transiente Transfektion von ANT-1 führt zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. HeLa-Zellen in 12-Loch-Platten wurden mit je 0,5 µg Expressionsplasmiden für GFP und ANT-1 bzw. leerem Vektor transfiziert und nach 16 h mit Mitotracker gefärbt. Die Dokumentation erfolgte mit einem Zeiss Axiophot Fluoreszenzmikroskop. GFP wurde bei 450-490 nm angeregt, CMXRos bei 546 nm. (B) Cytochrom c-Freisetzung nach ANT-1-Überexpression. Jeweils 10 µg leerer Vektor bzw. ANT-1-Expressionsplasmid wurden in HEK 293T-Zellen transfiziert. Nach 20 h wurden zytoplasmatische Extrakte präpariert und in einem Immunblot mit einem Anti-Cytochrom c Antikörper getestet.

4.1.4 ANT-1-Überexpression führt zur Aktivierung von Caspasen

Im Rahmen des Apoptose-Programms spalten spezielle Proteasen, die Caspasen, definierte zelluläre Substrate und katalysieren so die regulierte Selbstzerstörung der Zelle. Im Rahmen der mitochondrial induzierten Apoptose führt die zytoplasmatische Lokalisation von Cytochrom c (vgl. 1.3) zur Assemblierung eines Multiproteinkomplexes, des sog. "Apoptosoms". Dieser führt zur kaskadenartigen Aktivierung von Caspasen und somit zur Ausführung des apoptotischen Programms. Da ANT-1 zur Cytochrom c-Freisetzung führt, sollte hier die weitere Signaltransduktion untersucht werden. Verschiedene Experimente wurden durchgeführt, um eine mögliche Caspase-Aktivierung nachzuweisen. Die DNase CAD (Caspase-aktivierte DNase) spaltet nach Aktivierung die nucleosomale DNA und produziert so Fragmente von ca. 180 bp und Vielfache davon. Um den Status der DNA in ANT-1-transfizierten HEK 293T-Zellen zu untersuchen, wurde die sog. "niedermolekulare" DNA ("low molecular weight DNA") isoliert und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Nach Ethidiumbromid-Färbung war unter UV-Licht die charakteristische "DNA-Leiter", bestehend aus Vielfachen von 180 bp, sichtbar. DNA aus Zellen, die zur Kontrolle mit leerem Vektor transfiziert worden waren, zeigte keine Degradation (Abb. 4.5 A). Ein weiteres Caspase-Substrat ist das DNA-Reparaturenzym Poly-ADP-Ribose Polymerase (PARP). Für dieses Experiment wurden HEK 293T-Zellen mit leerem Vektor, dem proapoptischen Protein RIP sowie ANT-1 transfiziert. Nach 16 h wurden nukleäre Proteinextrakte präpariert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. In einem Immunblot mit einem anti-PARP Antikörper wurden in RIP- und ANT-1-transfizierten Zellen Signale bei ca. 90 kd detektiert, die als spezifische PARP-Abbaubanden interpretiert werden können (Abb 4.5 B). In einem dritten Experiment wurde untersucht, ob der Caspasen-Inhibitor fmk-zVAD die ANT-1-induzierte Apoptose hemmen kann. Das VAD-Tripeptid mimikriert eine kanonische Substratsequenz und wirkt so als kompetitiver Inhibitor. Dazu wurden HEK 293T-Zellen mit leerem Vektor, bzw. ANT-1 transfiziert und die Hälfte der Ansätze anschliessend mit fmk-zVAD behandelt. Die quantitative FACS-Analyse ergab eine Hemmung der ANT-1 -induzierten Apoptose um mehr als 90% (Abb. 4.5 C)

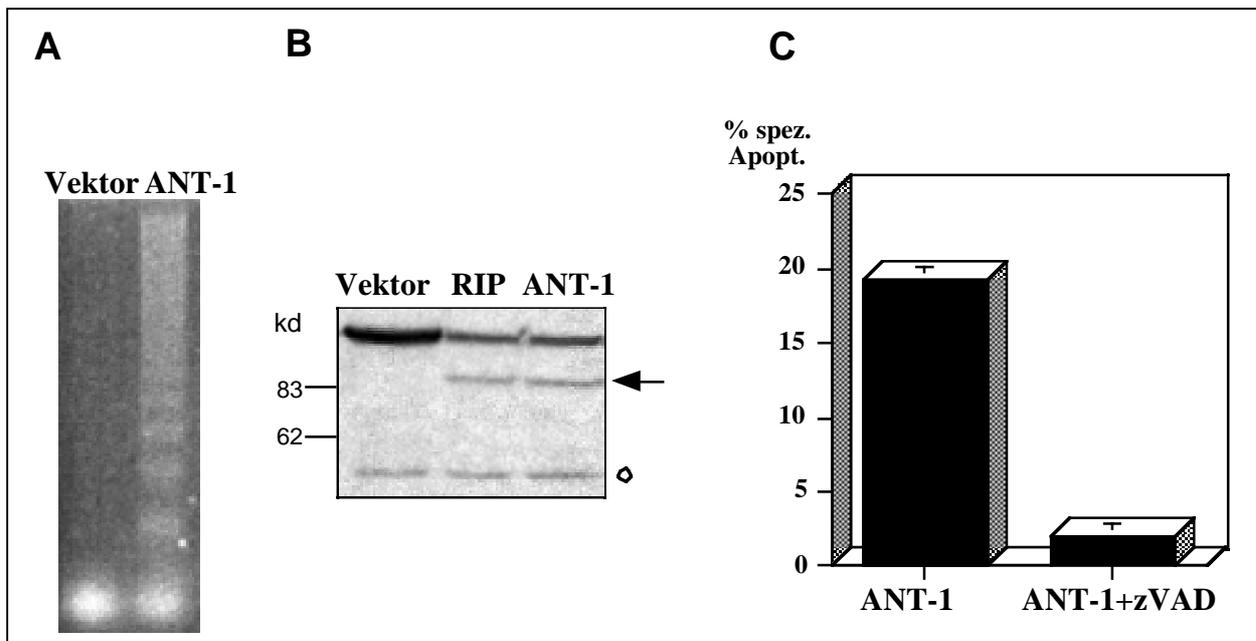


Abb. 4.5 Effekt von ANT-1 auf Caspase-abhängigen DNA- und Proteinabbau. (A) ANT-1 induziert die Fragmentierung nucleosomaler DNA. HEK 293T-Zellen in 10 cm-Kulturschalen wurden mit je 10 µg ANT-1-Expressionsplasmid bzw. leerem Vektor transfiziert. Nach ÜN-Inkubation wurde die niedermolekulare DNA isoliert, auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und nach Färbung mit Ethidiumbromid durch UV visualisiert. (B) ANT-1 induziert die Spaltung von PARP. HEK 293T-Zellen in 10 cm-Kulturschalen wurden mit jeweils 10 µg Expressionsplasmid für RIP und ANT-1 bzw. leerem Vektor transfiziert. Nach 16 h wurden nukleäre Proteinextrakte präpariert und auf einem Polyacrylamidgel (8% PAA) aufgetrennt. Der Status von PARP wurde in einem Immunblot mit einem spezifischen PARP-Antikörper untersucht. Das PARP-Fragment ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Eine unspezifische Bande (Kreis) wurde als interne Ladungskontrolle verwendet. (C) Inhibition von ANT-1 durch den Caspasen-Inhibitor zVAD. HEK 293T-Zellen in 6-Loch-Platten wurden jeweils mit 1 µg ANT-1-Expressionsplasmid oder einem Expressionsplasmid für Luciferase transfiziert. Nach 16 h wurde ein Teil der Zellen mit 50 µM zVAD behandelt. Die Analyse der Zellen erfolgte per FACS.

4.1.5 ANT-1-Punktmutanten, die defizient für ADP/ATP-Transport sind, induzieren Apoptose

Im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung werden durch Proteinkomplexe Protonen über die innere Mitochondrien-Membran gepumpt, so dass ein Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) entsteht. Der Rückfluss der Protonen treibt die ATP-Synthase an, so dass in der mitochondrialen Matrix mit ATP der zentrale Energielieferant der Zelle gebildet wird. ANT-1 ist der Transporter, der ADP in das Mitochondrium und im Gegenzug ATP ins Zytoplasma transportiert und so verfügbar macht. ATP verfügt über vier negative Ladungen, ADP hingegen nur über drei, d.h. der ADP/ATP-Antiport bedeutet einen Nettoexport einer negativen Ladung aus der mitochondrialen Matrix. Da der Protonengradient von der zytoplasmatischen Seite zur Matrix verläuft, könnte die Apoptose-Induktion durch ANT-1-Überexpression demnach das Ergebnis einer elektro-

chemischen Entkopplung sein. Um zu untersuchen, ob die Kapazität von ANT-1 Apoptose zu induzieren mit der Nukleotidtransport-Aktivität verknüpft ist, wurden sechs verschiedene Punktmutanten von ANT-1 durch PCR-Mutagenese hergestellt. Die mutierten Reste sind zwischen der Isoform aus *S. cerevisiae* AAC-1 und der murinen Proteinsequenz konserviert. Für jede der hergestellten Mutanten wurde bei AAC-1 ein Verlust der Transportaktivität nachgewiesen (Müller *et al.*, 1996). HEK 293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die entsprechenden Genkonstrukte sowie den ANT1-1-Wildtyp und anderen Kontrollen transfiziert und nach 16 h mit dem Cell Death Detection ELISA (CDD-ELISA; Roche, Mannheim) untersucht. Mit geeigneten Antikörpern werden hier in Lysaten aus transfizierten Zellen nucleosomale DNA-Fragmente nachgewiesen. Alle getesteten ANT-1-Punktmutanten sind nach wie vor in der Lage, Apoptose zu induzieren, teilweise wohl stärker als der Wildtyp (Abb. 4.6).

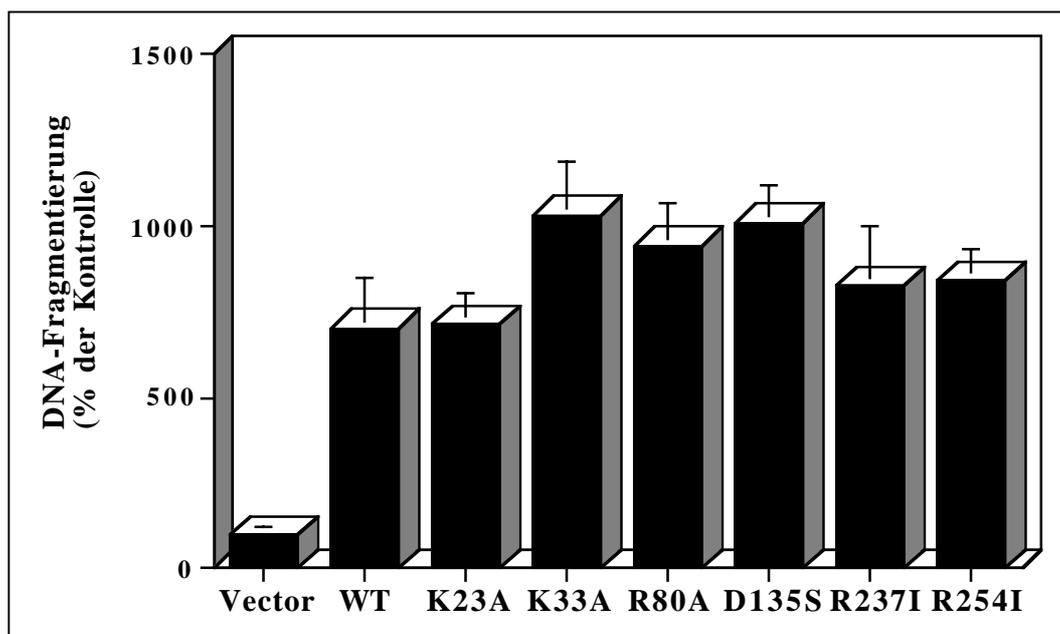


Abb. 4.6. Apoptose-Induktion durch Nukleotidtransport-defiziente ANT-1-Punktmutanten. Jeweils 1 µg Expressionsplasmid für Wildtyp ANT-1 bzw. 6 verschiedene Punktmutanten wurden in HEK 293T-Zellen transfiziert. Nach 16 h wurden die Zellen mit dem CDD-ELISA analysiert. Für jede Punktmutante sind die Aminosäureposition und der ausgetauschte Rest angegeben. Die DNA-Fragmentierung ist als prozentuale Steigerung des Kontrollwertes (Vektor) dargestellt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen zeigen die Ergebnisse aus drei unabhängigen Transfektionen. In Zusammenarbeit mit Stefan Grimm.

4.1.6 Die N-terminale Hälfte von ANT-1 ist ausreichend für die Induktion von Apoptose

Um zu untersuchen, welche Bereiche des ANT-1-Proteins wichtig für die Apoptose-Induktion sind, wurden verschiedene Deletionsmutanten kloniert. Dabei wurden C-terminal verschieden grosse Bereiche des Proteins entfernt. Der Mutante $\Delta 201$ fehlen die Transmembrandurchgänge 5 und 6, die Mutante $\Delta 142$ besteht aus der N-terminalen Hälfte des Proteins und die Mutante $\Delta 102$ verfügt nur noch über die ersten beiden Transmembrandurchgänge. Wie unter 4.6 wurden HEK 293T-Zellen mit Expressionsplasmiden für ANT-1 Wildtyp sowie den verschiedenen Mutanten transfiziert und anschliessend mit dem CDD-ELISA analysiert. Die Mutante $\Delta 201$, der C-terminal 97 Aminosäuren fehlen, induziert genauso stark Apoptose wie der Wildtyp, während $\Delta 142$ noch ca. 50% der WT-Aktivität aufweist. Die Mutante $\Delta 102$ zeigt keinerlei Apoptose-Induktion (Abb. 4.7.)

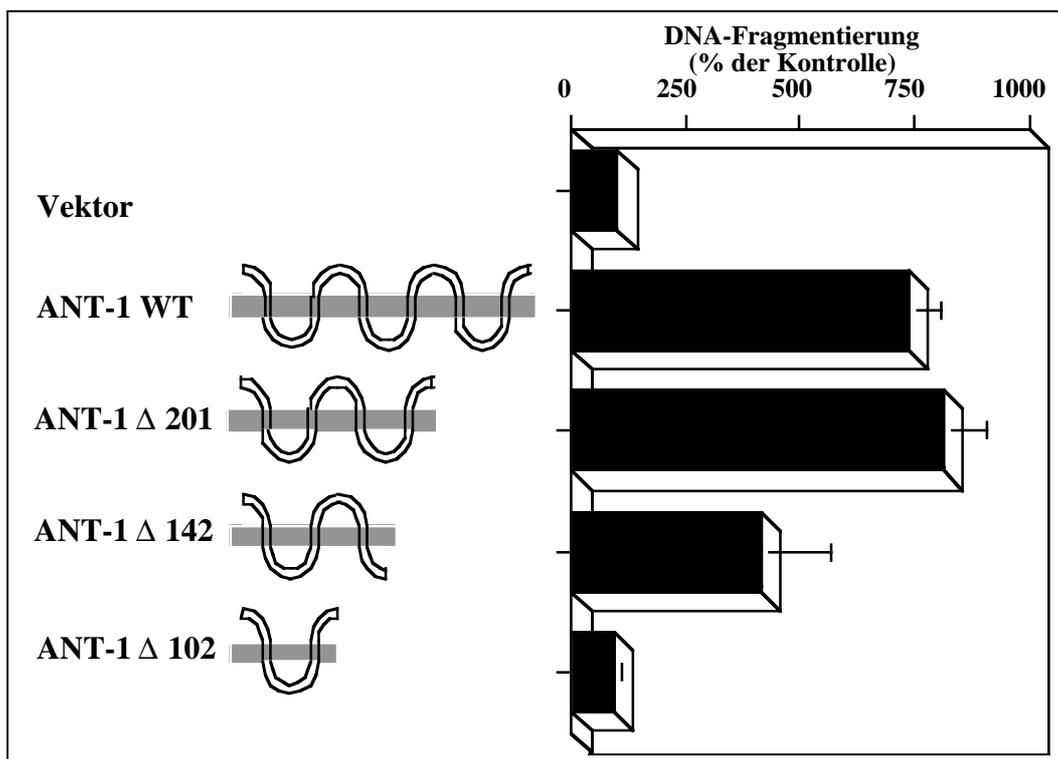


Abb. 4.7 Apoptose-Induktion durch ANT-1 Deletionsmutanten. HEK 293T-Zellen wurden in 12-Loch-Platten mit jeweils 1 μ g ANT-1 WT bzw. den angegebenen Deletionsmutanten transfiziert. Nach 16 h wurden die Zellen mit dem CDD-ELISA analysiert. Die DNA-Fragmentierung ist als prozentuale Steigerung des Kontrollwertes (Vektor) dargestellt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen zeigen die Ergebnisse aus drei unabhängigen Transfektionen. In Zusammenarbeit mit Stefan Grimm.

4.1.7 ANT-1 induziert Apoptose in HeLa-Zellen ohne mitochondriale DNA ($\rho 0$ -Zellen)

Die Überexpression eines Transmembranproteins der inneren Mitochondrienmembran könnte zu einer empfindlichen Beeinträchtigung der Struktur und Funktion von Proteinkomplexen der Elektronentransportkette (ETK) und so evtl. zur Auslösung des Zelltodprogramms führen. Die ETK wird von Proteinkomplexen gebildet, die sich aus kern- und mitochondrial-kodierten Polypeptiden zusammensetzen. Um zu prüfen, ob die ANT-1-induzierte Apoptose abhängig von einer funktionellen Elektronentransportkette ist, wurden Zellen hergestellt, die über keine mitochondriale DNA (mtDNA) mehr verfügen, sog. " $\rho 0$ -Zellen". Der komplette Verlust der mtDNA wird durch Kultur der Zellen in Anwesenheit geringer Mengen von Ethidiumbromid erreicht. Charakteristischerweise wachsen die Zellen dann in Abhängigkeit von Uridin (Marusich *et al.*, 1997). HeLa-Zellen wurden für sechs Wochen mit Ethidiumbromid im Wachstumsmedium gehalten (s. Legende, Abb. 4.8). Wachstum ohne Uridinzusatz im Medium führte nach 3 Tagen zum Tod der Zellen (Abb.4.8 A). Total-RNA aus HeLa- und HeLa $\rho 0$ -Zellen wurde isoliert und auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Nach Kapillartransfer und anschließender Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden konnte im Falle der $\rho 0$ -Zellen keine mRNA für die mitochondrial kodierte Untereinheit I der Cytochrom-Oxidase detektiert werden. Eine Kontrollhybridisierung gegen β -Actin ergab, dass gleiche Mengen RNA geladen worden waren (Abb.4.8 C). HeLa- und HeLa $\rho 0$ -Zellen wurden ausserdem mit Expressionsplasmiden für das proapoptotische Protein RIP, ANT-1 sowie mit leerem Vektor transfiziert und nach 48 h im FACS analysiert. RIP und ANT-1 induzieren in beiden Zelllinien vergleichbar stark Apoptose (Abb. 4.8 B).

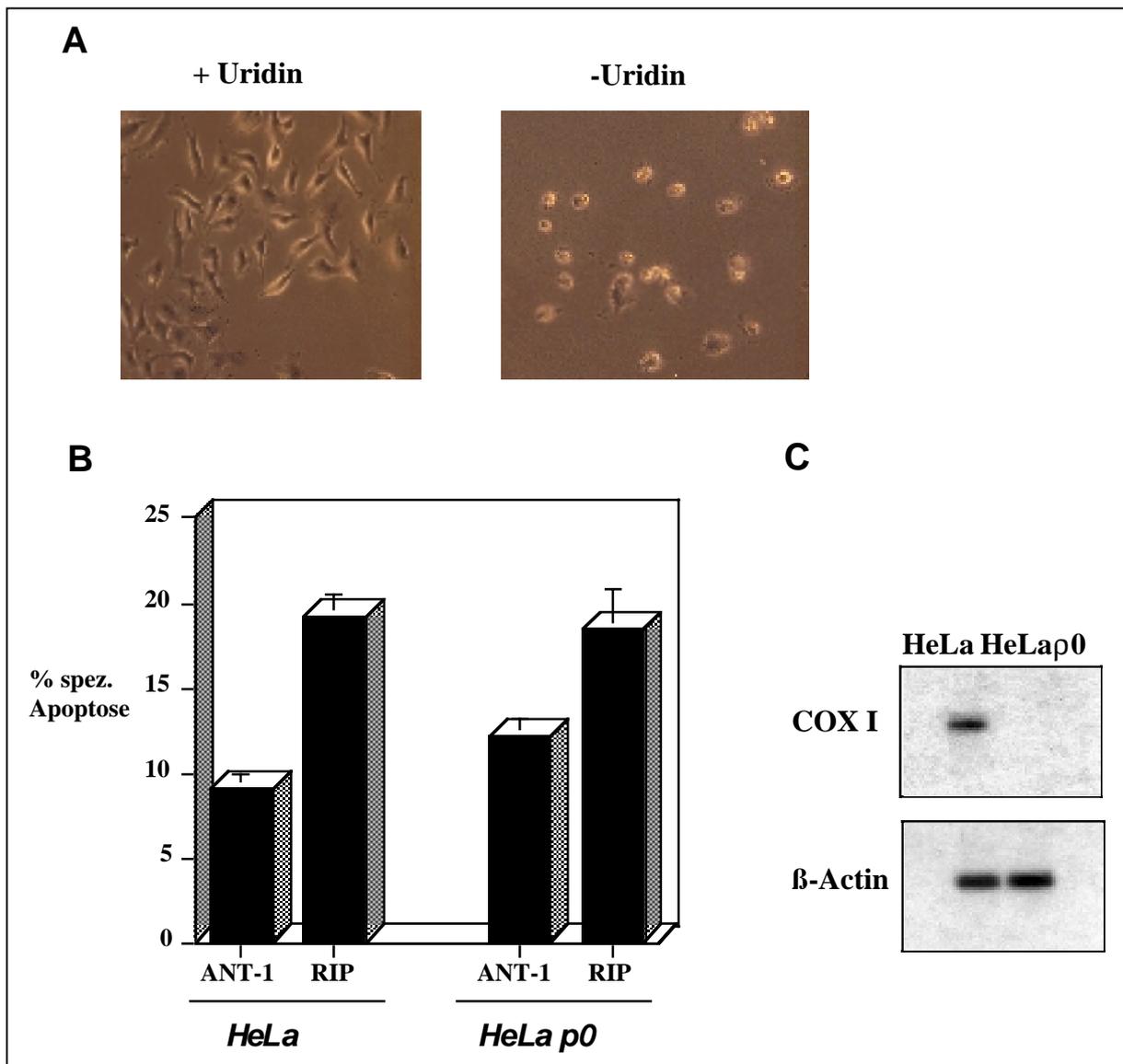


Abb. 4.8 HeLap0-Zellen sind sensitiv gegenüber ANT-1 induzierter Apoptose. (A) Uridinabhängigkeit von HeLap0-Zellen. HeLa-Zellen wurden für sechs Wochen mit 50 ng/ml Ethidiumbromid kultiviert. Jeweils ca. 10^4 der so hergestellten HeLa p0-Zellen wurden in 6cm-Schalen ausgesät und bei täglichem Mediumwechsel ($\pm 50 \mu\text{g/ml}$ Uridin) für 3 Tage bei 37°C und 5% CO_2 gehalten. Die Dokumentation erfolgte mit einem Zeiss Axiovert Mikroskop. Vergr. 200x (B) HeLap0-Zellen besitzen keine mRNA für COX I. Aus jeweils 5×10^6 Zellen wurde Total-RNA isoliert und 2x2 Aliquots (2x HeLa/HeLap0) von je $20 \mu\text{g}$ wurden auf einem 1%igen denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Nach einem Kapillartransfer wurde die Membran in zwei Hälften geteilt. Jeweils 5×10^6 cpm ^{32}P -markiertes DNA-Fragment zur Detektion von β -Actin (Basen 1201-1794) oder COX I (Basen 5999-6925) wurden zur Hybridisierung eingesetzt. Die Detektion der Banden erfolgte durch Autoradiographie (C) ANT-1 induziert Apoptose in HeLap0-Zellen. Zellen in 12-Loch-Platten wurden mit jeweils $0,2 \mu\text{g}$ Expressionsplasmid für RIP, ANT-1 bzw. leerem Vektor transfiziert und 40 h später per FACS analysiert.

4.1.8 Die Überexpression des Adenin-Nukleotid-Translokator-2 (ANT-2) induziert keine Apoptose

Der Adenin-Nukleotid-Translokator-2 (ANT-2) ist eine hochgradig homologe Isoform von ANT-1. ANT-2 ist ebenfalls ein Transmembranprotein der inneren Mitochondrienmembran und besitzt die gleiche Anzahl von Aminosäuren wie ANT-1. Die Expression von ANT-2 und ANT-1 zeigt deutliche Unterschiede bzgl. der Gewebsspezifität. Auch die Transportkinetik der beiden Translokatoren weist leichte Unterschiede auf. Auf Proteinebene besitzen die beiden Gene eine Identität von fast 90 %. Daher war es naheliegend, zu untersuchen, ob auch ANT-2 bei Überexpression Apoptose induzieren kann. Interessanterweise zeigt ANT-2 im entsprechenden Experiment keinerlei Potenzial den Tod von Zellen zu induzieren, obwohl die Expression des Proteins mit der von ANT-1 vergleichbar ist (Abb. 4.9).

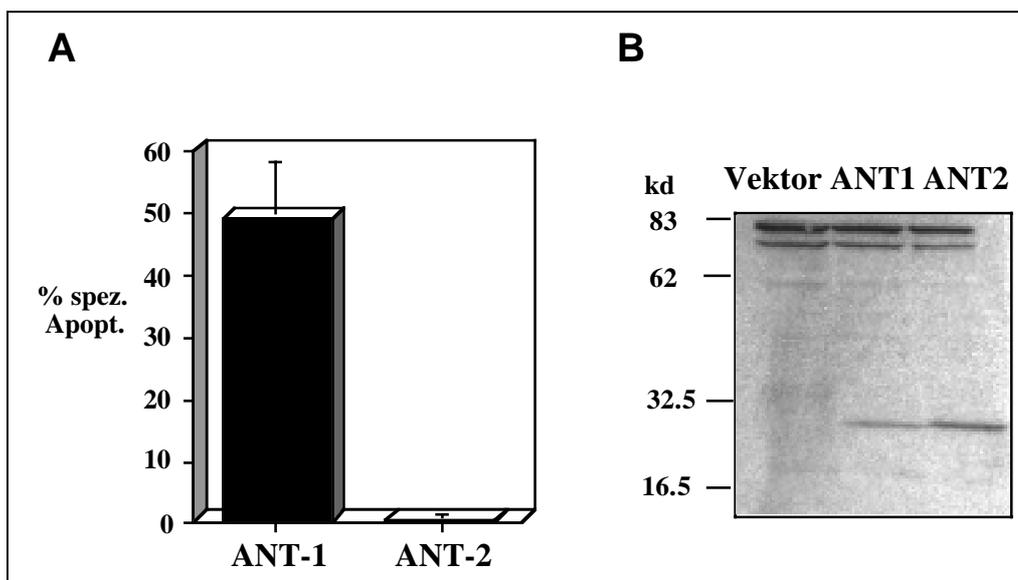


Abb. 4.9. Vergleich der Apoptose-Induktion durch ANT-1 und ANT-2 (A) ANT-2 induziert keine Apoptose bei Über-expression. HEK 293T-Zellen wurden in 6-Loch-Platten mit je 1 µg Expressionsplasmid für ANT-1 bzw. ANT-2 oder mit leerem Vektor transfiziert. Nach 16 h wurden die Zellen für die quantitative FACS-Analyse verwendet. **(B)** Beide ANT-Isoformen werden exprimiert und in Mitochondrien importiert. HEK 293T-Zellen wurden in 10 cm-Schalen mit jeweils 10 µg Expressionsplasmid kodierend für HA-Fusionen von ANT-1, ANT-2 bzw. mit leerem Vektor transfiziert. Nach 24 h wurden mitochondriale Proteinextrakte (vgl. Abb.4.3) präpariert und Aliquots von 35 µg wurden per SDS-PAGE (10% PAA) aufgetrennt. In einem Immunblot wurden die Proben mit einem anti-HA-Antikörper analysiert. Abb A in Zusammenarbeit mit Manuel Bauer.

4.1.9 Die Überexpression von ANT-1 in *S. cerevisiae* beeinflusst nicht die Zellproliferation

Das proapoptotische Bcl-2-Gen Bax induziert bei Überexpression in *S. cerevisiae* eine Form von Zelltod, die makroskopisch als Wachstumsinhibition sichtbar ist. Die Bax-induzierte Apoptose in Säugerzellen scheint über die PT-Pore vermittelt zu werden, evtl. durch direkte Interaktion mit ANT-1. Hier sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die Überexpression von ANT-1 in Hefezellen hat.

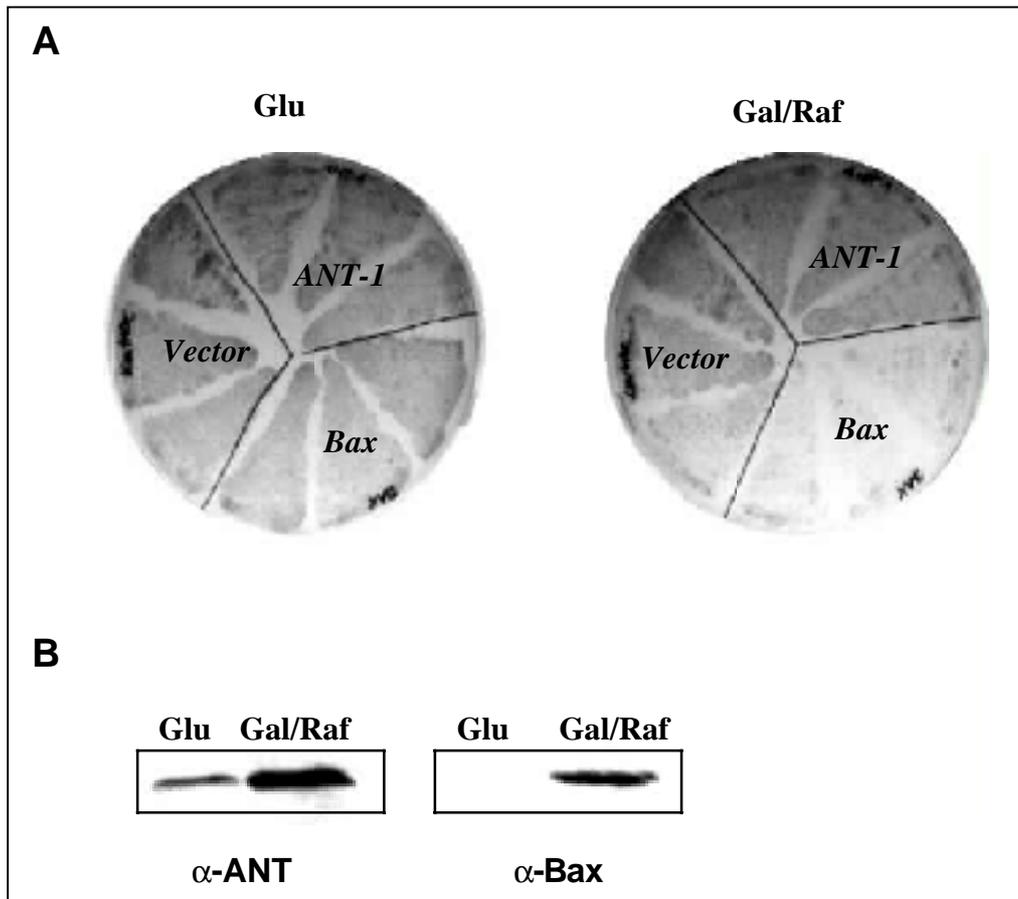


Abb. 4.10. Einfluss von Bax- und ANT-1-Expression auf das Wachstum von Hefezellen.

(A) Die Expression von Bax, nicht jedoch von ANT-1, führt zur Wachstumsinhibition von Hefezellen. Für Bax bzw. ANT-1 kodierende cDNAs wurden in den Hefeexpressionsvektor pYESTrp (Invitrogen, Heidelberg) inseriert und standen so unter dem Einfluss eines durch Galactose/Raffinose-induzierbaren Promoters. Mit den jeweiligen Plasmiden bzw. leerem Vektor transformierte Hefezellen des Stamms EGY 48 (*MATa trp1 ura3 his3 leu2::plexAop₆-leu2*) wurden auf YC Ura⁻/Trp⁻-Agarplatten (20% (w/v) Glucose) inokuliert. Nach 24 h wurden je drei unabhängige Klone in YC Ura⁻/Trp⁻-Flüssigmedium propagiert und bei einer OD_{600nm} geerntet. Jeweils 4,5x10⁴ Zellen wurden auf YC Ura⁻/Trp⁻-Agarplatten (2% (w/v) Glucose bzw. 2% (w/v) Galactose+2% (w/v) Raffinose) ausgestrichen. Die Dokumentation erfolgte nach drei Tagen Inkubation bei 30°C. (B) Kontrolle der induzierbaren Expression von Bax und ANT-1 in Hefezellen. Klone aus (A) wurden für 8 h in YC mit bzw. ohne Galaktose/Raffinose (Konzentrationen siehe (A)) im Schüttelinkubator gehalten. Gesamtproteinextrakte wurden präpariert und per SDS-PAGE (10% PAA) aufgetrennt. In einem Immunblot wurde ein Antiserum gegen ANT-1 (Labor Klingenberg, München) sowie ein mAb gegen Bax eingesetzt. Das ANT-spezifische Antiserum kreuzreagiert mit der Hefe-Isoform. In Zusammenarbeit mit Ulla Cramer und Manuel Bauer.

Dazu wurden cDNAs, die für Bax und ANT-1 kodieren, in einen Galactose/Raffinose-induzierbaren Expressionsvektor, der die Uracil- (Ura) und Tryptophan (Trp)-Auxotrophie des verwendeten Hefestamms komplementiert, subkloniert. Nach Transformation mit den entsprechenden Plasmiden wurden die Hefezellen auf Ura⁻/Trp⁻-Agar-Platten wachsen gelassen. Die aus dieser Selektion resultierenden Klone wurden in Ura⁻/Trp⁻-YC-Flüssigkulturen inokuliert und anschliessend auf Glucose- bzw. Galactose/Raffinose-haltige Agarplatten ausgestrichen. Auf Glucose-haltigen Agarplatten zeigen die Hefezellen normales Wachstum, unabhängig vom transformierten Plasmid. Im Gegensatz dazu ist auf der Galactose/Raffinose-haltigen Platte eine deutliche Wachstums-Inhibition der Bax-transformierten Zellen zu beobachten. Keinerlei Effekt auf das Wachstum hat die Transformation der Zellen mit leerem Vektor oder ANT-1-Expressionsplasmid (Abb.4.10 A). In Gesamtzellextrakten, die aus parallel inokulierten Flüssigkulturen gewonnen wurden konnte eine spezifische Verstärkung der ANT-1- und Bax-Expression in Abhängigkeit von Galactose/Raffinose gezeigt werden (Abb.4.10 B).

4.1.10 ANT-1 induziert Apoptose in der Myoblasten-Zelllinie H9c2

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist eine schwere dystrophische Erkrankung des Herzmuskels, gekennzeichnet durch eine prominente Herzinsuffizienz, die eine Erweiterung (Dilatation) des rechten und/oder linken Ventrikels bewirkt. DCM ist die häufigste primäre (d.h. mit bisher unbekannter Ätiologie) Kardiomyopathie, die Anzahl der Neuerkrankungen weist eine steigende Tendenz auf (Inzidenz z.Zt. 36 Fälle pro 100.000 Einwohner). Die Therapie der Wahl ist z.Zt. die Transplantation eines gesunden Spenderherzens (Stierle *et al.*, 1997). Doerner und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die ANT-1-Expression im Myokard von DCM-Patienten signifikant erhöht ist, dies gilt sowohl für die RNA- als auch die Protein-Expression. In anderen primären Kardiomyopathien wie der restriktiven oder der hypertrophen Kardiomyopathie (RCM bzw. HCM) sind keinerlei Veränderungen der ANT-1-Expression festzustellen. Interessanterweise findet man in Myokard-Gewebeschnitten von DCM-Patienten deutlich mehr apoptotische Zellen als in Schnitten von gesunden Kontrollpersonen (Narula *et al.*, 1996, Doerner *et al.*, 1997b) . Es besteht aufgrund dessen die Möglichkeit, dass die Myokard-Dystrophie bei DCM-Patienten auf Apoptose, induziert durch ANT-1-Überexpression, zurückzuführen ist. Diese

Fragestellung sollte in Kollaboration mit anderen Labors bzw. Firmen im transgenen Tiermodell bearbeitet werden. In einem ersten Vorversuch sollte getestet werden, ob ANT-1-Überexpression in einer Muskel-Zelllinie Apoptose induziert. Hierfür wurde die aus Rattengewebe gewonnene Myoblasten-Zelllinie H9c2 verwendet. Die Überexpression von ANT-1, jedoch nicht von ANT-2, induziert in den Zellen einen typischen Apoptose-Phänotyp (Abb 4.11 A). Aufgrund der geringen Transfektionseffizienz wurden die Zellen nicht per FACS analysiert. Für die Auswertung wurden stattdessen die GFP-positiven Zellen gezählt und der Anteil an abgerundeten, toten Zellen bestimmt (Abb.4.11 B).

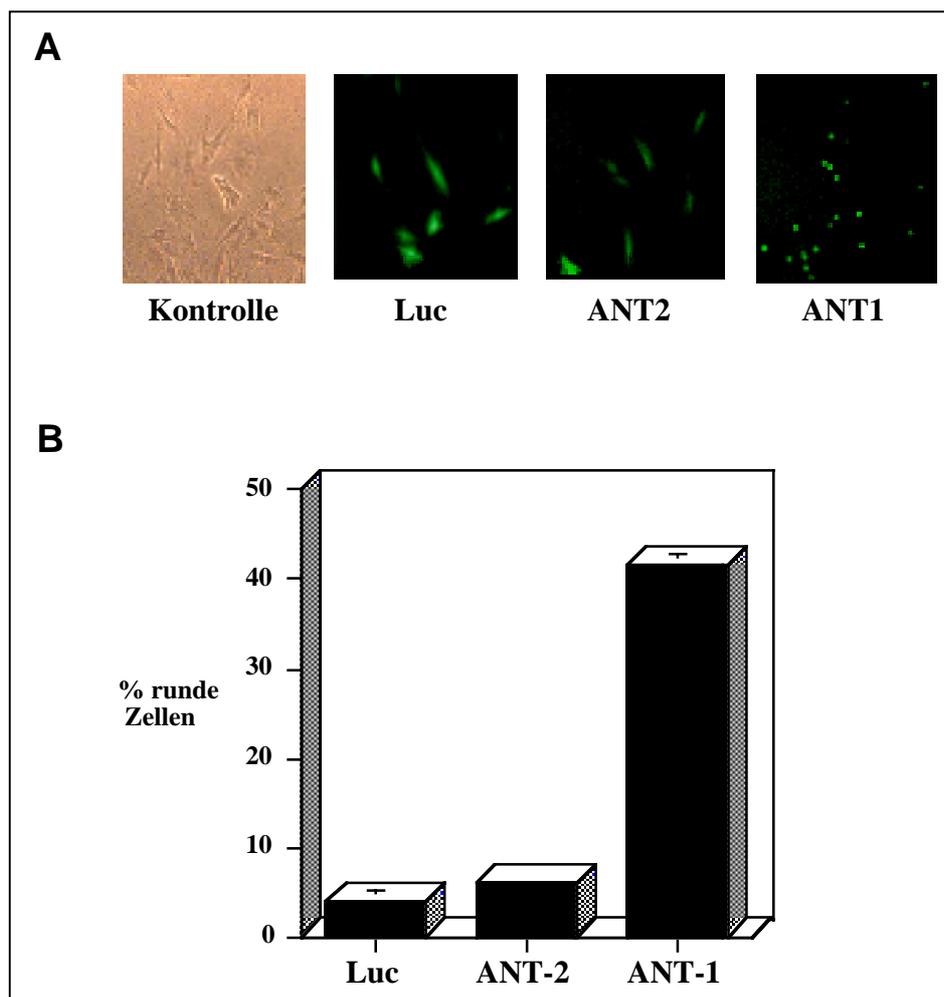


Abb. 4.11. ANT-1-Überexpression induziert Apoptose in der Myoblasten-Zelllinie H9c2. (A) Apoptose-Phänotyp von H9c2-Zellen nach ANT-1-Transfektion. Die Zellen wurden in 6-Loch-Platten mit je 1 µg GFP-Expressionsplasmid bzw. 1 µg Expressionsplasmid für Luciferase (Luc) bzw. ANT-1 und -2 transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit dem Transfektionsreagenz FuGENE. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen unter einem Zeiss Axiovert-Fluoreszenz-Mikroskop inspiziert. Die Anregung der GFP-Fluoreszenz erfolgte bei 450-490 nm. Vergr. 200x (B) Quantitative Apoptose-Induktion in H9c2-Zellen durch ANT-1-Überexpression. Jeweils 300 GFP-positive Zellen wurden inspiziert und der Anteil runder bzw. apoptotischer Zellen bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen repräsentieren jeweils drei unabhängige Bestimmungen.

4.1.11 Die ANT-1-induzierte Apoptose kann durch den PTP-Inhibitor Bongkreksäure gehemmt werden

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Apoptose-Induktion durch ANT-1-Überexpression nicht auf einer gesteigerten Nukleotidtransport-Aktivität oder der Ausbildung eines unspezifischen Kanals beruht (4.5, 4.9). Die Tatsache, dass die sehr homologe Isoform ANT-2 keinerlei Potential zeigt, bei Überexpression Apoptose zu induzieren, spricht ebenfalls für eine spezifische Aktivierung von intrazellulären Zelltod-Signalen. Hier sollte untersucht werden, ob die ANT-1-Überexpression zu einer Öffnung der endogenen PT-Pore und so zur mitochondrialen Apoptose-Induktion, führt.

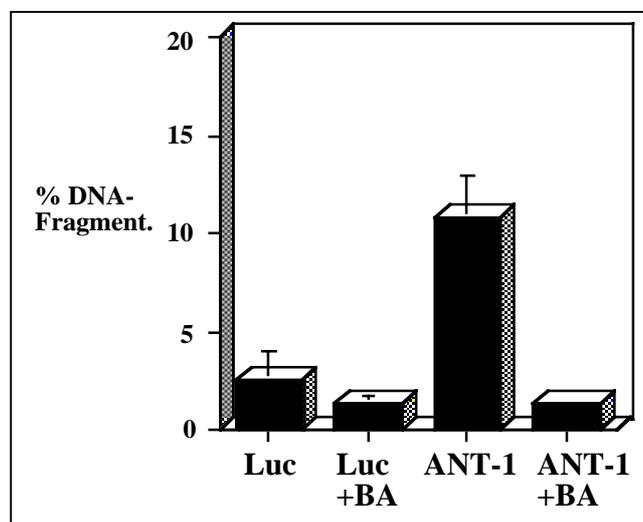


Abb. 4.12. Inhibition der ANT-1-induzierten Apoptose durch Bongkreksäure. HEK 293T-Zellen in 6-Loch-Platten wurden jeweils mit 1 µg Expressionnsplasmid für ANT-1 bzw. Luciferase (Luc) transfiziert. Nach 5 h wurde das Wachstumsmedium gewechselt und jeweils die Hälfte der ANT-1- bzw. Luc-Ansätze wurde mit Wachstumsmedium, dem 65 µM Bongkreksäure (BA) zugesetzt war behandelt. Dargestellt ist der Anteil der Zellen mit hypodiploidem DNA-Gehalt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen repräsentieren jeweils drei unabhängige Transfektionen.

Zu diesem Zweck wurde der PTP-spezifische Inhibitor Bongkreksäure eingesetzt. HEK 293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für ANT-1 bzw. Luciferase transfiziert und Aliquots der jeweiligen Ansätze wurden beim Medienwechsel mit Bongkreksäure behandelt. Eine komplette Repression der ANT-1 induzierten Apoptose durch Bongkreksäure konnte beobachtet werden (Abb. 4.12).

4.1.12 Die Kotransfektion der Peptidyl-prolyl-Isomerase Cyclophilin D (CypD) hemmt die ANT-1 induzierte Apoptose vollständig

Die Aktivierung der PT-Pore und die sukzessive Zelltod-Signaltransduktion scheinen integrale Elemente der ANT-1 induzierten Apoptose zu sein. Sämtliche bisherigen Experimente sprechen für ein hochspezifisches, mitochondriales Todessignal, ausgelöst durch ANT-1-Überexpression. Vor allem die Inaktivität von ANT-2 bzgl Apoptose-Induktion lässt vermuten, dass eventuell Protein:Protein-Interaktionen zwischen ANT-1 und einem noch unbekanntem Protein zur Aktivierung der PT-Pore führen könnten. So gesehen wäre es denkbar, dass überexprimiertes ANT-1 einen Faktor bindet, der normalerweise für die Inhibition der PT-Pore wichtig ist, und so quasi 'ausgetriggert', was in der Folge zur Öffnung der PTP führen könnte. In diesem Fall müsste die ANT-1-induzierte Apoptose durch Kotransfektion mit dem entsprechenden Faktor hemmbar sein. Es erschien in diesem Fall naheliegend Proteine zu testen, die als Komponenten der PT-Pore vermutet werden. Zu diesem Zweck wurden cDNAs, die für die mitochondriale Creatinkinase (CK), den peripheren Benzodiazepinrezeptor (BDR), die mitochondriale Peptidyl-prolyl-Isomerase Cyclophilin D (CypD) sowie für den 'Voltage-Dependent Anion Channel I' (VDAC I) kodieren, kloniert und im dreifachen Überschuss zu ANT-1 kotransfiziert. Die Kotransfektion von ANT-1 und Cyclophilin D führte zu einer signifikanten Apoptose-Inhibition. Eine ebenfalls deutliche Hemmung der Apoptose war bei der Kotransfektion von ANT-1 und der Creatinkinase (CK) zu beobachten, während alle anderen PT-Faktoren keinerlei Einfluss auf die ANT-1-induzierte Apoptose hatten (Abb.4.13 A).

Als Kontrolle für die Spezifität des ANT-1-Apoptose-Signals wurde untersucht, inwieweit die Überexpression der klonierten PT-Faktoren zu Apoptose-Induktion führt. Dazu wurden HEK 293T-Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert und per FACS analysiert. Im Vergleich zu dem ANT-1-Expressionsplasmid wurde für die PT-Faktoren die fünffache DNA-Menge eingesetzt, um Gene mit vermeintlich geringerem Apoptose-Potential zu erfassen. Die VDAC-Expression führte zu Apoptose-Induktion, wenn auch in einem relativ schwachen Maße verglichen mit der Apoptose-Induktion durch ANT-1. Alle anderen getesteten Gene induzierten keinen Zelltod (Abb. 4.13 B).

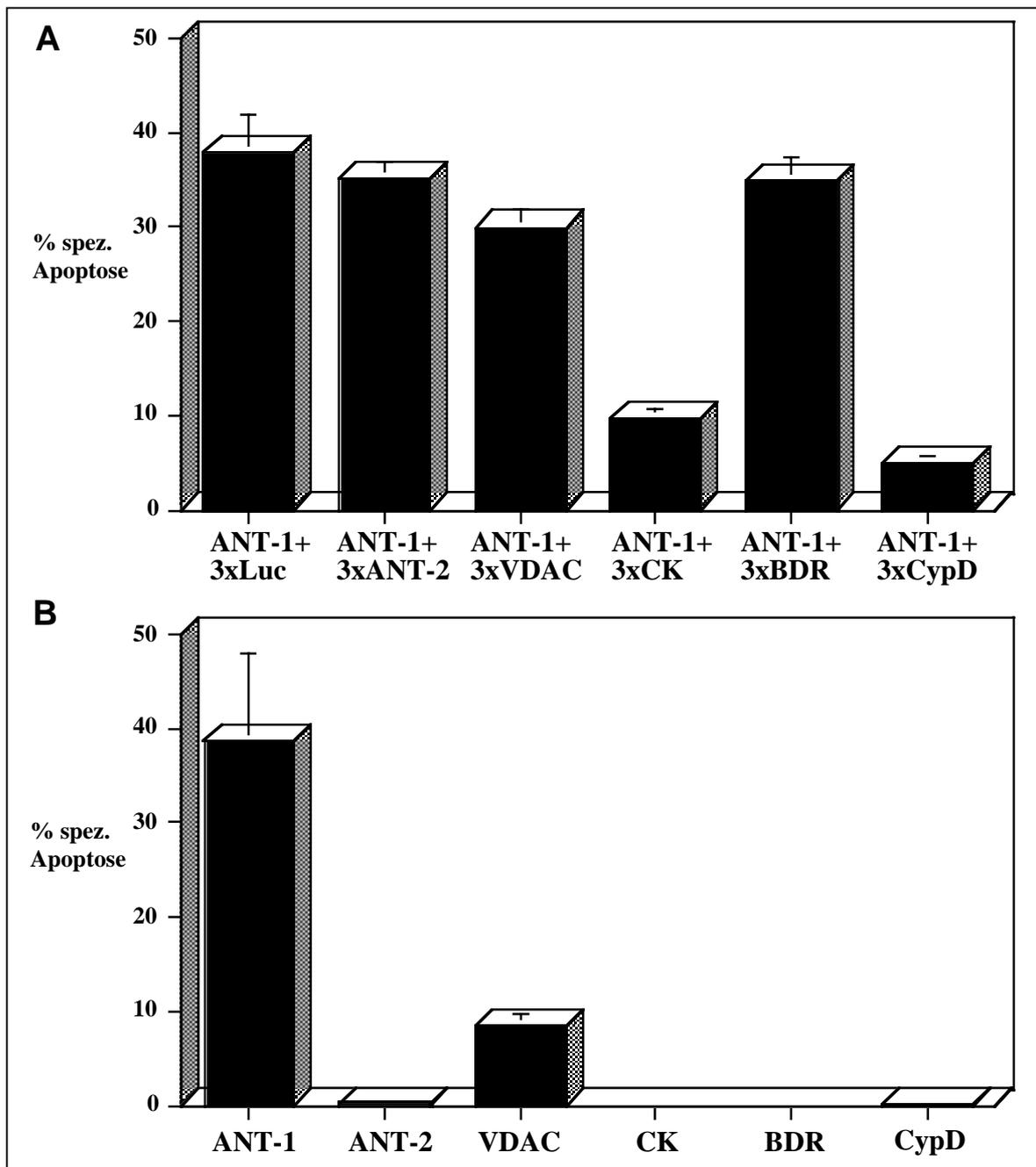


Abb. 4.13 PT-Poren-Proteine und ihre Rolle in der Apoptose. (A) Apoptose-Infektion durch PT-Komponenten HEK 293T-Zellen in 6-Loch-Platten wurden pro Vertiefung mit 5 µg Expressionsplasmid für ANT-2, VDAC (bzw. 1 µg ANT-1-Expressionsplasmid und 4 µg Luciferase-Expressionsplasmid) etc. sowie 1 µg GFP-Expressionsplasmid transfiziert. Die FACS-Analyse erfolgte nach 18 h. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen repräsentieren drei unabhängige Transfektionen. (B) Bestimmte PTP-Faktoren inhibieren bei Koftransfektion die ANT-1-induzierte Apoptose. HEK 293T-Zellen in 6-Loch-Platten wurden pro Vertiefung mit 1 µg ANT-1-Expressionsplasmid, 1 µg GFP-Expressionsplasmid und 3 µg Expressionsplasmid für Luciferase, ANT-2 usw. transfiziert. Nach 18 h erfolgte die Analyse der Zellen per FACS. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen repräsentieren drei unabhängige Transfektionen.

4.1.13 Durch ANT-2/ANT-1-„Austausch-Mutanten“ lassen sich Domänen identifizieren, die für die Apoptose-Induktion durch ANT-1 wichtig sind

Die bisherigen Ergebnisse deuten daraufhin, dass die ANT-1-Überexpression durch spezifische Protein:Protein-Interaktionen zu einer Aktivierung der PT-Pore führt. Vor allem die Kotransfektion von Cyclophilin D (CypD), einer Peptidyl-prolyl-Isomerase in der mitochondrialen Matrix, führt zur Repression der ANT-1-induzierten Apoptose. Woodfield und Kollegen konnten zeigen, dass ANT-1 und CypD physikalisch interagieren (Woodfield *et al.*, 1998). Es erschien daher sinnvoll, zunächst zu testen, welche Regionen im ANT-1-Protein für die Apoptose-Induktion wichtig sind und eventuelle Bindungsmodule für Interaktionen mit anderen PT-Komponenten darstellen könnten. Da die Proteinsequenz der ANT-2-Isoform zu fast 90% identisch mit der von ANT-1 ist, bei gleicher Anzahl der Aminosäuren und „Drei-Domänen-Struktur“, bot es sich an, definierte homologe Abschnitte der beiden Proteine auszutauschen. Durch rekombinante PCR wurden N-terminale ANT-1/ANT-2-„Austausch-Mutanten“ hergestellt, d.h. chimäre Proteine, in denen beispielsweise die ersten 17 Aminosäuren der ANT-2-Sequenz entsprechen, während die restlichen 282 Aminosäurereste ANT-1-spezifisch sind („ex17“). Sechs verschiedene Austausch-Mutanten wurden kloniert und auf ihre Apoptose-Induktion nach Überexpression getestet. Der Austausch der ersten, höchstwahrscheinlich zytoplasmatisch lokalisierten 17 Aminosäuren am N-Terminus („ex 17“) führt zu einer Abschwächung der Apoptose-Induktion um ca. 25% verglichen mit dem ANT-1 Wildtyp (von 41% auf 31%). Werden die nächsten 50 ANT-1-spezifischen Aminosäurereste gegen die homologe ANT-2-Sequenz ausgetauscht, so hat dies keine signifikanten Auswirkungen auf die Apoptose-Induktion („ex 67“: 29% spezifische Apoptose). Die Mutante „ex 107“ verfügt dagegen nur noch über ca. 50% der wt-Aktivität von ANT-1 (22% gegenüber 41%) und die Chimäre „ex 170“ lediglich über 17% der Wildtypaktivität (7% spez. Apoptose) Die Mutante „ex 227“ induzierte ebenso wie ANT-2 keine Apoptose (Abb. 4.14 A). In einem Immunblot wurde die Expression verschiedener Austauschmutanten, in Form von C-terminalen HA-Fusionsproteinen, getestet. Sowohl apoptotisch aktive (ex67, ex107) wie inaktive (ex170, ex227) werden danach gleichermassen stark exprimiert (Abb. 4.14 B).

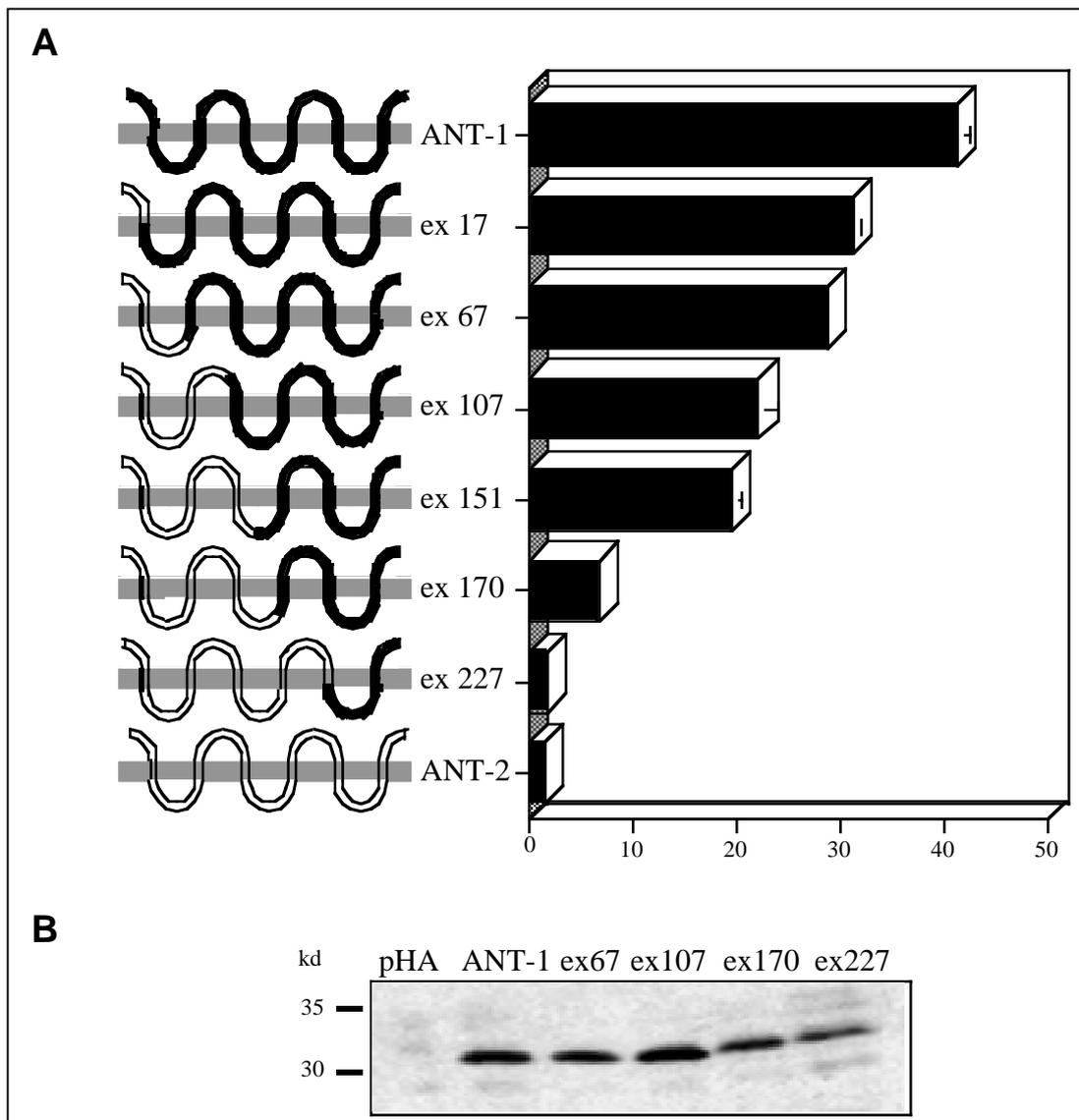


Abb. 4.14. Charakterisierung chimärer ANT1/2-Austausch-Mutanten.

(A) Zelltod ausgelöst durch Expression von ANT1/2-Austauschmutanten. HEK 293T-Zellen in 6-Loch-Platten wurden je mit 1 μ g Expressionsplasmid bzw. solchen kodierend für ANT-1, ‚ex17‘ etc. sowie 1 μ g GFP-Expressionsplasmid transfiziert und 16 h darauf per FACS analysiert. Die gezeigten Mittelwerte und Standardabweichungen sind repräsentativ für drei unabhängige Bestimmungen. (B) Nachweis der Expression verschiedener ANT1/2-Austausch-Mutanten. HEK 293T-Zellen in 10cm-Kulturschalen wurden mit je 8 μ g pHA-Expressionsplasmid bzw. solchen kodierend für ANT-1-HA bzw. den angegebenen Mutanten (HA-Fusionen) transfiziert. Nach 24 h wurden Gesamtproteinextrakte hergestellt und in einem Immunblot mittels eines HA-Antikörpers analysiert.

4.2 CypD als Repressor der mitochondrial vermittelten Apoptose

4.2.1 Die Hemmung der ANT-1-induzierten Apoptose durch Kotransfektion von CypD ist dosisabhängig und interferiert nicht mit der Expression des Proteins

Um zu klären, ob die starke Hemmung der ANT-1-induzierten Apoptose durch CypD dosisabhängig ist, wurden variierende Mengenverhältnisse der jeweiligen Expressionsplasmiden in Kotransfektionsexperimenten eingesetzt. Als Kontrollen für eine Inhibition des mitochondrial induzierten Zelltodes dienten die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L. HEK 293T-Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und nach 18 h mittels FACS analysiert. Bei einem Mengenverhältnis von 1:1 (z.B. 1 µg ANT-1-Expressionsplasmid und 1 µg CypD-Expressionsplasmid) hemmt CypD die ANT-1-induzierte Apoptose um ca. 70% (44% auf 13%) während Bcl-2 und Bcl-x_L keinen signifikanten Hemmeffekt zeigen. Wenn fünfmal mehr Cyclophilin D-Expressionsplasmid als solches für ANT-1 eingesetzt wird, so ist die Hemmung nahezu vollständig (von 43% auf 0,5%). Die Inhibition der ANT-1-induzierten Apoptose durch Bcl-2 beträgt in diesem Versuch ca. 70% (43% auf 13%). Der ausserordentlich starke Hemmeffekt von CypD warf die Frage auf, inwieweit Sekundäreffekte der Koexpression der beiden Proteine dafür verantwortlich zu machen sind. Beide Proteine sind beispielsweise nukleär kodiert und müssen in Mitochondrien importiert werden - ein möglicherweise limitierender Schritt. Aus diesem Grund wurde untersucht, inwieweit das überexprimierte ANT-1-Protein bei Koexpression von Cyclophilin D in mitochondrialen Proteinextrakten nachgewiesen werden kann. HEK 293T-Zellen wurden mit einem ANT-1-myc-Konstrukt und einem fünffachen Überschuss Luciferase bzw. CypD transfiziert. Mitochondriale Proteinextrakte wurden anschliessend in einem Immunblot mit verschiedenen Antikörpern analysiert. Es ist klar ersichtlich, dass die Anwesenheit von CypD keinen Einfluss auf die Expression und den mitochondrialen Import von überexprimiertem ANT-1-myc hat. Ein Immunblot gegen Tim 23, wie ANT-1 in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert, indiziert dabei gleiche Mengen aufgetragenen mitochondrialen Proteins (Abb.4.15).

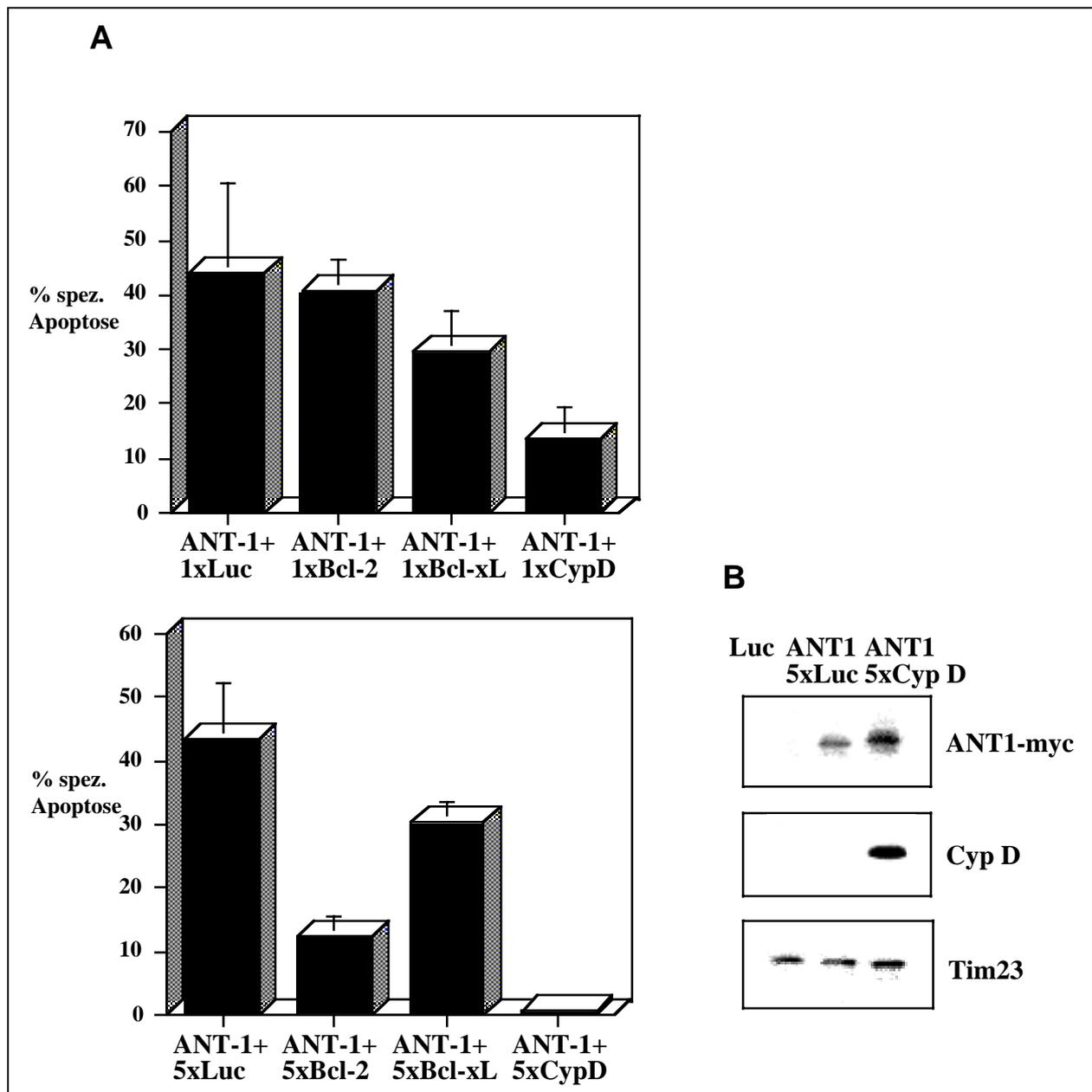


Abb. 4.15 Dosisabhängige Hemmung der ANT-1-induzierten Apoptose durch CypD-Kotransfektion.

(A) Bcl-2 und CypD hemmen Zelltod, ausgelöst durch ANT-1. HEK 293T-Zellen in 6-Loch-Platten wurden mit 1 µg GFP-Expressionsplasmid, 1 µg ANT-1-Expressionsplasmid sowie 1 bzw. 5 µg (1x' bzw. ,5x') Expressionsplasmid für Luciferase (Luc), Bcl-2 usw. transfiziert und nach 16h per FACS analysiert. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen repräsentieren drei unabhängige Messungen. (B) Die Expression von ANT-1-myc wird durch CypD-Kotransfektion im fünffachen Überschuss nicht beeinträchtigt. HEK 293T-Zellen in 10 cm-Kulturschalen wurden mit 2 µg GFP-Expressionsplasmid, 2 µg ANT1-myc-Expressionsplasmid und 10 µg Expressionsplasmid für Luciferase bzw. CypD transfiziert. Nach 48 h wurden mitochondriale Proteinextrakte hergestellt (vgl. Abb. 4.3) und in einem Immunblot sukzessiv mit Antikörpern gegen das Myc-Epitop, CypD sowie Tim23 analysiert. Dabei wurden assoziierte Proteine durch ,Strippen' der Membran vor jeder erneuten Antikörper-Inkubation entfernt

4.2.2 Die PPIase-defiziente CypD-Mutante R96A/H167Q hemmt Apoptose

CypD ist als Peptidyl-Prolyl-Isomerase beschrieben, d.h. als Enzym, das die cis/trans-Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen katalysiert, und dadurch Einfluss auf die Struktur von Proteinen hat. Um zu untersuchen, inwieweit diese Enzymaktivität mit der Inhibition von Apoptose durch CypD zusammenhängt, wurde eine Mutante kloniert, die an zwei Positionen einen Aminosäureaustausch aufweist. Jeder der beiden Austausche führt für sich genommen bereits zu einem kompletten Verlust der PPIase-Aktivität des CypD-Hefe-Homologs Cpr3 in einem *in vitro*-Test (Scholz *et al.*, 1999). Die hier konstruierte Doppelmutante R96A/H167Q hemmt im Kotransfektionsexperiment die ANT-1-induzierte Apoptose ebenso stark wie der Wildtyp (Abb. 4.16).

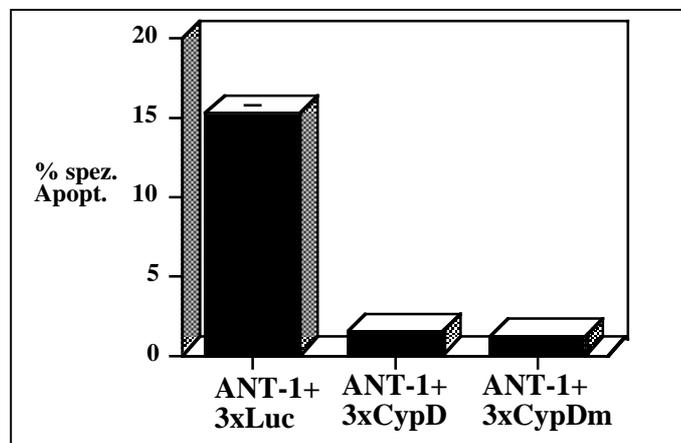


Abb. 4.16 Hemmung der ANT-1-induzierten Apoptose durch Kotransfektion der CypD-Mutante R96A/H168Q. HEK 293T-Zellen in 6-Loch-Platten wurden mit 1 µg GFP-Expressionsplasmid, 1 µg ANT-1-Expressionsplasmid, sowie 3µg Expressionplasmid kodierend für Luciferase (Luc), CypD bzw. der Doppelpunktmutante („CypDm“) transfiziert. Die Analyse der Zellen per FACS erfolgte nach 16 h. Die gezeigten Mittelwerte und Standardabweichungen repräsentieren jeweils drei unabhängige Messungen.

4.2.3 Die transiente Transfektion von CypD desensitiviert Zellen gegenüber verschiedenen Apoptose-Signalen

Es sollte zunächst untersucht werden, ob CypD auch Zelltod ausgelöst durch ‚externe Stimuli‘ inhibieren kann. Für dieses Experiment wurden HeLa-Zellen mit Plasmiden, kodierend für Luziferase, Bcl-xL sowie CypD transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit verschiedenen Apoptose-Stimuli behandelt und nach 18stündiger Inkubation per

FACS analysiert. Die Apoptose-Induktion durch TNF- α wird schwach durch CypD-Transfektion gehemmt (von 22% auf 15%), während die UV-Induktion des Zelltd-programms im wesentlichen insensitiv gegenüber der Hemmung durch CypD ist (von 20% auf 16%). Interessanterweise konnte die As₂O₃-induzierte Apoptose um ca. 50% (von 10% auf 5%) durch Transfektion der Zellen mit CypD gehemmt werden. Alle hier eingesetzten Zelltd-Stimuli wurden signifikant durch das antiapoptotische Bcl-2-Gen Bcl-xL gehemmt (Abb. 4.17).

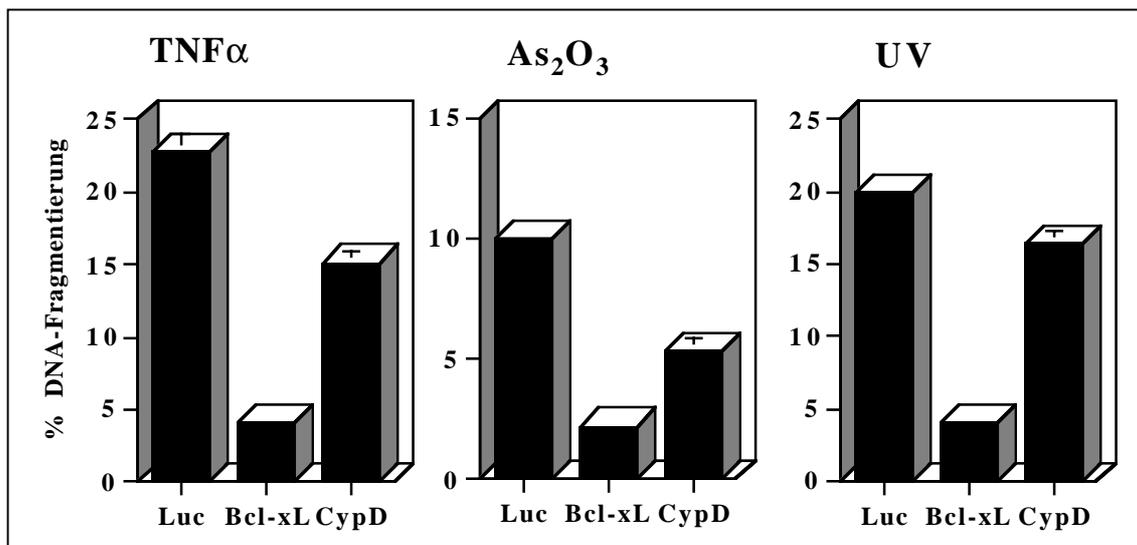


Abb. 4.17 Inhibition ‚extrinsischer‘ Zelltdsignale durch Transfektion von Zellen mit CypD. HeLa-Zellen in 12-Loch-Platten wurden mit 50 ng GFP-Expressionplasmid sowie 400 ng Expressionplasmid kodierend für Luciferase, Bcl-xL oder CypD transfiziert (FuGENE). Nach Über-Nacht-Inkubation wurde die Zellen verschiedenen Behandlungen unterworfen (TNF- α : 0,05 ng/ml TNF α + 0,1 μ g/ml Actinomycin D, As₂O₃: 40 μ M, UV: 50 mJ/cm²). Nach 16h Inkubation wurde der Anteil der Zellen mit apoptotischer DNA-Fragmentierung bestimmt, und mit der Transfektionseffizienz verrechnet.

4.2.4 Apoptose-Induktion durch Caspase 8 wird durch CypD-Kotransfektion signifikant gehemmt

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass Zellen durch Transfektion mit CypD gegenüber verschiedener apoptotischer Stimuli partiell geschützt werden. Die so induzierten Zelltd-Signaltransduktionswege sind teilweise noch weitgehend unbekannt bzgl. der aktivierten Signalmoleküle und ihrer Verschaltung. In diesem Experiment wurde

untersucht, inwieweit die Überexpression definierter, bekannter proapoptotischer Faktoren durch Kotransfektion mit CypD gehemmt werden kann. Der generelle PT-Poren-Inhibitor Bongkrekssäure (BA) und die antiapoptotischen Bcl-2-Gene Bcl-2 und Bcl-xL wurden als Kontrolle parallel eingesetzt. Da die BA-Behandlung die GFP-Fluoreszenz der transfizierten Zellen beeinflusst, wurde bei Experimenten mit BA keine spezifische Apoptose errechnet, sondern nur der Anteil von Zellen mit hypoploidem DNA-Gehalt dargestellt.

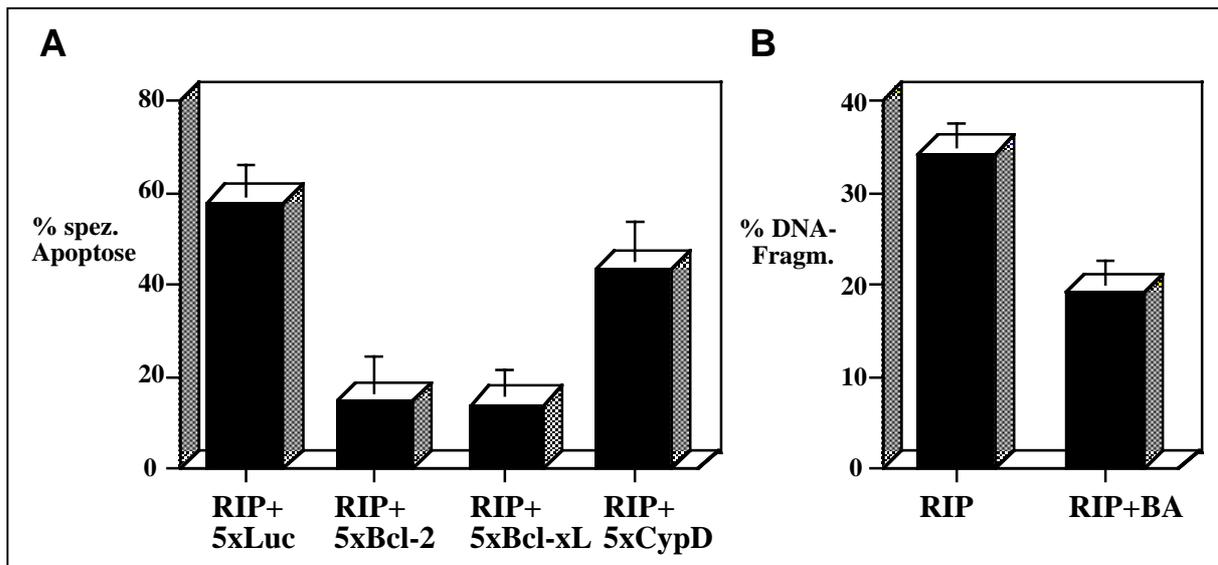


Abb. 4.18 Einfluss von antiapoptotischen Bcl-2-Genen, CypD und BA auf RIP-induzierte Apoptose. (A) Starke Hemmung des durch RIP ausgelösten Zelltods durch Bcl-2 und Bcl-xL. HEK 293T-Zellen in 6-Loch-Platten wurden mit 1 µg GFP-Expressionsplasmid, 2 µg RIP-Expressionsplasmid sowie 10 µg Expressionsplasmid für Luciferase, Bcl-2 usw. transfiziert und nach 16 h per FACS analysiert. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen repräsentieren drei unabhängige Messungen. (B) Der spezifische PTP-Inhibitor Bongkrekssäure (BA) hemmt die RIP-induzierte Apoptose partiell. HEK 293T-Zellen in 12-Loch-Platten wurden mit 2 µg RIP-Expressionsplasmid transfiziert. Nach 4 h wurde dem Kulturmedium Bongkrekssäure zugesetzt (65 µM). Nach 16 h Inkubation wurde der Anteil von Zellen mit apoptotischer DNA-Fragmentierung bestimmt. Die gezeigten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden jeweils aus drei unabhängigen Bestimmungen errechnet.

Zelltod ausgelöst durch die Transfektion der Zellen mit einem Adaptorprotein des TNF-Rezeptors-1, RIP (receptor-interacting protein), wurde durch CypD-Kotransfektion und Behandlung mit BA partiell gehemmt (von 58% auf 43%, bzw. von 34% auf 19%). Sowohl Bcl-2- als auch Bcl-xL-Kotransfektion führten zu einer starken Abschwächung der RIP-induzierten Apoptose (von 58% auf 14% bzw. 13%; Abb. 4.18).

Eine deutlich abschwächende Wirkung zeigten CypD-Kotransfektion und auch BA-Behandlung bezüglich der durch die Initiatorcaspase-8-induzierten Apoptose (von 60% auf 21%, bzw. von 15% auf 6,5%). Die Hemmung von Caspase-8 durch Bcl-2- und Bcl-xL-Koexpression war im Vergleich mit CypD weniger stark (von 60% auf 35% bzw. 30%) (Abb. 4.19).

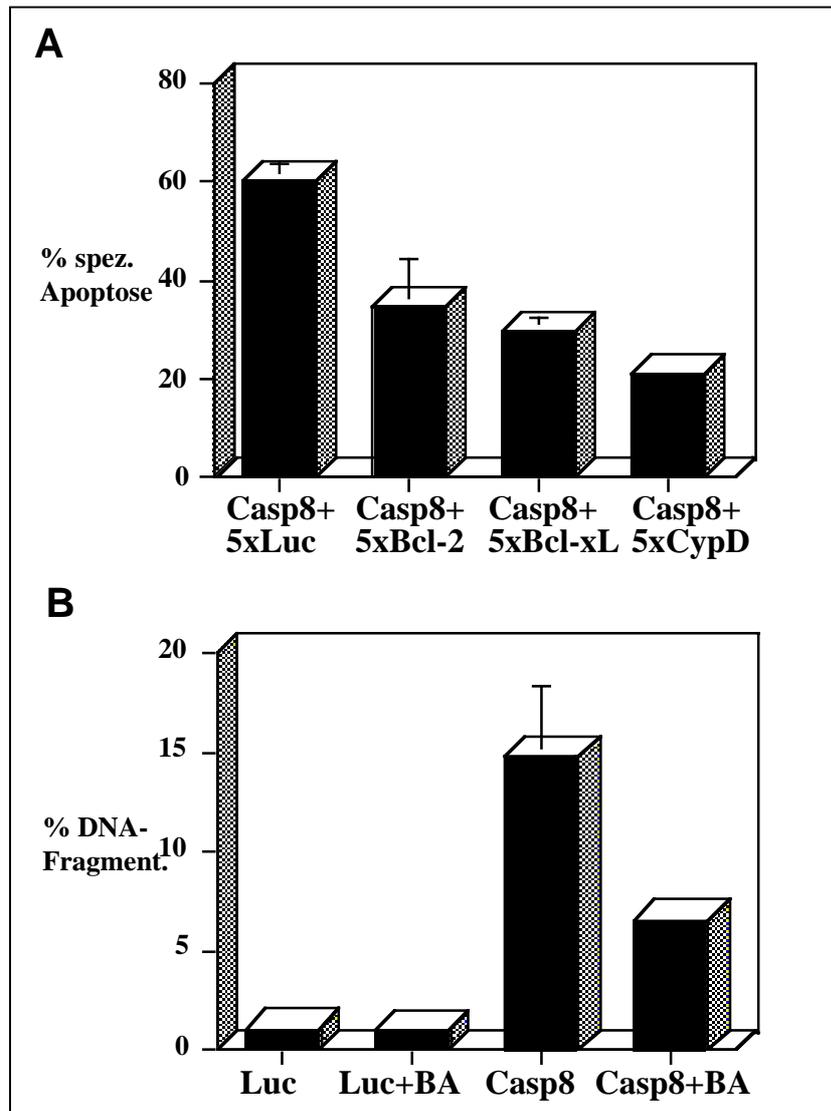


Abb. 4.19 Einfluss von antiapoptotischen Bcl-2-Genen, CypD und BA auf Caspase-8 (Casp8)-induzierte Apoptose. (A) Starke Hemmung des durch Casp8 ausgelösten Zelltods durch CypD. HEK 293T-Zellen in 6-Loch-Platten wurden wie unter 4.18 transfiziert und analysiert. (B) Der spezifische PTP-Inhibitor Bongkreksäure (BA) hemmt die Casp8-induzierte Apoptose partiell. HEK 293T-Zellen in 12-Loch-Platten wie in 4.18 beschrieben behandelt und analysiert.

Die Caspase 2-induzierte Apoptose konnte durch CypD-Kotransfektion oder BA-Behandlung nicht bzw. nur unbedeutend reduziert werden (von 10% auf 10%, bzw. von 17% auf 15%). Interessanterweise war eine jedoch deutliche Hemmung von Caspase-2 durch Bcl-2-Kotransfektion zu beobachten (von 10% auf 4%) (Abb. 4.20)

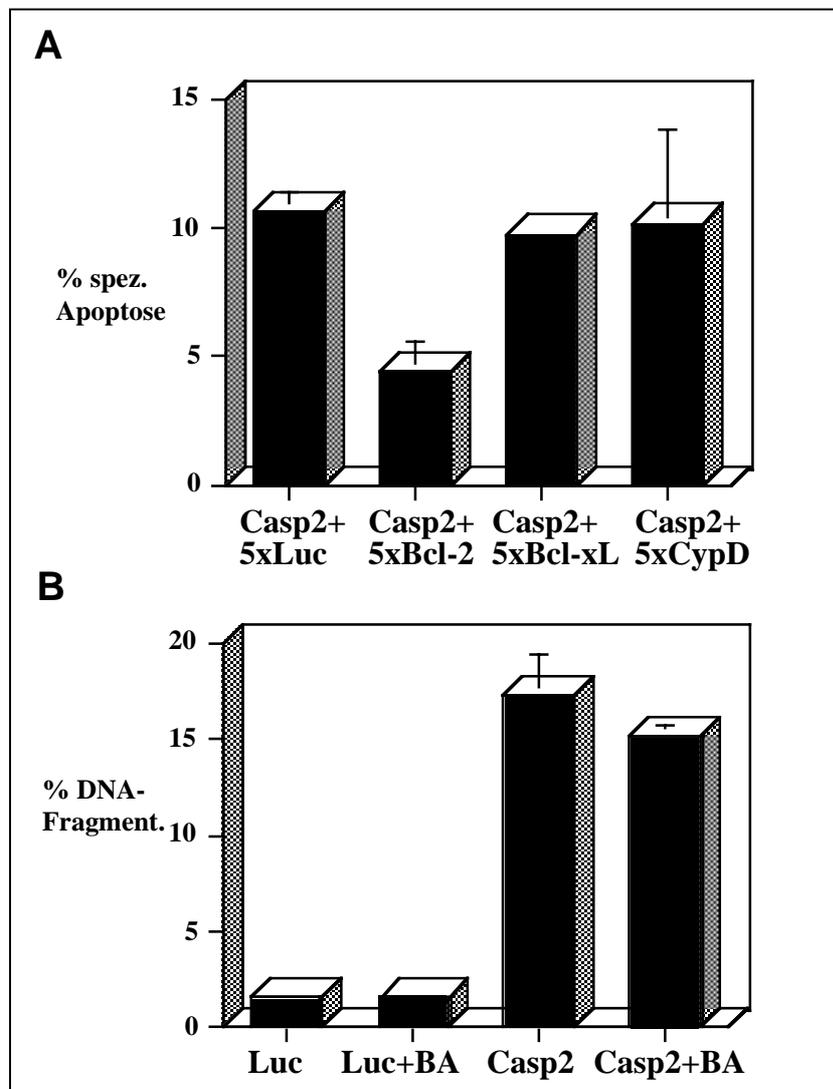


Abb. 4.20 Einfluss von antiapoptotischen Bcl-2-Genen, CypD und BA auf Caspase-2 (Casp2)-induzierte Apoptose. (A) Keine Hemmung des durch Casp2 ausgelösten Zelltods durch CypD. HEK 293T-Zellen in 6-Loch-Platten wurden wie unter 4.18 transfiziert und analysiert. (B) Der spezifische PTP-Inhibitor Bongkreksäure (BA) hemmt die Casp2-induzierte Apoptose marginal. HEK 293T-Zellen wurden in 12-Loch-Platten wie in 4.18 beschrieben behandelt und analysiert.

4.2.5 Die proapoptotischen Proteine Bax und ANT-1 werden verschieden stark durch CypD-Kotransfektion inhibiert

Das proapoptotische Bcl-2-Familienmitglied Bax zählt zu den am besten beschriebenen Genen, deren Überexpression die PT-Pore und sukzessive das Zelltodprogramm aktivieren. Unklar ist bisher, inwieweit die Bax-induzierte Apoptose mit einer unmittelbaren Aktivierung der PTP einhergeht oder ob dieses Phänomen als sekundärer Effekt einer autonomen Aktivität des Bax-Proteins einzustufen ist (Cory & Adams, 2002, Martinou & Green, 2001). ANT-1 wurde in dieser Arbeit als neuer Aktivator der PT-Pore charakterisiert und sollte hier mit Bax bezüglich des Einflusses von CypD-Kotransfektion und BA-Behandlung verglichen werden. Wie in den vorangegangenen Experimenten wurden HEK 293T-Zellen mit Plasmiden kodierend für die verschiedenen proapoptotischen Faktoren und einem Überschuss an Plasmiden für verschiedene Inhibitoren transfiziert. Da erste Vorversuche keinerlei Hemmeffekt von CypD bezüglich Bax-induzierter Apoptose erkennen liessen (nicht gezeigt), wurde das Verhältnis von Induktor und Inhibitor in diesem Experiment auf den Faktor 10 erhöht (s.u.).

Interessanterweise wird auch unter diesen Bedingungen der durch Bax ausgelöste Zelltod durch CypD-Kotransfektion und auch durch BA-Behandlung nur schwach gehemmt (von 45% auf 28%, bzw. von 25% auf 16%) während der durch ANT-1 ausgelöste Zelltod nahezu komplett inhibiert wird (von 38% auf 0,5%, bzw. von 35% auf 6%). Bax und ANT-1 werden durch Bcl-2-Kotransfektion gehemmt (25% auf 5%, 38% auf 9%) während die parallele Expression von Bcl-xL nur die Bax-induzierte Apoptose hemmt (25% auf 2% gegenüber 38% auf 35% im Falle von ANT-1; Abb. 4.21).

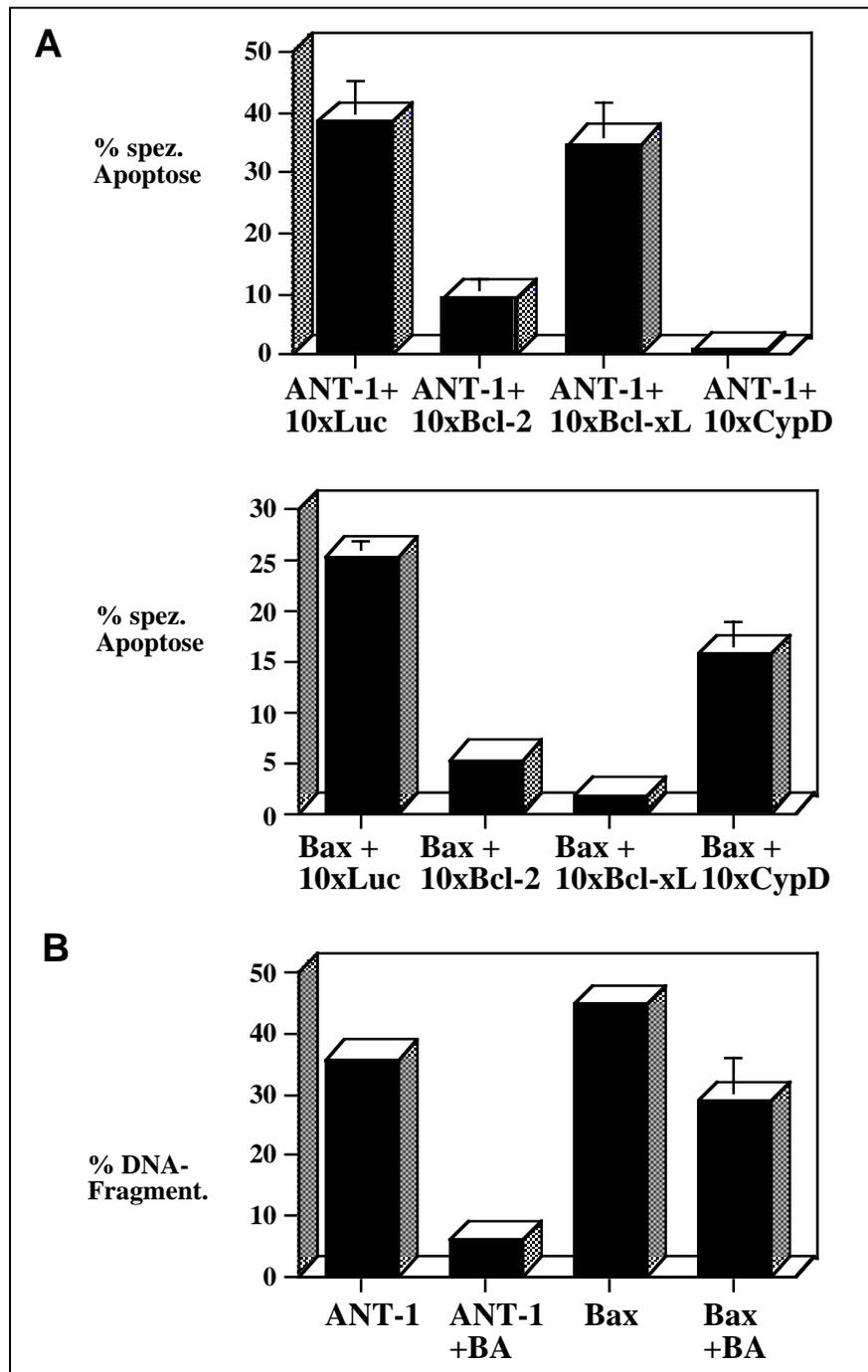


Abb. 4.21 Differentieller Einfluss von antiapoptotischen Bcl-2-Genen, CypD und BA auf die ANT-1- bzw. Bax-induzierte Apoptose. (A) CypD-Kotransfektion hemmt Zelltod, ausgelöst durch Transfektion von ANT-1 bzw. Bax unterschiedlich stark. HEK 293T-Zellen in 6-Loch-Platten wurden wie unter 4.18 transfiziert und analysiert. (B) Der spezifische PTP-Inhibitor Bongkrekensäure (BA) hemmt die ANT-1- bzw. Bax-induzierte Apoptose unterschiedlich stark. HEK 293T-Zellen wurden in 12-Loch-Platten wie in 4.18 beschrieben behandelt und analysiert.

4.2.6 Das proapoptotische Bcl-2-Gen Bid wird durch CypD-Kotransfektion gehemmt

Mit Bid sollte ein BH3-only Protein der pro-apoptotischen Bcl-2-Gen-Familie bezüglich der Hemmung durch CypD und BA untersucht werden. Im Rahmen der TNFR1/FASR-vermittelten Apoptose wird Bid an Aminosäure-Position 65 proteolytisch prozessiert. Die so entstandene kürzere Isoform tBid (truncated Bid) transloziert sukzessive in die äussere mitochondriale Membran und löst die PT aus (Li *et al.*, 1998, Zamzami *et al.*, 2000). In Koexpressionsexperimenten wird die tBid-induzierte Apoptose durch CypD vollständig gehemmt (von 13% auf 0%), während die Inhibition durch Bcl-2 und Bcl-xL weniger stark ist (von 13% auf 6% bzw. 4%). Die parallel durchgeführten Experimente mit BA zeigen eine starke, wenn auch nicht komplette Hemmung des durch Expression von tBid ausgelösten Zelltods (von 10% auf 4%).

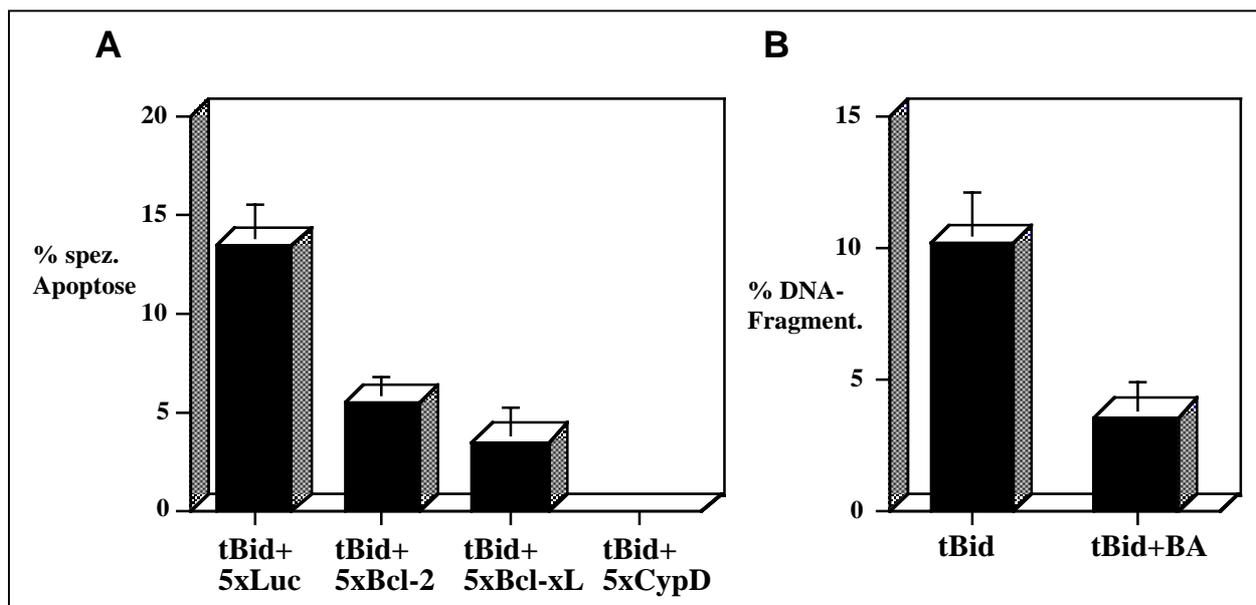


Abb.4.22 Einfluss von antiapoptotischen Bcl-2-Genen, CypD und BA auf die tBid-induzierte Apoptose. (A) Komplette Hemmung des Zelltods ausgelöst durch tBid, durch CypD-Kotransfektion. HEK 293T-Zellen in 6-Loch-Platten wurden wie unter 4.18 transfiziert und analysiert. (B) Der spezifische PTP-Inhibitor Bongkrekensäure (BA) hemmt die tBid-induzierte Apoptose signifikant. HEK 293T-Zellen in 12-Loch-Platten wurden wie in 4.18 beschrieben behandelt und analysiert.

4.2.7 Die CypD-mRNA ist in Gewebeproben aus Krebsformen der weiblichen Reproduktionsorgane signifikant hochreguliert

Das Beispiel Bcl-2 verdeutlicht, dass anti-apoptotische Gene bei einer entsprechenden Hochregulation zur Tumorgenese beitragen können. Hier sollte deswegen der Status der CypD-kodierenden mRNA in Tumorgewebe untersucht werden. Für dieses Experiment wurde ein kommerziell erhältlicher sog. ‚Tumor vs. Normal Profiling Blot‘ verwendet.

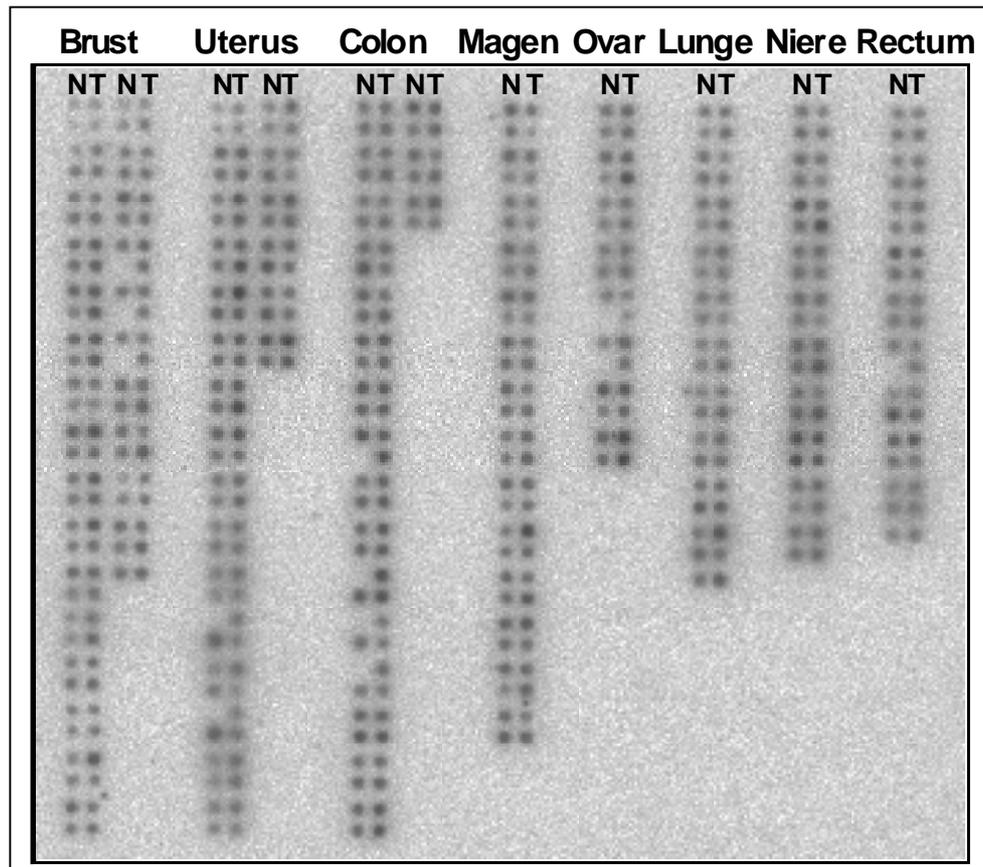


Abb. 4.23 Autoradiographie des ‚Tumor vs. Normal Profiling Blot‘ nach Hybridisierung mit radioaktiv markierten CypD-DNA-Fragmenten. Die Membran (Clontech) wurde in Denhardt’s-Lösung prähybridisiert. Der CypD-kodierende ORF wurde aus einem Expressionskonstrukt durch Restriktionsverdau gewonnen und ca. 150 ng wurden mit 25 μCi ^{32}P - α -ATP mittels des ‚rediprime kit‘ (random priming) zur Synthese von CypD-Sonden eingesetzt. Ca. 3×10^7 cpm CypD-Sonden wurden in der Hybridisierungsreaktion eingesetzt (6h, 65°C). Nach mehreren Waschschrinen, mit zunehmender Stringenz, wurde die Membran für 5 d auf einer Phosphoimager-Membran (Fuji) exponiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte an einem BAS 2000 Phosphoimager unter Zuhilfenahme der ‚Image Gauge‘-Software (Fuji). N=Normalgewebe, T=Tumorgewebe. Jeweils nebeneinanderstehende N- und T-spots sind ein Wertepaar. Einzelne spots in der ‚T‘-Kolumne gehören zum darüberstehenden Wertepaar und wurden aus zugehörigen Metastasen präpariert (nicht ausgewertet).

Auf einer Membran sind hier nebeneinander mRNA-Proben aus jeweils Tumor- und Normal-Gewebe eines Patienten aufgetragen, d.h. bei einer operativen Entfernung eines Mammakarzinoms beispielsweise wurde auch gesundes Brustgewebe entfernt. Der Blot wurde mit einer radioaktiv markierten CypD-Sonde hybridisiert und die Signalintensität mittels Phosphoimager densitometrisch bestimmt (Abb. 4.23).

Der Quotient jeden Wertepaars (Tumor/Normal) wurde gebildet und der natürliche Logarithmus bestimmt. Aufgrund von Erfahrungen mit anderen im Labor Grimm untersuchten cDNAs wurde eine Verstärkung bzw. Abschwächung des Signals um den Faktor 1,5 ($\ln 0,4$) als signifikant angesehen (Gewies *et al.*, unveröffentlicht, Mund *et al.* 2003). Es fällt auf, dass die CypD-mRNA in Tumorproben aus den weiblichen Reproduktionsorganen (Brust, Uterus, Ovar) signifikant hochreguliert ist, während in Tumoren, die sich aus anderen Geweben wie Niere, Magen oder Darm ableiten, keine auffällige Verstärkung des Signals festzustellen war. Eine mögliche Hochregulation der CypD-mRNA ist auch im Fall der auf der Membran befindlichen Proben aus Lungentumoren nicht auszuschliessen; sie erscheint jedoch im Vergleich mit den o.a. Akkumulationen von geringerer Signifikanz (Abb. 4.24).

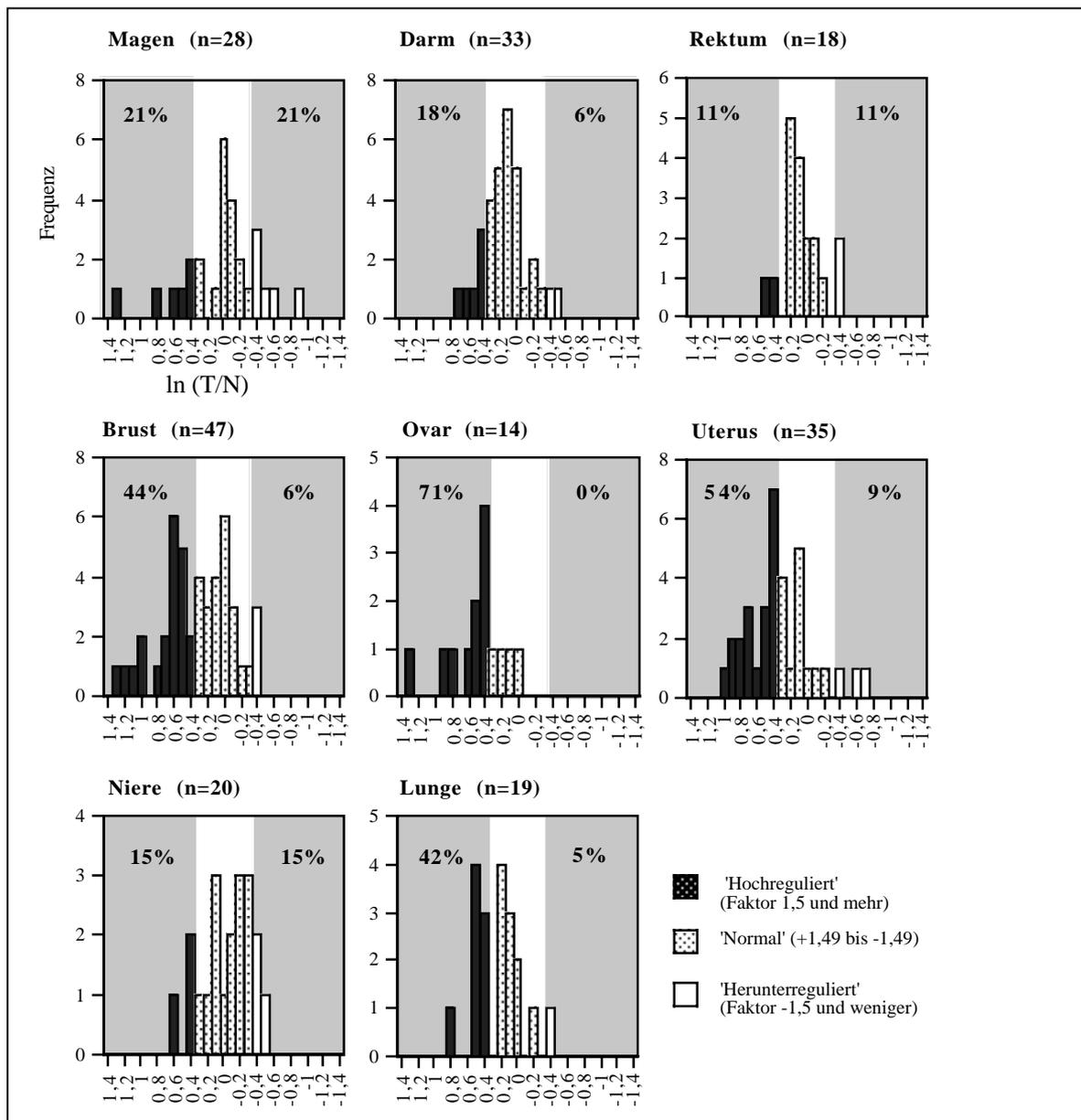


Abb. 4.24 Akkumulation der CypD-mRNA in verschiedenen Tumoren der weiblichen Reproduktionsorgane. Graphische Auswertung des ‚Tumor vs. Normal Blot‘. Für jede Tumorart ist die Anzahl der ausgewerteten Wertepaare (n) angegeben. Aufgetragen ist der natürliche Logarithmus des -Quotienten der densitometrischen Auswertung der einzelnen Tumor/Normal-Wertepaare (x-Achse) gegen die Frequenz (y-Achse). Hoch- bzw. Herunterregulation (s. Text) sind durch verschiedenfarbige Balken (s. Abb. unten rechts) und graue Hinterlegung in den Graphen angedeutet, sowie prozentual ausgewiesen.

5 Diskussion

5.1 "Screening" nach dominanten, Apoptose-induzierenden Genen

Die Sequenzierung des humanen Genoms macht eine Fülle von Daten über die kodierenden und nichtkodierenden Regionen unserer DNA verfügbar. Von den ca. 34.000 identifizierten Genen sind bisher nur ein Bruchteil funktionell beschrieben. (Venter *et al.*, 2001). Bei bisher unbekanntem Genen ist die Aussagekraft der Daten aus den Celera- und HUGO-Projekten jedoch auf mögliche Primärsequenzen von vermuteten Polypeptiden und RNAs beschränkt. Dazu kommt, dass vielfältige Einblicke in Prozesse wie beispielsweise entwicklungs- und gewebespezifisches mRNA-Spleissen die ‚Ein Gen, ein Protein‘-Hypothese stark relativieren. Eine zentrale Herausforderung in der molekularbiologischen Forschung muss es daher sein, Genen zelluläre Funktionen zuzuordnen.

Eine Möglichkeit dies zu tun, besteht in der sogenannten Expressionsklonierung. Hierfür existieren zwei klassische Ansätze (Simonsen & Lodish, 1994). Bei der ersten Möglichkeit werden mit verschiedenen Genen transfizierte Zellen, die eine gesuchte Funktion ausprägen, physikalisch vom Rest der Population getrennt. Die DNA wird isoliert, amplifiziert und ein weiteres Mal in Zellen transfiziert. Die Prozedur wird erneut vorgenommen und auf diese Weise kann das interessierende Gen angereichert werden, bis einzelne Klone getestet werden können.

Die zweite Möglichkeit wird „sib selection“ genannt. Hierbei wird eine komplexe cDNA Bibliothek in mehrere Aliquots aufgeteilt, die sich hinsichtlich der Zusammensetzung unterscheiden. Da jedes der Aliquots unterschiedliche Gene enthält, werden verschiedene Zellpopulationen mit je einem Aliquot transfiziert. Anschließend werden die Zellen auf die Ausprägung einer bestimmten Funktion hin untersucht. Positive DNA-Pools werden erneut in Aliquots aufgeteilt und transfiziert. Der Vorgang wird wiederholt bis ein interessierendes Gen soweit angereichert ist, dass einzelne Klone getestet werden können.

Beide Methoden haben den Nachteil, dass mehrere Gene zeitgleich in Zellen transfiziert werden und der interessierende cDNA-Klon nur durch wiederholte Tests nach und nach isoliert werden kann. Wenn extrem sensitive und spezifische Nachweismethoden für das zu

klonierende Protein vorhanden sind, wie z.B. radioaktiv markierte Liganden von Plasmamembranrezeptoren, dann kann sich der Aufwand einer Expressionsklonierung durchaus lohnen. Die geringe Sensitivität ist jedoch ansonsten ein Problem: Es ist innerhalb eines solchen *screens* mit Transfektionen von Aliquots zu beispielsweise je zehn cDNAs durchaus möglich, dass die entsprechenden Polypeptide überhaupt nicht in erforderlichen Mengen exprimiert werden, um die entsprechende Veränderung zellulärer Marker zu induzieren. Es besteht also die Gefahr, einen guten Teil möglicher Kandidaten-Gene gar nicht erst zu detektieren. Weil die Transfektion einzelner Klone eine vorherige Isolation und Präparation der entsprechenden Plasmid-DNA voraussetzt, wurde dieser offensichtlich Aufwand bisher gescheut. Die Isolierung von cDNAs, deren Expression die Proliferation der transfizierten Zellen negativ beeinflusst (Zellzyklusinhibition, Apoptose) ist durch die Methode der Expressionklonierung kaum möglich, da die jeweiligen Zellen und so auch die zu untersuchenden cDNAs, nicht mehr für weitere Transfektions- und Analyserunden zur Verfügung stehen würden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein genetischer Expressionsscreen zur Identifikation dominanter, Apoptose-induzierender Gene benutzt, der einem anderen Ansatz folgt (Grimm & Leder, 1997). Im Unterschied zur Expressionsklonierung werden bei dieser Methode einzelne cDNAs in Zellen transfiziert und das eventuelle Auftreten apoptotischer Veränderungen dann lichtmikroskopisch kontrolliert. Hierfür wurde ein einfach durchführbares Protokoll entwickelt, welches die simultane Isolation und anschließende Transfektion von 96 cDNAs ermöglicht (Neudecker & Grimm, 2000).

Weil offensichtlich Protein-Protein Interaktionen für die Induktion der Apoptose verantwortlich sind und die meisten Proteine proapoptotischer Signalwege, wie z.B. Bax, Caspase-8 etc. die Eigenschaft haben, nach Überexpression dominant Apoptose zu induzieren, können so einzelne Gene aufgrund ihrer unmittelbaren "tödlichen" Funktion isoliert werden (Yang *et al.*, 1998). Somit können schnell und gezielt neue Gene bzw. Proteine dargestellt werden, die an der Vermittlung und/oder Auslösung der Apoptose sehr wahrscheinlich beteiligt sind. Selbstverständlich ist mit der Isolierung von dominanten Apoptose-Induktoren erst der Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen erreicht. Vor allem stellt sich die Frage, ob die jeweiligen isolierten Gene/Proteine Bestandteil von physiologisch oder pathologisch relevanten Zelltod-Signalwegen sind oder ob ihre

Überexpression quasi "Unfälle" in der Zelle simulieren, auf die nachgeschaltet und als Sekundäreffekt Apoptose ausgelöst wird?

Im Rahmen dieses *screens* wurden im Labor Grimm bei der Analyse von ca. 40.000 Klonen mehr als 80 cDNAs über ihre Eigenschaft isoliert, bei Überexpression in Säugerzellen Apoptose auszulösen. Die Sequenzierung ergab, dass die zugehörigen Polypeptide in den verschiedensten Kompartimenten der Zelle lokalisieren. Bereits bekannte Apoptose-induzierende Gene wie das zytoplasmatische DISC-Protein FADD und die nukleären Proteine CIDE-A und -B wurden isoliert und können als interne Positivkontrollen interpretiert werden (Chinnaiyan *et al.*, 1996, Inohara *et al.*, 1998). Als dominant Apoptose-induzierende Gene wurden u.a. charakterisiert: das plasmamembranständige C33/KAI-1, das ER-assoziierte, neue BH3-only Protein Spike, die zytoplasmatische Ubiquitin-spezifische Protease UBP41 sowie die lysosomale Protease Cathepsin L (Schönfeld *et al.*, eingereicht, Mundt *et al.*, 2003, Gewies *et al.*, 2003, Gewies *et al.*, eingereicht).

Das KAI-1-Gen löst Zelltod durch apoptotische Aktivierung von Mitochondrien, Cytochrom c-Freisetzung und Caspase-Aktivierung aus. Diese erstmals gezeigte Aktivität von KAI-1 könnte erklären, warum es bisher als Metastasensuppressor beschrieben wurde, der in bösartigen Tumoren oftmals herunterreguliert ist. Das Spike-Genprodukt, ein neues *BH3-only*-Protein, scheint am ER mit anderen Bindungspartnern einen Komplex zu bilden, der wahrscheinlich die Wirkung des antiapoptotischen Bcl-2-Gens Bcl-xL antagonisiert und so Zelltod auslöst. In verschiedenen Tumoren ist die für Spike kodierende mRNA signifikant unterrepräsentiert verglichen mit normalem Gewebe. Spike könnte somit einen neuen Tumorsuppressor darstellen. Die Verwendung von *high throughput*-Methodologie in einem Test basierend auf einer zellulären Funktion hat also zur Isolierung von neuen, hochspezifischen Zelltod-Signalmolekülen geführt, die evtl. an der Entstehung schwerer Erkrankungen beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde ANT-1, ein Bestandteil der PTP, als Apoptose-Induktor isoliert. Vor dem Hintergrund der spezifischen Hochregulation des ANT-1-Proteins in der degenerativen Herzerkrankung DCM sollte somit ein weiteres Beispiel für eine potentiell neue Schaltstelle in der Zelltod-Signalleitung mit möglichen Verbindungen zu einer schweren Erkrankung untersucht werden.

5.2 ANT-1 als Induktor von Apoptose

5.2.1 ANT ist Bestandteil der PTP und Mitglied der mitochondrialen Carrier-Familie

Die PTP ist ein Multiproteinkomplex, der verschiedene mitochondriale Kompartimente verbindet und bei Aktivierung eine Pore zu bilden scheint, die aufgrund der Pemeabilisierung der inneren Mitochondrienmembran $\Delta\Psi_m$ destabilisiert. Die Folge der "permeability transition" ist die Freisetzung von Cytochrom c, Caspase-Aktivierung und die Fragmentierung der nukleären DNA (Kroemer & Reed, 2000). Die Überexpression von ANT-1 löst diese typischen apoptotischen Veränderungen aus (Abb. 4.4 und 4.5). Die Apoptose-Induktion korreliert dabei direkt mit dem mitochondrialen Import des überexprimierten Proteins, was einen unspezifischen Effekt, etwa durch mRNA-Akkumulation oder Sättigung der mitochondrialen Proteinimport-Maschinerie ausschliesst (Abb. 4.3).

ANT ist zentraler Bestandteil der PTP und lokalisiert in der inneren Mitochondrienmembran und könnte somit die entscheidende ‚Porenkomponente‘ der PTP darstellen. Isoliertes ANT-Protein, rekonstituiert in Liposomen und/oder synthetischen Lipidmembranen, kann durch geeigneter Behandlung, z.B. Ca^{2+} und Atractylosid, in eine Kationenspezifische Pore umgewandelt werden (Dierks *et al.*, 1990, Brustovetsky *et al.*, 1996, Gonzalez-Barrosco *et al.*, 1997). Das Protein gehört zur Familie der mitochondrialen Carrier. Diese Transportproteine bestehen aus drei 100 Aminosäure-Modulen mit je zwei Transmembrandomänen. Die Familie der mitochondrialen Carrier transportiert Metabolite wie Zucker, Aminosäuren oder Nukleotide im Symport bzw. Antiport durch die sonst kaum permeable innere Mitochondrienmembran (Kuan *et al.*, 1993). Für den Aspartat/Glutamat-Carrier und auch für ANT wurde gezeigt, dass sie durch Thiolreagenzien in unspezifische Poren verwandelt werden können; ebenso das Uncoupling Protein, sobald acht Aminosäurereste im Protein (Nr. 261-269) deletiert werden (Gonzales-Barrosco *et al.*, 1997). Es lag deshalb auf der Hand zu untersuchen, ob die Apoptose-Induktion durch ANT-1-Überexpression auf der Bildung einer unspezifischen Pore in der inneren Mitochondrienmembran und des zu erwartenden Zusammenbruchs von $\Delta\Psi_m$, beruht, der dann als Sekundäreffekt die PT auslösen könnte.

5.2.2 Bildet überexprimiertes ANT-1 eine unspezifische Pore in der inneren Mitochondrienmembran?

Verschiedene experimentelle Strategien wurden verwendet, um die Frage nach einer eventuellen Porenbildung durch überexprimiertes ANT-1-Protein zu adressieren.

Nach gängigen Theorien liegt ANT in mitochondrialen Membranen als Homotetramer zusammengesetzt aus zwei Dimeren vor. Diese Architektur ähnelt entfernt der des Na⁺-Kanals aus dem Zitterrochen *Electrophorus electricus*, einem 260 kD-Polypeptid mit 4x6 Transmembrandurchgängen (Hackenberg & Klingenberg, 1980, Block *et al.*, 1986a, Block *et al.*, 1986b, Unwin, 1993). Die oben angeführten Rekonstitutionsexperimente, in denen in Liposomen inkorporiertes ANT-Protein einen kationenspezifischen Kanal bildet, beruhen auf der Expression des kompletten Proteins. Deshalb sollte hier zunächst untersucht werden, inwieweit die Deletion von Teilen des Proteins einen Einfluss auf die Apoptose-Induktion hat.

Deletionsmutanten von ANT-1 wurden hergestellt, denen verschieden grosse Bereiche des C-Terminus fehlten. Die Mutante $\Delta 201$ mit nur vier Transmembrandomänen löste bei Überexpression ebenso effektiv Zelltod aus wie der Wildtyp. Die Expression der N-terminalen Hälfte des ANT-Proteins ($\Delta 142$), die wahrscheinlich drei Transmembrandomänen beinhaltet, verfügt immer noch über ca. 50% der Wildtyp-Aktivität. Dagegen löst die Mutante $\Delta 102$, der C-terminal 196 Aminosäuren fehlen, keinen Zelltod bei Überexpression aus (Fig. 4.7). Sollte wirklich die Bildung einer unspezifischen Pore der Grund für ANT-1-induzierte Apoptose sein, so erscheint es wenig wahrscheinlich, dass dazu das C-terminale Drittel des Proteins nicht benötigt wird oder allein die N-terminale Hälfte des Proteins in der Lage ist, eine solche zu bilden. Der homologe ANT-2-Carrier, der durch eine ca. 90%ige Sequenzidentität auf Proteinebene und eine identische Transportaufgabe im Vergleich zu ANT-1 charakterisiert wird, löste bei Überexpression keinen Zelltod aus. Gleichwohl wird das HA-markierte ANT-2-Protein überexprimiert und lokalisiert in Mitochondrien (Fig. 4.9). Offensichtlich bestimmen die minimalen Unterschiede zwischen diesen beiden Isoformen ANT-1 zum spezifischen Induktor von Apoptose und ANT-2 nicht. Da mehrere andere Mitglieder der mitochondrialen Carrierfamilie durch biochemische Behandlung bzw. Mutationen in kationenspezifische

Poren verwandelt werden können, erscheint es wenig plausibel, warum dies bei ANT-1 im vorliegenden Überexpressionsmodell der Fall sein sollte, hingegen nicht bei ANT-2.

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* scheint als Antwort auf geeignete Stimuli einem Apoptose-ähnlichen Zelltod anheim zu fallen, der makroskopisch als Wachstumsinhibition deutlich wird. Das proapoptotische Bcl-2-Gen Bax löst bei Überexpression in Hefezellen eine Hyperpolarisation der Mitochondrien und nachfolgend Zelltod mit DNA-Fragmentierung und 'membrane-blebbing' aus (Ligr *et al.*, 1998, Gross *et al.*, 2000). Wenn ANT-1 in *S. cerevisiae* überexprimiert wird, so hat dies keinerlei Wachstumsinhibition/Zelltod zur Folge, im Gegensatz zur heterologen Expression von Bax. (Fig. 4.10). Eine Porenbildung und die damit verbundene, zunächst PT-unabhängige, mitochondriale Schädigung durch überexprimiertes ANT-1-Protein scheint vor diesem Hintergrund nicht die Ursache für die beobachtete Zelltod-Induktion in Säugerzellen zu sein.

5.2.3 ANT-1 induziert Apoptose in Zellen ohne mitochondriale DNA

Die Elektronentransportkette (ET) setzt sich aus fünf Proteinkomplexen in der inneren Mitochondrienmembran und assoziierten Proteinen zusammen und transportiert im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung Protonen in den Intermembranraum. Eine Störung dieses Transports, etwa durch chemische Entkoppler wie CCCP, führt zum Zusammenbruch von $\Delta\Psi_m$ und PT. Dementsprechend stellt die ET einen Apoptosensordar: Dosisabhängig induziert der Komplex I-Inhibitor Rotenon Zelltod, und während der TNF-induzierten Apoptose kommt es zur Hemmung von Komplex I und sukzessiver PT (Higuchi *et al.*, 1998). Es bestand die Möglichkeit, dass die fortgesetzte Inkorporation von überexprimiertem ANT-Protein in die innere Mitochondrienmembran die Komposition von ET-Komplexen beeinträchtigt und so Apoptose auslöst. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Zellen generiert, die keine mitochondriale DNA besitzen. Da sämtliche ET-Komplexe aus nukleär und mitochondrial kodierten Polypeptiden zusammengesetzt sind, verfügen diese sog. $\rho 0$ -Zellen nicht mehr über eine funktionelle ET. Die hier verwendeten HeLap0-Zellen zeigten die charakteristische Abhängigkeit von Uridin im Wachstumsmedium und ihnen fehlte die mRNA für die mitochondrial kodierte Untereinheit I der Cytochrom-Oxidase. Sowohl in den parentalen HeLa-Zellen als auch in

den abgeleiteten HeLap0-Zellen induzierte ANT-1-Überexpression Zelltod mit gleicher Effizienz, was die Theorie eines 'Dekompositionseffekt' von ANT-1 bezüglich der ET-Komplexe widerlegt (Fig. 4.8).

5.2.4 Apoptose-Induktion durch vermehrten ADP/ATP-Transport?

ANT transportiert im stöchiometrischen Antiport ADP in die mitochondriale Matrix und ATP ins Zytosol. Das Protein verfügt über Adeninukleotid-bindende Domänen auf der zytosolischen Seite und der der Matrix zugewandten Seite, die alternierend präsentiert werden. Je nachdem, welche dieser Domänen exponiert wird, spricht man auch von der "m-Konformation" (Matrix) oder der "c-Konformation" (Zytoplasma) (vgl. 1.2.10.1.). Die Bindungsaffinität für ADP und ATP sind jedoch für die beiden Domänen fast identisch, so dass dieser gerichtete stöchiometrische Antiport in hohem Masse von $\Delta\Psi_m$ abhängig ist: nur im Falle einer negativ geladenen Matrix bindet ATP mit hoher Affinität an die "m-site" und nur dann kann es anschliessend auch ADP-Import geben über die dann zugängliche "c-site" geben (Klingenberg, 1992, Walker 1992). Diese Kopplung ermöglicht zwar den kontrollierten ADP/ATP-Austausch, bedeutet jedoch auch, dass aufgrund von 4 negativen Ladungen im ATP-Molekül und nur 3 im ADP-Molekül die Matrix eine negative Ladung pro Antiport-Ereignis verliert und so das Membranpotential $\Delta\Psi_m$ kontinuierlich geschwächt wird. Durch das zusätzliche Pumpen von Protonen müssen Zellen diesen Effekt kontern und so $\Delta\Psi_m$ stabilisieren. Einige Autoren schätzen die dafür benötigte Energie auf bis zu 25% des Nettoertrags durch oxidative Phosphorylierung (Klingenberg, 1992, Stryer, 1995). Das Absinken des ATP-Gehalts in der Zelle und der Verlust von $\Delta\Psi_m$ sind klassische Auslöser der PT, und die beschriebene enge Kopplung dieser Parameter bezüglich der ANT-Aktivität erschwert hier die Frage nach Ursache und Wirkung der PT-Induktion. An dieser Stelle sollte zunächst untersucht werden, ob ein Zusammenhang besteht zwischen der ‚zusätzlichen‘ Nukleotidtransportaktivität von überexprimiertem ANT-1 und der Apoptose-Induktion.

Vor allem polare Aminosäuren sind für den Transport geladener Moleküle von Bedeutung. Für die Hefe-Isoform AAC-2 konnten Müller und Mitarbeiter zeigen, dass die Mutation sechs verschiedener Argininreste den ATP/ADP-Antiport nahezu vollständig unterbindet

(Müller *et al.*, 1996). In allen bisher bekannten ANT-Proteinen sind diese Aminosäurereste konserviert. Die entsprechenden sechs murinen ANT-1-Punktmutanten lösten bei Überexpression in HEK 293T-Zellen Apoptose aus (Fig. 4.6). Mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit darf vermutet werden, dass diese Punktmutanten keinerlei Nukleotidtransport bewerkstelligen können; dies wurde jedoch nicht mit einem *in vitro*-Transportsystem gezeigt. Die Tatsache, dass ATP-Zugabe in vielen mitochondrialen Zelltodmodellen inhibierend wirkt, spricht ebenfalls gegen eine Auslösung der PT durch verstärkte ANT-Transportaktivität. Die Überexpression der murinen Isoform ANT-2 (vgl. 5.2.5) löst keinerlei Zelltod in HEK 293T-Zellen aus. Im Hefesystem ist die Aktivität der AAC-2-Isoform deutlich höher ist, als die von AAC-1 – und obwohl diese Daten wahrscheinlich nicht direkt auf die Aktivität der Säugerisoformen übertragen werden können, machen sie deutlich, wie unwahrscheinlich eine Auslösung der PT aufgrund verstärkten ADP/ATP-Transportes ist (Gawaz *et al.*, 1990, Klingenberg & Nelson, 1992, Müller *et al.*, 1997). Es kann trotzdem nicht formal ausgeschlossen werden, dass die Überexpression von ANT-1 den Nukleotidtransport durch das endogene ANT-1-Protein beeinträchtigt. Vander Heiden und Kollegen beobachteten in einem Wachstumsfaktor-Entzugs-Modell für Zelltod einen Verlust des ADP/ATP-Transports, der durch Bcl-xL wieder revertiert werden konnte. Es ist jedoch unklar, inwieweit dieses Phänomen direkt mit der apoptotischen Aktivierung von Mitochondrien in Zusammenhang gebracht werden kann (Vander Heiden *et al.*, 1998).

5.2.5 Überexprimiertes ANT-1 induziert die Aktivierung der endogenen PTP durch "Inhibitor-Kompetition"

Da die Apoptose-Induktion durch ANT-1-Überexpression unabhängig von der Nukleotidtransportaktivität des Proteins zu sein schien und auch eine eventuelle Porenbildung ausgeschlossen werden konnte, stellte sich die Frage nach der Natur des durch ANT-1 ausgelösten Zelltodsignals. Bei dem Versuch, die ANT-1-induzierte Apoptose mit PTP-Modulatoren zu beeinflussen, zeigte sich eine komplette Inhibition, bei Verwendung des PTP-Inhibitor Bongkrekensäure (Fig. 4.12). Die ektopische Expression von ANT-1 scheint also den endogenen Porenkomplex zu aktivieren. Die genaue molekulare Zusammensetzung und vor allem der Aktivierungsmechanismus der PTP sind nach wie vor ungeklärt. Offensichtlich kann die Pore *in vitro* durch eine Vielzahl artifizieller Liganden

aktiviert werden. Es gilt als akzeptiert, dass die Öffnung der PTP aufgrund von Konformationsänderungen einzelner Komponenten erfolgen muss, was den Schluss nahelegt, dass im Rahmen der physiologischen Apoptose-Induktion Protein:Protein-Interaktionen innerhalb der Pore entscheidend für deren Öffnung sein könnten. Der beobachtete Effekt der ANT-1-Überexpression könnte somit auf der Interaktion mit PT-Komponenten und einer veränderten Zusammensetzung des endogenen Porenkomplexes beruhen, was zur Aktivierung der PTP führen könnte. Koexpressionsexperimente legen nahe, dass diese Theorie richtig sein könnte: Die Apoptose-Induktion durch ANT-1 kann mittels paralleler Expression der PT-Komponenten mitochondriale Kreatinkinase (mtCK) und Cyclophilin D (CypD) nahezu vollständig gehemmt werden. Andererseits hat die Koexpression von ANT-2, VDAC I sowie dem Benzodiazepin-Rezeptor keinerlei Einfluss auf die ANT-1-induzierte Apoptose (Fig. 4.12). Die Kreatinkinase und Cyclophilin D könnten also endogene PT-Komponenten darstellen, die die PTP in einem inaktiven Zustand halten. Überexprimiertes ANT-1 würde diese Interaktionspartner durch ‚kompetitive‘ Bindung entfernen und eine ‚aktive‘ PTP-Konformation ermöglichen (s. Abb.5.1).

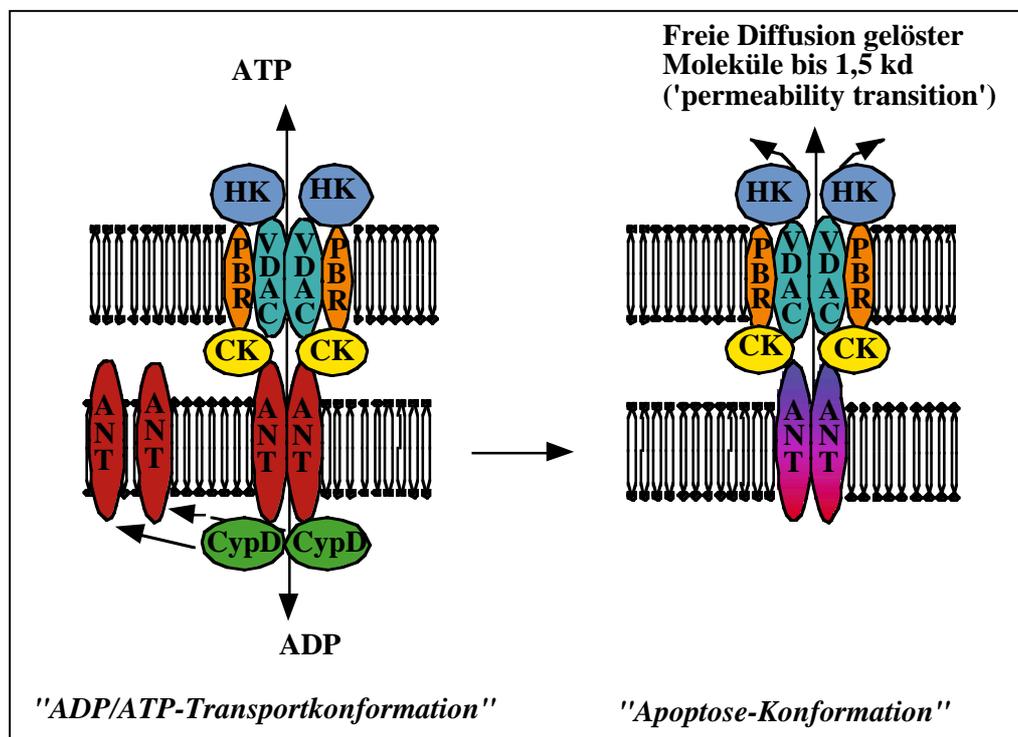


Abb. 5.1 „Inhibitor-Kompetitionsmodell“ für die Aktivierung der PTP durch ANT-1-Überexpression. Endogene Inhibitoren, hier CypD, stabilisieren nach diesem Modell die PTP bzw. ANT-1 in einer "Transportkonformation", die während der oxidativen Phosphorylierung entstehendes ATP in der Zelle verfügbar macht. Überexprimiertes ANT-1 ‚titriert‘ solche Bindungspartner aus dem Proteinkomplex. Ohne die entsprechenden Inhibitoren würde die Pore nach diesem Modell in der apoptotischen "PTP-Konformation" vorliegen (s. Text).

Wenn die beiden Inhibitoren durch Koexpression im Überschuss vorhanden sind, könnten sie die inaktive PTP-Konformation restaurieren und so den Effekt der ANT-1-Expression revertieren. Die mitochondriale Kreatinkinase wurde mehrmals als Teil von isolierten Proteinkomplexen beschrieben, die in rekonstituierten Liposomen PTP-Eigenschaften zeigten (Beutner *et al.*, 1996, Beutner *et al.*, 1998, Marzo *et al.*, 1998b). Die mtCK ist im Intermembranraum lokalisiert und scheint direkt mit ANT zu interagieren. Offensichtlich liegt die Kinase dabei als enzymatisch aktives Oktamer vor, das die beiden mitochondrialen Membranen miteinander verbindet und eventuell auch die "Transporterkonformation" von ANT stabilisiert und die "Porenkonformation" verhindert. Die Dissoziation der mtCK-Oktamere in Dimere durch geeignete "transition state"-Analoge in einem *in vitro*-Modell mit mtCK/ANT/VDAC-Komplexen führt nach Ca²⁺-Induktion zu PT und zur Freisetzung von Malat aus den Liposomen (Gross *et al.*, 1993, O’Gorman *et al.*, 1997, Dolder *et al.*, 2001). Die Verbindung zwischen mtCK-Enzymaktivität und PT-Inhibition wird auch durch Hemmung von Glutamat- und β -Amyloid-induzierter Apoptose in Neuronen durch Kreatin nahegelegt. Auch in einem Mausmodell für amyotrophe laterale Sklerose (ALS) wirkt das mtCK-Substrat neuroprotektiv (Klivenyi *et al.*, 1999, Brewer *et al.*, 2000).

Auch für CypD war aufgrund seiner Rolle als Rezeptor des PTP-Inhibitors Cyclosporin A (CsA) eine modulierende Rolle bei der PT-Regulation zu vermuten, und in Abschnitt 5.3 soll gesondert auf seine Rolle als Repressor der PTP eingegangen werden.

5.2.6 ANT-1 und ANT-2 haben offensichtlich verschiedene Aufgaben bezüglich Proliferation und Apoptose

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass der Adenin-Nukleotid-Translokator-1 ein spezifischer Induktor von Apoptose ist, während die Isoform ANT-2 nicht in der Lage ist, Zelltod bei Überexpression auszulösen. Mit der mitochondrialen Kreatinkinase und Cyclophilin D wurden zwei potentielle endogene PTP-Inhibitoren gefunden, deren Entfernung aus dem Porenkomplex durch ANT-1-vermittelte "Inhibitor-Kompetition" wahrscheinlich Ursache des ausgelösten Zelltodprogramms ist. Interessanterweise befindet sich CypD in der Matrix, während mtCK im Intermembranraum lokalisiert. Die zwischen den sechs Transmembrandurchgängen liegenden ‚loops‘ des ANT-1-Proteins haben Kontakt zu beiden Kompartimenten. Mittels ANT1/ANT2-Austausch-Mutanten konnte

untersucht werden, welche Bereiche im ANT-1-Protein entscheidend für die Apoptose-Induktion sind. Sowohl Reste, die dem Intermembranraum (AS #1-17, #67-107) zugewandt sind als auch der zweite Matrix-,loop' des Proteins (AS #151-170) sind entscheidend für die apoptotische Aktivität von ANT-1, den der Austausch dieser Aminosäuren gegen die entsprechenden Reste von ANT-2 resultiert in drastischen Reduktionen der Apoptose-Induktion (Fig. 4.14). Diese Domänen des Proteins könnten Interaktionsmodule für die mtCK bzw. CypD darstellen, und der Hintergrund für die ‚Inhibitor-Kompetition‘ sein. Dies erklärt auch den Befund, dass die ANT-1-induzierte Apoptose nicht durch Koexpression von ANT-2 beeinflusst wurde; offensichtlich partizipiert ANT-2 nicht an der Bildung und Regulation der PTP.

In einem *yeast two hybrid screen*, in dem Bcl-2 und Bax als *bait* benutzt wurden, isolierten Marzo und Kollegen das ANT-Fragment #105-156, das mit zwei o.a. möglichen Interaktions-Domänen überlappt. Damit könnte der beobachtete pro- und antiapoptotische Einfluss von Bcl-2-Genfamilien-Mitgliedern auf die PTP erklärt werden. Die entsprechende Sequenz stammt hingegen aus dem ANT-2-Protein, das in der vorliegenden Arbeit nicht mit PT bzw. Apoptose in Verbindung gebracht werden konnte (Marzo *et al.*, 1998c).

Die beobachteten Unterschiede zwischen ANT-1 und -2 lassen sich ferner auch nicht aus der gewebsspezifischen Expression der Isoformen erklären. Die drei humanen Isoformen, die wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden sind, werden in allen bisher untersuchten Geweben exprimiert, jedoch verschieden stark (Houldsworth & Attardi, 1988, Cozens *et al.*, 1989). Dabei fällt auf, dass ANT-1 die vorherrschende Isoform in postmitotischen Geweben wie dem Gehirn, dem Herzen, den Nieren und den Skelettmuskeln ist. In Geweben mit hohem proliferativen Regenerationspotential wie Leber und Milz sowie in Lymphozyten und Fibroblasten wird hauptsächlich ANT-2 exprimiert als Antwort auf mitogene Signale wie Thyroidhormone oder Serumstimulation. Die Expression des ANT-3-Gens weist dagegen keine signifikante Gewebsspezifität auf und ist bei Mäusen und Ratten nicht vorhanden (Battini *et al.*, 1987, Li *et al.*, 1997, Doerner *et al.*, 1997a). Die verschiedenen ANT-Isoformen sind demnach nahezu in jeder Körperzelle in Mitochondrien vorhanden. Bei der biochemischen Analyse von submitochondrialen Proteinfraktionen konnten Vyssokikh und Kollegen jedoch zeigen, dass ANT-1 und VDAC

spezifisch in den Fraktionen mit der höchsten Cyclophilin- und mtCK-Aktivität angereichert sind; dagegen liess sich so gut wie kein ANT-2 in diesen Proben nachweisen (Vyssokikh *et al.*, 2001). Dies spricht eindeutig dafür, dass ANT-1, aber nicht ANT-2, Bestandteil der PTP ist und dies könnte die hier beobachteten Unterschiede zwischen den beiden Isoformen bezüglich der Apoptose-Aktivität erklären. Demnach stellt ANT-2 vor allem in stark proliferierenden Geweben (evtl. hier bevorzugt wegen seiner höheren Transportaktivität, vgl. 1.1.1) benötigtes ATP zur Verfügung, während ANT-1 neben dem zu bewerkstellenden Nukleotidtransport eine zweite Aufgabe in der Beteiligung an der PTP besitzt.

5.2.7 ANT-1 und eine seine mögliche Beteiligung an der degenerativen Herzerkrankung DCM

Die Charakterisierung von ANT-1 als spezifischem Induktor der PT und sukzessiver Apoptose erfolgte aufgrund seiner Isolierung in einem Überexpressions-Screen. Wie in den vorangegangenen Abschnitten erläutert, scheint die beobachtete apoptotische Aktivität von überexprimiertem ANT-1 in den durchgeführten Experimenten auf kompetitiver Bindung endogener PTP-Inhibitoren und der nachfolgenden Aktivierung des Porenkomplexes zu beruhen. Zelltod-Signalmoleküle wie DISC-Proteine, Caspasen oder BH3-only-Proteine werden häufig durch kovalente Modifikationen wie Proteolyse oder Phosphorylierung aktiviert, während Transkription und/oder Translation als Aktivierungsstrategie eher seltener zu sein scheinen. Vor diesem Hintergrund ist es denkbar, dass die PTP-Aktivierung durch erhöhte Expression des ANT-1-Gens einen artifiziellen Zelltod-Stimulus darstellt. Umso faszinierender erscheint hier die molekularbiologische Analyse von Patienten, die an dilatativer Kardiomyopathie (DCM) leiden, einer Herzinsuffizienz, die auf die Dystrophie des Herzmuskels zurückzuführen ist: Auf RNA- und Proteinebene ist in den Kardiomyozyten spezifisch ANT-1 signifikant hochreguliert, und eine grosse Anzahl apoptotischer Zellen konnte im Herzmuskelgewebe von DCM-Patienten nachgewiesen werden (Narula *et al.*, 1996, Doerner *et al.*, 1997b). Ein erster Vorversuch mit der Ratten-Myoblasten-Zelllinie H9c2 bestätigte die spezifische apoptotische Aktivität von ANT-1, im Gegensatz zu ANT-2, in diesem System (Abb. 4.11). Die spezifische Hochregulation des ANT-1-Gens und die exzessive Apoptose als mögliche

Ursache von Herzmuskeldegeneration und DCM ist ein eindrucksvoller Beleg für die Isolierung von krankheitsrelevanten, Apoptose-induzierenden Genen mit Hilfe eines neuen funktionellen *screens*, der im Labor Grimm etabliert wurde.

5.3 Die Rolle von Cyclophilin D in der mitochondrial induzierten Apoptose

5.3.1 Molekulare Chaperone regulieren Apoptose

Konformationsänderungen in Komponenten der Zelltod-Maschinerie sind zentral für ihre Aktivierung und Funktion. In den letzten Jahren haben sich Hinweise gemehrt, dass molekulare Chaperone, eine Gruppe von Enzymen, die die dreidimensionale Struktur und Faltung von Proteinen beeinflussen kann, Apoptose-regulierend wirken können.

Zu den molekularen Chaperonen gehören u.a. die sog. "heat shock proteins" (HSP), die aufgrund von zellulären Stressbedingungen wie thermalem Stress, UV-Strahlung usw. hochreguliert werden. Die Hauptaufgabe der HSPs wurde bisher vor allem in der Faltung, Assemblierung und dem Transport von Proteinen sowie der Dissoziation von Proteinaggregaten gesehen.

Für HSP27 wurde überraschenderweise gezeigt, dass es direkt mit Cytochrom c interagiert und so die Apoptosom-Aktivierung inhibiert. HSP70 wirkt ebenfalls antiapoptotisch indem es durch Apaf-1-Bindung mit der Rekrutierung von Caspase-9 interferieren. Herzmuskelzellen werden durch stabile Transfektion von HSP60 und/oder HSP10 auf bisher noch unbekannte Weise vor apoptotischen Zellschädigungen durch Sauerstoffmangel bzw. Reoxygenierung geschützt (Ischaemie/Reperfusion) (Beere *et al.*, 2000, Pandey *et al.*, 2000, Lin *et al.*, 2001). Interessanterweise benötigen die HSPs für diese Apoptosehemmung nicht immer ihre Faltungsaktivität, wie im Fall einer HSP70-Mutante ohne ATP-Bindungsdomäne, die nach Transfektion Cervixkarzinomzellen noch vor vielfältigen Stimuli wie Vinblastin, Serumentzug, Staurosporin u.a. schützen kann. Auch im Fall von HSP27 wird die Cytochrom c-Bindung von Aminosäureresten vermittelt, die für die Faltungsaktivität *in vitro* unerheblich sind (Bruey *et al.*, 2000, Gio *et al.*, 2000, Ravagnan *et al.*, 2001)

Cyclophilin D gehört zur Familie der Immunophiline, die ebenfalls zu den molekularen Chaperonen zählen. Entdeckt wurden die Immunophiline als Rezeptoren immunsup-

primierender Medikamente. Die murine Immunophilin-Familie besteht aus zytoplasmatischen Proteinen, die FK506 (FK506-binding-protein, FKBP-12, -25 und -52) binden, sowie aus den Cyclosporin A-bindenden Proteinen Cyclophilin A, -40 (Zytoplasma), Cyclophilin E, F (Endoplasmatisches Retikulum) sowie Cyclophilin D (Mitochondrium) (Galat & Metcalfe, 1995). Immunophiline katalysieren die cis-trans-Isomerisierung der Peptidyl-Prolylbindung (PPIase-Aktivität) in Proteinen und vermitteln so beispielsweise die komplizierte dreidimensionale Struktur der Kollagentripelhelix (Fischer *et al.*, 1984, Steinmann *et al.*, 1991). Die Aminosäuresequenz und die dreidimensionale Struktur von PPIasen sind in der Evolution von Prokaryoten bis zu Säugern sehr gut konserviert, was eine essentielle Aufgabe dieser Chaperone nahelegt. Cyclophiline werden bisher nur vereinzelt mit Apoptose-Regulation in Verbindung gebracht, so zeigten Lee und Kollegen, dass Cyclophilin A-Transfektion Neuronen vor Zelltod ausgelöst durch oxidativen Stress, schützen kann. Dieser protektive Effekt war abhängig von der PPIase-Aktivität, da eine enzymatisch inaktive Mutante keine Apoptose-Inhibition bewirkte (Lee *et al.*, 1999). Cyclophilin D könnte als endogener Inhibitor der PTP eine zentrale Rolle in der mitochondrialen Apoptose-Induktion spielen, und es ist fraglich, ob die bisher beschriebene Enzymaktivität des Proteins hier eine Rolle spielt.

5.3.2 Die PPIase-Aktivität von Cyclophilin D und die PTP-Aktivierung

Cyclosporin A (CsA) hemmt die PPIase-Aktivität aller bisher beschriebenen Cyclophiline und wurde oftmals als genereller Inhibitor der PTP-Aktivität beschrieben. Cyclophilin D ist das bisher einzig bekannte mitochondriale Cyclophilin. Deswegen wird von einigen Autoren spekuliert, dass seine Enzymaktivität aktivierend auf die PTP wirkt. Interessanterweise existieren mindestens acht verschiedene Cyclophiline in humanen Zellen, die alle CsA binden (Martinou & Green, 2001, Halestrap *et al.*, 2002).

Die grösstenteils mit *in vitro*-Systemen erhobenen Daten zur Hemmung der PT durch CsA sind nicht immer konsistent: Die Inhibition der Ca^{2+} -induzierte PT sowie die PPIase-Aktivität isolierter Mitochondrien ist mit vergleichbarer Kinetik durch CsA hemmbar. Sobald jedoch submikromolare Ca^{2+} -Konzentration überschritten werden, ist die PT CsA insensitiv (Halestrap & Davidson, 1990, Connern & Halestrap, 1994).

Mittlerweile mehren sich auch Hinweise, wonach CsA Apoptose auslösen kann (Lee *et al.*, 1999, Esposito *et al.*, 2000, Damoiseaux *et al.*, 2002). In dieser Arbeit liess sich in

Vorversuchen mit CsA keinerlei Einfluss auf ANT-1-induzierten Zelltod bzw. auf dessen Hemmung durch CypD nachweisen (nicht gezeigt).

Die PPIase-Aktivität des Hefe-Cyclophilins Cpr3 wird wie bei allen bisher bekannten Cyclophilinen durch Cyclosporin A *in vitro* inhibiert. Eine vergleichbare Hemmung der Enzymaktivität wird durch die Einführung von zwei Punktmutationen, R73A und H144Q, erreicht (Scholz *et al.*, 1999). Diese beiden für die PPIase-Aktivität essentiellen Aminosäurereste sowie benachbarte Regionen sind in allen Familienmitgliedern konserviert. Auch Cyclophilin D und Cpr3 weisen im Bereich dieser entscheidenden Domäne grosse Homologien auf. Die korrespondierende CypD-Doppelpunktmutante, R96A/H167Q, inhibierte die ANT-1-induzierte Apoptose ebenso stark wie der CypD-Wildtyp (Fig. 4.16). Lin und Kollegen konnten zeigen, dass durch CypD-Transfektion Zellen vor oxidativem Stress geschützt wurden. Verwendeten sie jedoch die jeweiligen CypD-Einzelpunktmutanten R96G und H167Q, so wurde in den Zellen Apoptose ausgelöst (Lin *et al.*, 2002). Aufgrund immenser technischer Schwierigkeiten war es in der vorliegenden Arbeit leider nicht möglich ein PPIase-Testsystem zu etablieren, so dass die Frage nach dem Zusammenhang zwischen PPIase-Aktivität und PTP-Inhibition nicht zur vollständigen Zufriedenheit beantwortet werden konnte.

Der präzise molekulare Mechanismus der PTP-Inhibition durch CsA ist bisher nicht eindeutig aufgeklärt. Woodfield und Kollegen konnten zeigen, dass ANT aus solubilisierten inneren mitochondrialen Membranen an immobilisiertes GST-CypD bindet. Diese Interaktion konnte durch Präinkubation mit CsA verhindert werden (Woodfield *et al.*, 1998). Dies würde nahe legen, dass CsA eine Dissoziation des CypD::ANT-Komplexes bewirkt und so die PT hemmt. In diesem Sinn lassen sich auch *in vitro*-Experimente interpretieren, wonach CypD unter zellulären Stressbedingungen verstärkt an isolierte innere mitochondriale Membranen bindet, allerdings nur bei submikromolaren Ca^{2+} -Konzentrationen (Connern & Halestrap, 1994, Connern & Halestrap 1996).

Offensichtlich ist die Anwendung von *in vitro*-Systemen für die Erforschung des CsA-Wirkmechanismus auf CypD und die PTP mit grossen Schwierigkeiten verbunden. Die o.a. Experimenten scheinen die Theorie zu belegen, wonach die (CsA-inhibierbare) Bindung von CypD an ANT-1 die Aktivierung der PTP favorisiert. Dies steht jedoch in direktem Widerspruch zur beobachteten, dosiabhängigen Hemmung der ANT-1-induzierten

Apoptose durch CypD-Kotransfektion (Fig. 4.15). Vielmehr könnte die Anwesenheit von CypD die PTP bzw. ANT-1 in einer ‚ATP-Transportkonformation‘ stabilisieren und die Ausbildung einer apoptotischen ‚Porenkonformation‘ verhindern (vgl. Abb 5.1). Für dieses Modell spricht, dass es bei der Zelltod-Auslösung durch oxidativen Stress mit N-4-(Hydroxyphenyl)retinamid zu einer signifikanten Abnahme der Menge an CypD-mRNA kommt. Dies würde bedeuten, dass die PTP durch den Verlust eines endogenen Inhibitors aktiviert wird (Hursting *et al.*, 2002). So könnten vielfältige Zelltod-Signale die PTP aktivieren, indem sie eine ‚Porenkonformation‘ ohne gebundenes CypD induzieren. In diesem Sinne sollte CypD-Transfektion bzw. Kotransfektion verschiedene apoptotische Stimuli durch PTP-Inhibition revertieren. Eine Reihe von Experimenten wurde durchgeführt, um diese Hypothese zu überprüfen.

5.3.3 Cyclophilin D ist ein spezifischer Repressor der PTP

Die Anzahl Apoptose auslösender Stimuli steigt täglich, und für die wenigsten ist bekannt, welche intrazellulären Signalwege sie aktivieren. Diese Komplexität wird z.B. dadurch ersichtlich, dass rezeptorvermittelte Todessignale durch eine Vielzahl assoziierter Adaptorproteine und deren Interaktionspartner weitergeleitet werden, deren Verfügbarkeit gewebs- und entwicklungsabhängig sein kann (Ashkenazi, 2002). In einem ersten Experiment wurden HEK 293T-Zellen mit CypD transfiziert und anschliessend mit UV-Strahlung, Arsentrioxid und TNF- α , dem Liganden des TNF-R-1 behandelt. Offensichtlich konnte die Anwesenheit von CypD den Zelltod, ausgelöst durch UV-Strahlung nicht verhindern. Im Rahmen der zellulären Antwort auf eine so ausgelöste Schädigung der DNA wird oftmals der Tumorsuppressor p53 aktiviert, der wiederum eine Vielzahl von Signalmolekülen aktiviert, die z.B. die Progression des Zellzyklus verhindern und Apoptose auslösen (Wang *et al.*, 2001). Durch Arsentrioxid induzierter Zelltod konnte signifikant durch CypD-Transfektion der induzierten Zellen gehemmt werden. Arsentrioxid wird als Chemotherapeutikum in der Behandlung von Leukämie-Erkrankungen bereits in der klinischen Phase erprobt. Die molekulare Wirkungsweise dieser Substanz ist hingegen noch unbekannt.

TNF- α aktiviert den TNF-Rezeptor-1 sowie den *Death-Receptor-3* (vgl. Abb.1.2). Die Adaptorproteine FADD, TRADD sowie eine grosse Anzahl assoziierter DISC-Proteine

leiten u.a. dieses Todessignal weiter (Chen & Goeddel, 2002). Die durch TNF- α -Behandlung ausgelöste Apoptose wird nur schwach von CypD-Transfektion gehemmt (Fig. 4.17). In Kotransfektionsexperimenten sollten verschiedene, bekanntermassen durch TNF- α aktivierte, Signalkomponenten bezüglich ihrer Hemmung durch CypD untersucht werden. Dabei wurde parallel Bongkrekensäure (BA) als Kontrolle für PTP-Aktivität eingesetzt. Die antiapoptotischen Gene Bcl-2 und Bcl-x_L wurden ebenfalls kotransfiziert; ihre Rolle und auch die Rolle von Bax wird in einem gesonderten Abschnitt besprochen (s. 4.3.4).

Das *Receptor interacting protein* (RIP) ist über den Adaptor Traf-2 an die TNF- α -Signaltransduktion gekoppelt. RIP kann Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF- κ B aktivieren, aber auch Caspase-Aktivierung und Apoptose bei Überexpression induzieren (Hsu *et al.*, 1996, Grimm *et al.*, 1996). Der RIP-vermittelte Apoptose-Signalweg scheint nicht essentiell auf der Aktivierung der PTP zu beruhen, denn die Kotransfektion von RIP und CypD resultiert nur in einer milden Hemmung der Apoptose, und BA hemmt RIP vergleichbar schwach (Abb. 4.18). Die zentrale (Initiator-) Caspase-8 wird zum einen durch vielfältige extrinsische Todessignale, z.B. via TNF-R-1, FAS-R und DR-3, zum anderen durch Chemotherapeutika aktiviert. Caspase-8 ist Ausgangspunkt verschiedener Zelltodsignalwege; sie aktiviert die Caspasenkaskade und transduziert durch die proteolytische Aktivierung von Bid Apoptosestimuli zu Mitochondrien (Li *et al.*, 1998, Los *et al.*, 1999). Interessanterweise wird Caspase-8 durch CypD-Kotransfektion und BA-Behandlung signifikant gehemmt, was eine essentielle Rolle der PTP in der Signaltransduktion ‚downstream‘ dieser Initiatorcaspase suggeriert (Abb. 4.19). Im Einklang mit dieser Hypothese, wird durch tBid ausgelöster Zelltod von CypD vollständig gehemmt, während die BA-Behandlung überraschenderweise einen etwas schwächeren Effekt hat. Warum hier keine vollständige Hemmung durch BA erzielt werden konnte, kann beim gegenwärtigen Kenntnisstand nicht widerspruchsfrei erklärt werden, da alle bisher erhobenen Daten eine strikt PTP-spezifische Rolle für CypD suggerieren (Abb. 4.22). Auch Zamzami und Kollegen konnten nur eine partielle BA-Hemmung der Apoptose, induziert durch mikroinjiziertes tBid in Rat-1-Zellen, zeigen (Zamzami *et al.*, 2000). Nach vorherrschender Meinung spielen Mitochondrien keine wichtige Rolle innerhalb der sequentiellen Effektorcaspasen-Aktivierung. Wie zu erwarten, wird die Caspase-2-

induzierte Apoptose durch CypD und BA nicht beeinflusst, was die häufig vermutete Rolle von Caspase-2 als Effektorcaspase "downstream" von Mitochondrien bestätigt (Abb. 4.20). Aufgrund der hier diskutierten Ergebnisse darf angenommen werden, dass die Bedeutung von TNF- α für die Aktivierung von Caspase-8 in HEK 293T-Zellen nicht von zentraler Bedeutung ist, sondern wahrscheinlich über andere Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie erfolgt. Die starke Korrelation zwischen der Hemmung von Zelltod-Signalkomponenten durch CypD-Koexpression und BA-Behandlung etabliert CypD mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit als spezifischen Repressor der PTP. Damit wäre CypD – nach momentanem Kenntnisstand – der erste beschriebene, zelluläre Inhibitor der mitochondrial induzierten Apoptose, der nicht Mitglied der Bcl-2-Genfamilie ist. Vor allem die starke Hemmung von Caspase-8, eines wichtigen intrazellulären Apoptose-Faktors, markiert CypD als einen hochinteressanten Zelltodmodulator.

5.3.4 Multi-BH-Domänen-Proteine, CypD und die PTP

Der Einfluss der prominenten Multi-BH-Domänen-Proteine Bax, Bak, Bcl-2 und Bcl-x_L auf die PTP gehört zu den meistdiskutierten Problemstellungen der Apoptoseforschung. Die beiden hauptsächlich favorisierten Theorien für die proapoptotische Wirkung von Bax beschreiben zum einen die direkte Interaktion des Proteins mit Komponenten der PTP und deren sukzessiver Aktivierung, zum anderen die Bildung eines Bax-Kanals, der für die PTP-unabhängige Freisetzung von Cytochrom c verantwortlich sei.

Experimente mit rekombinanten Proteinen, die in Liposomen und/oder artifiziellen Doppelmembranen inkorporiert werden, liefern ein verwirrendes Bild: Mittels *Patch clamp*-Techniken lässt sich die Bildung von Kanälen nachweisen durch Bax allein, durch Bax und ANT, Bax und VDAC usw. (Marzo *et al.*, 1998, Brenner *et al.*, 2000, Saito *et al.*, 2000 Shimizu *et al.*, 2000a). Marzo und Kollegen begründeten ihre Theorie einer funktionellen Kooperation von Bax und ANT u.a. mit Daten aus ANT-defizienten Hefezellen, in denen Bax in ihren Händen keine apoptotische Aktivität mehr besitzt. Dies steht in direktem Widerspruch zu Daten von Shimizu und Mitarbeitern, die zeigten, dass *ANT-knockout* Hefezellen genauso susceptibel für Bax-induzierten Zelltod sind wie Wildtyp-Zellen, während VDAC-negative Zellen insensitive gegenüber Bax waren. Andere Gruppen wiederum zeigten eindeutig Zelltod, ausgelöst durch Bax in Hefen ohne VDAC (Marzo *et*

al., 1998, Priault *et al.*, 1999, Shimizu *et al.*, 2000b, Gross *et al.*, 2000). Offensichtlich ist die Frage, ob Bax durch ‚autonome‘ Bildung eines Kanals die Freisetzung von Cytochrom c bewirken kann oder ob es dazu mit der PTP kooperiert, nicht ohne weiteres zu klären. Alle bisher diskutierten Daten weisen auf eine Rolle von CypD als spezifischen PTP-Inhibitor hin, und deshalb sollten ANT – als offensichtlicher PTP-Induktor – und Bax bezüglich einer Hemmung durch CypD und BA direkt miteinander in einem zellulären System verglichen werden. Nach den vorliegenden Ergebnissen wird die Bax-induzierte Apoptose nur schwach durch CypD-Kotransfektion und BA-Behandlung inhibiert, während der durch ANT-1-Überexpression ausgelöste Zelltod vollständig durch CypD und BA gehemmt wird (Abb. 4.21). Diese Ergebnisse deuten in Richtung einer PTP-unabhängigen Wirkungsweise von Bax und bestätigen Untersuchungen, nach denen die Cytochrom c-Freisetzung in COS-Zellen nach Bax-Überexpression nicht durch BA gehemmt werden kann (Eskes *et al.*, 1998). Weiterhin unterstützt dieses Resultat die Beobachtung, dass Bax in Abhängigkeit von Apoptose-Stimuli wie UV-Strahlung und Staurosporin Oligomerkomplexe mit Grössen zwischen 100 und 260 kd (MW des Bax-Monomer ca. 20 kd) in der äusseren Mitochondrienmembran bildet, in denen per Immunblot weder ANT noch VDAC nachgewiesen werden konnten (Antonsson *et al.*, 2001). Die Erforschung der Bcl-2-Genfamilie und ihrer Rolle in der molekularen Apoptose-Regulation fördert widersprüchliche Ergebnisse zutage und evoziert konkurrierende Theorien; andere Autoren konnten z.B. die Bax-induzierte Cytochrom c –Freisetzung komplett durch BA hemmen (Narita *et al.*, 1998). Auf der anderen Seite ist es nicht unwahrscheinlich, dass Bax evtl., abhängig vom zellulären System, über PTP-unabhängige und –abhängige Wirkungsmechanismen verfügen könnte. Betrachtet man die Zelltod-Modulation durch die antiapoptotischen Familienmitglieder Bcl-2 und Bcl-xL, dann lassen sich auch hier deutliche Hinweise auf verschiedene Strategien erahnen. Beide Proteine hemmen die Freisetzung von Cytochrom c in einer Vielzahl von Apoptose-Modellen – allgemein gilt vor allem Bcl-2 als prominentester Apoptose-Inhibitor (Kluck *et al.*, 1997, Yang *et al.*, 1997, Kroemer & Reed, 2000). Eine für lange Zeit populäre Hypothese beruhte auf der Inaktivierung von Zelltodsignalen durch Kreuzinteraktion der pro- und antiapoptotischen Multi-BH-Domänen-Proteine Bcl-2 und Bcl-xL sowie Bax und Bak; d.h. Bcl-2 interagiert z.B. mit Bax-Oligomeren und bildet inaktive Bcl-2::Bax-Heterodimere usw. (Oltvai & Korsmeyer,

1994) Wie nach dieser Theorie zu erwarten wird der Effekt von Bax durch Bcl-2 und auch durch Bcl-xL fast vollständig revertiert (Abb. 4.21). Allerdings wird diese Hypothese mittlerweile durch Untersuchungen relativiert, wonach etwa Bcl-xL-Mutanten, die nicht mehr an Bax binden, immer noch antiapoptotisch wirken (Cheng *et al.*, 1998).

Andererseits bilden rekombinant hergestellte Bcl-2- und Bcl-xL-Moleküle Ionenkanäle in Vesikeln und künstlichen Doppelmembranen, und es wird teilweise angenommen, dass sie als H⁺-Kanäle $\Delta\Psi_m$ stabilisieren und die PT verhindern. Weitere Hinweise auf eine direkte Modulation der PTP sind beobachtete Interaktionen von Bcl-2 und Bcl-xL mit ANT sowie von Bcl-xL und VDAC (Marzo *et al.*, 1998, Kroemer & Reed, 2000, Shimizu *et al.*, 2000c). Eine solche PTP-inhibitorische Funktion würde die beobachtete Hemmung – in Korrelation mit BA - von Caspase-8, Bid und ANT in Kotransfektionsexperimenten erklären, wobei Bcl-xL ANT nur schwach inhibiert. Im Unterschied dazu wird Bax durch Bcl-xL-Koexpression vollständig gehemmt, was die Hypothese divergierender Todes-signale, ausgelöst durch Bax- und ANT-Überexpression unterstützt (Abb. 4.19, 4.21, 4.22). Interessanterweise werden mit RIP und Caspase-2 auch Apoptose-Induktoren durch Bcl-2 und Bcl-xL (nur RIP) gehemmt, die aufgrund der CypD- und BA-Hemmprofile eher PTP- und wahrscheinlich auch Mitochondrien-unabhängig sind (Abb. 4.18, 4.20). Die Ursache hierfür sind evtl. Bcl-2/Bcl-xL-regulierte Plattformen für Cytochrom c-unabhängige Caspase-Aktivierung, für die es mittlerweile zahlreiche Hinweise gibt und die auch aus *C. elegans* bekannt sind (Conradt & Horvitz, 1998, Chen *et al.*, 2000). Ein Beispiel dafür ist die Existenz eines ER-ständigen Komplexes aus dem Adaptorprotein Bap31 und Bcl-xL. Das im Labor Grimm neu entdeckte BH-3-only Protein SPIKE entfernt Bcl-xL aus dem Komplex, der dann wahrscheinlich durch Caspasen-Aktivierung Apoptose induziert (Mund *et al.*, 2003).

Über die Hintergründe der unterschiedlichen Hemmprofile von CypD/BA und Bcl-2/Bcl-xL kann an dieser Stelle nur spekuliert werden; zu wenig ist bisher bekannt über die genaue Rolle und Funktion von CypD abseits der bisher beschriebenen PPIase-Aktivität; und fast zuviel ist bekannt über molekulare Interaktionen und Effekte der anti-apoptotischen Bcl-2-Gene, um mit den durchgeführten Experimenten zu vergleichenden Aussagen kommen zu können. Nicht zuletzt die Möglichkeit variierender Expressionsstärken der verwendeten Konstrukte relativiert die Aussagekraft dieser ersten Reihe von Experimenten. Es ist jedoch

von Interesse festzuhalten, dass Bcl-2 und Bcl-xL sowohl PTP-inhibitorisch zu wirken scheinen (Vergleich mit CypD/BA), andererseits aber auch alternative Todessignalwege beeinflussen können, was aktuellen Theorien, die vielseitige Funktionen der Bcl-2-Gene postulieren (s.o.), entspricht, und erklären könnte, warum Bcl-2-Koexpression alle getesteten Apoptose-Stimuli zumindest partiell hemmen kann.

5.3.5 Die PTP und ihre Rolle in der Apoptose-Signalleitung

Bei der Untersuchung von Zelltod-Phänomenen ist die apoptotische Aktivierung von Mitochondrien in den letzten Jahren zum Standard-Parameter avanciert. Eine Vielzahl von Artikeln betont die Rolle der PTP bei der Permeabilisierung von Mitochondrien, und die initiale Charakterisierung neuer Apoptose-Stimuli beinhaltet typischerweise, ob sie in der Lage sind PT auszulösen (Kroemer & Reed, 2000, Martinou & Green, 2001, Belzacq *et al.*, 2002). Auf der anderen Seite gibt es Untersuchungen, wonach die Cytochrom c-Freisetzung zeitlich vor dem Verlust von $\Delta\Psi_m$ nachgewiesen wurde oder gar völlig unabhängig davon zu sein scheint (Finucane *et al.*, 1999, Waterhouse *et al.*, 2001). Andere Autoren postulieren wiederum, dass die PTP eher als Sensor für die biochemische Redox- und Energiesituation funktioniert, der bei intolerablen metabolischen Bedingungen den Suizid der Zelle auslöst und im Rahmen der "extrinsischen" Apoptose-Induktion eher als "Signalverstärker" zugeschaltet werden kann (Scaffidi *et al.*, 1998; Vander Heiden *et al.*, 1998; Dolder *et al.*, 2001; Halestrap *et al.*, 2002). Obwohl also eine Vielzahl physiologischer (z.B. TNF α) und pathologischer (z.B. das Vpr-Protein aus HIV-1) Stimuli die PTP aktivieren und zur Auslösung des Zelltod-Programms führen (s. 1.2.10.3), ist die Rolle des Porenkomplexes innerhalb der apoptotischen Signalleitung umstritten.

Die mit CypD erhobenen Daten sprechen eindeutig für eine wichtige Rolle der PTP bei der Modulation verschiedenster Zelltodsignalwege. Stimuli wie As₂O₃ und TNF- α werden offensichtlich durch die PTP vermittelt (und durch ektopische CypD-Expression attenuiert), andere dagegen wie UV-Bestrahlung, nicht. Ebenso werden Caspase-8 und tBid in ihrer apoptotischen Aktivität signifikant durch CypD-Koexpression gehemmt, Caspase-2 und RIP sind eher insensitive gegenüber paralleler CypD-Expression. Da CypD - vor allem aufgrund korrelierender BA-Hemmprofile (s. Abb. 4.18-22) - als spezifischer PTP-Repressor charakterisiert wurde, können diese Daten als eindeutiger Beleg für die zentrale

Rolle des Porenkomplexes bei der Transduktion von physiologisch relevanten Zelltod-Signalen angesehen werden.

Vor dem Hintergrund vielfältiger, z.T. sich überschneidender bzw. redundanter Zelltod-Signalwege (vgl. 5.3.4) bleibt die Aussagekraft dieser Daten jedoch beschränkt. Ein allgemeingültiges "Minimal-Szenario" der Apoptose-Signalleitung - ob mit oder ohne PTP-Beteiligung - ist nicht in Sicht und allein die Tatsache, dass hier offensichtlich gewebs- und zellspezifisch grundsätzlich verschiedene Wege der Informationsübermittlung zum Zuge kommen, etwa bei "Typ I"- vs. "TypII"-Zellen (s. 1.2.5), erschwert allgemeine Aussagen bezüglich einer generellen Rolle der PTP. Mit CypD existiert nun ein Werkzeug, das neue Möglichkeiten eröffnet, PTP-abhängige Apoptose-Signalwege zu identifizieren und zu untersuchen und somit die Aufgabe und die Rolle dieses Proteinkomplexes präziser studieren zu können.

5.3.6 CypD und Krebs

Apoptose-Inhibitoren sind im Kontext der Homöostase potentiell gefährliche Moleküle, denn sie können Zellen ‚unsterblich‘ machen, wie etwa im vielfach beschriebenen Fall von Bcl-2-Überexpression und Leukämien (Vaux *et al.*, 1988, Strasser *et al.*, 1993). CypD wurde in dieser Arbeit als neuer Apoptose-Inhibitor vorgestellt, der spezifisch mitochondriale Zelltodsignale abschaltet bzw. attenuiert. Über die Rolle der Cyclophiline ist neben ihrer PPIase-Aktivität ist z.Zt. nicht vieles bekannt. Es gibt jedoch einzelne Hinweise, dass Cyclophiline eine Rolle bei Proliferation und Tumorgenese spielen könnten. Die Überexpression von Cyclophilin A (CypA) beispielsweise erhöht die Wachstumsrate von HEB (*human embryonic brain*)-Zellen und ein neues, CypA-ähnliches Gen scheint in chemotherapieresistenten Brustkrebszellen amplifiziert zu sein. Im Fall von Cyclophilin E wurde ebenfalls eine Genamplifikation in kleinzelligem Lungenkarzinom nachgewiesen (Kim *et al.*, 1998, Nahreini *et al.*, 2001, Meza-Zepeda *et al.*, 2002).

Mit Hilfe einer kommerziell erhältlichen Membran (‚Tumor vs. Normal Profiling Blot‘, Clontech) wurde deshalb der Status der Cyclophilin D-Expression in normalem und neoplastischem Gewebe untersucht. Überraschenderweise war die Expression der CypD-mRNA in Krebsformen der weiblichen Reproduktionsorgane wie Brust, Uterus und Ovar signifikant (>Faktor 1,5) erhöht (Abb. 4.24). Kumar und Kollegen konnten zeigen, dass die

Expression der Cyclophilin-40-mRNA durch 17- β -Östradiol innerhalb von 24 h um den Faktor 5 verstärkt wird (Kumar *et al.*, 2001). Dies könnte auch im Fall von CypD der Hintergrund der beobachteten mRNA-Akkumulation sein. Eine Genamplifikation ist ebenfalls denkbar, vor allem hinsichtlich der oben angeführten Beispiele. Die wichtige Frage, ob es auch zur Überexpression des CypD-Proteins kommt, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Sollte dies der Fall sein, so würde dies vor dem Hintergrund vielfältiger Zelltodsignale, die CypD- und BA-sensitiv und damit offensichtlich PTP-abhängig sind (s.o.), einer partiellen Immortalisierung von Zellen gleichkommen. Im Detail wäre vorstellbar, dass die Anwesenheit von überschüssigem CypD eine "ADP/ATP-Transportkonformation" stabilisiert und eine apoptotische "Porenkonformation" der PTP verhindert (vgl. Abb. 5.1). Selbstverständlich kann über eine Rolle von CypD als Onkogen zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur spekuliert werden; eine Reihe weiterführender Untersuchungen wie Immunhistochemie mit Tumorgewebeproben, Transformations-Experimente usw. sind notwendig, um einen Zusammenhang zwischen Tumorgenese und CypD zu etablieren.

Die hier diskutierten Resultate der vorliegenden Arbeit belegen den Zusammenhang zwischen der molekularen Erforschung der Apoptose und der Hoffnung schwere Erkrankungen, wie Krebs oder DCM präziser ‚zellulär‘ verstehen zu können. Dies gilt natürlich auch im vorliegenden Fall zweier signifikanter Modulatoren der Apoptose mit Verbindungslinien zu Erkrankungen. Obwohl sicherlich noch substanzielle Anstrengungen unternommen werden müssen, um für diese und viele andere Beispiele unwiderlegbare Beweise für eine Beteiligung von Zelltod-Signalmolekülen bei der Entstehung von Erkrankungen zu erbringen, erscheint die immer häufiger werdende Verzahnung von molekularbiologischer Grundlagenforschung und Medizin als ein hoffnungsvoller Ansatz einer Entwicklung zu ‚biologischeren‘ Therapieformen und Medikamenten.

6 Zusammenfassung

Jede eukaryotische Zelle verfügt über ein genetisch determiniertes Selbstmordprogramm, Apoptose genannt, welches auf entsprechende Signale hin aktiviert werden kann. Die koordinierte Auslösung dieses Programms ist während der Entwicklung von Lebewesen ein entscheidender Parameter für die geordnete Anlage und Ausbildung von Geweben und Organen. Im adulten Organismus werden u.a. die Hämatopoiese, das Immunsystem, und die allgemeine Homöostase durch gezieltes apoptotisches Entfernen von Zellen moduliert. Die Verfügbarkeit einer solchen "Todesmaschinerie" stellt jedoch auch eine potenzielle Gefahr für den Organismus dar. Durch Mutation einzelner Komponenten der Apoptose-Signalleitung kann es zu einer überproportionalen Aktivierung des Programms kommen, was oftmals zur pathologischen Degeneration von Geweben, z.B. bei der Alzheimer-Krankheit, führt. Ebenso kann eine Verminderung der Apoptose-Rate die Entstehung von Tumoren begünstigen.

Eine Familie von Proteasen, die sogenannten Caspasen, katalysieren innerhalb des Apoptose-Programms die regulierte Zerstörung zellulärer Strukturen und Faktoren. Zwei prinzipielle Aktivierungswege führen zur Aktivierung dieser Enzyme. Der "extrinsische" Weg wird durch Plasmamembranrezeptoren und ihre Liganden aktiviert und mündet in Caspase-8-Aktivierung. Der "intrinsische" Weg ist gekennzeichnet durch die Freisetzung von Proteinen aus den Mitochondrien, die mit zytoplasmatischen Proteinen kooperieren, um Caspase-9 zu aktivieren. Caspase-8 und -9 initiieren die Aktivierung einer ganzen Kaskade weiterer Caspasen, die als "Effektorcaspasen" die hauptsächliche Zerstörungsarbeit leisten. Die apoptotische Aktivierung von Mitochondrien ist oftmals gekennzeichnet durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$, der auf der Öffnung eines Porenkomplexes, der "permeability transition pore" (PTP), beruht. Die PTP besteht aus Proteinen der beiden mitochondrialen Membranen und assoziierten Faktoren und scheint in einer normalen "ADP/ATP-Transportkonformation" und einer tödlichen "Apoptose-Konformation" vorliegen zu können.

In einem neuartigen *screen* zur Identifizierung neuer, Apoptose-induzierender Gen wurde die PTP-Komponente Adenin-Nukleotid-Translokator-1 (ANT-1) isoliert. ANT-1-Überexpression induzierte den Abfall von $\Delta\Psi_m$ und Caspase-Aktivierung, gefolgt von charak-

teristischen, apoptotischen Veränderungen der Zellen. Experimente mit Transportdefizienten Punktmutanten legten nahe, dass die Zelltod-Induktion unabhängig von der bekannten ADP/ATP-Antiport-Aktivität von ANT-1 ist. Das durch ANT-1 ausgelöste Todessignal ist von hoher Spezifität, da ANT-2, eine fast identische Isoform von ANT-1, keine apoptotische Aktivität bei Überexpression zeigte. Zusammen mit Ergebnissen, nach denen u.a. die ektopische Expression von ANT-1 keinen Zelltod in Hefezellen auslöst, schliesst dies die Existenz einer allein durch überexprimiertes ANT-1-Protein gebildeten Pore und damit einer unspezifischen Zelltod-Induktion aus. Offensichtlich werden als Folge der ANT-1-Überexpression inhibitorische Komponenten, die mitochondriale Creatinkinase und das molekulare Chaperon Cyclophilin D (CypD), aus der PTP entfernt, so dass der Porenkomplex in seiner "Apoptose-Konformation" vorliegt. ANT-1-Überexpression findet sich auch in den Zellen der durch Apoptose degenerierten Herzmuskeln von Patienten die an dilatativer Kardiomyopathie (DCM) leiden, was eine Beteiligung der PTP an der Entstehung von Krankheiten suggeriert.

Die PTP-Aktivierung durch ANT-1 kann durch parallele Expression der Peptidyl-Prolyl-Isomerase CypD revertiert werden, wobei die Enzymaktivität wahrscheinlich nicht verantwortlich für diese inhibitorische Aktivität ist. CypD desensitiviert Zellen gegenüber der Zelltod-Induktion durch Transfektion mit Initiatorcaspase-8, dem proapoptotischen Bcl-2 Gen Bid, und durch Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Arsentrioxid. Der spezifische PTP-Hemmstoff Bongkrekensäure zeigte ein nahezu identisches Hemmprofil wie CypD, so dass davon auszugehen ist, dass CypD tatsächlich ein endogener PTP-Inhibitor ist, der den Komplex in der ungefährlichen "ADP/ATP-Transportkonformation" stabilisiert. Die CypD-mRNA ist in Tumorproben, abgeleitet aus Geweben der weiblichen Reproduktionsorgane, signifikant überrepräsentiert. Dies legt eine Rolle von CypD als Onkogen nahe und ist ein weiterer Hinweis auf eine Rolle des Porenkomplexes und seiner Komponenten im Zusammenhang mit schweren Erkrankungen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sprechen für eine wichtige Beteiligung der PTP bei der Umsetzung des Zelltodprogramms als zelluläre Antwort auf physiologische und pathologische Todessignale.

7 Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptose-induzierender-Faktor
ANT	Adenin-Nukleotid-Translokator
Apaf-1	„Apoptotic protease-activating factor“
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BA	Bongkreksäure ("Bongkreic acid")
Bcl	„B-cell lymphoma“
Bp	Basenpaar(e)
CARD	„Caspase recruitment domain“
cDNA	„Complementary“-Desoxyribonukleinsäure
CMV	Cytomegalie-Virus
Co	Kontrolle
CK	Creatinkinase
CrmA	„Cytokine response modifier“
CsA	Cyclosporin A
CypD	Cyclophilin D
DD	„Death domain“
DED	„Death effector domain“
DISC	„Death inducing signaling complex“
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxsribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiammintetraessigsäure
EtBr	Ethdidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenzaktivierter „cell sorter“
FADD	„Fas associated protein with death domain“ (MORT-1)
Fas	„FS7-associated cell surface antigen“ (APO-1, CD95)
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fötale Kälberserum
FLIP	FLICE-inhibitorisches Protein
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m}^{-1}$)
Gal	Galaktosidase
GFP	„Green fluorescent protein“
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2'-Ethansulfonsäure
HIV	„Human immunodeficiency virus“
HK	Hexokinase
IAP	„Inhibitor of apoptosis“
ICE	„Interleukin-1 β -converting enzyme“
kb	Kilobasenpaare

kD	Kilodalton
kV	Kilovolt
LPS	Lipopolysaccharid
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
NaAc	Natriumacetat
OD	Optische Dichte
PARP	Poly-(Adenosindiphosphat-Ribose)-Polymerase
PT	"Permeability transition"
PTP	"Permeability transition pore"
PBR	Peripherer Benzodiazepin-Rezeptor
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RIP	„Receptor interacting protein“
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Radikale Sauerstoffintermediate
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TLCK	N α -p-Tosyl-L-Lysin-Chloromethyl-Keton
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-R	TNF-Rezeptor
TRADD	„TNF-receptor association protein with death domain“
TRAF	„TNF-receptor associated factor“
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (unit)
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett-Strahlung
VDAC	"Voltage Dependent Anion Channel"
wt	Wildtyp

8 Literatur

- Afanas'ev, V. N., B. A. Korol, Y. A. Mantsygin, P. A. Nelipovich, V. A. Pechatnikov, and S. R. Umansky (1986). Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death. *FEBS Lett* **194**, 347-359.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong, and J. Yuan (1996). Human ICE/CED-3 prease nomenclature. *Cell* **87**, 171-175.
- Altschul, S. F., M. S. Boguski, W. Gish, and J. L. Wootton. (1994). Issues in searching molecular sequence database. *Nature Genetics* **6**, 119-129.
- Andreeva, L., R. Heads, and C.J. Green (1999). Cyclophilins and their possible role in stress response. *Int. J. Exp. Path.* **80**, 305-315.
- Antonsson, B., F. Conti, A. M. Ciavatta, S. Montessuit, S. Lewis, I. Martinou, L. Bernasconi, A. Bernard, J.-C. Mermoud, G. Mazzei, K. Maundrell, F. Gambale, R. Sadoul, and J.C. Martinou (1997). Inhibition of Bax channel Forming Activity by Bcl-2. *Science* **277**, 370-372.
- Antonsson, B., S. Montessuit, B. Sanchez, and J.C. Martinou (2001). Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 11615-11623.
- Arends, M. J. and A. H. Wyllie (1991). Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Path.* **32**, 223-254.
- Ashkenazi, A. and V.M. Dixit (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 255-260.
- Attardi, L. D. E. E. Reczek, C. Cosmas, E. G. Demicco, M. E. McCurrach, S. W. Lowe, and T. Jacks (2000). PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. *Genes* **14**, 704-718.
- Barres, B.A. & M.C. Raff (1999). Axonal control of oligodendrocyte development. *J. Cell Biol.*, **147**, 1123-1128.-+
- Bauer, M. K. A., A. Schubert, O. Rocks, and S. Grimm (1999). Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *J Cell Biol.* **147**, 1493-1502.
- Battini, R. S. Ferrari, L. Kazcmarek, B. Calabretta, S.T. Chen, R. Baserga (1987). Molecular cloning of a cDNA for a human ADP/ATP carrier which is growth-regulated. *J. Biol. Chem.* **262**, 4355-4359.

- Beere, H.M., B.B. Wolf, K. Cain, D.D. Mosser, A. Mahboubi, T. Kuwana, P. Taylor, R.I. Motimoto, G.M. Cohen, and D.R. Green (2000). Heat shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.* **2**, 469-475.
- Bertin, J. R. C. Armstrong, S. Otilie, D. A. Martin, Y. Wang, S. Banks, G. H. Wang, T. G. Senkevich, E. S. Alnemri, B. Moss, M. J. Lenardo, K. J. Tomaselli, and J. I. Cohen (1997). Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 1172-1176.
- Beutner, G., A. Ruck, B. Riede, D. Brdiczka (1998). Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1368**, 7-18.
- Bhalla, K. (1993). Co-treatment with As₂O₃ enhances selective cytotoxic effects of STI-571 against Bcr-Abl-positive acute leukemia cells. *Leukemia.* **7**, 563-567.
- Birnboim, H. C. D. J. (1979). A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid-DNA. *Nucl. Acids Res.* **54**, 1513-1523.
- Block, M.R., P.V. Vignais (1986a). Dependence of the conformational state of the isolated adenine nucleotide carrier protein on the detergent used for solubilization. *Biochemistry* **25**, 374-9.
- Block, M.R., F. Boulay, G. Brandolin, Y. Dupont, G.J. Lauquin, P.V. Vignais (1986b). Fluorescent probes of the mitochondrial ADP/ATP carrier protein. *Methods Enzymol.* **125**, 639-649.
- Block, M.R., F. Boulay, G. Brandolin, G.J. Lauquin, P.V. Vignais (1986c). Chemical modifications and active site labeling of the mitochondrial ADP/ATP carrier protein. *Methods Enzymol.* **125**, 658-670.
- Bojes, H. K. K. Datta, J. Xu, A. Chin, P. Simonian, G. Nunez, and J. P. Kehrer (1997). Bcl-x_L overexpression attenuates glutathione depletion in FL5.12 cells following interleukin-3 withdrawal. *Biochem. J.* **325**, 315-319.
- Boya, P., B. Roques, and G. Kroemer (2001). Viral and bacterial proteins regulating apoptosis at the mitochondrial level. *EMBO J.* **20**, 4325-4331.
- Boldin, M. P. T. M. Goncharov, Y. V. Goltsev, and D. Wallach (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/Apo1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* **272**, 7795-7798.

- Borgers, M. L. G. Shu, R. Xhonneux, F. Thoné, and P. van Overloop (1987). Changes in ultrastructure and Ca^{2+} disruption in the isolated working rabbit heart after ischemia: a time-related study. *Am. J. Pathol.* **126**, 92-102.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brancolini, C. M. Benedetti, and C. Schneider (1995). Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases. *EMBO J.* **14**, 5179-5190.
- Brenner, C., H. Cadiou, H.L. Vieira, N. Zamzami, I. Marzo, Z. Xie, B. Leber, D. Andrews, H. Duclohier, J.C. Reed, G. Kroemer (2000). Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* **19**, 329-336.
- Brewer, G.J., T.W. Wallimann (2000). Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and beta-amyloid in rat hippocampal neurons. *J. Neurochem.* **74**, 1968-1978.
- Bruey, J.M., C. Ducasse, P. Bonniaud, L. Ravagnan, S.A. Susin, C. Diaz-Latoud, S. Gurbuxani, A.P. Arrigo, G. Kroemer, E. Solary, and C. Garrido (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat. Cell Biol.* **2**, 645-652.
- Brustovetsky, N., and M. Klingenberg (1996). Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca^{2+} . *Biochemistry* **35**, 8483-8488.
- Bucher, P. and A. Bairoch (1994). A generalized profile syntax for biomolecular sequence motifs and its function in automatic sequence interpretation. *Proceedings of the 2nd ISMB Conference*, 53-61.
- Bump, N. J. M. Hackett, M. Hugunin, S. Seshagiri, K. Brady, P. Chen, C. Ferenz, S. Franklin, T. Ghayur, and P. Li (1995). Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science.* **275**, 1885-1888.
- Cecconi, F., G. Alvarez-Bolado, B.I. Meyer, K.A. Roth, and P. Gruss (1998). Apaf1 (CED-4) homolog regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* **94**, 727-737.
- Chen, F., B.M. Hersh, B. Conradt, Z. Zhou, D. Riemer, Y. Gruenbaum, and R.H. Horvitz (2000). Translocation of *C. elegans* CED-4 to nuclear membranes during programmed cell death. *Science* **287**, 1485-1489.
- Cheng, E.H., B. Levine, L.H. Boise, C.B. Thompson, and J.M. Hardwick (1996). Bax - independent inhibition of apoptosis by Bcl-xL. *Nature* **379**, 554-556.

- Chinnaiyan, A. M. K. O'Rourke, M. Tewari, and V. M. Dixit (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-12.
- Connern, C.P., A.P. Halestrap (1994). Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive nonspecific channel. *Biochem. J.* **302**, 321-324.
- Conradt, B. and H.R. Horvitz (1998). The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* **93**, 519-529.
- Cote, J., and A. Ruiz-Carrillo (1993). Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science* **261**, 765-769.
- Cozens, A.L., M.J. Runswick, and J.E. Walker (1989). DNA sequences of two expressed nuclear genes for human mitochondrial ADP/ATP translocase. *J. Mol. Biol.* **206**, 261-280.
- Crompton, M., H. Ellinger, A. Costi (1988). Inhibition by Cyclosporin A of a Ca^{2+} dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J.* **255**, 357-360.
- Crompton, M., S. Virji, J.M. Ward (1998). Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur. J. Biochem.* **258**, 729-735.
- Crook, N. E. R. J. Clem, and L. K. Miller (1999). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J. Virol.* **67**, 2168-2174.
- Cryns V. and J. Yuan (1998). Proteases to die for. *Genes Dev.* **12**, 1551-1570.
- Damoiseaux, J.G., M.P. Defresne, C.P. Reutelingsperger, and P.J. Van Breda Vriesman (2002). Cyclosporin A differentially affects apoptosis during *in vivo* rat thymocyte maturation. *Scand. J. Immunol.* **56**, 353-360.
- Datta S.R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh, M.E. Greenberg (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231-41.
- Del Peso L, M. Gonzalez-Garcia, C. Page, R. Herrera, G. Nunez (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **278**, 687-689.
- Desagher S, A. Osen-Sand, A. Nichols, R. Eskes, S. Montessuit, S. Lauper, K. Maundrell, B. Antonsson, J.C. Martinou (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* **144**, 891-901

- Deveraux, Q.L., R. Takahashi, G. S. Salvesen, and J. C. Reed (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell death proteases. *Nature* **388**, 300-303.
- Deveraux Q.L. and J.C. Reed (1999). IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 239-252.
- Dierks, T., A. Salentin, C. Heberger, R. Kramer (1990). The mitochondrial glutamate/aspartate and ADP/ATP carrier switch from obligate counterexchange to unidirectional transport after modification by SH-reagents. *Biochim. Biophys. Acta* **1028**, 268-280.
- Digby, M. R. W. G. Kimpton, J. J. York, T. E. Connick, and J. W. Lowenthal (1996). ITA, a vertebrate homologue of IAP that is expressed in T lymphocytes. *DNA Cell. Biol.* **15**, 981-988.
- Dixit, V.M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous Ice/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/Apo-1) death-inducing signaling complex. *Cell* **85**, 817-827.
- Doerner, A., M. Pauschinger, A. Badorff, M. Noutsias, S. Giessen, K. Schulze, J. Bilger, U. Rauch, H.P. Schultheiss (1997a). Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocase isoforms in humans. *FEBS Letters* **414**, 258-262.
- Doerner, A. K. Schulze, U. Rauch, and H. P. Schultheiss (1997b). Adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy: pathophysiological alterations in expression and function. *Mol Cell Biochem.* **174**, 261-9.
- Doerner, A., M. Olesch, S. Giessen, M. Pauschinger, H.P. Schultheiss (1999). Transcription of the adenine nucleotide translocase isoforms in various types of tissues in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* **1417**, 16-24
- Dolder, M., S. Wendt, T. Wallimann (2001). Mitochondrial Creatine Kinase in Contact sites: Interaction with Porin and Adenine Nucleotide Translocase, Role in Permeability Transition and Sensitivity to Oxidative Damage. *Biol. Signals Recept.* **10**, 93-111.
- Dragovich, T. C. M. Rudin, and C. B. Thompson (1998). Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene.* **17**, 3207-13.
- Duckett, C. S. V. E. Nava, R. W. Gedrich, R. J. Clem, J. L. Van Dongen, M. C. Gilfillan, H. Shiels, J. M. Hardwick, and C. B. Thompson (1996). A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* **15**, 2685-2694.
- Ehrhardt, P. K. J. Tomaselli, and G. M. Cooper (1997). Identification of the MDM-2 oncoprotein as a substrate for CPP32-like apoptotic proteases. *J.Biol.Chem.* **272**, 15049-15052.

- Ellerby, L. M. H. M. Ellerby, S. M. Park, A. L. Holleran, A. N. Murphy, G. Fiskum, D. J. Kane, M. P. Testa, C. Kayalar, and D. E. Bredesen (1996). Shift of the cellular oxidation-reduction potential in neural cells expressing Bcl-2. *Neurochem.* **67**, 1259-1267.
- Ellis, H.M. and H.R. Horvitz (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell* **44**, 817-829.
- Ellis, R. E. J. Yuan, and H. R. Horvitz (1991). Mechanism and functions of cell death. *Rev. Cell. Biol.* **4**, 663-698.
- Emoto, Y. Y. Manome, G. Meinhardt, H. Kisaki, S. Kharbanda, M. Robertson, T. Ghayur, W. W. Wong, R. Kamen, and R. Weichselbaum (1995). Proteolytic activation of protein kinase C δ by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J.* **14**, 6148-6156.
- Enari, M. H. Hug, and S. Nagata (1995). Involvement of an Ice-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature* **375**, 78-81.
- Enari, M. H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, S. Nagata, and H. Sakahira (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43-50.
- Esposito, C., A. Fornoni, F. Cornacchia, N. Bellotti, G. Fasoli, A. Foschi, I. Mazzucchelli, T. Mazzullo, L. Semeraro, A. Dal Canton (2000). Cyclosporin induces different responses in human epithelial, endothelial and fibroblast cell cultures. *Kidney Int.* **58**, 123-130.
- Finucane, D.M., N.J. Waterhouse, G.P. Amarante-Mendes, T.G. Cotter, D.R. Green (1999). Collapse of the inner mitochondrial transmembrane potential is not required for apoptosis of HL60 cells. *Exp. Cell Res.* **251**, 166-174.
- Fischer, G. H. Bang, and C. Mech (1984). Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed. Biochim. Acta* **43**, 1101-1111.
- Galat, A., and S.M. Metcalfe (1995). Peptidylproline cis/trans isomerases. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **63**, 67-118
- Gawaz, W, M.G. Douglas, and M. Klingenberg (1990). Structure-function studies of adenine nucleotide transport in mitochondria.II. Biochemical analysis of distinct AAC1 and AAC2 proteins in yeast. *J. Biol. Chem.* **265**, 14202-14207.
- Ghayur, T. M. Hugunin, R. V. Talanian, S. Ratnofsky, C. Quinlan, Y. Emoto, P. Pandey, R. Datta, Y. Huang, S. Kharbanda, H. Allen, R. Kamen, W. Wong, and D. Kufe (1996). Proteolytic activation of protein kinase C δ by an ICE/CED-3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J. Exp. Med.* **184**, 2399-2404.

- Gewies, A and S. Grimm (2003). UBP41 is a proapoptotic Ubiquitin-specific Protease. *Cancer Res.* **63**, 682-688.
- Gietz, D. A. Jean, R. A. Woods, and R. H. Schiestl (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic. Acids. Res.* **20**, 1425-1432.
- Green, D. R. (1998). Apoptotic Pathways: The Roads to Ruin. *Cell* **94**, 695-698.
- Gio, Z., and L.F. Cooper (2000). An N-terminal 33-aminoacid deletion variant of Hsp25 retains oligomerization and functional properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 183-189.
- Gonzalez-Barrosco, M.M., C. Fleury, C. Levi-Meyrueis, P. Zaragoza, F. Bouillaud, E. Rial (1997). Deletion of amino acids 261-269 in the brown fat uncoupling protein converts the carrier into a pore. *Biochemistry* **36**, 10930-10935.
- Grimm, S., B.Z. Stanger, and P. Leder (1996). RIP and FADD: Two "death domain"-containing proteins can induce apoptosis by convergent, but dissociable pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci* **93**, 10923-10927.
- Grimm, S. and P. Leder (1997). An apoptosis-inducing isoform of neu differentiation factor (NDF) identified using a novel screen for dominant, apoptosis-inducing genes. *J. Exp. Med.* **185**, 1137-42.
- Gross A., J. Jockel, M.C. Wei, and S.J. Korsmeyer (1998). Enforced dimerization of Bax results in translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* **17**, 3878-3885.
- Gross, A., X.M. Yin, K. Wang, M.C. Wei, J. Jockel, C. Milliman, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and S.J. Korsmeyer (1999). Caspase cleaved Bid targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while Bcl-xL prevents this release but not tumor necrosis factor-RI/Fas death. *J. Biol. Chem.* **274**, 1156-1163.
- Gross, A., J. M. McDonnell, and S. J. Korsmeyer (1999). Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 623-634.
- Gross, A., K. Pilcher, E. Blachly-Dyson, E. Basso, J. Jockel, M.C. Bassik, S.J. Korsmeyer, and M. Forte (2000). Biochemical and genetic analysis of the mitochondrial response of yeast to Bax and Bcl-xL. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3125-3136.
- Gross, M., T. Wallimann (1993). Kinetics of assembly and dissociation of the mitochondrial creatine kinase octamer. A fluorescence study. *Biochemistry* **32**, 13933-13940
- GuénaI, I. C. Sidoti-de Fraisse, S. Gaumer, and B. Mignotte. (1997). Bcl-2 and Hsp27 act at different levels to suppress programmed cell death. *Oncogene.* **15**, 347-360.

- Häcki, J. L. Egger, L. Monney, S. Conus, R. Rossé, I. Fella, and C. Borner (2000). Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene*. **19**, 2286-2295.
- Halestrap, A.P., and A.M. Davidson (1990). Inhibition of Ca²⁺-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem. J.* **268**, 153-160.
- Halestrap, A.P., G.P. McStay, S.J. Clarke (2002). The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* **84**, 153-166.
- Hawkins, C., S.Wang, and B. Hay (1999). A cloning method to identify caspases and their regulators in yeast: identification of Drosophila IAP-1 as an inhibitor of Drosophila caspase DCP-1. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **96**, 2885-2890.
- Higuchi, M., R.J. Proske, E.T. Yeh (1998). Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis. *Oncogene*. **17**, 2515-2524.
- Hofmann, K. P. Bucher, and J. Tschopp (1997). The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 155-156.
- Holdsworth, J. and G. Attardi (1988). Two distinct genes for ADP/ATP translocase are expressed at the mRNA in adult human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **85**, 377-381.
- Honarpour, N., Gilbert, S., Lahn, B., Wang, X., and J. Herz (2001). Apaf-1 deficiency and neural tube closure defects are found in fog mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9683-9687.
- Hsu, H., H. B. Shu, M. G. Pan, and D. V. Goeddel (1996). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* **4**, 387-396.
- Hursting, S.D., J.C. Shen, X.Y. Sun, T.T.Y. Wang, J.M. Phang, and S.N. Perkins (2002). Modulation of cyclophilin gene expression by N-4-(Hydroxyphenyl)retinamide: Association with reactive oxygen species generation and apoptosis. *Mol. Carcinog.* **33**, 16-24.
- Huseyin, M. (2000). Apoptosis: Caspases find a new place to hide. *Nature* **403**, 29-30.
- Inohara, N. T. Koseki, S. Chen, X. Wu, and G. Nunez (1998). CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J.* **17**, 2526-2533.
- Jacobson, M. D., M. Weil, M.C. Raff (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-354.

- Jacotot E, K.F. Ferri, C. El Hamel, C. Brenner, S. Druillennec, J. Hoebeke, P. Rustin, D. Metivier, C. Lenoir, M. Geuskens, H.L. Vieira, M. Loeffler, A.S. Belzacq, J.P. Briand, N. Zamzami, L. Edelman, Z.H. Xie, J.C. Reed, B.P. Roques, G. Kroemer (2001). Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein rR and Bcl-2. *J Exp Med.* **193**, 509-19.
- Jänicke, R. U. P. Walker, X. Y. Lin, and A. G. Porter. (1996). Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J.* **15**, 6969-6978.
- Jenis, D. M. A. L. Stepanowski, O. C. Blair, D. E. Burger, and A. C. Sartorelli (1984). Lectin receptor proximity on HL-60 leukemia cells determined by fluorescence energy transfer using flow cytometry. *J. Cell. Physiol.* **121**, 501-507.
- Jiang, C. Baehrecke, E.H. and C.S. Thummel (1997). Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development* **124**, 4673-4683.
- Jiang, S., J. Cai, D.C. Wallace, D.P. Jones (1999). Cytochrome c-mediated apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. Signaling pathway involving release and caspase 3 activation is conserved. *J. Biol. Chem.* **274**, 29905-11
- Jurgensmeier J.M., Z. Xie, Q. Deveraux, L. Ellerby, D. Bredesen, J.C. Reed (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 4997-5002.
- Kane, D. J. T. A. Sarafian, R. Anton, H. Hahn, E. B. Gralla, J. S. Valentine, T. Örd, and D. E. Bredesen (1993). Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* **262**, 1274-1277.
- Kawai, T. M. Matsumoto, K. Takeda, and H. A. Sanjo (1998). ZIP kinase, a novel serine/threonine kinase which mediates apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1642-1651.
- Kerr, J. F. A. H. Wyllie, and A. R. Currie (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* **26**, 239-57.
- Kerr, J.F.A. (1994). Apoptosis. *Cancer* **73**, 2013-2026.
- Kim, J.O., M.M. Nau, K.A. Allikian, T.P. Makela, K. Alitalo, B.E. Johnson, M.J. Kelley (1998). Co-amplification of a novel cyclophilin-like gene (PPIE) with L-myc in small cell lung cancer cell lines. *Oncogene* **17**, 1019-1026.
- Kirby, K. S. (1957). A new method for the isolation of deoxyribonucleotide acids: evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acids and protein. *Biochem. J.* **66**, 495-504.
- Klingenberg M, I. Mayer, A.S. Dahms (1984). Interaction of fluorescent adenine nucleotide derivatives with the ADP/ATP carrier in mitochondria. 2. [5-(Dimethylamino)-1-

naphthoyl]adenine nucleotides as probes for the transition between c and m states of the ADP/ATP carrier. *Biochemistry* **23**, 2442-2449.

Klivenyi, P., R.J. Ferrante, R.T. Matthews, M.B. Bogdanov, A.M. Klein, O.A. Andreassen, G. Mueller, M. Wermer, R. Kaddurah-Daouk, M.F. Beal (1999). Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Med.* **5**, 347-350.

Kluck, R. M. E. Bossy Wetzler, D. R. Green, and D. D. Newmeyer (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132-1136.

Knirsch M, M.P. Gawaz, M. Klingenberg (1989). The isolation and reconstitution of the ADP/ATP carrier from wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of primarily one type (AAC-2). *FEBS Lett.* **244**, 427-32.

Krajewski, S., S. Tanaka, S. Takayama, M.J. Schibler, W. Fenton, J.C. Reed (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic Reticulum, and outermitochondrial membranes. *Cancer Res.* **53**, 4701-4714.

Kroemer, G., N. Zamzami, and S.A. Susin (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* **18**, 44-51.

Kroemer, G. (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat. Med.* **3**, 614-620.

Kroemer, G. P. Petit, N. Zamzami, J.-L. Vayssière, and B. Mignotte (1995). The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* **9**, 1277-1287.

Kroemer, G., and J.C. Reed (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* **6**, 513-519

Kuida, K., T.F. Haydar, C.Y. Kuan, Y. Gu, C. Taya, H. Karasuyama, M.S. Su, P. Rakic, and R.A. Flavell (1998). Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* **94**, 325-337

Kumar, P., P.J. Mark, B.K. Ward, R.F. Minchin, T. Ratajczak (2001). Estradiol-regulated expression of the immunophilins cyclophilin 40 and FKBP52 in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 219-225.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T8. *Nature* **227**, 680-685.

- Lazebnik, Y., A. S. H. Kaufmann, S. Desnoyers, G. G. Poirier, and W. C. Earnshaw (1994). Cleavage of poly (ADP-ribose)polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**, 346-347.
- Lee, J.P., H.C. Palfrey, V.P. Bindokas, G.D. Ghadge, L. Ma, R.J. Miller, and R.P. Roos (1999). The role of immunophilins in mutant superoxide dismutase-1-linked familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **96**, 3251-3256.
- Le Quoc, K., and D. Le Quoc (1988). Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability: importance of the orientation of the nucleotide binding site. *Arch. Biochem. Biophys.* **265**, 249-257.
- Li, H., H. Zhu, C.J. Xu and J. Yuan (1998). Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.
- Li, L.Y., X. Luo, X. Wang (2001). Endonuclease G (EndoG) is an apoptotic Dnase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-99
- Li, P. D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri, and X. Wang (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/Capase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489.
- Li, R., K. Luciakova, A. Zaid, S. Betina, E. Fridell, B.D. Nelson (1997). Thyroid hormone activates transcription from the promoter regions of some nuclear-encoded genes of the oxidative phosphorylation system. *Mol. Cell. Endocrinol.* **128**, 69-75.
- Ligr, M., F. Madeo, E. Fröhlich, W. Hilt, K.U. Fröhlich, D.H. Wolf (1998). Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. *FEBS Letters* **438**, 61-65.
- Lin, K.M., B. Lin, I.Y. Lian, R. Mestril, I.E. Scheffler, and W.H. Dillmann (2001). Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell death induced by stimulated ischaemia reoxygenation. *Circulation* **103**, 1787-1792.
- Lin, D.T., J.D. Lechleiter (2002). Mitochondrial targeted cyclophilin D protects cells from cell death by peptidyl prolyl isomerization. *J. Biol. Chem.* **277**, 31134-31141.
- Lindsten, T., A.J. Ross, A. King, W.X. Zong, J.C. Rathmell, H.A. Shiels, E. Ullrich, K.G. Waymire, P. Mahar, K. Frauwirth, Y. Chen, M. Wei, V.M. Eng, D.M. Adelman, M.C. Simon, A. Ma, J.A. Golden, G.I. Evan, S.J. Korsmeyer, G.R. MacGregor, and C.B. Thompson (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members Bak and Bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol. Cell* **6**, 1389-1399.
- Liston, P., N. Roy, K. Tamai, C. Lefebvre, S. Baird, G. Cherton Horvat, R. Farahani, M. McLean, J. E. Ikeda, A. MacKenzie, and R. G. Korneluk (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* **379**, 349-353.

- Liu, M.C., E.P. Gelmann (2002). P53 gene mutations: case study of a clinical marker for solid tumors. *Semin. Oncol.* **29**, 246-257.
- Liu, X. C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, and X. Wang (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **87**, 147-157.
- Lockshin, R. A. and J. Beaulaton (1981). Cell death: questions for histochemics concerning the causes of the various cytological changes. *Histochem. J.* **13**, 659-666.
- Lockshin, R. A. and C. M. Williams (1965). Programmed cell death - Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silmoth. *J. Insect. Physiol.* **11**, 803-809.
- Lodish, H.F., and N. Kong (1991). Cyclosporin A inhibits an initial step in folding of transferrin within the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **266**, 14835-14838.
- Loetscher, H. Y. C. Pan, H. W. Lahm, R. Gentz, M. Brockhaus, H. Tabuchi, and W. Lesslauer (1990). Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis facot receptor. *Cell* **61**, 351-359.
- Lüthy, R. I. Xenarios, and P. Bucher (1994). Improving the sensitivity of sequence profile method. *Prot. Sci.* **3**, 139-146.
- Luo, X., I. Budihardjo, H. Zuo, C. Slaughter and X. Wang (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.
- Macho, A. D. Decaudin, M. Castedo, T. Hirsch, S.A. Susin, N. Zamzami, and G. Kroemer (1996). Chloromethyl X-Rosamine is an aldehyde-fixable potential sensitive fluorochrome for the detection of early apoptosis. *Cytometry* **25**, 334-340.
- Manon, S., B. Chaudhuri, and M. Guerin (1997). Release of cytochrome c and decrease of cytochrome oxidase in Bax-expressing yeast cells, and ürevention of these effects by coexpression of Bcl-x_L. *FEBS Letters* **415**, 29-32.
- Marchetti, P. D. Decaudin, A. Macho, N. Zamzami, T. Hirsch, S. A. Susin, and G. Kroemer (1997). Redox regulation of apoptosis: impact of thiol oxidation status on mitochondrial function. *Eurol. J. Immun.* **27**, 289-296.
- Martin, S. J. G. A. O'Brien, W. K. Nishioka, A. J. McGahon, A. Mahboubi, T. C. Saido, and D. R. Green (1995). Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J. Biol. Chem.* **6**, 6425-6428.
- Marusich, M.F., B.H. Robinson, J.W. Taanman, S.J. Kim, R. Schillace, J.L. Smith, R.A. Capaldi (1997). Expression of mtDNA and nDNA encoded respiratory chain proteins in

chemically and genetically-derived Rho0 human fibroblasts from a patient with mtDNA depletion syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* **1362**, 145-59.

Marzo, I., S.A. Susin, P.X. Petit, L. Ravagnan, C. Brenner, N. Larochette, N. Zamzami, Guido Kroemer (1998a). Caspases disrupt mitochondrial membrane barrier function. *FEBS Letters* **427**, 198-202.

Marzo, I., C. Brenner, N. Zamzami, S.A. Susin, G. Beutner, D. Brdiczka, R. Remy, Z.H. Xie, J.C. Reed, and G. Kroemer (1998b). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and Bcl-2 related proteins. *J. Exp. Med.* **187**, 1261-1271.

Marzo, I, C. Brenner, N. Zamzami, J.M. Jürgensmeier, S.A. Susin, H.L.A. Viera, M.C. Prevost, Z. Xie, S. Matsuyama, J.C. Reed, G. Kroemer (1998c). Bax and Adenine Nucleotide Translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* **281**, 2027-2031.

McCloskey, D. E. (1996). Programmed cell death in human breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **2**, 847-851.

McNew, J. A. and J. M. Goodman (1996). The targeting and assembly of peroxisomal proteins: some old rules do not apply. *Trends in Biochem. Sci.* **21**, 54-60.

Medema, J. P. C. Scaffidi, F. C. Kischkel, A. Shevchenko, M. Mann, P. H. Krammer, and M. E. Peter (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* **16**, 2794-2804.

Meza-Zepeda, L.A., A. Forus, B. Lygren, A.B. Dahlberg, L.H. Godager, A.P. South, I. Marenholz, M. Lioumi, V.A. Florenes, G.M. Maelandsmo, M. Serra, D. Mischke, D. Nizetic, J. Ragoussis, M. Tarkkanen, J.M. Nesland, S. Knuutila, O. Myklebost (2002). Positional cloning identifies a novel cyclophilin as a candidate amplified oncogene in 1q21. *Oncogene* **21**, 2261-2269.

Minn, A. J. P. Velez, S. L. Schendel, H. Liang, S. W. Muchmore, S. W. Fesik, M. Fill, and C. B. Thompson (1997). Bcl-x_L forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* **385**, 353-357.

Mittl, P. R. S. Di Marco, J. F. Krebs, X. Bai, D. S. Karanewsky, J. P. Priestle, K. J. Tomaselli, and M. G. Grutter (1997). Structure of recombinant human CCPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone. *J. Biol. Chem.* **272**, 6539-6547.

Miyashita, T. and J. C. Reed (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* **80**, 293-999.

- Muchmore, S. W. M. Sattler, H. Liang, R. P. Meadows, J. E. Harlan, H. S. Yoon, D. Nettlesheim, B. S. Chang, C. B. Thompson, S. L. Wong, S. L. Ng, and S. W. Fesik. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-x_L, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**, 335-341.
- Mund, T., A. Gewies, N. Schoenfeld, M.K.A. Bauer, and S. Grimm (2003). Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum. *FASEB J.* **17**, 696-698.
- Muzio, M. A. M. Chinnaiyan, F. C. Kischkel, K. O'Rourke, A. Shevchenko, J. Ni, C. Scaffidi, J. D. Bretz, M. Zhang, R. Gentz, M. Mann, P. H. Krammer, M. E. Peter, and V. Nahreini, P., A.R. Hovland, B. Kumar, C. Andreatta, J. Edwards-Prasad, K.N. Prasad (2001). Effects of altered cyclophilin A expression on growth and differentiation of human and mouse neuronal cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* **21**, 65-79.
- Nakano, K. and K.H. Vousden (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* **7**, 683-694.
- Nechushtan, A., C.L. Smith, I. Lamensdorf, S.H. Yoon, R.J. Youle (2001). Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J. Cell Biol.* **153**, 1265-76.
- Neudecker, F. and S. Grimm (2000). High-throughput method for isolating plasmid DNA with reduced lipopolysaccharide content. *Biotechniques* **28**, 107-109.
- Newmeyer, D.D., D.M. Farschon, and J.C. Reed (1994). Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts:inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell* **79**, 353-364.
- Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T., Taniguchi, and N. Tanaka (2000). Noxa, a BH3-only member of the bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**, 1053 -1058.
- O'Gorman, E., G. Beutner, M. Dolder, A.P. Koretsky, D. Brdiczka, T. Wallimann (1997). The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Letters* **414**, 253-257.
- Ohtsuki, K. S. Tanoue, and A. Karino (1997). Biochemical mechanisms of NCS-chromophore-induced DNA cleavage and inhibition of protein kinase activity. *Gan To Kagaku Ryoho.* **24**, 443-453.
- Oltvai, Z.N., and S.J. Korsmeyer (1994). Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* **79**, 189-192.
- Oren, M. (1999). Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem.* **274**, 36031-36034.

- Orth, K. K. O'Rourke, G. S. Salvesen, and V. M. Dixit (1996). Molecular ordering of apoptotic mammalian CED-3/ICE-like proteases. *J. Biol. Chem.* **271**, 20977-20980.
- Pandey, P., A. Saleh, A. Nakazawa, S. Kumar, S.M., Srinivasula, V. Kumar, R. Weichselbaum, C. Nalin, E.S. Alnemri, D. Kufe, and S. Kharbanda (2000). Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J.* **19**, 4310-4322.
- Peitsch, M. C. H. G. Mannherz, and J. Tschopp (1994). The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death? *Trends Cell Biol.* **4**, 37-41.
- Pitti, R. M. S. A. Marsters, S. Ruppert, C. J. Donahue, A. Moore, and A. Ashkenazi (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem.* **271**, 12687-12690.
- Puthalakath, H., D.C. Huang, L.A. O'Reilly, M.S. King, and A. Strasser (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol. Cell* **3**, 287-296.
- Puthalakath H, A. Villunger, L.A. O'Reilly, J.G. Beaumont, L. Coultas, R.E. Cheney, D.C. Huang, A. Strasser (2001). Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* **293**, 1829-1832.
- Radeke, M. J. T. P. Misko, C. Hsu, L. A. Herzenberg, and E. M. Shooter (1987). Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature* **325**, 593-597.
- Raff, M. C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* **356**, 398-400.
- Ratan, R. R. T. H. Murphy, and J. M. Baraban (1994). Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons. *J. Neurochem.* **62**, 376-379.
- Ravagnan, L., S. Gurbuxani, S.A. Susin, C. Maise, E. Daugas, N. Zamzami, T. Mak, M. Jäättelä, J.M. Penninger, C. Garrido, and G. Kroemer (2001). Heat shock protein 70 antagonizes apoptosis inducing factor. *Nat. Cell Biol.* **3**, 839-843.
- Reed, J. C. (1997). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* **387**, 773-776.
- Rostovtseva, T., and M. Colombini (1997). VDAC channels mediate and gate the flow of ATP: implications for the regulation of mitochondrial function. *Biophys. J.* **72**, 1954-1962.
- Roy, N. Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G.S. Salvesen, and J. C. Reed (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* **16**, 6914-6925.

- Ruck, A., M. Dolder, T. Wallimann, D. Brdiczka (1998). Reconstituted adenine nucleotide translocase forms a channel for small molecules comparable to the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Letters* **426**, 97-101
- Rudel, T.B., G.M. Bokoch (1997). Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science*. **276**, 1571-1574.
- Saito, M., S.J. Korsmeyer, and P.H. Schlesinger (2000). Bax-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat. Cell Biol.* **2**, 553-555
- Sambrook, J. R. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour, New York. **2**.
- Saito, M., S.J. Korsmeyer, P.H. Schlesinger (2000). Bax-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat. Cell Biol.* **2**, 553-555.
- Sato, N. S. Iwata, K. Nakamura, T. Hori, K. Mori, and J. Yodoi (1995). Thiol-mediated redox regulation of apoptosis. Possible roles of cellular thiols other than glutathione in T cell apoptosis. *J. Immunol.* **154**, 3194-3204.
- Scaffidi C, S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K.J Tomaselli, K.M. Debatin, P.H. Krammer, M.E Peter (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17**, 1675-87.
- Schendel, S. L. Z. Xie, M. O. Montal, S. Matsuyama, M. Montal, and J. Reed (1997). Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 5113-5118.
- Scholz, C., P. Maier, K. Dolinski, J. Heitman, F.X. Schmid (1997). R73A and H144Q mutants of the yeast mitochondrial cyclophilin Cpr3 exhibit a low prolyl isomerase activity in both peptide and protein-folding assays. *FEBS Lett.* **443**, 367-369.
- Schreiber, E., P. Matthias, M.M. Muller, and W. Schaffner (1989). Rapid detection of octamer-binding proteins with "mini-extracts" prepared from a small number of cells. *Nucl. Acid Res.* **17**, 6419.
- Schultheiss, H. P. K. Schulze, and A. Doerner (1996). Significance of the adenine nucleotide translocator in the pathogenesis of viral heart disease. *Mol Cell Biochem.* **163-164**, 319-327.
- Shimizu, S., M. Narita, and Y. Tsujimoto (1999). Bcl-2 family proteins regulate release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483-487.
- Shimizu, S., T. Ide, T. Yanagida, and Y. Tsujimoto (2000a). Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J. Biol. Chem.* **275**, 12321-12325.

- Shimizu, S., Y. Shinohara, and Y. Tsujimoto (2000b). Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene* **19**, 4309-4318.
- Shimizu, S., A. Konishi, T. Kodama, and Y. Tsujimoto (2000c). BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **97**, 3100-3105.
- Shinji, T. E. Yutaka, K. Manabu, T. Masatoshi, and T. Yoshihide (2000). A novel protein, RTN-x_S, interacts with both Bcl-x_L and Bcl-2 on endoplasmic Retikulum and reduces their anti-apoptotic activity. *Oncogene* **19**, 5736-5746.
- Simonsen, H. and H. F. Lodish (1994). Cloning by function: expression cloning in mammalian cells. *Trends Pharmacolog. Sci.* **15**, 437-441.
- Smith, C. A. T. Davis, D. Anderson, L. Solam, M. P. Beckmann, R. Jerzy, S. K. Dower, D. Cosman, and R. G. Goodwin (1990). A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* **248**, 1019-1023.
- Song, Q. S., P. Lees Miller, S. Kumar, Z. Zhang, D. W. Chan, G. C. Smith, S. P. Jackson, E. S. Alnemri, G. Litwack, K. K. Khanna, and M. F. Lavin (1996). DN-a-dependent protein kinase catalytic subunit: a target for an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J.* **15**, 3238-3246.
- Steinmann, B., P. Bruckner, A. Superti-Furga (1991). Cyclosporin A slows collagen triple helix formation *in vivo*: indirect evidence for a physiological role of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *J. Biol. Chem.* **266**, 1299-1303.
- Stepien, G., A. Torroni, A.B. Chung, J.A. Hodge, D.C. Wallace (1992). Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **267**, 14592-14597.
- Stierle, U., C. Niederstedt. *Klinikleitfaden Kardiologie*, G. Fischer Verlag, Stuttgart, 1. Aufl., 1997.
- Strasser, A., A.W. Harris, and S. Cory (1993). E μ -bcl-2 transgene facilitates spontaneous transformation of early-pre B and immunoglobulin secreting cells but not T cells. *Oncogene* **8**, 1-9.
- Stroh, C. and K. Schulze-Osthoff (1998). Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Diff.*, **5**, 997-1000.
- Susin S.A., H.K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B.E. Snow, G.M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D.R. Goodlett, R. Aebersold, D.P. Siderovski, J.M. Penninger, G. Kroemer (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446

Suzuki, M., R.J. Youle, and N. Tjandra (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* **103**, 645-654.

Suzuki Y., Y. Nakabayashi and Takahashi R (2001a) 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. USA* **98**, 8662-8667.

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

Tewari, M.,V.M. Dixit (1995). Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus CrmA gene product. *J. Biol. Chem.* **270**, 3255-3260.

The C. elegans Genome Sequencing Consortium, W. U. G. S. C. St. Louis U.S.A. and the Sanger Centre, Hinxton U.K. (1998). Genome Sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology. The C. elegans Sequencing Consortium. *Science* **282**, 2012-2018.

Thome, M. P. Schneider, K. ofmann, H. Fickenscher, E. Meinl, F. Neipel, C. Mattmann, K. Burns, J. L. Bodmer, M. Schroter, C. Scaffidi, P. H. Kramer, M. E. Peter, and J. Tschopp (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* **386**, 517-521.

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science*, **267**, 1456-1458.

Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik (1998). Caspases: Enemies within. *Science*, **281**, 1312-1316

Towler, D. A. J. I. Gordon, S. P. Adams, and L. Glaser (1988). The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 69-99.

Trump, B. F. and R. E. Bulger (1967). Studies of cellular injury in isolated flounder tubules. Correlation between morphology and function of control tubules and observations of autophagocytosis and mechanical cell damage. *Lab. Invest.* **16**, 453-482.

Unwin, N. (1993). Neurotransmitter action: Opening of ligand-gated ion channels. *Cell* **72**, 31-41.

Vander Heiden, M.G., N.S. Chandel, P.T. Schumacker, and C.B. Thompson (1999). Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP-exchange. *Mol. Cell* **3**, 159-167.

- Vaux, D.L., Cory, S. and J.M. Adams (1988). Bcl-2 gene promotes haematopoietic cell survival and cooperates with c-Myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**, 440-442.
- Vaux, D.L., Weissman, I.L. and S.K. Kim (1992). Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* **258**, 1955-1957.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., and D.L. Vaux (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43-53.
- Voehringer, D. W., D.L. Hirschberg, J. Xiao, M. Roederer, C.B. Lock, L.A. Herzenberg, L. Steinman, L.A. Herzenberg (2000). Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2680-2685.
- Voll, R. E. M. Herrmann, E. A. Roth, C. Stach, J. R. Kalden, and I. Girkontaite (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* **390**, 350-351.
- Vyssokikh, M.Y., A. Katz, A. Rueck, C. Wuensch, A. Dörner, D.B. Zorov, and D. Brdiczka (2001). Adenine nucleotide translocator isoforms 1 and 2 are differently distributed in the mitochondrial inner membrane and have distinct affinities to cyclophilin D. *Biochem. J.* **358**, 349-358.
- Walker, J.E. (1992). The mitochondrial transporter family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 519-526.
- Walker, N. P. R. V. Talanian, K. S. Brady, L. C. Dang, N. J. Bump, C. R. Ferenz, S. Franklin, T. Ghayur, M. C. Hackett, and L. D. Hammill (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1- β -converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* **78**, 343-352.
- Wallach, D. (1997). Placing death under control. *Nature* **388**, 123-126.
- Wang, L., Q. Wu, P. Qiu, A. Mirza, M. McGuirk, P. Kirschmeier, J.R. Greene, Y. Wang, C.B. Pickert, S. Liu (2001). Analyses of p53 target genes in the human genome by bioinformatic and microarray approaches. *J. Biol. Chem.* **276**, 43604-10.
- Wang X, (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **15**, 2922-2933.
- Watanabe-Fukunaga, R. C. I. Brannan, N. Itoh, S. Yonehara, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and S. Nagata. (1992). The cDNA structure, expression and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J. Immunol.* **148**, 1274-1279.

Wei, M.C., W.X. Zong, E.H.Y. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A.J. Ross, K.A. Roth, G.R. MacGregor, C.B. Thompson, S.J. Korsmeyer (2001). Proapoptotic Bax and Bak: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**, 727-730.

Welihinda, A. A. W. Tirasophon, and R. J. Kaufman. (1999). The cellular response to protein misfolding in the endoplasmic Retikulum. *Gene Expr.* **7**, 293-300.

Wilson, J.E. (1995). Hexokinases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **126**, 65-198.

Wilson, K. P. J. A. Black, J. A. Thompson, E. E. Kim, J. P. Griffith, M. A. Navia, M. A. Murcko, S. P. Chambers, R. A. Aldape, and S. A. Raybuck (1994). Structure and mechanism of interleukin-1- β -converting enzyme. *Nature* **370**, 270-275.

Wolter, K.G., Y.T. Hsu, C.L. Smith, A. Nechushtan, X.G. Xi, and R.J. Youle (1997). Movement of Bax from the cytosol to the mitochondria during apoptosis. *J. Cell. Biol.* **139**, 1281-1292.

Wong, G. H. W. J. H. Elwell, L. W. Oberley, and D. V. Goeddel (1989). Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* **58**, 923-931.

Woodfield, K., A. Ruck, D. Brdiczka, A.P. Halestrap (1998). Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem. J.* **336**, 287-290.

Xue, D. H. H.R. Horvitz (1995). Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature.* **377**, 248-251.

Yang, J. X. Liu, K. Bhalla, C. N. Kim, A. M. Ibrado, J. Cai, T. I. Peng, D. P. Jones, and X. Wang (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**, 1129-1132.

Yang, X., H. Y. Chang, and D. Baltimore (1998). Autoproteolytic activation of procaspases by oligomerization. *Mol. Cell* **1**, 319-325

Yang, X., H.Y. Chang, and D. Baltimore (1998). Essential role of CED-4 Oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* **281**, 1355-1357.

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

Zamzami, N., C. El Hamel, C. Maise, C. Brenner, C. Muñoz-Pinedo, A.S. Belzacq, P. Costantini, H. Vieira, M. Loeffler, G. Molle, and G. Kroemer (2000). Bid acts on the permeability transition pore complex to induce apoptosis. *Oncogene* **19**, 6342-6350.

Zha, J. S. Weiler, K. J. Oh, M. C. Wei, and S. J. Korsmeyer (2000). Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* **290**, 1761-1765.

Zhang, H. (2000). BAR: an apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 2597-2602.

Zhivotovsky, B. A. Gahm, and S. Orrenius (1997). Two different proteases are involved in the proteolysis of lamin during apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 96-101.

Zhivotovsky, B. A., O.T. Brustugun, S.D. Doskeland, and S. Orrenius (1998). Injected cytochrome c induces apoptosis. *Science* **391**, 449-450.

Zhoratti, M. and I. Szabo (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta.* **1241**, 139-176.

Zhu, W. A. Cowie, G. W. Wasfy, L. Z. Penn, B. Leber, and D. W. Andrews (1996). Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *EMBO J.* **15**, 4130-4141.

Zou, H. W. J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg, and X. Wang (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C.elegans* Ced-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**, 405-413.

.

9 Veröffentlichungen

Schubert, A.*, M.K.A. Bauer*, O. Rocks, and S. Grimm (1999). Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *J. Cell Biol.* **147**, 1493-1502. * gleichberechtigte Erstautorenschaft

Schubert, A., M.K.A. Bauer, O. Rocks, and S. Grimm
„Adenine nucleotide translocase-1 dominantly induces apoptosis upon overexpression“
Poster-Präsentation, FEBS-Meeting, Nizza, Frankreich, 1999.

Schubert, A. and S. Grimm. Cyclophilin D is a repressor of the permeability transition pore. *Eingereicht*

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Promotionsarbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

München, 15. 05. 2003

(Alexis Schubert)

Lebenslauf

Name: Alexis Schubert

Geburtsdatum: 08.04.1972

Geburtsort: Marburg a.d. Lahn

Nationalität: deutsch

Schulausbildung: 1978-1982 Schulzentrum Blumenthal, Bremen
1982-1991 Gymnasium Eggestedter Str., Bremen
30.06.1991 Abitur

Biologiestudium: 1991-1994 Universität Bremen, Fakultät für Biologie
1991-1998 Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Fakultät für Biologie, Fakultät für Philologie
07/1997-07/1998 Diplomarbeit am Institut experimentelle Krebsforschung, Klinik für Tumorbiologie, Freiburg
Thema: "Inhibition des Transkriptionsfaktors STAT5 durch spezifische Peptide."
Diplomprüfungen: Zellbiologie (Hauptfach)
Biochemie
Genetik
1997 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Genetik, Fakultät für Biologie, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
1998 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biochemie, Fakultät für Biologie, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg

Promotion 1998-2003 Ludwig-Maximilians-Universität München und Max-Planck-Institut für Biochemie Martinsried, Arbeitsgruppe „Programmierter Zelltod“