

**Biochemische und molekularbiologische
Charakterisierung von Spike, einem neuen BH3-
Domänen Protein**

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

Vorgelegt von

Thomas Mund

München, 16. 12. 2002

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in
Martinsried angefertigt, unter der Betreuung von Herrn Dr. Stefan
Grimm, Gruppenleiter der selbständigen Arbeitsgruppe
„Programmierter Zelltod“.

Tag der mündlichen Prüfung: 03. 07. 2003

Erstgutachter: PD Dr. Stefan Grimm

Zweitgutachter: Prof. Dr. Charles David

Danksagung

Bedanken möchte ich mich in erster Linie bei Herrn Dr. Stefan Grimm, der mir die Möglichkeit gab, meine Promotion am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchführen zu können und unter dessen Anleitung und Diskussionsbereitschaft diese Arbeit zustande kam.

Mein besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Programmierter Zelltod“ für ihre Hilfsbereitschaft und Diskussion wissenschaftlicher Ergebnisse einerseits und die freundschaftliche und angenehme Arbeitsatmosphäre und Gesellschaft innerhalb und außerhalb des Institutes andererseits. Insbesondere gilt mein Dank Timur Albayrak, Manuel Bauer, Erik Braziulis, Tanja Büsgen, Ulla Cramer, Andreas Gewies, Matthias Grimmer, Jasmina Putnik, Volker Scherhammer, Nicole Schönfeld, Alexis Schubert und Frank Voß, ohne die diese Arbeit in dieser Form nicht Zustande gekommen wäre.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Charles David, Leiter der Biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Zeit, die er mir als Zweitgutachter dieser Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

*"It is an old maxim of mine that when you
have excluded the impossible, whatever remains,
however improbable, must be the truth."*

*-Conan Doyle, The Adventures of Sherlock Holmes,
"The Beryl Coronet"*

*"The pure and simple truth
is rarely pure and never simple."*

-Oscar Wilde

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	11
1.1	GESCHICHTE DER APOPTOSEFORSCHUNG	11
1.2	BEDEUTUNG DER APOPTOSE	12
1.2.1	<i>Apoptose im gesunden Organismus</i>	12
1.2.2	<i>Fehlregulation der Apoptose</i>	13
1.2.3	<i>Evolutive Konservierung apoptotischer Mechanismen</i>	14
1.3	CASPASEN	15
1.3.1	<i>Einteilung und Funktion der Caspasen</i>	15
1.3.2	<i>Struktur und Aktivierung der Caspasen</i>	17
1.3.3	<i>Caspasensubstrate</i>	18
1.4	REGULATION UND WEGE DER CASPASENAKTIVIERUNG	19
1.4.1	<i>Der rezeptorvermittelte Apoptosesignalweg</i>	19
1.4.2	<i>Der mitochondriale Signalweg zur Caspasenaktivierung</i>	21
1.4.2.1	Caspase-abhängige Apoptose durch Cytochrome c	21
1.4.2.2	Caspase-unabhängige Apoptose durch AIF und EndoG	23
1.5	DIE IAP-FAMILIE ALS INHIBITOREN DER CASPASEN	25
1.5.1	<i>Bedeutung der IAPs in der Apoptose</i>	25
1.6	REGULATION DES MITOCHONDRIALEN APOPTOTISCHEN SIGNALS	26
1.6.1	<i>Die Bcl-2-Familie</i>	27
1.6.1.1	Molekularer Mechanismus der Mitochondrienaktivierung	28
1.6.1.2	Regulation der BH3-only-Proteine	30
1.6.1.3	Wirkungsweise der antiapoptotischen Bcl-2-Mitglieder	32
1.7	DAS ENDOPLASMATISCHE RETIKULUM (ER) ALS ORGANELLE IN DER APOPTOSEREGULATION	33
1.7.1	<i>Die UPR ("unfolded protein response")</i>	33
1.7.2	<i>Caspase-12</i>	34
1.7.3	<i>ER-Ca²⁺-Austritt und Apoptose</i>	34
1.7.4	<i>Zusammenspiel zwischen ER und Mitochondrien bei der Apoptose</i>	35
1.7.5	<i>Der Bap31-Komplex am ER</i>	36
1.8	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	37
2	ERGEBNISSE	39

2.1	REIHENUNTERSUCHUNG NACH DOMINANT APOPTOSE-INDUZIERENDEN GENEN	39
2.2	CHARAKTERISIERUNG VON SPIKE ALS APOPTOSE-INDUZIERENDES GEN	42
2.2.1	<i>Spike induziert Apoptose in verschiedenen Säugerzellen.....</i>	42
2.2.2	<i>Spike induziert Caspase-abhängige Apoptosewege</i>	44
2.2.3	<i>Die Apoptose-induzierende Funktion von Spike ist evolutiv konserviert</i>	46
2.2.4	<i>Sequenzanalyse von Spike</i>	48
2.2.4.1	Sequenzanalyse der Primärsequenz.....	48
2.2.4.2	Sekundärstrukturanalyse	50
2.2.4.3	Potentielle Oligomerisierung der coiled-coil-Domänen.....	51
2.2.5	<i>Genomanalyse des humanen Spike-Gens.....</i>	52
2.2.6	<i>Expressionsstudien von humanem Spike.....</i>	53
2.2.7	<i>Subzelluläre Lokalisation von Spike</i>	56
2.2.8	<i>Spike aktiviert mitochondriale apoptotische Ereignisse</i>	58
2.2.9	<i>“Mapping” des proapoptotischen Signals in der Spike-Sequenz</i>	58
2.2.10	<i>Spike interagiert nicht mit Bcl-2, Bcl-X_L oder Bax.....</i>	60
2.2.11	<i>Spike homomerisiert unabhängig von der BH3-Domäne</i>	61
2.2.12	<i>Spike interagiert mit Bap31 am ER.....</i>	62
2.2.13	<i>Apoptose-induzierende Spike-Deletionsmutanten interagieren mit Bap31 in Abhängigkeit vom N-Terminus und unabhängig von der BH3-Domäne.....</i>	64
2.2.14	<i>Spike induziert die caspase-abhängige Prozessierung von Bap31</i>	65
2.2.15	<i>Spike verhindert die Komplexbildung zwischen Bcl-X_L und Bap31.....</i>	66
2.2.16	<i>Spike ist an der Fas-induzierten Apoptose beteiligt.....</i>	69
2.2.16.1	Die Deltionsmutante ΔN19 inhibiert effizient Spike-vermittelten Zelltod.....	69
2.2.16.2	Repression der Spike-Expression mit Hilfe eines Antisense-Oligonukleotids.....	70
2.2.16.3	Loss-of-function von Spike reduziert Fas-induzierte Apoptose	70
2.2.17	<i>Verringerte Spike-Expression in spezifischen Tumoren.....</i>	72
3	DISKUSSION	75
3.1	EXPRESSIONSSCREEN NACH DOMINANT APOPTOSE-INDUZIERENDEN GENEN	75
3.2	EVOLUTIVE ASPEKTE	77
3.3	SPIKE INDUZIERT CASPASE-ABHÄNGIGE APOPTOSESIGNALE.....	79
3.4	WIRKT SPIKE ALS GENERELLER APOPTOSEREGULATOR?	81
3.5	STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE SEQUENZANALYSE VON SPIKE	82
3.6	DAS BH3-MOTIV IST NOTWENDIG FÜR DIE PROAPOPTOTISCHE AKTIVITÄT VON SPIKE.....	86

3.7	SPIKE INTERAGIERT AM ER MIT BAP31	87
3.8	POTENTIELLE MODELLE ZUM MOLEKULAREN MECHANISMUS DER SPIKE- VERMITTELTEN APOPTOSE.....	89
3.8.1	<i>Das „C. elegans-Modell“</i>	89
3.8.2	<i>Bedeutung der BH3-Domäne und das „Faktor X-Modell“</i>	91
3.9	BETEILIGUNG VON SPIKE AN FAS-INDUZIERTER APOPTOSE.....	94
3.10	IST SPIKE EIN TUMORSUPPRESSOR?	99
4	ZUSAMMENFASSUNG.....	102
5	MATERIAL	104
5.1	CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL	104
5.1.1	<i>Radiochemikalien</i>	104
5.1.2	<i>Verbrauchsmaterial</i>	104
5.2	PLASMIDE	104
5.3	DNA-OLIGONUKLEOTIDE	106
5.4	MOLEKULARGEWICHTS- UND LÄNGENSTANDARDS	109
5.5	REAGENZIEEN UND REAKTIONSS-SETS („KITS“)	109
5.6	ENZYME.....	110
5.7	PUFFER UND LÖSUNGEN	110
5.8	ORGANISMEN UND ZELLINIEN.....	112
5.8.1	<i>Bakterienstämme</i>	112
5.8.2	<i>Eukaryontische Zelllinien</i>	112
5.9	MEDIEN UND MEDIENZUSÄTZE	113
5.9.1	<i>Medien für die Bakterienkultur</i>	113
5.9.2	<i>Medien und Lösungen für die Hefekultur</i>	113
5.9.3	<i>Medien für die eukaryontische Zellkultur</i>	114
5.10	ANTIKÖRPER UND ANTISEREN.....	115
5.11	SONSTIGES	115
6	METHODEN	117
6.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	117
6.1.1	<i>Nukleinsäure-Fällung</i>	117
6.1.2	<i>Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration</i>	117

6.1.3	<i>Präparation von Plasmid-DNA</i>	117
6.1.4	<i>Isolierung von Plasmid-DNA für Screen</i>	118
6.1.5	<i>Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen</i>	119
6.1.6	<i>Dephosphorylierung von DNA-Enden mit CIAP</i> <i>(calf intestinal alkaline phosphatase)</i>	119
6.1.7	<i>Glätten überhängender DNA-Enden</i>	119
6.1.8	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	120
6.1.9	<i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen</i>	120
6.1.10	<i>Ligation von DNA-Fragmenten</i>	120
6.1.11	<i>Gesamt-RNA-Isolation aus Säugerzellen</i>	121
6.1.12	<i>Gesamt-RNA-Isolation aus Drosophila melanogaster</i>	121
6.1.13	<i>Reverse Transkription</i>	121
6.1.14	<i>Polymerase Kettenreaktion (PCR)</i>	122
6.1.15	<i>Gerichtete in vitro Mutagenese</i>	122
6.1.16	<i>Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung nach der Didesoxy-</i> <i>Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977)</i>	123
6.1.17	<i>Herstellung von [³²P]-markierten cDNA-Fragmenten für</i> <i>Northern-Blot-Analysen</i>	124
6.1.18	<i>Nachweis membrangebundener RNA mit spezifischen,</i> <i>[³²P]-markierten cDNA-Proben</i>	124
6.2	METHODEN DER PROKARYONTISCHEN ZELLKULTUR	125
6.2.1	<i>Herstellung kompetenter E. coli</i>	125
6.2.1.1	<i>Herstellung chemokompetenter E. coli</i>	125
6.2.1.2	<i>Herstellung elektrokompeter E. coli</i>	125
6.2.2	<i>Transformation kompetenter Bakterien</i>	126
6.2.2.1	<i>Transformation chemokompetenter Bakterien</i>	126
6.2.2.2	<i>Transformation elektrokompeter Bakterien</i>	126
6.3	METHODEN DER ZELLKULTUR FÜR HEFEN	126
6.3.1	<i>Zellkulturbedingungen</i>	126
6.3.2	<i>Lagerung der Zellen</i>	127
6.3.3	<i>Transformation von Hefezellen</i>	127
6.3.3.1	<i>Small Scale Transformation</i>	127
6.3.3.2	<i>Large Scale Library Transformation</i>	127
6.3.4	<i>β-Gal Assay</i>	128

6.3.5	<i>Hefeminipreps</i>	129
6.4	METHODEN DER EUKARYONTISCHEN ZELLKULTUR (OHNE HEFEN)	129
6.4.1	<i>Kultivierung eukaryontischer Zelllinien</i>	129
6.4.2	<i>Einfrieren und Auftauen von Gewebekulturzellen</i>	130
6.4.3	<i>Transiente Transfektion von Gewebekulturzellen</i>	130
6.4.3.1	Effectene Transfektion.....	130
6.4.3.2	Calciumphosphat-Präzipitation.....	131
6.4.4	<i>Oligonukleotid-Transfektion in HeLa-Zellen</i>	132
6.4.4.1	Ca ₃ (PO ₄) ₂ -Transfektion der Oligonukleotide (Ghosh und Iversen, 2000).....	132
6.4.4.2	Oligofectamine-Transfektion der Oligonukleotide.....	132
6.4.5	<i>Herstellung stabiler Klonpools</i>	133
6.5	PROTEINCHEMISCHE STANDARDMETHODEN	133
6.5.1	<i>Herstellung von Gesamtzell-Lysaten</i>	133
6.5.2	<i>Konzentrationsbestimmung von Proteinen</i>	133
6.5.3	<i>Zellfraktionierung</i>	134
6.5.4	<i>Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	134
6.5.5	<i>Coomassie-Färbung von Proteingelen</i>	135
6.5.6	<i>Silberfärbung von Proteingelen</i>	135
6.6	IMMUNOLOGISCHE UND IMMUNBIOCHEMISCHE METHODEN	135
6.6.1	<i>Immunoblot-Analyse</i>	135
6.6.1.1	Proteintransfer auf Membranen (Western-Blot).....	135
6.6.1.2	Ponceau S-Färbung von Proteinen.....	136
6.6.1.3	Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern.....	136
6.6.1.4	ECL-Detektion von Proteinen.....	136
6.6.2	<i>Immunpräzipitation von Proteinen</i>	137
6.6.3	<i>Indirekte Immunfluoreszenz</i>	137
6.6.4	<i>DAPI-Färbung</i>	138
6.6.5	<i>2-Dimensionale Gelelektrophorese</i>	138
6.7	EXPRESSION UND AUFREINIGUNG REKOMBINANTER PROTEINE	139
6.7.1	<i>Expression rekombinanter Proteine in E. coli</i>	139
6.7.2	<i>Affinitätsreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine</i>	139
6.8	HERSTELLUNG EINES POLYKLONALEN ANTISERUM	140
6.9	METHODEN ZUM NACHWEIS DER APOPTOSE	141
6.9.1	<i>DNA-Leiter</i>	141
6.9.2	<i>Nachweis hypodiploider DNA mittels Durchflußcytofluorimetrie</i>	

	<i>(Afanas'ev et al., 1986)</i>	142
6.9.3	<i>Test auf Cytochrome c-Austritt</i>	142
6.9.4	<i>Test auf Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta \Psi$</i> <i>mittels DiOC₆</i>	143
6.9.5	<i>Caspase-3-Aktivitätstest</i>	143
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	144
8	LITERATUR	147
9	VERÖFFENTLICHUNGEN	168
10	ERKLÄRUNG	169
11	LEBENS LAUF	170

1 Einleitung

1.1 Geschichte der Apoptoseforschung

Das Auftreten von Zelltod unter bestimmten physiologischen und pathologischen Bedingungen in vielzelligen Organismen ist in den vergangenen 150 Jahren mehrfach dokumentiert worden. Bereits 1871 prägte Virchow die Begriffe „necrosis“ und „necrobiosis“ (Virchow, 1871). Etwa 100 Jahre umfaßte der Begriff Nekrose (*necrosis*, griechisch für Tod, Tötung, Absterben) alle Typen des Zelltods. Das weitverbreitete Auftreten und die biologische Relevanz des Zelltods erkannten 1972 der australische Pathologe John F. R. Kerr und seine schottischen Kollegen Andrew H. Wyllie und Alastair R. Currie (Kerr et al., 1972). Sie führten die terminologische Unterscheidung zwischen nekrotischem Zelltod, der durch mechanische Verletzung oder durch eine andere irreparable Schädigung wie Sauerstoffmangel hervorgerufen wird, und „physiologischem“,

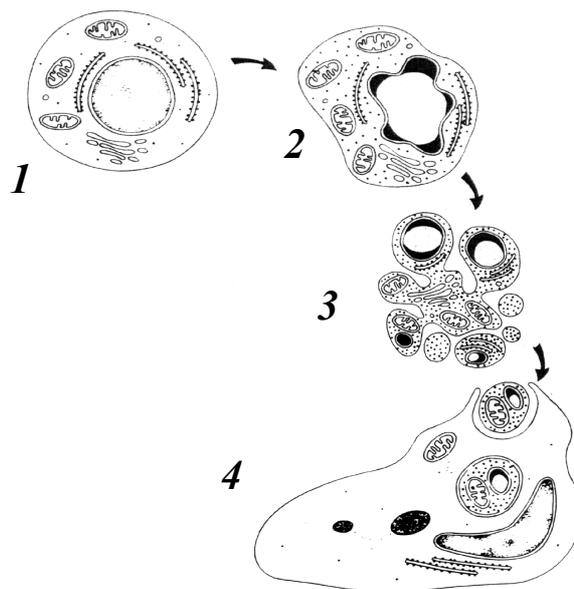


Abb. 1.1: Strukturelle Veränderungen einer Zelle während der Apoptose. Zunächst schrumpft die Zelle (1), das Cytoplasma und das Chromatin kondensieren (2). Im weiteren Verlauf (3) wird der Zellkern fragmentiert und Vesikel werden von der Cytoplasmamembran abgeschnürt. Diese sogenannten „apoptotischen Körperchen“ werden von Nachbarzellen oder Makrophagen phagozytiert und durch lysosomale Enzyme (4) verdaut (nach Kerr et al., 1994).

ATP-verbrauchenden Zelltod ein, den sie Apoptose nannten. Der Begriff Apoptose setzt sich zusammen aus *apo* (griechisch für „ab, los, weg“) und *ptosis* (griechisch für „Senkung“)

und bezeichnet sinnbildlich ein Abfallen, vergleichbar mit welken Blättern im Herbst (Kerr et al., 1972).

Eine apoptotische Zelle durchläuft ein aktives Zelltodprogramm, das sie phänotypisch und biochemisch von normalen Zellen unterscheidet. So ist eine apoptotische Zelle wegen des Ablösens von der extrazellulären Matrix und der Bildung membranumschlossener Vesikel, der sogenannten “apoptotischen Körperchen”, durch eine veränderte Morphologie erkennbar (siehe Abb. 1.1). Desweiteren fragmentiert der Zellkern und das Chromatin kondensiert. Biochemisch wird die DNA durch Apoptose-spezifische Endonukleasen (zB. CAD) internukleosomal zerlegt, welches als charakteristische DNA-Leiter nachweisbar ist (siehe Kapitel 1.3.3). Zusätzlich erfolgt eine Desintegration der Plasmamembran, welches *in vivo* die Erkennung und Phagozytierung apoptotischer Zellen von Makrophagen ermöglicht. Dadurch werden Komplikationen durch das Entlassen intrazellulärer Bestandteile verhindert. Diese Beseitigung apoptotischer Zellen im Organismus ist ein Grund, warum Apoptose lange unbeachtet blieb (Arends and Wyllie, 1991; Raff, 1992; Kerr et al., 1994; Peitsch et al., 1994; Thornberry und Lazebnik, 1998).

1.2 Bedeutung der Apoptose

Apoptose und DNA-Sequenzen für Caspasen (siehe Kapitel 1.3), die auf ein Vorkommen apoptotischer Prozesse hindeuten, findet man bei Cnidariern, Nematoden, Insekten, Fischen und Säugetieren. Sogar bei Pflanzen wurden Komponenten der apoptotischen Maschinerie identifiziert (Aravind et al., 1999; Cikala et al., 1999; Inohara und Nunez, 2000). Diese evolutionäre Konserviertheit der Apoptose ist ein Indiz für die Notwendigkeit des gesteuerten Zelltods für das Entstehen und Überleben von vielzelligen Organismen.

1.2.1 Apoptose im gesunden Organismus

Apoptose ist durch die Regulation der Zellhomeostase für das Entstehen und Überleben eines vielzelligen Organismus von entscheidender Bedeutung, indem kontrolliert überflüssige und gealterte Zellen eliminiert werden. Apoptose, die bei der Entwicklung eines Organismus eine Rolle spielt, wird auch programmierter Zelltod genannt. Im Verlauf der Ontogenese ist der programmierte Zelltod für die Strukturbildung von essentieller Bedeutung: beispielsweise wird die Gastrulation des frühen Embryos durch den regulierten

Tod von Zellen im Innern der Blastula ermöglicht (Joza et al., 2001). Ebenso sind apoptotische Prozesse bei der Entstehung des Augenbeckers, der Augenlinse oder des Neuralrohrs beim Ablösen vom umliegenden Gewebe beteiligt. Die freistehenden Finger und Zehen des Menschen, die in der frühen Embryogenese durch Zwischengewebe verbunden sind, werden durch programmierten Zelltod hervorgebracht (Meier et al., 2000; Milligan und Schwartz, 1997). Auch die Funktion von Gehirn und Immunsystem wird dadurch ermöglicht, dass zunächst sehr viele Zellen gebildet werden, von denen nur einige ausgewählte überleben. So sterben etwa 80 % der Ganglionzellen in der Katzenretina kurz nach der Geburt, da es ihnen nicht gelungen ist, durch ausreichende Vernetzung mit Nachbarzellen ihre eigene Versorgung mit neurotrophen Faktoren zu gewährleisten (Meier et al., 2000). Im Immunsystem ist der programmierte Zelltod verantwortlich für die negative Selektion autoreaktiver und unzureichend aktiver B- und T-Zellen, sowie für die Entfernung virusbefallener Zellen. Zudem wird die Zahl antigenreaktiver Lymphozyten, die durch klonale Expansion vermehrt wurde, durch Apoptose wieder auf das normale Maß reduziert (Bouillet et al., 1999; Braun et al., 1996; Kagi et al., 1994a; Kagi et al., 1994b; Krammer, 2000).

1.2.2 Fehlregulation der Apoptose

Das Entfernen von verletzten und entarteten Zellen verhindert den Ausbruch von Krankheiten. Funktionelle Defekte, die eine unnatürliche Verstärkung apoptotischer Prozesse und somit einen Anstieg der Zelltodrate bewirken, sind unter anderem beteiligt an der Entstehung neurodegenerativer und neuromuskulärer Krankheiten, wie Alzheimer oder Parkinson (Thompson, 1995; Kroemer et al., 1997). Auch bei AIDS und Infarkten kann Apoptose zum Krankheitsbild beitragen. Sind durch Apoptose wesentliche Komponenten des Immunsystems geschwächt, kann es zu vermehrten Infektionen, beispielsweise mit Herpes- oder Adenoviren, kommen (McLaughlin et al., 2001; Thompson, 1995). Dagegen führt eine Reduktion der Apoptoserate zu einem Ansammeln überflüssiger Zellen. Ebenso verringert sich die Beseitigung selbstspezifischer und mutierter Zellen, was zu Mißbildungen, Autoimmunkrankheiten oder Krebs führt (Kroemer et al., 1997). So sind zB. bei einer verstärkten humoralen Immunantwort Autoimmunerkrankungen wie

Systemischer Lupus erythematosus die Folge, da autoreaktive Lymphozyten nicht ausreichend eliminiert werden (Bouillet et al., 1999; Watanabe-Fukunaga et al., 1992).

Immer mehr Hinweise aus den letzten 10 Jahren deuten verstärkt darauf hin, daß genetische Defekte, welche die Fähigkeit der Apoptoseinduktion beeinträchtigen, für die Entstehung und das Ausbreiten von Tumoren notwendig sind (Zörnig et al., 2001). Die Vermehrung eines transformierten Klonen wird nicht nur durch dessen erhöhte Proliferationsrate erreicht, sondern wird auch in sehr starkem Maße durch eine verringerte Apoptoserate begünstigt. Studien an Mausmodellen oder Analysen verschiedener Stadien humaner Tumore zeigen, daß eine Resistenz in der Apoptoseinduktion für die meisten, wenn nicht sogar aller Tumore entscheidend ist (Strasser et al., 1997; Jäätelä et al., 1999; Hanahan und Weinberg, 2000). In allen Stadien der Tumorgenese ist eine erhöhte Überlebensrate notwendig:

- (1) Eine deregulierte Onkogenexpression führt nicht nur zu einer verstärkten Proliferation, sondern hat gleichzeitig Apoptoseinduktion zur Folge, die von der transformierten Zelle zum Vermehren unterdrückt werden muß.
- (2) Ab einer bestimmten Tumorgroße wird die Versorgung jeder Tumorzelle limitierend und eine fehlende Wachstumsfaktorversorgung führt normalerweise zur Apoptose.
- (3) Metastasierenden Tumorzellen fehlen die Zell-Zell-Kontakte ihrer normalen zellulären Umgebung. Normalerweise führt dies zu einer besonderen Form von Apoptose: Anoikis (Zörnig et al., 2001).

1.2.3 Evolutive Konservierung apoptotischer Mechanismen

Da ein Abweichen von der normalen apoptotischen Aktivität drastische Konsequenzen für einen Organismus zur Folge hat, ist eine extrem fein abgestimmte Regulationsmaschinerie auf allen Ebenen notwendig. Die in den letzten Jahren entschlüsselten und an der Apoptose beteiligten biochemischen Wege und Moleküle vermitteln einen Eindruck über die Komplexität dieses Prozesses. Folglich sind wegen der Notwendigkeit von Apoptose viele dieser Mechanismen und Moleküle evolutiv konserviert. So wurden viele ursprüngliche und bahnbrechende Untersuchungen an Apoptose mit Hilfe genetischer Analysen im

Nematoden *Caenorhabditis elegans* durchgeführt. 1993 konnte gezeigt werden, daß die Deletion oder Mutation eines einzelnen Gens, *Ced-3*, die Apoptose aller 131 von 1090 somatischen Zellen verhinderte, die bei normaler Entwicklung der Hermaphroditen durch programmierten Zelltod eliminiert worden wären. Es stellte sich heraus, daß *Ced-3* homolog zu dem humanen *Interleukin-1 β converting enzyme (ICE)* ist, einer Cysteinprotease, die bis dahin noch nicht mit Apoptose in Verbindung gebracht wurde. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, daß die Proteasen bei der Vermittlung der Apoptose als essentielle Komponenten entscheidend beteiligt sind (Metzstein et al., 1998; Conrads und Horvitz, 1998; Chen et al., 2000; Kaufmann und Hengartner, 2001).

1.3 Caspasen

1.3.1 Einteilung und Funktion der Caspasen

Die Familie der zu *Ced-3/ICE* homologen Cysteinproteasen umfaßt bis heute 14 Mitglieder, die Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz und Struktur aufweisen. Zur Vereinheitlichung der Nomenklatur wurde der Begriff Caspasen eingeführt, der die 2 Hauptmerkmale dieser Enzymfamilie beinhaltet: es sind Cysteinproteasen, die spezifisch ihre Substrate auf der Carboxylseite eines Aspartats spalten (Alnemri et al., 1996). Ihre Nomenklatur ist abhängig vom Zeitpunkt ihrer Entdeckung: so ist *ICE* auch unter dem Namen Caspase-1 bekannt.

Die bisher in Säugern identifizierten 14 Caspasen können aufgrund phylogenetischer und funktioneller Analysen in 3 Unterfamilien eingeteilt werden: (A) den Caspasen, die bei der Vermittlung von Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen, sowie die bei der Umsetzung apoptotischer Prozesse beteiligten (B) Initiator- und (C) Effektorcaspasen (Thornberry und Lazebnik, 1998; Earnshaw et al., 1999; Strasser et al., 2000). Zur ersten Gruppe (A) zählen die Caspasen 1, 4, 5, 11, 12, 13 und 14. Sie sind (soweit bekannt) hauptsächlich an der Cytokinreifung bei Entzündungsreaktionen beteiligt (Earnshaw et al., 1999; Strasser et al., 2000). Dagegen vermitteln die Caspasen 2, 3, 6, 7, 8, 9 und 10 vermutlich ausschließlich apoptotische Prozesse (Kaufmann und Hengartner, 2001).

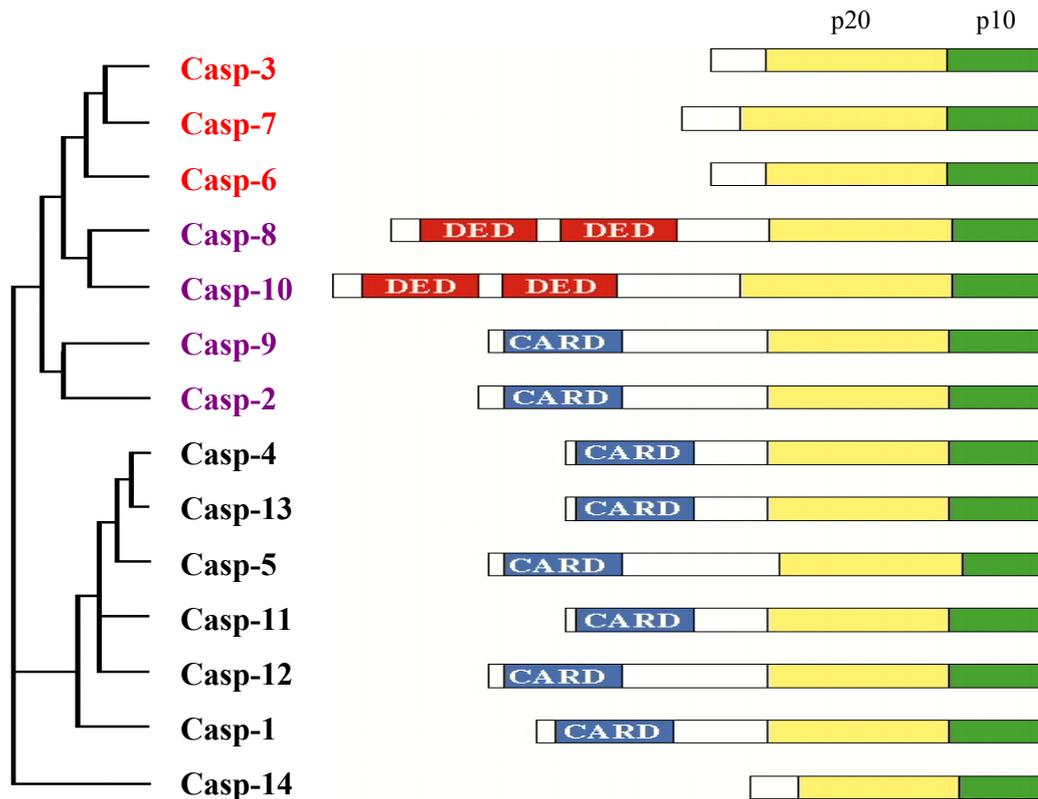


Abb. 1.3.1: Schematisches Diagramm der Säugercaspasen. Mit Ausnahme von Caspase-11 (Maus), -12 (Maus) und -14 (Rind) sind alle aufgelisteten Caspasen vom Menschen. Ihre phylogenetische Verwandtschaft (links) scheint mit ihrer Funktion in Apoptose oder Entzündungsreaktionen zu korrelieren. Die Effektor- und die Initiator-Caspasen bilden den oberen Teil des phylogenetischen Stammbaums, alle anderen Caspasen den unteren Teil. Sie werden mit einer Funktion bei Entzündungsreaktionen in Verbindung gebracht oder sind noch nicht genauer zuzuordnen (nach Shi, 2002).

Die Caspasen-2, -8, -9 und -10 sind aufgrund ihrer Stellung in der Aktivierungskaskade sogenannte Initiator-Caspasen. Sie enthalten im Gegensatz zu den Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7) verlängerte N-terminale Prodomänen (siehe Abb. 1.3.1) mit homotypischen Protein-Protein-Interaktionsmodulen wie DED (Procaspase-8 und -10) und CARD (Procaspase-9 und -2) (Kaufmann und Hengartner, 2001). Dabei vermittelt Procaspase 8 als Bestandteil des DISC an der Plasmamembran hauptsächlich „extrinsische“ Apoptosesignale, Procaspase-9 ist als Bestandteil des Apoptosoms dagegen an der Vermittlung „intrinsischer“ Signale entscheidend beteiligt (siehe Kapitel 1.4). Genetische Studien lassen vermuten, daß Procaspase-10 lymphoide apoptotische Reaktionen beeinflusst (Wang et al., 1999) und Procaspase-2 den Zelltod in Neuronen und Oozyten moduliert (Bergeron et al., 1998). Dies deutet im Gegensatz zur ubiquitär in allen untersuchten

Gewebe wirkenden Procaspase-9 (als Bestandteil des Apoptosoms) auf eine eher Zelltyp-spezifische Rolle von Procaspase-2 und -10 hin bei der Vermittlung Gewebe-abhängiger Apoptosesignale.

1.3.2 Struktur und Aktivierung der Caspasen

Caspasen werden als inaktive Proenzyme synthetisiert (30 bis 50 kD), die in dieser Form keine oder nur geringe katalytische Aktivität besitzen. Sie bestehen aus drei Domänen, einer N-terminalen Prodomäne, einer großen (etwa 17-22 kD) und einer kleinen Untereinheit (etwa 10-12 kD) (siehe Abb. 1.3.2). Die Aktivierung erfolgt mittels proteolytischer Spaltung zwischen den Domänen nach einem Aspartat entweder durch Autoprozessierung (die von Cofaktoren oder durch das Entfernen von inhibitorischen Molekülen ausgelöst wird) oder durch eine andere Caspase mit ähnlicher Substratspezifität. Im Anschluß assoziieren die kleinen und großen Untereinheiten zu Heterodimeren, wobei zwei Heterodimere ein $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer mit zwei unabhängigen katalytischen Zentren bilden (Abb. 1.3.2).

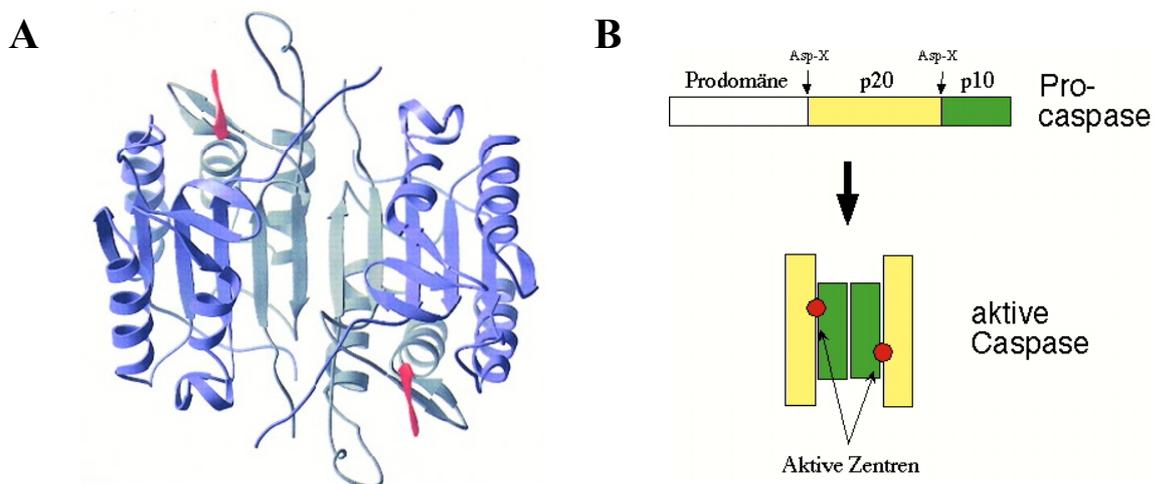


Abb. 1.3.2: Struktur und Aktivierung der Caspasen. A, Kristallstruktur von Caspase-3 (Tetramer) im Komplex mit einem Tetrapeptidinhibitor in den aktiven Zentren (aus Thornberry und Lazebnik, 1998). B, Wie andere Enzyme werden Caspasen als inaktive Vorläufer synthetisiert. Die Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung und Assoziation zweier Heterodimere zu einem Tetramer (nach Thornberry und Lazebnik, 1998).

1.3.3 *Caspasensubstrate*

Nach proteolytischer Aktivierung durch Initiator-Caspasen (siehe Abb. 1.3.2) greifen aktivierte Effektor-Caspasen in eine Vielzahl essentieller zellulärer Prozesse ein (Han et al., 1997). Bisher wurden über 100 Apoptosesubstrate identifiziert (Kaufmann und Hengartner, 2001). Aktivierte Caspasen sind vermutlich für die meisten typischen mit Apoptose einhergehenden morphologischen Veränderungen verantwortlich (siehe Abb. 1.1), indem sie zellinterne Strukturen (wie zB. den Zellkern) auflösen. Die hauptsächlich aus Laminpolymeren bestehende Kernlamina ist eine der Kernmembran strukturgebende Intermediärfilamentschicht, die an der Chromatinorganisation beteiligt ist. Die Spaltung des Lamins durch Caspasen während der Apoptose führt zum Zusammenbruch der Kernlamina und trägt zur Chromatinkondensation bei (Thornberry und Lazebnik, 1998; Takahashi et al., 1996; Orth et al., 1996). Desweiteren reorganisieren aktivierte Caspasen Zellstrukturen indirekt, indem Proteine gespalten und somit inaktiviert oder dereguliert werden, die an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt sind, wie Gelsolin (Kothakota et al., 1997), *focal adhesion kinase (FAK)* (Wen et al., 1997) oder p21-aktivierte Kinase 2 (PAK2) (Rudel und Bokoch, 1997).

Neben der Desintegration von Zellstrukturen beeinflussen aktivierte Caspasen eine Vielzahl biochemischer Prozesse. So inaktivieren oder deregulieren sie Proteine, die involviert sind in DNA-Reparatur (zB. DNA-PK_{CS}, PARP), mRNA-Spleißen (U1-70K) oder DNA-Replikation (Replikationsfaktor C) (Cryns et al., 1998; Lazebnik et al., 1994; Song et al., 1996; Rheaume et al., 1997). Eine weitere Aufgabe der Caspasen ist die Inaktivierung von Proteinen, welche die Zelle vor Apoptose schützen. Ein Beispiel dafür ist die Spaltung von I^{CAD}/DFF45, einem Inhibitor der für die apoptosetypische DNA-Fragmentierung verantwortlichen Endonuklease CAD (Enari et al., 1998; Liu et al., 1997). In nicht-apoptotischen Zellen bilden sie einen inaktiven Komplex, der bei Apoptoseinduktion zerfällt und CAD kann als Nuklease wirken. Weitere Apoptoseinhibitoren, die von Caspasen prozessiert werden, sind Bcl-2 Proteine (siehe Kapitel 1.7.1). Es scheint sogar, daß diese Proteine nicht nur inaktiviert werden, sondern daß sogar proapoptotische Fragmente entstehen (Bcl-2, Bcl-X_L), die zu einer weiteren Amplifikation des Apoptosesignals beitragen (Xue et al., 1997; Cheng et al., 1997; Adams und Cory, 1998).

Jede lebende Zelle exprimiert konstitutiv Caspasenvorläufermoleküle, deren Aktivierung innerhalb kürzester Zeit zu einer exponentiellen Amplifikation des apoptotischen Signals führen kann. Da bereits die Aktivierung einzelner Effektorcaspasenmoleküle unausweichlich den Tod der gesamten Zelle bewirkt, ist ein hochkomplexes Regulationssystem notwendig, das in seiner Komplexität dem der Blutgerinnung oder des Komplementsystems vergleichbar ist (Thornberry und Lazebnik, 1998).

1.4 Regulation und Wege der Caspasenaktivierung

Zwei Hauptwege der Caspasenaktivierung sind bisher beschrieben worden: der „extrinsische“ Aktivierungsweg über spezialisierte Zelloberflächenrezeptoren zur Vermittlung extrazellulärer Apoptosesignale und der „intrinsische“ oder mitochondriale Weg.

1.4.1 Der rezeptorvermittelte Apoptosesignalweg

Zu den für Apoptose relevanten Zelloberflächenrezeptoren gehören Fas/CD95 und TNF α -Rezeptor 1, sowie die TRAIL-Rezeptoren 1 (DR4) und 2 (DR5) (Scaffidi et al., 1999/a). Eine Aktivierung der Rezeptoren erfolgt durch das Binden des entsprechenden Liganden: Fas-Ligand, TNF α oder TRAIL. Die sehr fein abgestimmte Apoptoseregulationsmaschinerie moduliert das Apoptosesignal bereits auf Rezeptorebene durch das Auftreten sogenannter *Decoy*-Rezeptoren. DcR3 ist beispielsweise ein löslicher, den Fas-Liganden bindender Rezeptor, der inaktiv für die Signalübertragung ist und somit das rezeptorvermittelte Apoptosesignal entscheidend abschwächt. In mehr als 50% der primären Lungen- und Darmtumoren ist DcR3 hochreguliert (Pitti et al., 1998; Bai et al., 2000). Der für die Apoptosesignalübertragung notwendige Signalkomplex (DISC) bildet sich intrazellulär nach Aktivierung und anschließender Trimerisierung der Rezeptormoleküle durch den entsprechenden Liganden. Die genaue Zusammensetzung des DISC ist abhängig von Rezeptor- und Zelltyp (Scaffidi et al., 1999/a). Ein gemeinsames Merkmal dieser Rezeptoren ist die Präsenz eines konservierten cytoplasmatischen Protein-Protein-Interaktionsmotivs, der *Death Domain* (DD) (Kaufmann und Hengartner, 2001). Neben DED und CARD ist die DD das dritte in der Apoptose essentielle homotypische Interaktionsmodul. Alle 3 Module treten ausschließlich in Proteinen auf, die bei der

Vermittlung von Apoptose und Entzündungsreaktionen beteiligt sind, was eine evolutive Verbindung nahelegt. Diese Vermutung wird durch ihre ähnliche 3D Struktur unterstützt (Aravind et al., 2001; Vaughn et al., 1999; Fesik, 2000). Die DD im cytoplasmatischen Teil der Rezeptoren ist in der Lage, DD-enhaltende Adaptermoleküle (wie z.B. FADD, TRADD) zu rekrutieren. Ob diese Rekrutierung durch ligandenaktivierte Konformationsänderungen oder den Verlust eines inhibitorischen Bindungspartners ermöglicht wird, ist unklar (Kaufmann und Hengartner, 2001). Obwohl die genaue Zusammensetzung an Adaptermolekülen zwischen den einzelnen Zelltodrezeptoren variiert, ist die Vermittlung des Zelltods vermutlich ähnlich. Demnach führt eine DED-vermittelte Konzentrierung von Procaspase-8 am Rezeptorkomplex (siehe Abb. 1.4.1) über Adaptermoleküle wie FADD zu einer Autoaktivierung von Caspase-8, die daraufhin ins Cytosol freigesetzt wird (Ashkenazi und Dixit, 1999; Salvesen und Dixit, 1999).

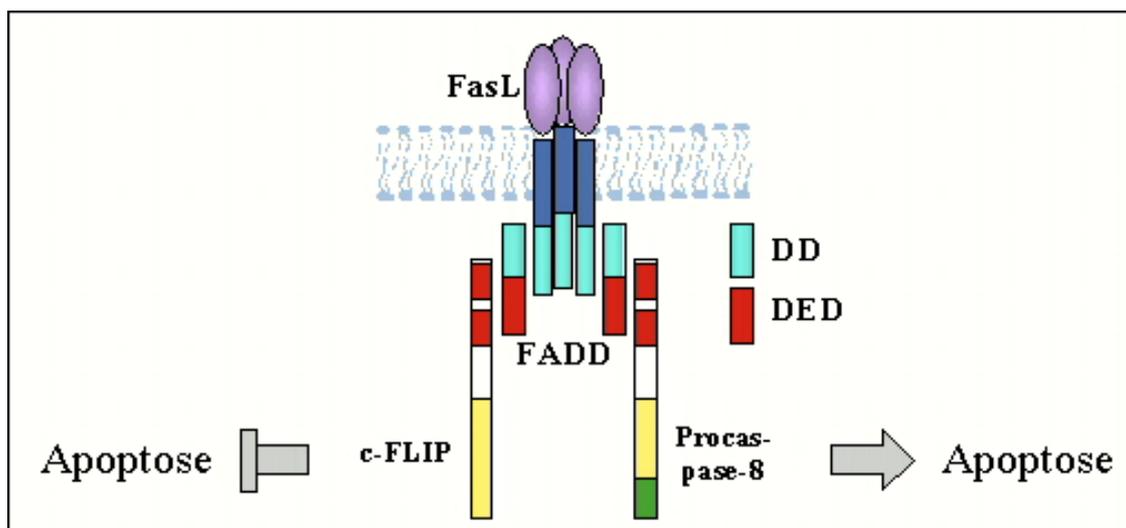


Abb. 1.4.1: Schematische Darstellung des Fas-Rezeptorkomplexes. Durch die Interaktion des Fas-Liganden (FasL) trimerisiert der in der Cytoplasmamembran lokalisierte Rezeptor und ermöglicht die Rekrutierung von Adapterproteinen wie FADD an den aktivierten Komplex. Diese erfolgt über spezifische, durch die „Todes-Domänen“ (*death domains*, DD) vermittelte Protein-Protein-Interaktionen. FADD ermöglicht über Proteininteraktionen der *death effector domains* (DED) die Konzentrierung von Procaspase-8 am Rezeptorkomplex, die sich durch die räumliche Nähe gegenseitig aktivieren (Ashkenazi und Dixit, 1998).

Um diesen entscheidenden Schritt in der rezeptorvermittelten Apoptoseinduktion zu regulieren, greifen natürlich vorkommende Inhibitoren genau an diesem Punkt ein: sie verhindern die Rekrutierung von Procaspase 8 und damit dessen Autoaktivierung (Zörnig et

al., 2001). Diese Inhibitormoleküle werden FLIPs genannt: Fas assoziierte Deathdomänen-ähnliche *ICE*-Inhibitorproteine. Neben zweier funktionell identischer Isoformen zellulärer c-FLIPs kodieren eine Anzahl von Viren v-FLIP als Teil ihrer Überlebensstrategie (Thome et al., 1997; Zörnig et al., 2001). Aufgrund ihrer zwei *death effector domains* und ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Caspase-8 sind sie in der Lage, Caspase-8 am Rezeptorkomplex zu ersetzen. Da sie jedoch wegen des Fehlens eines funktionellen Cysteins in ihrer caspase-ähnlichen Domäne trotz Spaltung in p18 und p10 nicht aktivierbar sind, blocken sie effektiv rezeptorvermittelte Apoptose (Scaffidi et al., 1999/b).

Ist Caspase 8 am Rezeptorkomplex einmal aktiviert divergieren die Rezeptor-vermittelten Apoptosewege in verschiedenen Zelltypen. In Typ I-Zellen (zB. verschiedene lymphoide Zellen) kann aktive Caspase-8 direkt Procaspase-3 prozessieren und aktivieren. In allen anderen Zellen (Typ II) wird nur ein geringer Teil von Caspase-8 aktiviert, der nicht ausreicht, um direkt Procaspase-3 zu aktivieren (Budihardjo et al., 1999; Scaffidi et al., 1999/a). In diesen Zellen ist dagegen eine Spaltung des proapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieds Bid (siehe Kapitel 1.7) notwendig, um Apoptose zu vermitteln. Das 15 kDa große C-terminale Spaltprodukt von Bid (tBid) ist in der Lage, mitochondriale Apoptosewege zu initiieren (Luo et al., 1998; Li et al., 1998). Die Spezifität von tBid für Mitochondrien wird durch die Bindung des mitochondrialen Lipids Cardiolipin gewährleistet, wobei die Myristoylierung des durch die Spaltung exponierten N-terminalen Glycins die Translokationseffizienz deutlich erhöht (Lutter et al., 2000; Zha et al., 2000; Wang, 2001). Die Bedeutung dieser Kreuzverbindung zwischen Zelltodrezeptoren und Mitochondrien in der Apoptoseinduktion für Typ II-Zellen wurde in Bid *knock-out* Mäusen verdeutlicht, die resistent für Fas und TNF-induzierte Apoptose sind, jedoch nicht für andere Stimuli (Wang, 2001).

1.4.2 Der mitochondriale Signalweg zur Caspasenaktivierung

1.4.2.1 Caspase-abhängige Apoptose durch Cytochrome c

Egal ob durch tBid oder andere Signale, die Aktivierung der Caspasen durch Mitochondrien beinhaltet die Freisetzung verschiedener mitochondrialer Faktoren (siehe Abb. 1.6.2). Cytochrome c, normalerweise ein Bestandteil der mitochondrialen

Elektronentransportkette, ist ein Hauptfaktor, der nach seiner Freisetzung im Cytoplasma einen caspaseabhängigen Signalweg initiiert (Liu et al., 1996). Dort bindet es Apaf-1, ein cytosolisches Protein mit einer CARD, einer *nucleotide-binding domain* und zahlreichen WD-40 *repeats* (Zou et al., 1997). Die Assoziation mit Cytochrome c erhöht die Affinität von Apaf-1 für dATP/ATP um das 10-fache, wobei die gebundenen Nukleotide eine Oligomerisierung des Cytochrome c/Apaf-1-Komplexes auslösen, das sogenannte Apoptosom entsteht (Zou et al., 1999).

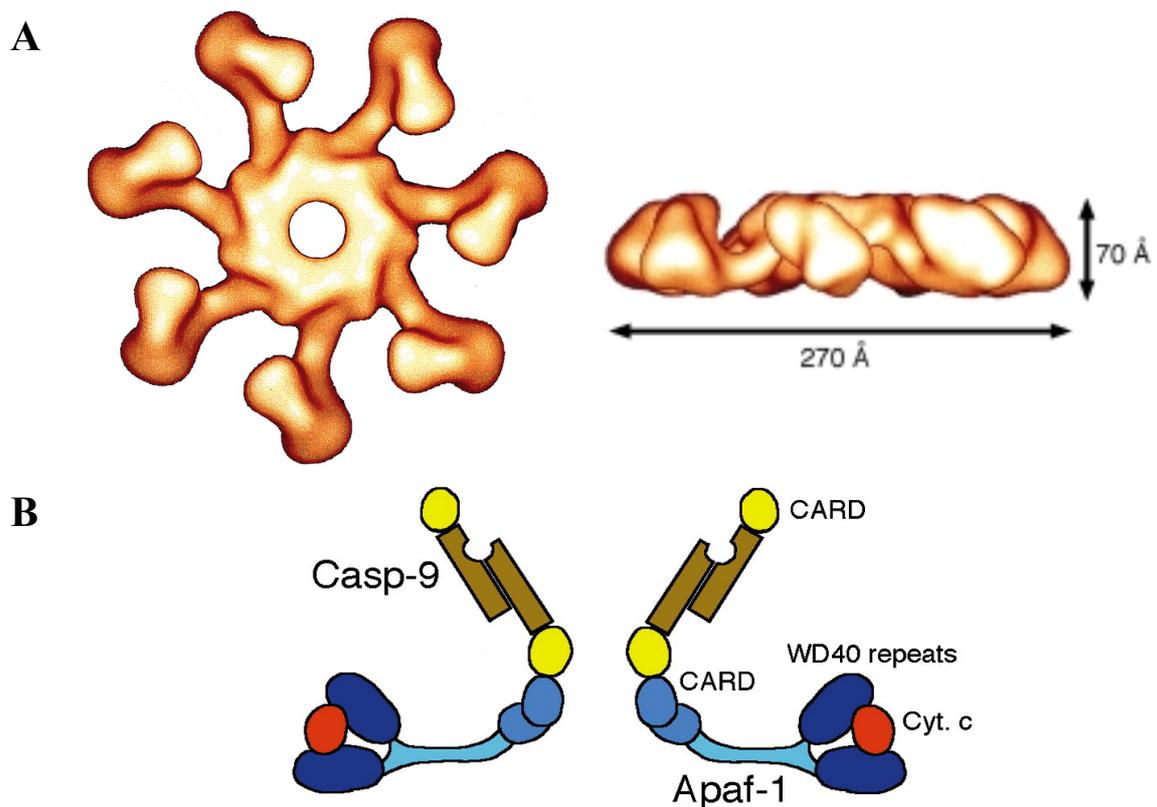


Abb. 1.5.2: Struktur des Apoptosoms. (A) Zwei Ansichten des heptamerischen Apoptosoms bestehend aus Apaf-1, Cytochrome c und dATP, (B) Modell für die molekulare Zusammensetzung des apoptosomalen Holoenzym und Mechanismus der Caspase-9-Aktivierung. Die CARD-Domänen von Apaf-1 bilden den zentralen Ring wogegen die WD40 *repeats* zusammen mit Cytochrome c die Spitzen der „Speichen“ bilden (aus Shi, 2002).

Die biochemische Funktion des Apoptosoms besteht in der Aktivierung von Procaspase-9 zur Weiterleitung des Apoptosesignals (Stennicke et al., 2002). Die 3D-Struktur des etwa 1000 kD großen Apoptosoms wurde kürzlich entschlüsselt (Acehan et al., 2002). Dadurch wurden auch genauere Theorien der Procaspase-9-Aktivierung möglich. In inaktivem

Zustand ist Apaf-1 sehr kompakt und die N-terminalen CARD sind intramolekular mit den C-terminalen WD-40 Domänen assoziiert. Cytoplasmatisches Cytochrome c verdrängt die CARD, was zu einer eher ausgestreckten linearen Struktur des Apaf-1-Moleküls führt (Stennicke et al., 2002). Die so exponierte *nucleotide-binding domain* ermöglicht eine ATP-getriebene Multimerisierung der Cytochrome c/Apaf-1-Komplexe in eine Struktur, die einem Rad mit sieben Speichen ähnelt (siehe Abb. 1.5.2). Jede Speiche entspricht dabei einem Apaf-1/ Cytochrome c-Aggregat mit den CARD im Zentrum (Acehan et al., 2002; Stennicke et al., 2002).

Obwohl der genaue Mechanismus der Procaspase-9-Aktivierung noch nicht bekannt ist, läßt die Struktur des Apoptosoms mit seinem zentralen Ring von CARDS auf einen der Caspase-8-Aktivierung analogen Mechanismus schließen: Autoaktivierung durch Erhöhung der lokalen Procaspase-9-Konzentration (Renatus et al., 2001; Acehan et al., 2002; Stennicke et al., 2002). Nur mit dem Apoptosom assoziierte Caspase-9 ist in der Lage, effizient Effektorcaspasen wie Caspase-3 zu aktivieren (Rodriguez und Lazebnik, 1999). *Knock-out* Experimente verdeutlichten die Bedeutung dieses mitochondrialen Apoptosesignalwegs. Das Ausschalten von Apaf-1, Caspase-9 oder Caspase-3 verhindert fast komplett den neuronalen Zelltod während der normalen Entwicklung (Kuida et al., 1996; Kuida et al., 1998; Cecconi et al., 1998; Yoshida et al., 1998; Honarpour et al., 2000; Honarpour et al., 2001). Interessanterweise entwickelten sich im Gegensatz zu einer abnormalen Neuronalentwicklung die meisten anderen Organe normal (Wang, 2001). Untersuchungen an nicht-neuronalen *knock-out*-Zellen von Apaf-1 demonstrierten, daß Zelltod in diesen Zellen caspase-unabhängig induziert wurde, obwohl mit geringer zeitlicher Verzögerung gegenüber WT oder heterozygoten Zellen (Honarpour et al., 2000; Haraguchi et al., 2000).

1.4.2.2 Caspase-unabhängige Apoptose durch AIF und EndoG

Dieses Phänomen des caspase-unabhängigen Zelltods wird durch die mitochondrialen Proteine AIF und EndoG induziert. Sie treten nach Apoptoseinduktion aus dem mitochondrialen Intermembranraum aus, jedoch bewirken sie im Gegensatz zu allen bisher identifizierten proapoptotischen mitochondrialen Faktoren caspase-unabhängig im

Zellkern internukleosomale DNA-Fragmentierung (Susin et al., 1999; Miramar et al., 2001; Wang, 2001).

AIF ist ein 57 kD Flavoprotein im mitochondrialen Intermembranraum, das Homologien zur bakteriellen Oxidoreduktase aufweist (Susin et al., 1999). Nach Apoptoseinduktion tritt es aus den Mitochondrien aus und lokalisiert in den Nukleus, in dem AIF unabhängig von Caspasen und seiner Oxidoreduktase-Aktivität Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung verursacht (Susin et al., 1999; Miramar et al., 2001). Die entwicklungspezifische Bedeutung von AIF konnte in *knock-out* Mäusen demonstriert werden, in denen essentielle apoptotische Prozesse für eine normale Mausmorphogenese ausfallen (Joza et al., 2001).

EndoG ist eine 30 kD Nuklease aus der Mitochondrienmatrix mit Substratspezifität für GC-reiche Sequenzen. Da auch ein großer Anteil von EndoG im Intermembranraum lokalisiert ist, wurde eine ausschließliche Funktion bei der mitochondrialen Replikation angezweifelt (Cote und Ruiz-Carillo, 1993; Tiranti et al., 1995; Li et al., 2001; Wang, 2001). Ebenso wie AIF tritt EndoG aus den Mitochondrien aus und verursacht im Nukleus unabhängig von Caspasen DNA-Fragmentierung (Wang, 2001). Die Rolle von EndoG in der Apoptose ist konserviert bis zu *C. elegans*. Dessen Homolog *cps-6* zeigt eine hohe Ähnlichkeit zu EndoG in Sequenzhomologie und biochemischen Eigenschaften und brachte zum ersten Mal Hinweise auf die Bedeutung der Mitochondrien für apoptotische Prozesse im Nematoden *C. elegans* (Parrish et al., 2001). Die Identifizierung von AIF und EndoG erklärt das beschriebene Phänomen des caspaseunabhängigen Zelltods nach einer Schädigung der Mitochondrien. Sie starten ein Apoptoseprogramm, daß parallel zur Caspasenaktivierung abläuft (Wang, 2001).

Kürzlich wurden zwei weitere proapoptotische Faktoren entdeckt, die bei Apoptoseinduktion aus den Mitochondrien freigesetzt werden: Smac/Diablo (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000) und HtrA2/Omi (Suzuki et al., 2001/a). Beide Proteine modulieren Apoptose, indem sie die antiapoptotische Wirkung der Mitglieder der IAP-

Familie durch direkte Interaktion über ein konserviertes N-terminales IAP-bindendes Tetrapeptid aufheben (Shi, 2002).

1.5 Die IAP-Familie als Inhibitoren der Caspasen

IAPs bilden eine konservierte Proteinfamilie, die ursprünglich im Baculovirusgenom aufgrund ihrer apoptoseinhibitorischen Aktivität in infizierten Wirtszellen entdeckt wurde. In Säugern wurden bisher acht IAPs identifiziert (u.a. XIAP, c-IAP-1 oder c-IAP-2). Sie interagieren mit bereits aktiven Caspasen-3, -7 und -9 und inhibieren somit deren enzymatische Aktivität (Deveraux et al., 1997; Kaufmann und Hengartner, 2001; Shi, 2002). Eine Inhibition anderer Caspasen *in vivo* wurde nicht gefunden (Shi, 2002).

Alle bisher bekannten Mitglieder enthalten eine (ML-IAP/Livin) oder mehrere N-terminale BIR-Domänen, die eine Zinkfinger-ähnliche Struktur annehmen. Diese sind in der Lage Caspaseoberflächen zu binden (Shi, 2002). XIAP, c-IAP-1 oder c-IAP-2 enthalten drei BIR-Domänen, wobei die dritte BIR-Domäne (BIR3) spezifisch die katalytischen Zentren von prozessierter Caspase-9 blockiert. Die Caspasen-3 und -7 werden dagegen ausschließlich durch Sequenzen zwischen den BIR-Domänen 1 und 2 inaktiviert (Miller et al., 1999; Deveraux et al., 1999; Shi, 2002). Es ist jedoch so, daß nicht alle BIR-Domänen enthaltenden Proteine notwendigerweise Caspaseinhibitoren sind (Kaufmann und Hengartner, 2001). So konnte bei Survivin mit einer einzelnen BIR-Domäne keine caspaseinhibitorische Aktivität festgestellt werden (Banks et al., 2000). Im Gegensatz zu den relativ konstanten Expressionsniveaus anderer BIR-Domänenproteine schwankt die Expression von Survivin zellzyklusabhängig (Li et al., 1998). Survivin spielt daher vermutlich eine wichtige Rolle in der Regulation der Mitose (Altieri et al., 2001; Li et al., 1998). BIR-Domänen scheinen also nicht ausschließlich apoptoserelevante Funktionen zu erfüllen oder sie verbinden bisher noch für unabhängig gehaltene zelluläre Prozesse.

1.5.1 Bedeutung der IAPs in der Apoptose

Obwohl die generelle Funktion der BIR-Domäne noch nicht genau bekannt ist, spielt sie jedoch in IAPs durch ihre Caspase-bindende und damit Caspase-inhibierende Wirkung eine essentielle Rolle. Bei einer Präsenz von hohen Leveln an IAPs in der Zelle kann beispielsweise der durch Cytochrome c initiierte apoptosomale Signalweg durch das

neutralisieren aktiver Caspase-9 im Apoptosom blockiert werden (Bratton et al., 2001; Srinivasula et al., 2001). Diese Inhibition könnte zeitlich verlängert werden, indem die RING-Finger-Domäne der IAPs die gebundene Caspase zum Abbau durch das Proteasom dirigiert (Yang et al. 2000; Suzuki et al., 2001/b). Dies würde eine Apoptoseinduktion verhindern, die durch geringe, unbedeutende Mengen an ausgetretenem Cytochrome c aus den Mitochondrien ungerechtfertigterweise einsetzen könnte (Chai et al., 2000). Ist die Schädigung oder eine Aktivierung der Mitochondrien jedoch sehr stark, verhindern größere Menge an entlassenem Smac/Diablo und HtrA2/Omi eine Apoptoseinhibition durch die IAPs (Wang, 2001). Entscheidend für die Apoptoseinduktion ist daher die Menge proapoptotischer Faktoren, die aus den Mitochondrien entlassen werden.

1.6 Regulation des mitochondrialen apoptotischen Signals

Essentiell für das Austreten proapoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien ist die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membranen. Derzeit existieren mehrere Modelle zur Erklärung des Zustandekommens dieses Phänomens während der Apoptose. Ein Modell postuliert die Zerstörung der äußeren Membran durch das Anschwellen der Mitochondrienmatrix (Martinou et al., 2000). Dies könnte einerseits durch das Öffnen eines die äußere und innere Membran umspannenden Riesenkanals, der so genannten PT-Pore (*permeability transition pore*) entstehen. Das Öffnen dieser Pore würde zur Depolarisation des Membranpotentials und dem Eintritt von Wasser in die Mitochondrienmatrix führen (Zörnig et al., 2001). Andererseits könnte dieses Anschwellen von einem Defekt im mitochondrialen ATP/ADP-Austausch verursacht werden, was zu einer Schließung des VDAC und der damit einhergehenden Hyperpolarisation der inneren Mitochondrienmembran führt. Beide Modelle widersprechen Ergebnissen, wonach der Zusammenbruch des Membranpotentials zeitlich dem Entlassen von Cytochrome c folgt (Zörnig et al., 2001).

Andere Theorien schließen eine komplette Zerstörung der äußeren Membran als Ursache des Austretens proapoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien aus. Sie postulieren eher eine regulierte Pore in dieser äußeren Membran, die den Austritt von Cytochrome c und anderer mitochondrialer Proteine ermöglicht (Zörnig et al., 2001). Eine entscheidende

regulatorische Rolle spielen dabei die Mitglieder der Bcl-2-Familie (Wang, 2001). Proapoptotische, sogenannte Multi-BH-Domänenproteine wie Bax sind selbst in der Lage, in isolierten Lipidbilayern (*in vitro*) Membrankanäle zu bilden. Sie werden nach derzeitigen Theorien als Hauptfaktoren für die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und dem anschließenden Austritt von Cytochrome c und anderer mitochondrialer Proteine verantwortlich gemacht (Antonsson, 2001) (siehe Abb. 1.6.1). Andererseits sind Bcl-2-Mitglieder wie Bax möglicherweise auch in der Lage, eine Aktivierung der sogenannten PT-Poren zu vermitteln. Interaktionen von Bax mit VDAC oder ANT, die Komponenten der PT-Poren sind, wurden bereits mit verschiedenen Methoden demonstriert (Antonsson und Martinou, 2000; Desagher et al., 1999; Eskes et al., 2000; Martinou und Green, 2001; Wei et al., 2001; Zamzami und Kroemer, 2001).

1.6.1 Die Bcl-2-Familie

Die Mitglieder der Bcl-2-Familie gelten als Schlüsselregulatoren in der Kontrolle der Freisetzung proapoptotischer mitochondrialer Faktoren (Kaufmann und Hengartner, 2001). Bcl-2 wurde ursprünglich als Onkogen am chromosomalen Bruchpunkt t(14:18) in B-Zell Lymphomen entdeckt (Tsujimoto et al., 1985; Zörnig et al., 2001). Die Bcl-2 Familie (siehe Abb. 1.6.1) enthält sowohl antiapoptotische (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Bfl-1, Mcl-1, A1, Boo/Diva und *C. elegans Ced-9*) als auch proapoptotische Mitglieder (Bax, Bak, Bcl-X_S, Bad, Bid, Bik, Nip-3 und Hrk) (Bouillet und Strasser, 2002). Bezüglich ihrer Struktur und ihrer biochemischen Funktion können die proapoptotischen Mitglieder in zwei Untergruppen unterteilt werden: die Multi-BH-Domänenproteine, zu denen Bax, Bak und Bok gehören, welche über die Bcl-2-Homologiedomänen BH1, BH2 und BH3 verfügen, und die Familie der BH3-*only*-Proteine, die lediglich Sequenzhomologien in der BH3-Domäne besitzen (Martinou und Green, 2001; Strasser et al., 2000). Viele Mitglieder der Bcl-2-Familie enthalten eine C-terminale Transmembrandomäne, die eine subzelluläre Verteilung auf der zytoplasmatischen Seite in den Membranen der Mitochondrien, des Endoplasmatischen Retikulums und des Zellkerns ermöglicht (Bouillet und Strasser, 2002).

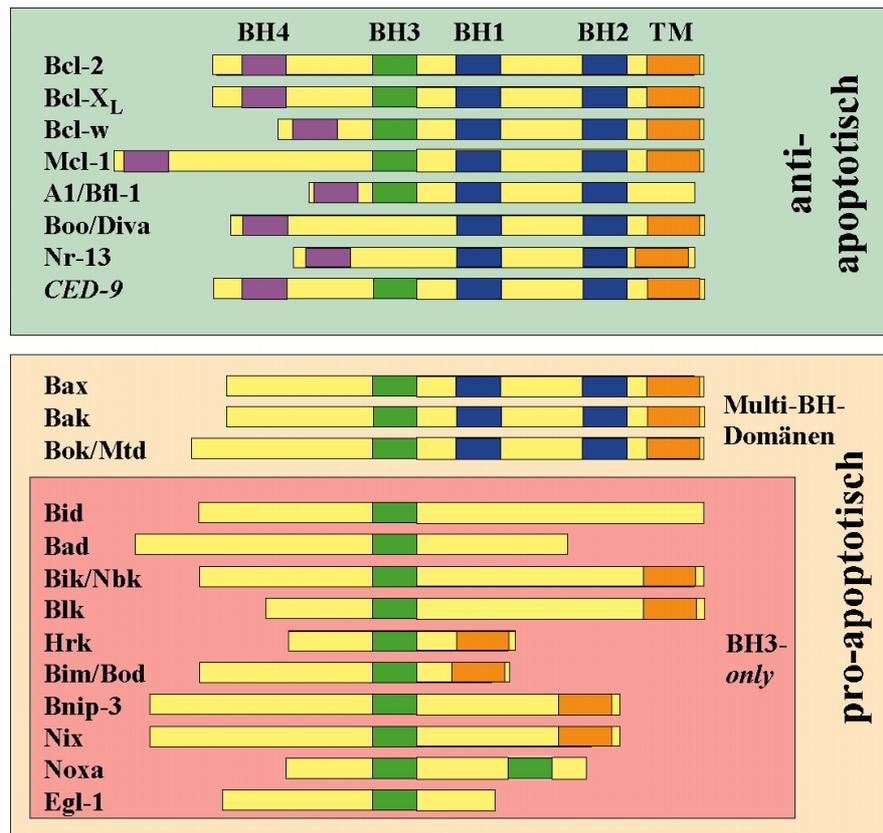


Abb. 1.6.1: Übersicht über die Mitglieder der Bcl-2-Familie. Die Bcl-2-Proteine enthalten bis zu vier Bcl-2-Homologiedomänen (BH1-4), einige besitzen eine hydrophobe Transmembrandomäne (TM). Die Bcl-2-Familie unterteilt sich in anti- und proapoptotische Mitglieder, wobei die proapoptotischen Proteine sich aufgrund der Sequenzhomologien in Multi-BH-Domänen-Proteine und BH3-only-Proteine unterteilen (nach Ranger et al., 2001).

1.6.1.1 Molekularer Mechanismus der Mitochondrienaktivierung

Die Wirkungsweise der Mitglieder der Bcl-2-Familie richtet sich nach dem derzeitigen Wissensstand hauptsächlich auf die Mitochondrien und die Kontrolle der Freisetzung proapoptotischer mitochondrialer Faktoren (Bouillet und Strasser, 2002). Entscheidend für deren pro- bzw. antiapoptotische Wirkungsweise ist die Eigenschaft, funktionell zu interagieren. Die verschiedenen Familienmitglieder bilden Homo- und Heterodimere, die je nach Zusammensetzung pro- oder antiapoptotisch wirken: z.B. antiapoptotische Bcl-2/Bcl-2-Homo- oder Bcl-2/Bax-Heterodimere sowie proapoptotische Bax/Bax-Homodimere und Homooligomere. Bestimmte proapoptotische Signale beeinflussen nach diesem Modell die Verfügbarkeit und Aktivität der einzelnen Familienmitglieder (und damit die Zusammensetzung der Dimere) und aktivieren so das mitochondriale Zelltodprogramm (Gross et al., 1998; Oltvai et al., 1993; Puthalakath et al., 1999; Sedlak et al., 1995).

Die Bcl-2-Proteine ähneln in ihrer Struktur *Diphtheria toxin* und Colicin. Die daraufhin durchgeführten Untersuchungen ergaben, daß sowohl pro- als auch antiapoptotische Bcl-2-Mitglieder in artifiziellen Membranen Kanäle bilden können, jedoch sind vermutlich nur proapoptotische Proteine dazu auch unter physiologischen Bedingungen in der Lage (Antonsson, 2001). Obwohl der genaue Mechanismus noch Spekulation ist, wird allgemein angenommen, daß die Multi-BH-Domänenproteine Bax und Bak durch ihre Fähigkeit Kanäle zu bilden, die Freisetzung proapoptotischer mitochondrialer Faktoren bewirken. Während Bax nach Apoptosestimulation von seiner löslichen, monomeren zytoplasmatischen Verteilung in die äußere Mitochondrienmembran inseriert (als Oligomer), erfährt das Mitochondrienprotein Bak keine Lokalisationsänderung und wird direkt über eine Konformationsänderung aktiviert (Antonsson, 2001; Griffiths et al., 1999).

Eine essentielle Rolle bei dieser Aktivierung spielen die BH3-*only*-Proteine. Sie sind normalerweise in nicht-mitochondrialen Kompartments der Zelle lokalisiert und relokalisieren auf einen apoptotischen Stimulus hin zu den Mitochondrien (Wang, 2001). Entscheidend für ihre Aktivität ist die BH3-Domäne, dessen alpha-helikale Struktur direkt mit einem Motiv interagiert, das durch die BH1-, BH2- und BH3-Domäne anderer Bcl-2-Mitglieder gebildet wird (Cory und Adams, 2002). So aktivieren sie entweder Bax oder Bak direkt, wie tBid (siehe Kapitel 1.4.1), oder indirekt (wie z.B. Bad), durch eine Interaktion mit Bcl-2 oder Bcl-X_L, deren antiapoptotische Wirkung auf Bax oder Bak damit neutralisiert wird (siehe Abb. 1.6.2). Die Freisetzung von Bax und Bak könnte daraufhin deren Oligomerisierung und Kanalbildungsaktivität in der äußeren Mitochondrienmembran bewirken (Gross et al., 1998; Martinou und Green, 2001; Wang, 2001). *Knock-out* Experimente demonstrieren die Bedeutung von Bax und Bak als finale Vermittler der Apoptoseinduktion von BH3-*only*-Proteinen: *bax*^{-/-} und *bak*^{-/-}-Doppel-*knock-out*-Zellen sind apoptoseresistent gegen die Überexpression von BH3-*only*-Proteinen (Ranger et al., 2001).

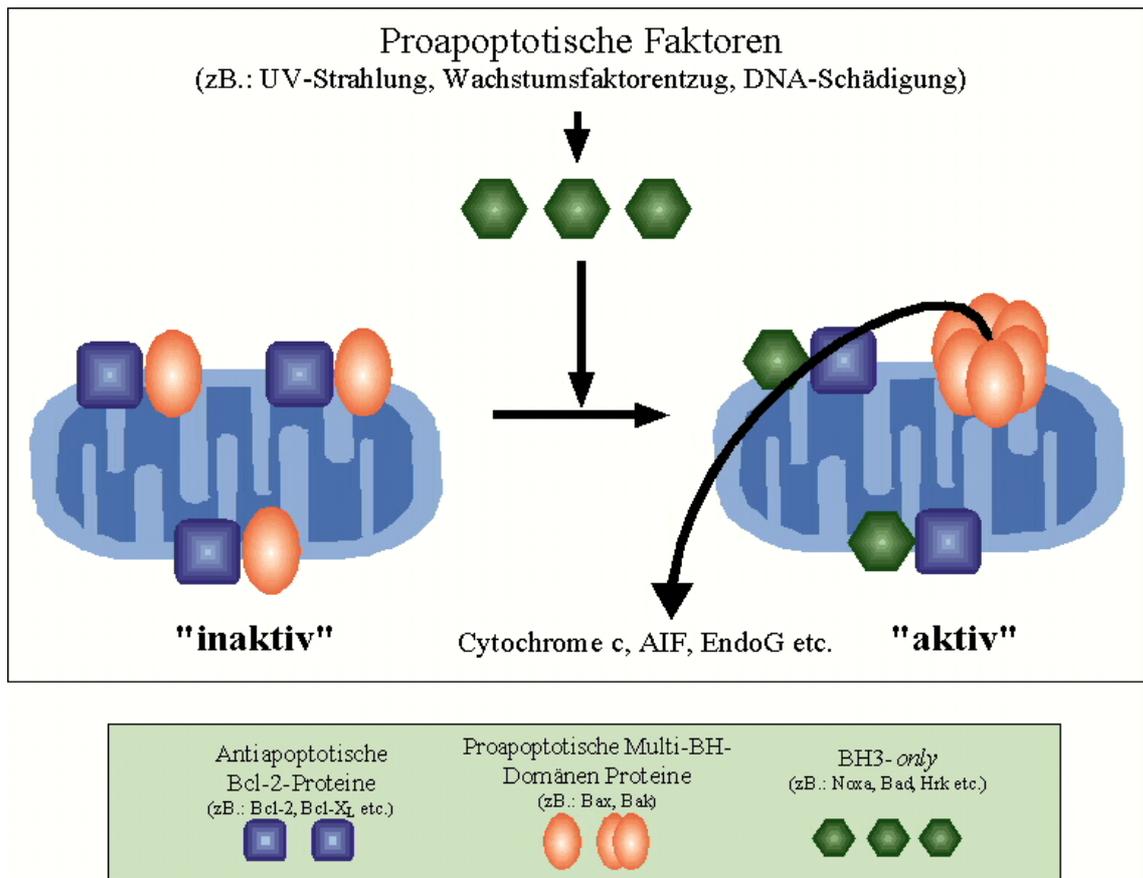


Abb. 1.6.2: Aktuelles Modell zur Aktivierung der Mitochondrien durch BH3-*only*-Proteine. Bcl-2 und andere antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie neutralisieren die proapoptotische Wirkung von Bax und Bak. BH3-*only*-Proteine relokalisieren auf einen apoptotischen Stimulus zu den Mitochondrien, wo sie mit den antiapoptotischen Bcl-2-Mitgliedern heterodimerisieren, was zu einer Freisetzung von Bax und Bak und deren anschließender Oligomerisierung führt. Die daraufhin gebildeten Membrankanäle ermöglichen den Austritt proapoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien.

1.6.1.2 Regulation der BH3-*only*-Proteine

Die Tatsache, daß BH3-*only*-Proteine unter anderem auch in dem von Säugern evolutiv sehr entfernten Organismus *C. elegans* identifiziert wurden (Egl-1, Conradt und Horvitz 1998), verdeutlicht deren Bedeutung in der Apoptose. Mindestens 9 BH3-*only*-Proteine sind in Säugern bisher identifiziert worden, die nur das etwa 9-12 Aminosäuren umfassende und in sich divergierende BH3-Motiv vereint (Huang und Strasser, 2000). Dabei ist die BH3-Domäne für deren proapoptotische Aktivität essentiell. Sie ist für die Heterodimerisierung mit antiapoptotischen Bcl-2-Mitgliedern verantwortlich (Ausnahme: BNip3, Ray et al. 2000), was die derzeitige Theorie über die proapoptotische

Wirkungsweise der BH3-*only*-Proteine verdeutlicht (siehe Kapitel 1.6.1.1) (Bouillet und Strasser, 2002).

Die BH3-*only*-Proteine spielen eine essentielle Rolle bei der Vermittlung verschiedenster apoptotischer Signale (Huang und Strasser, 2000), wobei sie nach einem apoptotischen Stimulus zu den Mitochondrien relokalisieren (Wang, 2001). Bad spielt beispielsweise eine wichtige Rolle bei Wachstumsfaktorentzug. Wachstumsfaktoren wie Interleukin-3 induzieren – vermittelt durch Kinasen wie Akt oder die mitochondriale Proteinkinase A – eine Phosphorylierung von Bad, welches durch anschließende Bindung an 14-3-3-Proteine inaktiviert wird. Liegt Bad jedoch, ausgelöst durch Wachstumsfaktorentzug, in freier Form vor, induziert es Apoptose über den mitochondrialen Weg. Dieser Mechanismus ermöglicht es der Zelle, bei Verschlechterung der Wachstumsfaktorsituation, Apoptose zu induzieren (Datta et al., 1997; del Peso et al., 1997; Harada et al., 1999; Zha et al., 1996).

Andere BH3-*only*-Proteine, wie Bim und Bmf, sind über Dynein am Cytoskelett verankert. Ihre Freisetzung führt zur Aktivierung von Mitochondrien. Verantwortlich für die Freisetzung sind spezifische proapoptotische Signale: beispielsweise im Fall von Bmf der Verlust der Substratadhäsion. Bmf übernimmt daher eine wichtige Rolle bei der Adhäsionsverlust-induzierten Apoptose (Anoikis), die bekanntermaßen über den mitochondrialen Weg erfolgt (Puthalakath et al., 1999; Puthalakath et al., 2001).

Die Regulation der BH3-*only*-Proteine erfolgt jedoch nicht nur auf post-translationeller Ebene, sondern wird in einigen Fällen auch transkriptionell reguliert. Die Proteine Noxa und Puma wurden beide als p53 induzierbare Gene identifiziert und es wird vermutet, daß sie für die nach DNA-Schädigung induzierte Apoptose entscheidend sind (Han et al., 2001; Nakano und Wousden, 2001; Oda et al., 2000; Yu et al., 2001). Ein anderer apoptoseinduzierender Streßstimulus, Wachstumsfaktorentzug, verstärkt dagegen die mRNA-Expression der BH3-*only*-Proteine Hrk und Bim über einen JNK-abhängigen Mechanismus in Neuronen (Harris und Johnson, 2001; Putcha et al., 2001; Whitfield et al., 2001).

Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, daß der Proteinlevel (bei transkriptioneller Regulation) und die subzelluläre Lokalisation der BH3-*only*-Proteine eine kritische Rolle bei der Apoptosekontrolle spielen. Nach dem derzeitigen Modell ermöglicht es gesunden Zellen eine Heterodimerisierung der BH3-*only*-Proteine mit antiapoptotischen Bcl-2-Mitgliedern und somit eine Aktivierung von Bax und Bak zu vermeiden. Die Zelle ist jedoch in der Lage, schnell und effizient auf externe und interne Zelltodsignale zu reagieren (Bouillet und Strasser, 2002).

1.6.1.3 Wirkungsweise der antiapoptotischen Bcl-2-Mitglieder

Wie bereits beschrieben beziehen sich die Modelle über die Wirkungsweise der antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie bisher hauptsächlich auf den mitochondrialen Weg, wo sie die proapoptotische Wirkung von Bax und Bak neutralisieren. Andererseits wird aber auch über eine direkte Modulation der Caspasenaktivierung spekuliert. Eine direkte Regulation der Caspasenaktivierung durch Bcl-2-Mitglieder wurde bereits in *C. elegans* beschrieben (Chen et al., 2000; Conradt and Horvitz, 1998; Metzstein et al., 1998). Nach dem derzeitigen Modell bindet *Ced-9*, ein Bcl-2-Homolog, das Apaf-1-Homolog *Ced-4*, welches dadurch nicht in der Lage ist, die Caspase *Ced-3* zu aktivieren. Zelltodsignale führen zur Expression des bisher einzigen in *C. elegans* beschriebenen BH3-*only*-Proteins Egl-1, welches mit *Ced-9* heterodimerisiert und somit *Ced-4* zur Aktivierung von *Ced-3* freisetzt (Chen et al., 2000; Conradt and Horvitz, 1998; Metzstein et al., 1998; Kaufmann und Hengartner, 2001). Obwohl in Säugerzellen bisher keine Interaktion von antiapoptotischen Bcl-2-Mitgliedern mit Apaf-1 gezeigt werden konnte, schließt das nicht die Existenz einer analogen Situation zu der in *C. elegans* unter der Beteiligung zusätzlicher Faktoren aus. So könnten in Säugerzellen antiapoptotische Bcl-2-Mitglieder über mehrere Adaptorproteine direkt mit einer Caspase gekoppelt sein und die Wechselwirkung von pro- und antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen würde die Freisetzung der gebundenen Caspase regulieren. Interessanterweise konnte eine Interaktion von Bcl-2 und Bcl-X_L mit dem in der Endoplasmatischen Retikulum-Membran lokalisierten Protein Bap31 gezeigt werden (Ng et al., 1997), das gleichzeitig eine ER-spezifische Isoform von Caspase-8 bindet: Procaspase-8L (Breckenridge et al., 2002). Dies deutet einerseits auf eine mögliche Funktion von Bcl-2 und Bcl- X_L als direkte Regulatoren

von Procaspase-8L hin und andererseits scheint das ER eine größere Rolle in der Apoptoseregulation zu spielen, als bisher angenommen.

1.7 Das Endoplasmatische Retikulum (ER) als Organelle in der Apoptoseregulation

In den letzten Jahren ließ eine zunehmende Anzahl von experimentellen Daten erkennen, daß das ER durch Kommunikation mit den Mitochondrien Apoptose reguliert und auch selbst Apoptosesignale initiiert (Breckenridge und Shore, 2002).

1.7.1 Die UPR (“*unfolded protein response*”)

Zelluläre Bedingungen, die eine effiziente Faltung sekretorischer Proteine im ER-Lumen beeinträchtigen, können potentiell toxische und für den Organismus gefährliche mißgefaltete Proteine hervorrufen. In eukaryontischen Zellen existiert daher ein System, welches die Proteinfaltung innerhalb des ER-Lumens verfolgt und reguliert: die sogenannte *unfolded protein response* (Breckenridge und Shore, 2002). Es reagiert entweder mit Überlebenssignalen, die einen Stop in der Proteinsynthese mit anschließender Hochregulation ER-ständiger Chaperonine umfaßt, oder es reagiert mit der Induktion von Zelltod. Die UPR kann durch chemische Reagenzien ausgelöst werden. Brefeldin A (BFA), eine niedermolekulare, organische Substanz, verursacht eine Inhibition des Vesikeltransports von Proteinen zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat, Tunicamycin verhindert die N-Glycosylierung von Proteinen (Ferri und Kroemer, 2001; Breckenridge und Shore, 2002). ER-Streß-abhängige Signalwege beeinflussen in einem Zusammenspiel von Proteasen und Kinasen über das ER-ständige Chaperonin Bip/Grp78 unterschiedliche zelluläre Prozesse. Ire- β vermittelt durch Degradation der 28S rRNA eine Inhibition der Translation (Iwawaki et al., 2001). Den gleichen Effekt bewirkt PERK, welches den generellen Translationsinitiationsfaktor eIF2- α inhibiert. Der Transkriptionsfaktor ATF-6 kann nach einer ER-Streß-spezifischen Proteasespaltung in den Zellkern relokalisieren und einerseits Überlebenssignale vermitteln, wie bei der Hochregulation von Chaperoninen (zB. Bip/Grp78), oder ATF-6 kann Apoptose auslösen, indem durch CHOP/GADD153 die Bcl-2-Expression herabgesetzt wird (Ferri und Kroemer, 2001; McCullough et al., 2001; Niwa et al., 1999; Patil und Walter, 2001; Urano et al., 2000).

1.7.2 *Caspase-12*

Ein weiterer Hauptfaktor in der durch ER-Streß-induzierten Apoptose ist die auf cytoplasmatischer Seite mit dem ER assoziierte Caspase-12. Caspase-12 ist ER-Streß-spezifisch und wird nicht durch TNF α oder Fas bei rezeptorvermittelten und mitochondrialen Apoptosesignalwegen aktiviert (Nakagawa et al., 2000; Nakagawa und Yuan, 2000; Yoneda et al., 2001). Dementsprechend sind caspase-12^{-/-} embryonische Mausfibroblasten teilweise resistent gegen Apoptoseinduktion durch Brefeldin A, Tunicamycin oder Thapsigargin (siehe Kap. 1.8.1 und 1.8.2) (Breckenridge und Shore, 2002). Ein Mysterium ist, daß diese Caspase bisher nur in der Maus identifiziert und charakterisiert wurde und es ist unklar, ob eine humane Form des Proteins existiert oder ob die Aufgabe von Maus-Caspase-12 beim Menschen durch andere Caspasen (Caspase-4 oder -5) übernommen wird. Caspase-4 und -5 sind diejenigen Proteasen mit der größten Homologie zu Maus-Caspase-12. Die physiologischen Regulatoren von Caspase-12 sind bisher nicht bekannt. Ein Anstieg der cytosolischen Ca²⁺-Ionenkonzentration führt zur Aktivierung von Caspase-12, jedoch sind die dafür verantwortlichen Enzyme bisher nicht beschrieben worden. Ebenso unbekannt sind bislang die spezifischen Substrate von Caspase-12 (Huseyin, 2000).

1.7.3 *ER-Ca²⁺-Austritt und Apoptose*

ER-Streß wird immer begleitet von einem Anstieg der cytosolischen Konzentration an freiem Ca²⁺ (Breckenridge und Shore, 2002). In ungestreßten Zellen wird der Level an cytosolischem Ca²⁺ stringend reguliert. Der Austritt erfolgt über einen spezifischen Ca²⁺-Kanal (InsP₃R) und über die sarcoplasmatische / endoplasmatische Ca²⁺-ATPase (SERCA) wird cytosolisches Ca²⁺ zurück ins ER-Lumen gepumpt, wo es entweder frei oder gebunden an Calreticulin oder Calnexin vorliegt (Ferri und Kroemer, 2001). Da ein akuter Ca²⁺-Austritt aus dem ER Zelltod auslösen kann, wird der SERCA-Inhibitor Thapsigargin verwendet, um experimentell diesen Zustand auszulösen. Neben einer funktionellen Kopplung von ER-Streß - ausgelöst durch die *UPR* - und dem Anstieg der cytosolischen

Ca²⁺-Konzentration gibt es auch eine Korrelation zu mitochondrialen apoptotischen Ereignissen, wie der Freisetzung von Cytochrome c (Ferri und Kroemer, 2001).

1.7.4 Zusammenspiel zwischen ER und Mitochondrien bei der Apoptose

Die Bedeutung mitochondrialer apoptotischer Ereignisse für die durch ER-Streß induzierte Apoptose werden von der Tatsache eindrucksvoll verdeutlicht, daß *bax*^{-/-} und *bak*^{-/-}-Doppel-*knock-out*-Zellen resistent gegenüber Zelltodinduktion mit Brefeldin A und Tunicamycin sind (Wei et al., 2001). Dies zeigt entweder die Notwendigkeit der Mitochondrien für ER-Streß-induzierte Apoptose oder deutet auf eine bisher unbekannt Funktion von Bax und Bak am ER hin (Ferri und Kroemer, 2001). Um die Funktion von Bcl-2-Mitgliedern am ER genauer analysieren zu können, wurden Bcl-2-Varianten hergestellt, die ausschließlich am ER bzw. exklusiv an den Mitochondrien lokalisiert sind (Häcki et al., 2000; Lee et al., 1999). Interessanterweise gibt es Unterschiede im Inhibitionsverhalten zwischen ER-lokalisiertem (ER-)Bcl-2 und ausschließlich mitochondrialem (Mito-)Bcl-2. So wird nach Brefeldin A- und Tunicamycin-Behandlung eine Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien nicht nur durch Wildtyp-Bcl-2 sondern auch durch (ER-)Bcl-2 inhibiert. Dagegen inhibiert ER-Bcl-2 in MDCK-Zellen jedoch keine mit Etoposide oder Serumentzug induzierte Apoptose, welche aber von mitochondrialem Bcl-2 inhibiert wird (Häcki et al., 2000; Lee et al., 1999; Annis et al., 2001). Diese Ergebnisse deuten auf eine exklusive Funktion der antiapoptotischen Bcl-2-Mitglieder am ER für spezifische Signalwege hin.

Dennoch ist eine ER-Lokalisation von Bcl-2 und Bcl-X_L nicht in jedem Fall mit einer Apoptose-inhibitorischen Funktion verbunden. Eine Interaktion mit den Mitgliedern der ER-ständigen Reticulon Proteinfamilie (RTN) neutralisiert diese Aktivität. Sie interagieren dort mit Bcl-2 und Bcl-X_L (RTN-XS) bzw. mit Bcl-X_L (RTN1-C) (Shinji et al., 2000; Tagami et al., 2000).

1.7.5 *Der Bap31-Komplex am ER*

Ein weiteres ER-Protein, mit dem Bcl-2 und Bcl-X_L interagieren, ist Bap31. Bap31 ist ein ubiquitär exprimiertes integrales ER-Membranprotein, welches einerseits als Chaperonin für den Proteinexport wirken kann und andererseits mit Apoptoseregulation in Verbindung gebracht wurde (Breckenridge und Shore, 2002). Der C-terminale cytoplasmatische Teil von Bap31 enthält eine *coiled-coil*-Domäne mit Sequenzhomologien zu den *death effector*-Domänen (DED) (siehe Kap. 1.4.1 und Abb. 1.3.1) von Procaspase-8 und -10. Es konnte gezeigt werden, daß Bap31 nach Apoptosestimulation eine ER-spezifische Isoform von Caspase-8 bindet: Procaspase-8L, welche bezüglich Caspase-8 eine 59 Aminosäurereste umfassende N-terminale Verlängerung enthält, die eine Interaktion mit Bap31 ermöglicht (Breckenridge et al., 2002). Apoptoseinduktion durch das Onkogen E1A induziert die Assoziation von Procaspase-8L mit Bap31. Procaspase-8L wird durch einen Mechanismus prozessiert, der durch Bcl-2 inhibierbar und abhängig von Bap31 ist. So können Zellen, die defizient an Bap31 und dessen Homolog Bap29 sind, Procaspase-8L nach Apoptoseinduktion durch E1A nicht prozessieren. Neben seiner Funktion als Apoptoseregulator ist Bap31 auch ein Caspase-8-Substrat, es enthält zwei identische Caspaseschnittstellen im C-terminalen cytoplasmatischen Teil. Ein nach Prozessierung durch Caspase-8 entstehendes 20 kD Fragment besitzt Apoptose-induzierende Eigenschaften, ein Mechanismus, der an Bcl-2 erinnert, dessen prozessierte Fragmente proapoptotisch sind und zu einer Amplifikation des Apoptosesignals beitragen (siehe Kap. 1.3.3) (Ng et al., 1997; Ng und Shore, 1998; Nguyen et al., 2000; Breckenridge et al., 2002).

Interessanterweise ist der Bap31-Komplex auch an der Apoptoseinduktion durch den Fas-Rezeptor beteiligt, zumindest in einigen Zelltypen (Typ II), die eine Beteiligung von Mitochondrien zur Vermittlung des apoptotischen Signals benötigen und nicht direkt am Fas-Rezeptorkomplex über Caspase-8-Aktivierung Apoptose induzieren können (siehe Kap. 1.4.1). So kann eine stabil in KB-Zellen exprimierte Bap31-Mutante, welche nicht durch Caspase-8 prozessiert werden kann und somit caspase-resistent ist (crBap31), Fas-induzierte Apoptose inhibieren (Nguyen et al., 2000). Obwohl crBap31 in diesen Zellen nur einen geringen Einfluß auf die Fas-induzierte Caspase-Aktivierung und Spaltung von

Caspasesubstraten hat, inhibiert es jedoch den Cytochrome c-Austritt, die Mitochondriendepolarisation, sowie die Reorganisation des Zytoskeletts und verhindert somit phänotypische Veränderungen, die zur Bildung membranumschlossener Vesikel, sogenannter apoptotischer Körperchen führen. Der Bap31-Komplex scheint also die Vermittlung des Apoptosesignals vom Fas-Rezeptor zu den Mitochondrien zu blockieren. Erst die Prozessierung von Bap31 durch Caspase-8 löst diese Blockade auf und verwandelt Bap31 von einem Inhibitor zu einem Aktivator, da das entstehende 20 kD-Fragment über einen Mitochondrien-abhängigen Signalweg Apoptose induzieren kann (Nguyen et al., 2000; Breckenridge und Shore, 2002). Diese Ergebnisse unterstreichen die enge Verknüpfung in der Apoptoseregulation zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien, jedoch sind die molekularen Mechanismen und die beteiligten Faktoren noch weitestgehend unbekannt.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Da erst ein Bruchteil 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. Hierzu wurde ein von Grimm und Leder (1997) entwickelter genetischer Expressionsscreen angewendet, der die rasche Untersuchung ganzer cDNA-Bibliotheken erlaubt. Er beruht auf der transienten Transfektion von Einzelplasmiden von einer normalisierten Maus-cDNA-Bibliothek in humane Nierenzellen (293T) mit anschließender phänotypischer Analyse apoptotischer Veränderungen. Dieses Verfahren erlaubt die vergleichsweise zeitsparende Analyse vieler cDNAs (Grimm und Leder, 1997). Es nutzt aus, daß viele Proteine bekannter Apoptosewege in der Lage sind, bei Überexpression Apoptose zu induzieren (wie z.B. Caspase-2 oder Bax). Diese Eigenschaft ist mit einem dominanten Effekt bestimmter Mutationen vergleichbar, die eine konstitutive Aktivierung eines Proteins zur Folge haben. Die Überexpression von proapoptotischen Genen kann die Interaktion zu Proteinen beeinflussen, welche proapoptotische Signalwege regulieren. So kann ein endogener Inhibitor durch die forcierte Überexpression stöchiometrisch nicht mehr in der Lage sein zu inhibieren. Andererseits werden somit auch Interaktionen mit anderen

proapoptotischen Signalmolekülen ermöglicht, deren Assoziation normalerweise streng reguliert ist und nur auf spezifische Signale hin erfolgt.

Von den mit Hilfe dieses Verfahrens erhaltenen Klonen, die bei Überexpression proapoptotisch wirken, wurde eine bislang nicht genauer beschriebene cDNA ausgewählt, die nach transienter Transfektion schnell und effizient in humanen Zellen Apoptose induziert. Zusätzlich enthält dieser Klon eine dem BH3-Motiv (siehe Kap. 1.6.1) entsprechende Aminosäuresequenz und wurde daraufhin im Rahmen dieser Arbeit genauer charakterisiert.

2 Ergebnisse

2.1 Reihenuntersuchung nach dominant Apoptose-induzierenden Genen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein *screening* nach dominanten Apoptose-induzierenden Genen durchgeführt. Hierzu wurden (wie unter Kapitel 6.1.4 beschrieben) im *96-well*-Format einzelne cDNA-Klone einer normalisierten Mausnieren-cDNA-Bank isoliert und im *24-well*-Format in humane embryonale Nierenzellen (293T) transfiziert. Dabei wurden vor der Plasmidisolierung im *96-well*-Format die Bakterienklone soweit verdünnt, daß statistisch Einzel-cDNAs transfiziert wurden. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch 20 bis 48 h nach Transfektion auf die Ausbildung eines typischen apoptotischen Phänotyps (siehe Abb. 2.2.1.1). Als Positivkontrollen wurden Caspase-2 (Nedd2) oder ANT-1 verwendet, von denen bekannt ist, daß sie bei Überexpression Apoptose induzieren (Bauer et al., 2000). Als Negativkontrollen im *Screen* dienten die nicht-positiven Klone.

Insgesamt wurden im Verlauf dieser Arbeit etwa 5000 unabhängige cDNA-Klone getestet. Nach Vereinzlung und wiederholter Transfektion erwiesen sich 21 Klone als positiv, was einem Anteil von 0,42 % entspricht. Die Länge der entsprechenden cDNAs variierte zwischen ca. 0,6 und 2,5 kb und betrug im Durchschnitt 1,3 kb. Die positiven Klone wurden sequenziert und mittels einer *BLAST*-Suche unter www.ncbi.nlm.nih.gov/blast (Altschul et al., 1997) mit den allgemein zugänglichen Datenbanken abgeglichen und identifiziert. Die Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die erhaltenen positiven Klone.

Drei der aus dem *Screen* erhaltenen 21 Klone wurden schon mit einer Funktion in der Apoptose beschrieben: die Serine Palmitoyltransferase (Dawkins et al., 2001; Perry et al., 2000), PERP (Attardi et al., 2000) und RhoB (Esteve et al., 1995; Lebowitz et al., 1997).

Tabelle 2.1: Überblick über die Apoptose-induzierenden Klone aus dem screening. Die Klonnummer, die Genbank-Zugangsnummer und eine kurze Klonbeschreibung sind dargestellt. In einigen Fällen wurde wegen des Fehlens der Mausequenzen in den Datenbanken die entsprechende humane Genbank-Zugangsnummer angegeben und gekennzeichnet. Die Klonnummer entspricht der internen Nomenklatur, fehlende Nummern sind im Sekundärscreen (siehe Kap.6.1.4) herausgefallen.

Klon	Genbank-Zugangsnummer	Klonbeschreibung
<i>1. Klone mit bereits bekannter Funktion in der Apoptose:</i>		
#4	NM_011479	Serine Palmitoyltransferase, <i>subunit 2</i> (Sptlc2)
#6	AF249870	PERP (p53 <i>apoptosis-associated target</i>)
#29	X99963	RhoB
<i>2. Klone mit bereits bekannter Funktion, die jedoch noch nicht mit Apoptose in Verbindung gebracht wurden:</i>		
#3	AF223950	Tim22 (Preprotein Translokase)
#8	X60036 (human)	Mitochondrialer Protonen/Phosphate Symporter
#10	M31775	Cytochrome beta-558
#23	X04297 (human)	Na,K-ATPase alpha-Untereinheit (unvollständiger Klon)
#26	NM_003002 (human)	Succinate dehydrogenase complex, <i>subunit D</i> integrales Membranprotein (SDHD)
#28	U95822 (human)	Tim23, Transmembrane GTPase (unvollständiger Klon)
<i>Bereits beschriebene Klone, deren Funktion jedoch weitestgehend unbekannt ist:</i>		
#2	AJ006341	PMP34 (Peroxisomales integrales Membranprotein)
#9	AF113127 (human)	S1R protein, humanes Cowpoxvirus-Homolog
#20	NM_011512	Surfeit-Gen 4 (Surf4)
#24	AF192558	<i>Mitochondrial carrier homolog 1 isoform b</i> (Mtch-1b), uncharakterisierte mRNA
#25	NM_016783	Progesterone-Rezeptor Membrankomponente
#27	U21049 (human)	DD96, hochreguliert in Tumoren

#30	U76253	E25B, Homolog des humanen Bri-Proteins
#31	AF161525	HSPC177, uncharakterisierte mRNA
<i>Noch nicht beschriebene Klone mit unbekannter Funktion:</i>		
#18	UniGene: Mm.86545	unbekannt
#19	SPTREMBL:O75663	unbekannt
#21	UniGene: Mm.27841	unbekannt
#22	UniGene: Mm.31778	unbekannt

Dabei vermittelt die Serine Palmitoyltransferase die entscheidende Reaktion in der Ceramid-Synthese, einer Substanz, welche bekanntermaßen Apoptosesignalwege aktiviert (Perry et al., 2000). PERP ist ein Mitglied der mit verschiedenen neurodegenerativen Krankheiten in Verbindung gebrachten PMP-22/gas3-Proteinfamilie. Es wurde als p53-Targetgen identifiziert und induziert über einen noch unbekanntem Mechanismus Apoptose (Attardi et al., 2000). Das ebenfalls in diesem *screen* erhaltene RhoB kontrolliert über Integrin-abhängige Signalwege die Zelladhäsion und ist ein entscheidender Regulator beim Wachstum von Tumorzellen. Über einen Ceramid-abhängigen Signalweg ist RhoB in der Lage, Apoptose einzuleiten (Esteve et al., 1995; Udagawa und McIntyre, 1996; Lebowitz et al., 1997).

Vier der sechs Proteine mit einer bereits bekannten Funktion sind in den Mitochondrien lokalisiert (#3, #8, #26, #28). Deren Beteiligung an mitochondrialen apoptotischen Ereignissen wurde von Mitarbeitern am Max-Planck-Institut für Biochemie genauer untersucht. Vom Großteil der restlichen Gene war keine Funktion bekannt. Sie waren entweder in kurzen Veröffentlichungen beschrieben oder deren Sequenz war durch Sequenzierprojekte in die Datenbanken gelangt. Von 3 Genen gab es keine mRNA-Sequenz (#18, #21, #22). Es wurden nur Einträge in UniGene-Datenbanken gefunden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>), die automatisiert ESTs mit Sequenzüberlappungen zusammenfassen.

Zur genaueren Charakterisierung im Rahmen dieser Arbeit wurde eine bislang nicht genauer beschriebene cDNA ausgewählt, die nach transienter Transfektion schnell und effizient in humanen Zellen Apoptose induzieren konnte: #31. Zu Beginn dieser Arbeit existierten zwei Datenbankeinträge zu dieser mRNA-Sequenz. Die erste stammte aus einem Sequenzierprojekt humaner CD34-positiver Stammvorläuferzellen (HSPC177) (Zhang et al., 2000). Die zweite, eine aufgrund dreier Rastersprünge im ORF vermutlich fehlerhafte Sequenz (cgi-34), stammte aus einem Homologieklonierungsprojekt, bei dem zum Nematoden *C. elegans* homologe humane Gene indentifiziert wurden (Lai et al., 2000). Diese evolutive Konservierung und die Tatsache, daß dieser Klon eine dem BH3-Motiv (siehe Kap. 1.7.1) entsprechende Aminosäuresequenz enthielt, veranlaßten die genauere Charakterisierung dieses neuen, bisher uncharakterisierten cDNA-Klones im Rahmen dieser Arbeit. Diese cDNA enthält einen ORF, welcher für ein Protein mit 219 Aminosäureresten kodiert und *Small protein with inherent killing effect* (Spike) genannt wurde.

2.2 Charakterisierung von Spike als Apoptose-induzierendes Gen

2.2.1 Spike induziert Apoptose in verschiedenen Säugerzellen

Die transiente Transfektion von Spike in 293T-Zellen resultiert in den für Apoptose bekannten phänotypischen Veränderungen (siehe Abb. 2.2.1.1). Um proteinunabhängige Effekte bei der Apoptoseinduktion auszuschließen, wurde zur Kontrolle ein Plasmid mit deletiertem Startkodon (-ATG) transfiziert, welches nicht zur Ausbildung des apoptotischen Phänotyps in 293T-Zellen führte.

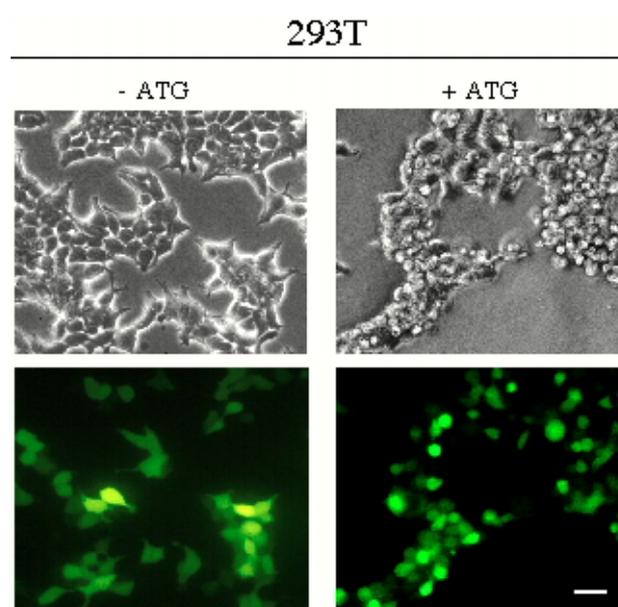


Abb. 2.2.1.1: Spike induziert Apoptose in 293T-Zellen. Die kodierende Region von Spike mit einer Deletion des Startkodons (links) und mit unmodifiziertem ORF (rechts) wurde mit GFP transient in 293T-Zellen transfiziert. Gezeigt sind Phasenkontrast- (oben) und Fluoreszenzaufnahmen (unten) 36 h nach der Transfektion. Der Balken entspricht 100 μm .

Um auszuschließen, daß die durch Überexpression von Spike induzierte Apoptose nur auf die im *Screen* verwendeten 293T-Zellen begrenzt ist, wurden unterschiedliche Zelltypen transient transfiziert. Neben 293T-Zellen führt eine Überexpression von Spike auch in HeLa, HeLa $\rho 0$ und MCF-7-Zellen phänotypisch zum Zelltod (siehe Abb. 2.2.1.2). HeLa $\rho 0$ -Zellen verfügen über keine intakte mitochondriale Atmungskette und können daher dort keine proapoptotischen Sauerstoffintermediate bilden (Chandel und Schumacker, 1999). MCF-7 sind dagegen defizient an Caspase-3 (Rehm et al., 2002). Diese Ergebnisse demonstrieren, daß die Apoptose-induzierende Eigenschaft von Spike nicht nur auf 293T-Zellen begrenzt ist, sondern daß Spike einen vermutlich generellen, in den verschiedensten Zelltypen aktivierbaren Apoptoseweg induziert. Außerdem wird deutlich, daß der Spike-vermittelte Zelltod weitestgehend unabhängig von einer intakten mitochondrialen Atmungskette und den dort zu bildenden radikalen Sauerstoffintermediaten ist (HeLa $\rho 0$ -Zellen), sowie daß die Spike-induzierte Apoptose unabhängig von Caspase-3 ist (MCF-7).

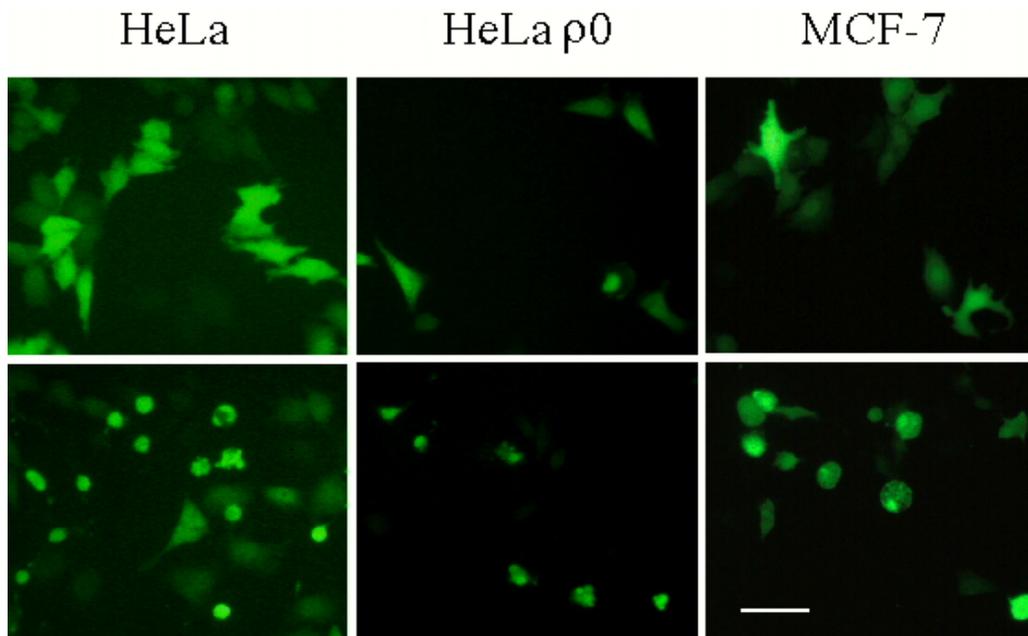


Abb. 2.2.1.2: Transiente Spike-Transfektion in HeLa-, HeLa $\rho 0$ - und MCF-7-Zellen. Ein Kontrollplasmid (Luciferase, oben) und Spike (unten) wurden transient mit GFP in die angegebenen Zelllinien transfiziert. Die Fluoreszenzaufnahmen entstanden 36 h nach der Transfektion. Der Balken entspricht 100 μm .

2.2.2 *Spike induziert Caspase-abhängige Apoptosewege*

Neben den phänotypischen Indizien für Apoptose konnte der biochemische Nachweis der Apoptose erbracht werden. So induziert Spike die durch Caspasen-aktivierte internukleosomale DNA-Fragmentierung (siehe Kap. 1.1 und 1.3.3), was als sogenannte DNA-Leiter in den typischen 180 bp-Multimeren sichtbar wird (Abb. 2.2.2.1/A). Einen weiteren Hinweis auf Caspasenaktivität lieferte der generelle Caspaseninhibitor zVADfmk, welcher als Pseudosubstrat die aktiven Zentren der Caspasen blockiert. Als mit Spike transfizierte HeLa-Zellen gleichzeitig mit zVADfmk behandelt wurden, konnte die Spike-induzierte DNA-Fragmentierung vollständig verhindert werden (Abb. 2.2.2.1/B). In einem anschließenden DEVD-spezifischen Aktivitätstest konnte die Aktivierung Caspase-3-ähnlicher Caspasen nach Spike-Transfektion nachgewiesen werden (Abb. 2.2.2.1/C).

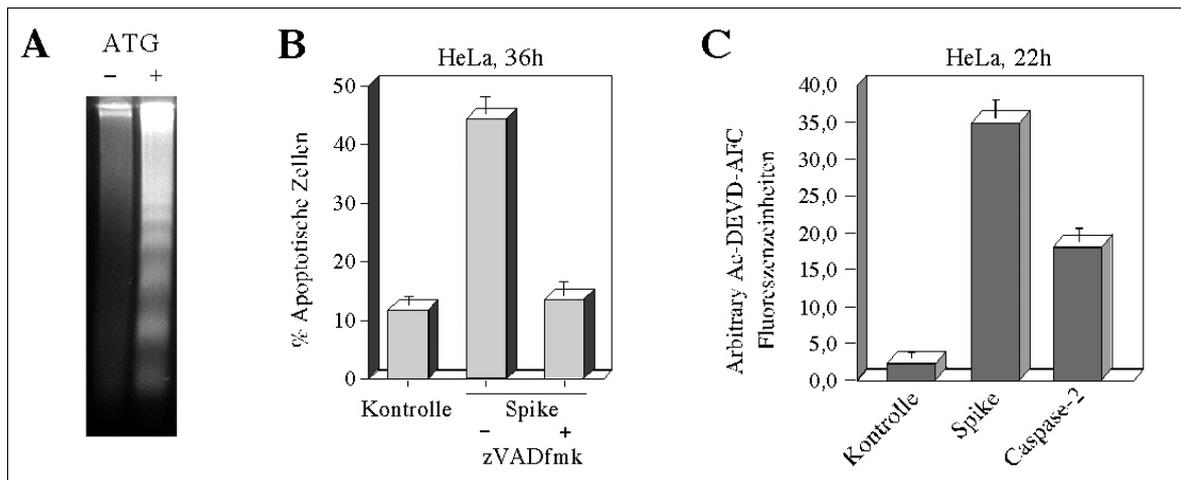


Abb. 2.2.2.1: Spike induziert Caspase-abhängige Apoptose. **A**, Spike-Expression führt zur Bildung der DNA-Leiter. 293T-Zellen wurden mit Spike transfiziert und nach 40 h wurde die niedermolekulare DNA isoliert und auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt. **B**, zVADfmk inhibiert Spike-induzierte Apoptose. HeLa-Zellen wurden mit Spike transfiziert und gleichzeitig wie angegeben mit und ohne 100 μ M zVADfmk inkubiert. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde nach 36 h durch FACS-Analyse quantifiziert. **C**, Spike-Expression aktiviert Caspase-3. Die angegebenen Konstrukte wurden in HeLa-Zellen transfiziert und nach 22 h die Caspase-3-Aktivität mittels eines ELISA-Assays bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei Experimenten. Die Abb. C ist in Zusammenarbeit mit Andreas Gewies entstanden.

Diese Daten deuten auf einen Caspase-abhängigen Apoptoseprozeß hin. Dennoch scheinen auch Caspase-unabhängige Prozesse eine Rolle zu spielen. So kann zwar die Spike-induzierte DNA-Fragmentierung durch Inkubation der transfizierten Zellen mit dem Caspaseinhibitor zVADfmk vollständig unterbunden werden, dennoch kommt es zur Ausbildung eines (wenn auch Apoptose-untypischen) Phänotyps (siehe Abb. 2.2.2.2). Von diesen Zellen scheint der zytoplasmatische Anteil zu schrumpfen. Es ist jedoch im Gegensatz zu HeLa-Zellen, die nicht mit zVADfmk behandelt wurden (Abb. 2.2.2.2/rechts), kein typisches apoptotisches fragmentieren („blebbing“) der Membranen ersichtlich.

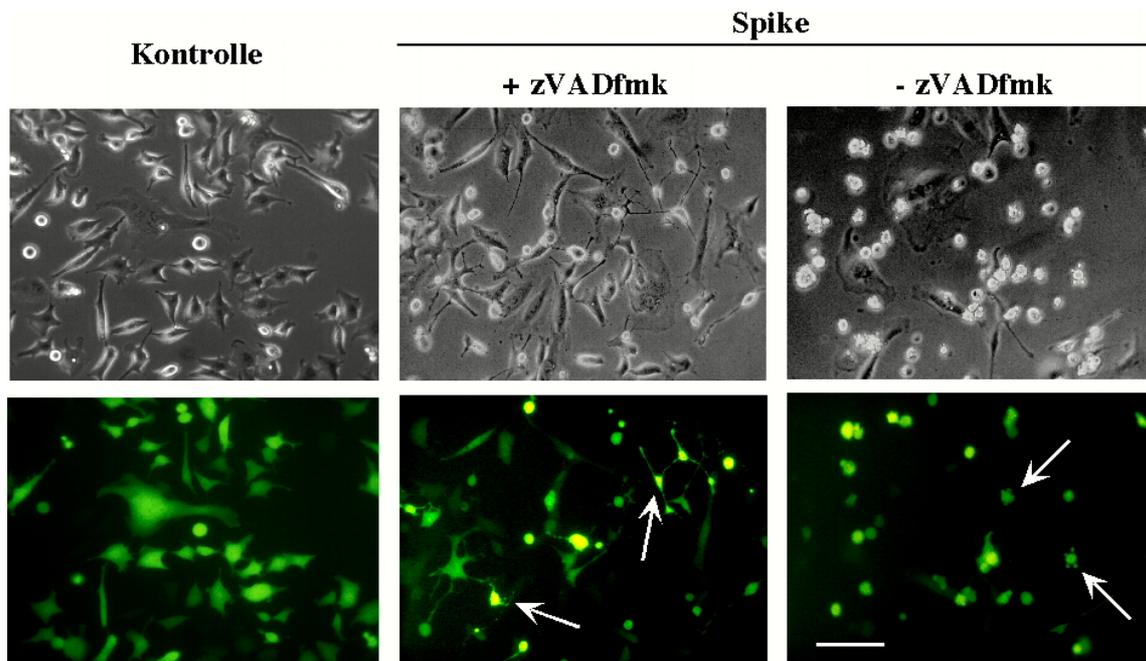


Abb. 2.2.2.2: Phänotyp von mit Spike transfizierten und mit zVADfmk behandelten HeLa-Zellen. Dargestellt sind HeLa-Zellen, die mit einem Kontrollplasmid (Luciferase, links) und Spike (Mitte und rechts) mit GFP transient transfiziert wurden. Die Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen entstanden 36 h nach der Transfektion. Die Pfeile markieren repräsentative Zellen zur Verdeutlichung des jeweiligen Phänotyps. Der Balken entspricht 100 μ m.

2.2.3 Die Apoptose-induzierende Funktion von Spike ist evolutiv konserviert

BLAST-Analysen in Sequenzdatenbanken (Altschul et al., 1997) erbrachten, daß es entfernte Spike-Homologe in einer Vielzahl von Organismen gibt, beispielsweise in Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) oder Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*). Allerdings war mit Ausnahme eines Homologen Proteins in *Candida albicans* diese Homologie nur auf den Sequenzbereich der zwei putativen *coiled coil*-Domänen begrenzt (siehe Kap. 2.2.4.1). Homologe Proteine, bei denen sich die Sequenzhomologien über die gesamte Spikesequenz erstreckt, existieren im Nematoden *Caenorhabditis elegans* und in der Taufliege *Drosophila melanogaster*. Beides sind Modellorganismen für die Untersuchung von programmiertem Zelltod, da viele Mechanismen und Signalmoleküle evolutiv konserviert sind. Sowohl das *C. elegans*-Spike als auch das *D. melanogaster*-Homolog zeigen trotz dieser evolutiven Distanzen eine erstaunlich hohe Homologie, sie sind zum Maus-Spike zu

60% (*C. elegans*) bzw. zu 63% (*D. melanogaster*) identisch. Das humane und murine Spike unterscheiden sich sogar nur in drei von 219 Positionen voneinander (siehe Abb. 2.2.3.1).

		1		50
hs-Spike	(1)	MNRLFGKAKPKAPPPSLTDCIGTVDSRAESTDKKISRLEAELVKYKDOI		K
mm-Spike	(1)	MNRFFGKAKPKAPPPSLTDCIGTVDSRAESTDKKISRLEAELVKYKDOI		K
cel-Spike	(1)	MNRIFGTGK-KVPPDLNNAISNVESRSDSIDKKIQKLDQDLMKLRDQMS		
Dro-Spike	(1)	MNRLFGRGKPKPEGPSLNDCIAGVDARATNIEEKISNLEAELRKYREQMS		
		51		100
hs-Spike	(51)	KMREGPAKNMVKQKALRVLKQKRMYEQQRDNLAAQOSFNMEQANNTTQSIK		
mm-Spike	(51)	KMREGPAKNMVKQKALRVLKQKRMYEQQRDNLAAQOSFNMEQANNTTQSIK		
cel-Spike	(50)	KMREGPSKNLTKQKALRVLKQKRMYENQKGLDQQAQFNMDQSNFAIQGMK		
Dro-Spike	(51)	KMREGPAKNMVKQKALRVLKQKRMYEQQAESEIRNQSFNMEQANNTTQSIK		
		101		150
hs-Spike	(101)	DTKITVDAMKLGVKEMKKAYKQVKIDQIEDLQDQLEDMMEDANEIQEAL		S
mm-Spike	(101)	DTKITVDAMKLGVKEMKKAYKEVKIDQIEDLQDQLEDMMEDANEIQEAL		G
cel-Spike	(100)	DNQVTVAAMKDGLKTMQKEYKKMNIHQIEDLQDQMEDMLDMNNEIQEAMS		
Dro-Spike	(101)	DTQATVAAMKDGVKQMKTEYKKINIDQIEDLQDDMADMFQADEVQEAL		G
		151		200
hs-Spike	(151)	RSYGTPELDEDDLEAELDALGDELLA-DEDS	SYLDEAASAPAI	---EGV
mm-Spike	(151)	RSYGTPELDEDDLEAELDALGDELLA-DEDS	SYLDEAASAPAI	---EGV
cel-Spike	(150)	RQYDTPDIDEADLEAELAMLGDEL	DIGESDTNYLDEALAAFTVP	----SD
Dro-Spike	(151)	RTYGMPEVDDDDLQAEALDALGDEIAL-	DDDSYLDVVKAPAP	SREPGA
		201		227
hs-Spike	(197)	PTDTKNKDGVLVDEFGLPQIPAS	----	
mm-Spike	(197)	PTDTKNKDGVLVDEFGLPQIPAS	----	
cel-Spike	(196)	KPKTRVAEGLEVDEFGLPKLPA	----	
Dro-Spike	(200)	DSIVPGKSTIETDEFGLPKIPTSLKTT		

Abb. 2.2.3.1: Sequenzvergleich zwischen Spike-Homologen aus Mensch (hs), Maus (mm), *C. elegans* (cel) und *D. melanogaster* (Dro). In allen Spezies identische Aminosäuren sind schwarz bzw. grau (nur teilweise identisch) unterlegt.

Um diese Homologen Gene genauer untersuchen zu können, wurden sie daraufhin aus den entsprechenden cDNA-Bibliotheken kloniert und in eukaryontische Zellen transfiziert. Sowohl das *C. elegans*-Spike als auch das *D. melanogaster*-Spike sind im eukaryontischen System in der Lage, Apoptose zu induzieren. Neben einem apoptotischen Phänotyp kann der durch diese Gene induzierte Zelltod auch biochemisch mittels DNA-Leiter (*C. elegans*-Spike) und FACS-Analyse (*D. melanogaster*-Spike) nachgewiesen werden (siehe Abb. 2.2.3.2).

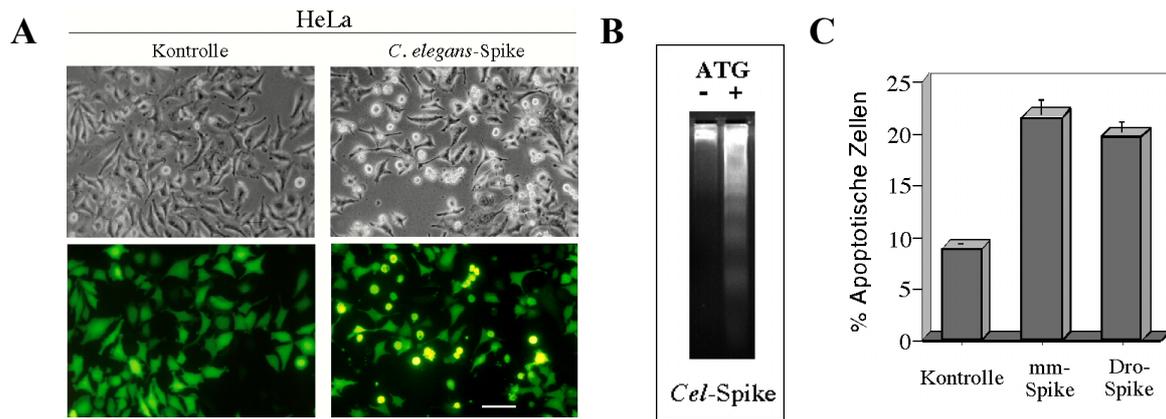


Abb. 2.2.3.2: *C. elegans*- und *D. melanogaster*-Spike induzieren Apoptose in humanen Zellen. A, HeLa-Zellen wurden mit einem Kontrollplasmid (Luciferase, links) und *C. elegans*-Spike (rechts) transient transfiziert; GFP wurde cotransfiziert. Die Phasenkontrast- (oben) und Fluoreszenzaufnahmen (unten) entstanden 36 h nach der Transfektion. Der Balken entspricht 100µm. B, 293T-Zellen wurden mit *C. elegans*-Spike (mit und ohne Start-ATG) transfiziert und nach 40 h wurde die niedermolekulare DNA isoliert und auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt. C, HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und der Anteil apoptotischer Zellen 24 h nach der Transfektion durch FACS-Analyse quantifiziert.

2.2.4 Sequenzanalyse von Spike

2.2.4.1 Sequenzanalyse der Primärsequenz

Der ORF des Spike-Gens kodiert für ein Protein von 219 Aminosäureresten. Insgesamt ist das Protein sehr stark geladen, mehr als ein Drittel aller Aminosäurereste sind entweder positiv (Lysin, Arginin) oder negativ geladen (Glutamat, Aspartat). Die Ladungsverteilung innerhalb der Gesamtsequenz ist jedoch sehr unterschiedlich, mit einer positiven Nettoladung im N-terminalen Teil (Aminosäurereste 1-124) und einem fast ausschließlich negativ geladenen C-terminalen Teil (Aminosäurereste 125-219). Die Ladungsdifferenz im N-Terminus mit 14x Glutamat oder Aspartat gegenüber 29x Lysin oder Arginin ist dagegen nicht so gravierend, wie im C-Terminus. Dort stehen 30 negative Glutamate oder Aspartate nur zwei Lysinen und einem Arginin gegenüber.

Verschiedene Analyseprogramme von Proteinsequenzen (PSORT, SMART, COILS) postulieren in der Spike-Sequenz zwei *coiled coil*-Domänen zwischen den Aminosäureresten 20-54 und 120-153 (Nakai und Kanehisa 1992; Schultz et al. 1998; Letunic et al. 2002; Lupas et al., 1991). Diese Domänen sind bekannte Protein-Protein-

Interaktionsmodule (Parry und Steinert, 1992). Ein Vergleich mit bekannten Apoptose-induzierenden Genen hat ergeben, daß Spike außerdem eine Sequenz enthält, welche dem BH3-Motiv der Apoptose-regulierenden Bcl-2-Familie entspricht (siehe Kap. 1.7.1). Das BH3-Motiv umfaßt etwa 12-15 Aminosäurereste, von denen neben einem relativ stark konservierten Kernmotiv von 5 Aminosäureresten jedoch nur wenige andere Positionen konserviert sind (siehe Abb. 2.2.4).

hs-Spike (163)	LEAELDALGDELLAD	(177)
hs-Bax (59)	LSECLKRIGDELDSN	(73)
hs-Bid (86)	IARHLAQVGDSMDRS	(100)
hs-Bik (57)	LALRLACIGDEMDVS	(71)
hs-BimL (148)	IAQELRRIGDEFNAY	(162)
hs-Hrk (33)	TAARLKALGDELHQR	(47)
hs-Rad9 (16)	AVHSLSRIGDELYLE	(30)
hs-Bad (110)	YGRELRRMSDEFVDS	(124)
hs-Bcl-2 (93)	VHLTLRQAGDDEFSRR	(107)
hs-Bak (74)	VGRQLAIIGDDINRR	(88)
cel-Egl-1 (54)	IGSKLAAMCDDFDAQ	(68)
Consensus	IA L <u>IGDEL</u>	

Kernsequenz

Abb. 2.2.4: Sequenzvergleich der BH3-Domänen von Spike und Mitgliedern der Bcl-2-Familie. Identische und konservierte Aminosäurereste sind schwarz unterlegt. Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der Position der Aminosäurereste innerhalb der jeweiligen Proteinsequenzen. (hs-*H. sapiens*, cel-*C. elegans*)

Mit Hilfe des NetPhos2.0-Programmes zur Sequenzanalyse (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) bezüglich der Wahrscheinlichkeit möglicher Phosphorylierungsstellen wurden acht Serin-, drei Threonin- und zwei potentielle Tyrosinphosphorylierungsstellen in der Spike-Sequenz postuliert (Blom et al., 1999). Dieses Programm analysiert jedoch nur die Primärsequenz und Daten über die potentielle Sekundärstruktur und damit die Zugänglichkeit der Reste für Kinasen fließen nur sehr begrenzt in diese Analyse ein.

Tabelle 2.2.4.1: Übersicht über potentielle Phosphorylierungsstellen laut Primärsequenzanalyse durch das NetPhos 2.0-Programm. Dargestellt sind die Position (Pos.) und die Sequenzumgebung (Context) in der Spike-Sequenz, sowie die potentielle Wahrscheinlichkeit (Score, 1=100%) einer Phosphorylierung laut Primärsequenz. Aminosäurereste mit einer hohen Phosphorylierungswahrscheinlichkeit sind gekennzeichnet.

Serine			Threonin			Tyrosine		
Pos	Context	Score	Pos	Context	Score	Pos	Context	Score
	v			v			v	
16	APPPSLTDC	0.952 *S*	18	PPSLTDCIG	0.117 .	45	ELVKYKDQI	0.289 .
26	GTVDSRAES	0.893 *S*	23	DCIGTVDSR	0.489 .	75	QKRMYEQQR	0.138 .
30	SRAESIDKK	0.981 *S*	95	QANYTIQSL	0.013 .	94	EQANYTIQS	0.152 .
36	DKKISRDLA	0.996 *S*	102	SLKDTKTTV	0.107 .	120	MKKAYKQVK	0.663 *Y*
86	LAQQSFNME	0.004 .	104	KDTKTTVDA	0.670 *T*	153	LSRSYGTPE	0.034 .
98	YTIQSLKDT	0.994 *S*	105	DTKTTVDAM	0.438 .	182	EDSSYLDEA	0.975 *Y*
150	QEALRSYSG	0.970 *S*	155	RSYGTPELD	0.858 *T*		^	
152	ALRSYGTGP	0.565 *S*	198	EGVPTDTKN	0.067 .			
180	ADEDSSYLD	0.096 .	200	VPTDTKNKD	0.857 *T*			
181	DEDSSYLDE	0.992 *S*		^				
188	DEAASAPAI	0.094 .						
219	QIPAS-----	0.096 .						
	^							

2.2.4.2 Sekundärstrukturanalyse

Basierend auf der Sequenz ist es möglich mit Hilfe von Sekundärstrukturanalyseprogrammen wie dem GOR4- (Garnier et al., 1996) oder dem SOPM-Programm (Geourjon und Del'age, 1994) die Sekundärstruktur unbekannter Proteine zu analysieren. Sowohl das GOR4- als auch das SOPM-Programm postulieren in der Spike-Sequenz hauptsächlich Alpha-helikale Strukturen vornehmlich in Bereichen der *coiled-coil*-Domänen und des BH3-Motivs (siehe Tab. 2.2.4.2). Die restlichen Sequenzbereiche zwischen den Alpha-Helices scheinen unstrukturiert zu sein (*random coil*).

Tabelle 2.2.4.2: Sekundärstrukturanalyse mit dem GOR4- und dem SOPM-Programm. Alpha-helices sind fett unterstrichen, *random coil*-Bereiche sind normal dargestellt. Im C-Terminus sind mögliche *extended strand*-Bereiche kursiv gekennzeichnet.

<p>Sekundärstrukturanalyse mit dem GOR4-Programm (Garnier et al., 1996):</p> <p>MNRLFGKAKPKAPPPSLTDCIGTVDSRAESIDKKISRDLAELVKYKDQIKKMRGPAKNMVK <u>OKALRVLKQKRMYEQQRDNL</u><u>LAQQSFNMEQANYTIQSLKDTKTTVDAMKLGVKEMKKAYKQVK</u> <u>IDQIEDLQDQLEDMMEDANEIQEALS</u>RSYGTPELD<u>EDDLEAELD</u><u>DALGDELLA</u>EDSSYLDEA <u>ASAPAI</u>PEGVPTDTKNKDGVLVDEFGLPQIPAS</p>
--

	GOR4	SOPM
Alpha helix	: 139 sind 63.47%	148 sind 67.58%
"Extended strand"	: 6 sind 2.74%	12 sind 5.48%
"Beta turn"	: 0 sind 0.00%	4 sind 1.83%
"Random coil"	: 74 sind 33.79%	55 sind 25.11%

2.2.4.3 Potentielle Oligomerisierung der coiled-coil-Domänen

Coiled-coil-Domänen sind bekannt für die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen. Inwieweit die *coiled-coil*-Domänen innerhalb der Spike-Sequenz eine Homodi- oder oligomerisierung ermöglichen können, ist mit Hilfe des MultiCoil-Programmes testbar (Wolf et al., 1997; siehe Abb. 2.2.4.3). Demnach wären die *coiled-coil*-Domänen von Spike in der Lage, dessen Selbstassoziation zu vermitteln. Dem Programm nach gilt eine Trimerisierung als wahrscheinlich.

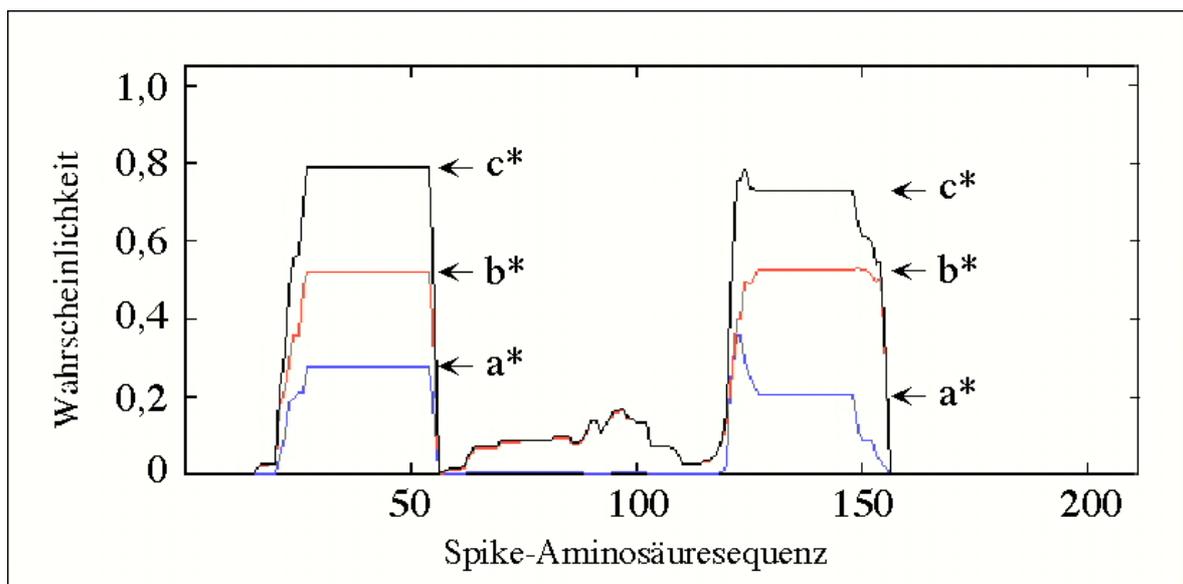


Abb. 2.2.4.3: Coiled-coil-Domänen vermittelte Homomerisierungswahrscheinlichkeit mit Hilfe des MultiCoil-Programmes (Wolf et al., 1997). Dargestellt ist die Wahrscheinlichkeit, mit der bestimmte Sequenzbereiche in der Spike-Sequenz eine Di- oder Trimerisierung ermöglichen (aus <http://nightingale.lcs.mit.edu/cgi-bin/multicoil>, Wolf et al., 1997). a*-Dimerisierung, b*-Trimerisierung, c*-Gesamtwahrscheinlichkeit.

2.2.5 Genomanalyse des humanen Spike-Gens

Nach den enormen Fortschritten des Humanen Genomprojektes in der Durchsequenzierung des humanen Genoms ist es möglich, mit Hilfe des Genom-BLAST-Programmes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/HsBlast.html>) die genaue Exon-Intron-Organisation humaner Gene zu analysieren. Das humane Spike-Gen wurde auf dem kurzen Arm von Chromosom 9p12 lokalisiert. Die mRNA setzt sich aus 8 Exons zusammen, deren Größe zwischen 49 und 113 bp (Exon 1-7) und 701 bp (Exon 8) variiert (siehe Abb. 2.2.5.1).

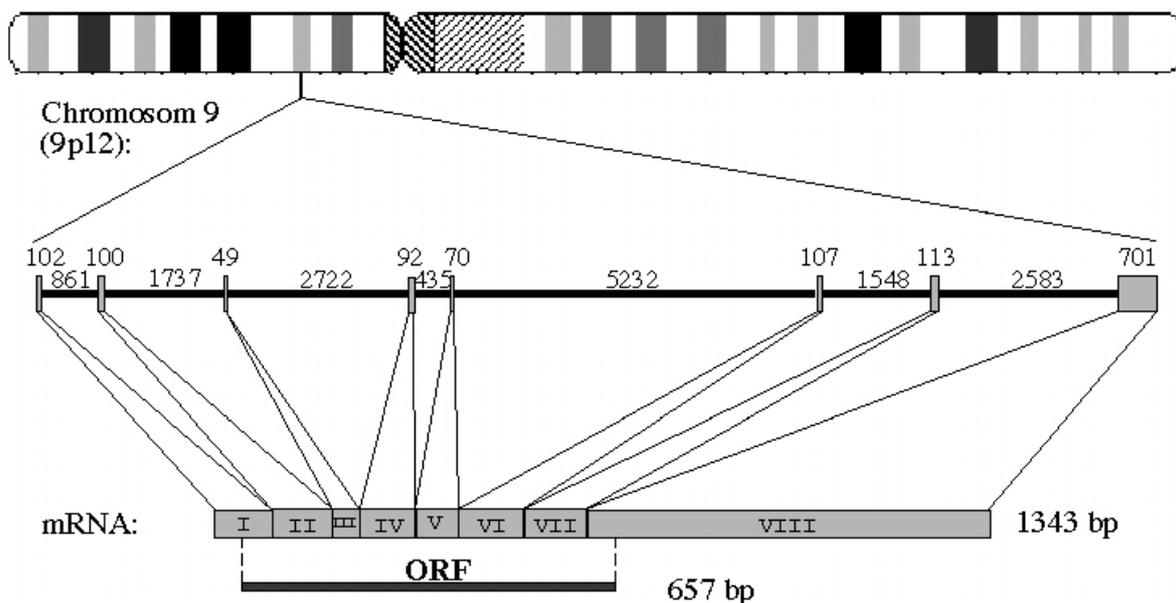


Abb. 2.2.5.1: Schematische Darstellung der Genomorganisation des humanen Spike-Gens. Das Spike-Gen wurde auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 an der bezeichneten Position (9p12) lokalisiert. Alle Zahlenangaben sind in bp, die Exons sind in römischen Ziffern angegeben.

Bei einem Vergleich der Exonstrukturen der humanen, *D. melanogaster*- und *C. elegans*-Gene von Spike in Bezug zur Proteinsequenz wird ersichtlich, daß die BH3-Domäne von Spike als konservierter Block in diesen Spezies nie durch verschiedene kodierende Exons getrennt war. Außerdem wird in der Exonstruktur deutlich, daß eine höhere evolutive Entwicklung mit einer komplexeren Genomorganisation einhergeht (siehe Abb. 2.2.5.2). Während der ORF von Spike in *C. elegans* noch von drei Exons kodiert wird, sind es in *D. melanogaster* bereits fünf und im Menschen acht Exons.

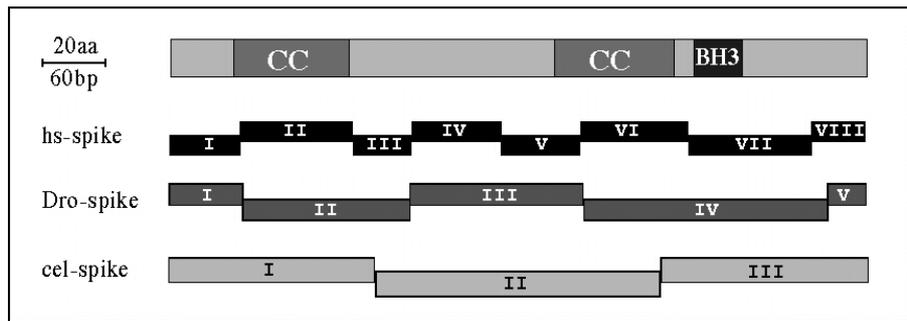


Abb. 2.2.5.2: Vergleich der Exonstrukturen der humanen (hs), *D. melanogaster* (Dro) und *C. elegans* (cel)-Gene von Spike in Bezug zur Proteinsequenz. Die Exons sind in römischen Ziffern angegeben. (CC-coiled coil, aa-Aminosäuren, bp-Basenpaare)

2.2.6 Expressionsstudien von humanem Spike

Sequenzierprojekte für Gewebe-spezifische Expressionsanalysen sammeln ihre Sequenzdaten als cDNA oder EST (*expressed sequence tag*) in öffentlich zugänglichen Datenbanken. Spezielle UniGene-Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>) fassen automatisiert ESTs und cDNAs mit Sequenzüberlappungen zusammen, so daß die Expressionsanalyse eines gesuchten Klones erleichtert wird. Obwohl mit dieser Methode keine verlässlichen Aussagen über die Expressionsmengen möglich sind, gibt sie jedoch einen groben Überblick, in welchen Geweben der entsprechende Klon exprimiert wird.

Wie eine Datenbankanalyse ergibt, wird Spike in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. Spike-ESTs wurden in zahlreichen adulten und fötalen Geweben gefunden, jedoch auch in einer Reihe von Tumoren. Die Tabelle 2.2.6 gibt einen Überblick über die Herkunft der bislang etwa 450 Spike-ESTs. Diesen Angaben nach scheint Spike ubiquitär exprimiert zu werden, zumindest im adulten Organismus. Den EST-Daten nach gibt es Hinweise, daß Spike auch in bestimmten Entwicklungsstadien bzw. in speziellen fötalen Geweben (Auge, Bauchspeicheldrüse) exprimiert wird (siehe Tab. 2.2.6).

Tab. 2.2.6: Auflistung aller Gewebe, in denen Spike-ESTs detektiert wurden. Dargestellt sind ESTs aus normalen (inklusive fötalen) Geweben und Tumoren.

Gewebearten		
Adrenaldrüse Amnion; Auge (Retina, Linse); Bauchspeicheldrüse Blut; Brust; Cervix; Dickdarm; Eierstock; fötale Augen; fötale Bauchspeicheldrüse Gebärmutter Gehirn; Harnblase; Haut;	Herz; Hoden; Hypothalamus; Keimzellen; Knochenmark; Leber; Leiomyos; Lunge; Lymphe; Magen; Melanocyten; Milz; Muskel (Skelett-, glatter) Niere; Ohr, (Cochlea);	Parathyroid; Placenta; Prostata; Rachenmandeln, Rückenmark; Urogenitaltrakt; ZNS, (multiple sclerosis lesions);
		Tumore
		Oligodendroglioma; Fibrosarcoma; Chondrosarcoma Pheochromocytoma; Uterustumor

Eine Northern-Blot-Analyse wurde durchgeführt, um genauere Aussagen über die Expressionsstärken treffen zu können. Außerdem wird dadurch die Detektion potentieller Isoformen von Spike ermöglicht. Die radioaktiv markierte Spike-Probe detektierte ein prominentes Signal in der zu erwartenden Größe von etwa 1,4 kb, eine deutlich schwächere Bande erschien bei etwa 1,2 kb, welche in seiner Intensität mit der prominenten Bande korrelierte. Spike-mRNA konnte in fast allen getesteten Geweben detektiert werden, mit Ausnahme von Leukozyten (siehe Abb. 2.2.6.1). In den anderen getesteten Geweben variierte die detektierte Menge sehr stark, mit vergleichsweise hohen Expressionsmengen in der Niere und Placenta. Nur sehr schwache Signale zeigten Dick- und Dünndarm, sowie Thymus.

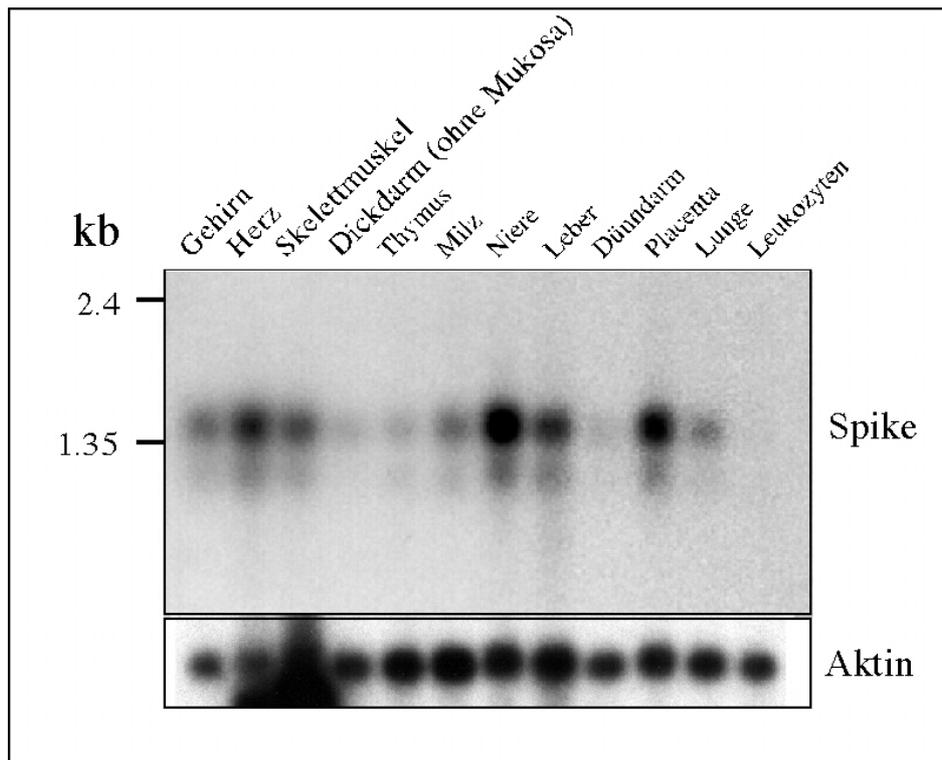


Abb. 2.2.6.1. Expressionsanalyse von humanem Spike mittels Northern-Blot. Ein *multiple tissue* –Northern (Clontech) wurde mit ^{32}P -markierter Spikeprobe inkubiert und Spike-mRNA mittels Autoradiographie detektiert. Als Ladekontrolle diente humanes Aktin (unten).

Zur Herstellung eines polyklonalen Antiserum in Kaninchen wurde murines Spike rekombinant in *E. coli* exprimiert und mit Hilfe eines GST-Tags affinitätsgereinigt. In Immunoblot-Analysen konnte nachgewiesen werden, daß das gewonnene Antiserum spezifisch transfiziertes wie auch endogenes Spike bei etwa 31 kD erkennt. Das Antiserum zeigte sogar Kreuzreaktivität zu transfiziertem *C. elegans*-Spike (siehe Abb. 2.2.6.2 /B). Bei Immunoblot-Analysen von Rohextrakten verschiedener Zelltypen konnte eine Spike-Expression in fast allen getesteten Zelllinien detektiert werden. Eine Ausnahme waren NRK-Zellen, dort wurde kein Signal sichtbar. Interessanterweise wurde eine prominente Bande bei 33 kD (p33) ersichtlich, die in ihrer Intensitätsstärke zur 31 kD-Bande in Abhängigkeit vom Zelltyp variierte. So ist p33 in BHK-Zellen die prominente Bande, in CHO-Zellen entsprechen sich p33 und p31 in ihrer Intensität und in MCF-7 wurde nur p31 sichtbar (siehe Abb. 2.2.6.2 /C).

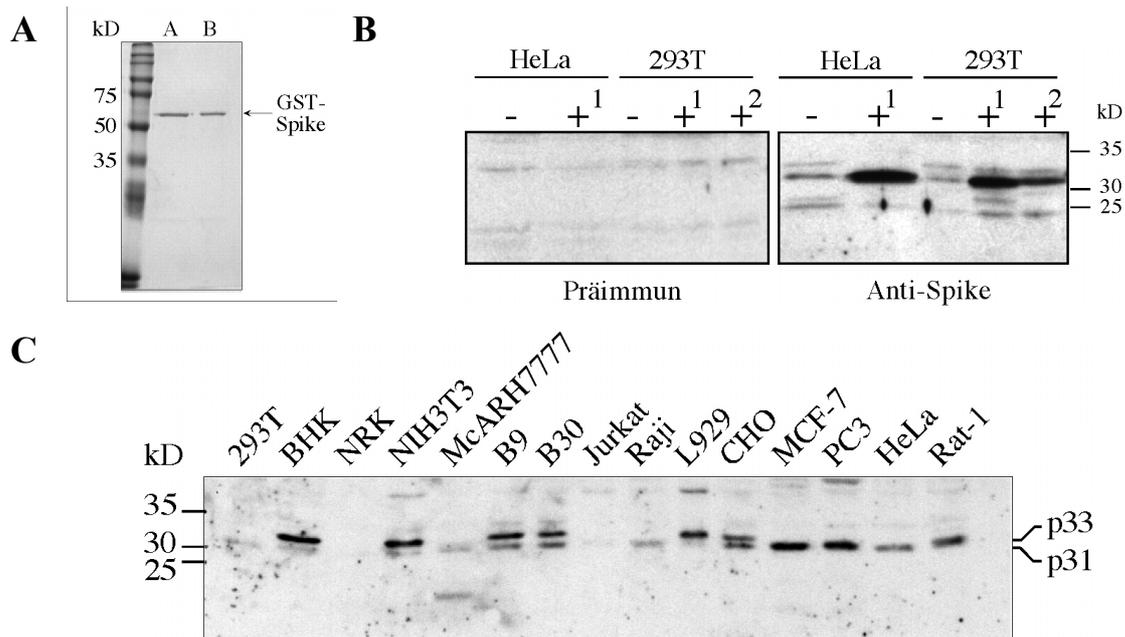


Abb. 2.2.6.2: Proteinexpressionsanalyse von endogenem Spike. *A*, Spike-Affinitätsreinigung. Coomassie-gefärbtes SDS-Gel zweier unabhängiger Affinitätsreinigungen (A und B) von rekombinatem GST-Spike. *B*, Immuno-Blot-Analyse mit dem Spike-Antiserum. Getestet wurden untransfizierte (-) und mit Maus- (1) oder *C. elegans*-Spike (2) transfizierte HeLa- und 293T-Zellen gegenüber einer Immunreaktivität mit dem Spike-Antiserum. Als Kontrolle diente das Präimmunserum (Präimmun), der Film wurde zeitgleich mit dem Antiserum exponiert. *C*, Expressionstest verschiedener Zelllinien auf endogenes Spike. Aufgetragen wurden jeweils 50 µg Zellextrakt, die per Immuno-Blot-Analyse mit dem Spike-Antiserum analysiert wurden.

2.2.7 Subzelluläre Lokalisation von Spike

Um die Lokalisation von endogenem Spike zu untersuchen, wurden für Immunfluoreszenz-Analysen MCF-7-Zellen ausgewählt, da sie vergleichsweise hohe Mengen an Spike exprimieren (siehe Abb. 2.2.6.2 /C). Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen verdeutlichen keine (oder nur eine teilweise) Überschneidung in der Lokalisation zwischen Spike mit einem mitochondrialen Marker (MitoTracker). Dagegen erbrachte eine Färbung des Endoplasmatischen Retikulums mit einem ER-spezifischen Marker eine vollständige Übereinstimmung in der Verteilung, was auf eine Lokalisation endogenen Spikes am ER hindeutet (siehe Abb. 2.2.7.1).

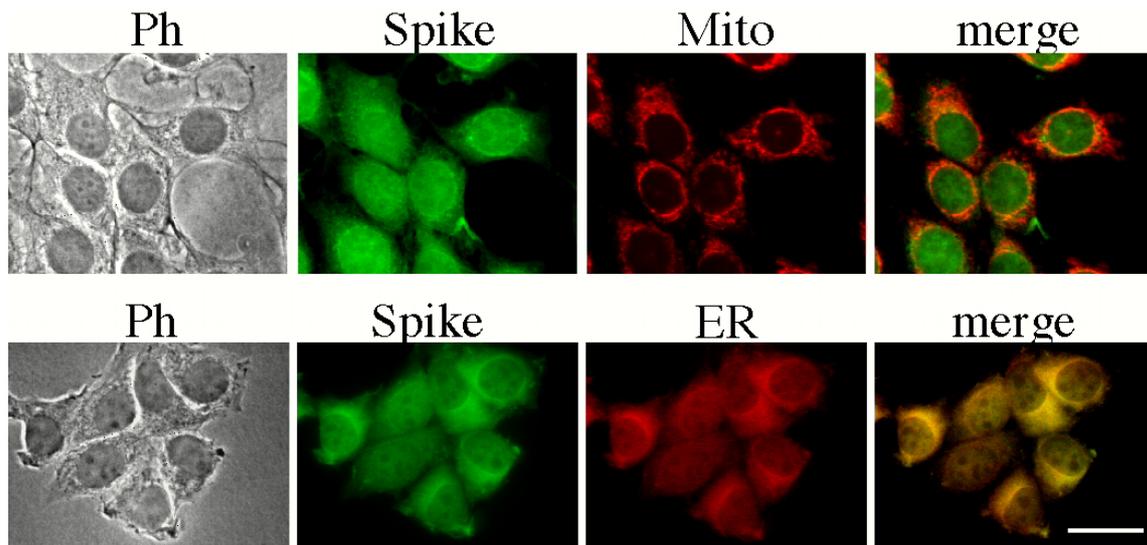


Abb. 2.2.7.1: Bestimmung der subzellulären Lokalisation mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Dargestellt sind MCF-7-Zellen als Phasenkontrastaufnahme (Ph, links), welche mit dem Spike-Antiserum (Spike, grün) und jeweils einem Zellkompartiment-spezifischen Lokalisationsmarker getestet wurden: oben Mitochondrien (Mito), unten Endoplasmatisches Retikulum (ER). Zur Detektion von endogenem Spike wurde ein mit AlexaGreen fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper verwendet. Der ER-Tracker wurde nachträglich mit Hilfe des IP-Lab-Programmes rot eingefärbt. Rechts ist jeweils eine Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen dargestellt (*merge*). Der Balken entspricht 50 μ m.

Zusätzlich wurde eine Zellfraktionierung von HeLa-Zellen zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation durchgeführt. Wie aus Abb. 2.2.7.2 ersichtlich, wird endogenes Spike ausschließlich in der 100.000g-Fraktion detektiert, welche charakteristisch für ER- und ER-assoziierte Proteine ist.

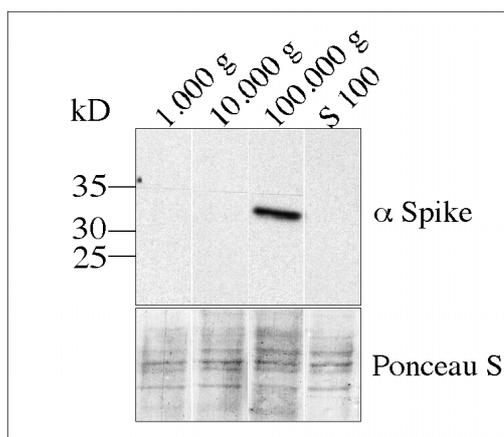


Abb. 2.2.7.2: Lokalisationsbestimmung von endogenem Spike mittels Zellfraktionierung. HeLa-Zellen wurden wie unter Kap. 6.5.3 beschrieben in 1.000g-, 10.000g- und 100.000g-Pelletfraktionen aufgetrennt und jeweils gleiche Proteinkonzentrationen zusammen mit dem 100.000g-Überstand (S100) mittels Immunoblot mit dem Spike-Antiserum analysiert. Als Ladekontrolle wurde der Immunoblot mit Ponceau S gefärbt (unten).

2.2.8 *Spike aktiviert mitochondriale apoptotische Ereignisse*

Interessanterweise sind auch die Mitochondrien in die durch Spike-induzierten Apoptosewege involviert. Es kommt zu einer Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials und zum Austritt von Cytochrome c (Abb. 2.2.8.1).

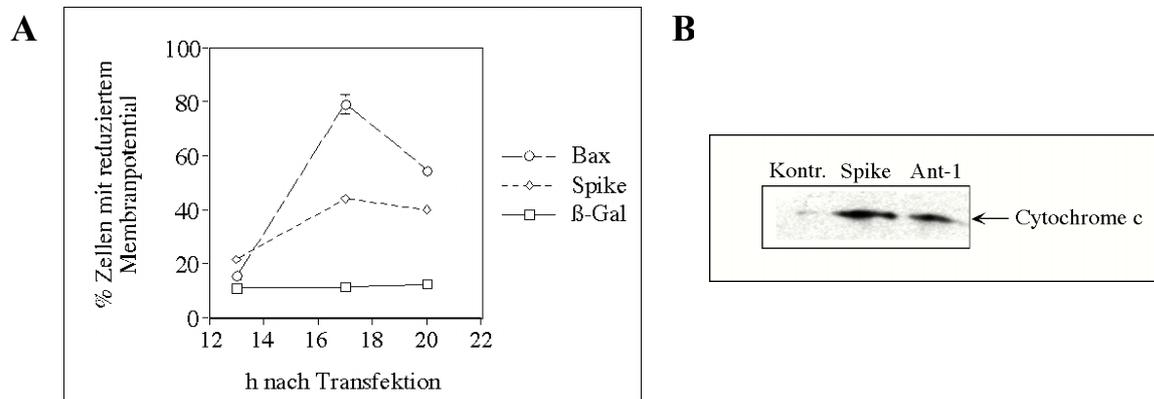


Abb. 2.2.8.1: Mitochondriale Ereignisse bei Spike-induzierter Apoptose. **A**, Die Mitochondrien von Spike-transfizierten HeLa-Zellen zeigen ein reduziertes Membranpotential. HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. Die Auswertung erfolgte mittels DiOC₆ mit anschließender Quantifizierung per FACS-Analyse. Als Kontrolle wurde β -Galactosidase (β -Gal) verwendet. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei Experimenten. **B**, Spike-Expression führt zum Austritt von Cytochrome c. Cytoplasmaextrakte transfizierter HeLa-Zellen (Luciferase als Kontrolle) wurden auf Cytochrome c-Gehalt durch Immunoblot-Analyse mit einem Cytochrome c-Antikörper getestet. Diese Abbildungen sind in Zusammenarbeit mit Nicole Schönfeld (A) und Manuel Bauer (B) entstanden.

2.2.9 “Mapping” des proapoptischen Signals in der Spike-Sequenz

Um abschätzen zu können, welche Sequenzbereiche innerhalb der Spike-Sequenz notwendig und hinreichend für dessen proapoptische Funktion sind und welche Rolle dabei die dem BH3-Motiv entsprechende Sequenz spielt, wurden Deletionsmutanten vom N- und C-terminalen Ende hergestellt. Beim Test dieser Deletionsmutanten auf deren Apoptose-induzierenden Eigenschaften konnte beobachtet werden, daß die Deletion des C-Terminus (Δ C181) zu einer leichten Verstärkung der Apoptose führt. Eine weitere Deletion der Sequenz, die dem BH3-Motiv entspricht (Δ C154), resultiert dagegen in einer drastischen Reduktion der proapoptischen Aktivität (siehe Abb. 2.2.9.1).

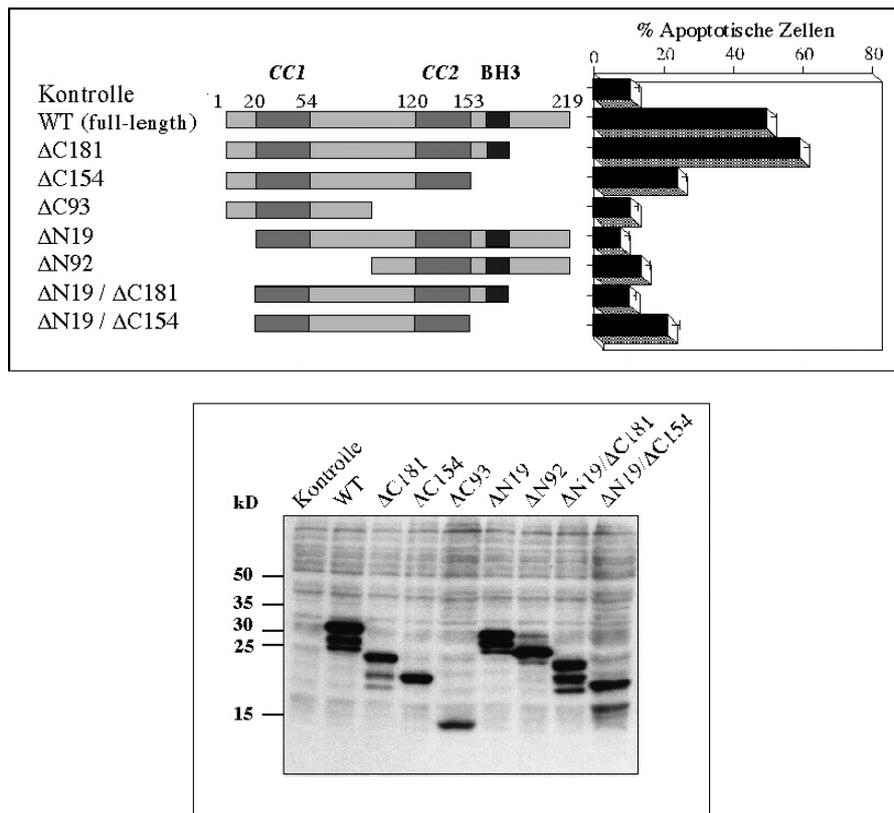


Abb. 2.2.9.1: Mapping des proapoptischen Signals in der Spike-Sequenz. Links, schematische Darstellung der Spike-Deletionsmutanten und deren proapoptische Aktivität in HeLa-Zellen. Die quantitative Auswertung erfolgte durch FACS-Analyse 40 h nach der Transfektion. (*CC-coiled coil*). Rechts, der Expressionsnachweis der einzelnen Konstrukte erfolgte mittels Immunoblot-Analyse mit einem Anti-HA Antikörper; alle Konstrukte sind C-terminal HA-getagt.

Eine zusätzliche Deletion der zweiten *coiled coil*-Domäne (*CC2*) verringerte die Apoptoseinduktion auf Hintergrundniveau. Interessanterweise hatte eine Deletion der N-terminalen 19 Aminosäurereste ($\Delta N19$) den gleichen Effekt. Alle weiteren Deletionskonstrukte schwankten in ihrer proapoptischen Aktivität um das Hintergrundniveau (siehe Abb. 2.2.9.1). Sowohl der N-Terminus ($\Delta C93$) als auch der C-terminale Teil inklusive des BH3-Motivs ($\Delta N92$) sind allein nicht in der Lage, Zelltod zu induzieren. Es zeigte sich also, daß das BH3-Motiv in der Spike-Sequenz neben den N-terminalen 19 Aminosäureresten für eine effiziente Apoptoseinduktion durch Spike notwendig ist. Um die Bedeutung dieses BH3-Motivs genauer zu analysieren, wurden Punktmutanten von kritischen und in Bezug auf andere Bcl-2-Familienmitglieder konservierten Aminosäurereste hergestellt. Wie in Abb. 2.2.9.2 ersichtlich, resultiert jede Mutation zu einem ungeladenen Aminosäurerest in einer Reduktion der Apoptose. Ein

Austausch von Leucin-170 zu dem geladenen Arginin zeigte dagegen offensichtlich keinen Effekt, ebenso wie die Mutation der Leucine-174/5 zu Argininen nur unwesentlich die proapoptotische Aktivität beeinflusst (Abb. 2.2.9.2).

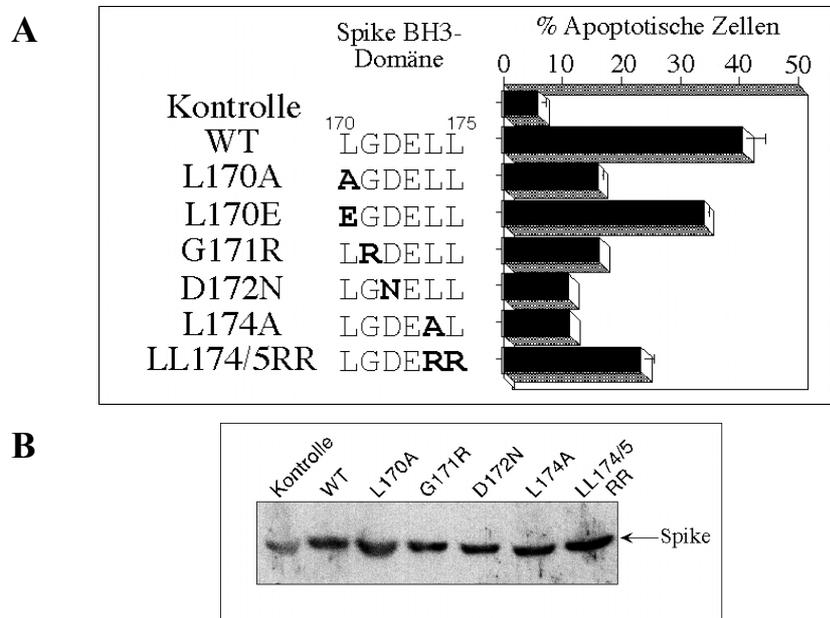


Abb. 2.2.9.2: Einfluß von Punktmutationen in der BH3-Sequenz auf die proapoptotische Aktivität von Spike. **A**, Darstellung der Spike-Punktmutanten und deren proapoptotische Aktivität in HeLa-Zellen. Die quantitative Auswertung erfolgte durch FACS-Analyse 48 h nach der Transfektion. **B**, Der Expressionsnachweis der einzelnen, ungetagten Konstrukte erfolgte mittels Immunoblot-Analyse mit dem Spike-Antiserum.

2.2.10 Spike interagiert nicht mit Bcl-2, Bcl-X_L oder Bax

Die BH3-Domäne ist charakteristisch für Mitglieder der Bcl-2-Familie. Entscheidend für deren pro- bzw. antiapoptotische Wirkungsweise ist die Eigenschaft, funktionell zu interagieren. Die verschiedenen Familienmitglieder bilden Homo- und Heterodimere, die je nach Zusammensetzung pro- oder antiapoptotisch wirken. Nach dem aktuellen Modell beeinflussen bestimmte proapoptotische Signale die Verfügbarkeit und Aktivität der einzelnen Familienmitglieder und damit die Zusammensetzung der Dimere (siehe Kap. 1.6.1). Aufgrund der Bedeutung der BH3-Domäne von Spike für dessen proapoptotische Aktivität wurde getestet, ob Spike mit anderen Mitgliedern der Bcl-2-Familie heterodimerisieren kann. Überraschenderweise konnte keine Interaktion von Spike mit Bcl-

2, Bcl-X_L oder Bax weder über *Two-Hybrid* in Hefe (nicht gezeigt) noch in Immunpräzipitationsexperimenten nachgewiesen werden (siehe Abb. 2.2.10). In parallelen Kontrollexperimenten wurden dagegen Interaktionen von Bcl-2, Bcl-X_L und Bax miteinander demonstriert.

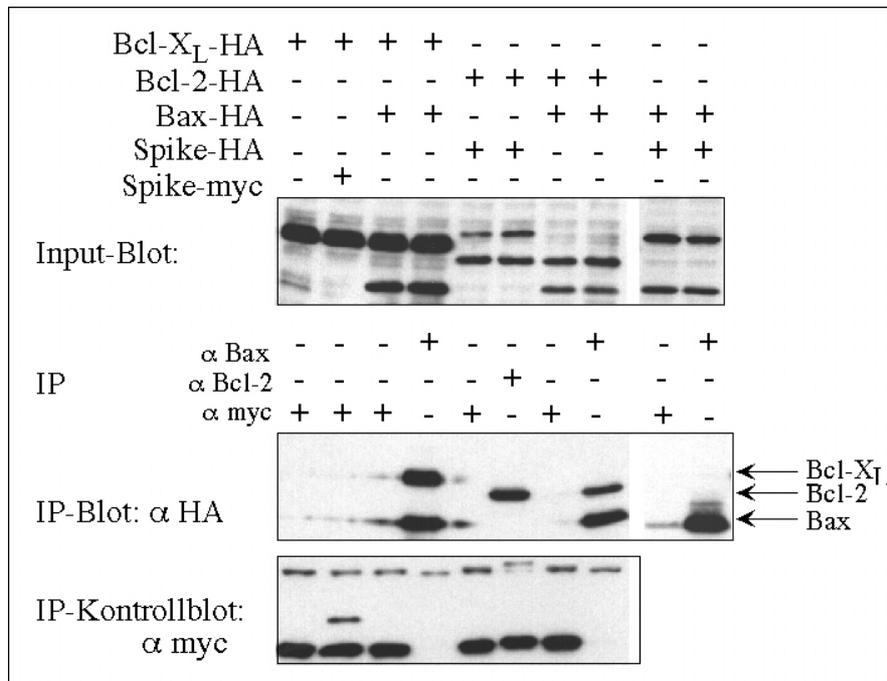


Abb. 2.2.10: Test einer Spike-Interaktion mit Bcl-2, Bcl-X_L und Bax durch Ko-Immunpräzipitation. Die jeweiligen Konstrukte wurden wie oben gekennzeichnet in 293T-Zellen transfiziert und mit den angegebenen Antikörpern (Mitte) immunpräzipitiert. Der Nachweis erfolgte jeweils über Immunoblot-Analyse. Als Negativ-Kontrolle diente in den meisten Fällen der Anti-myc-Antikörper.

2.2.11 *Spike homomerisiert unabhängig von der BH3-Domäne*

Viele Bcl-2-Mitglieder sind zur Selbst-Assoziation in der Lage (Kelekar und Thompson, 1998). Diese Aktivität wurde auch bei den BH3-*only*-Proteinen Bid (2002) und Bnip3 (Ray et al., 2000) gefunden. Zusätzlich zu den bisher identifizierten BH3-*only*-Proteinen ist Spike in der Lage, Homomere zu bilden. In Immunpräzipitationen mit unterschiedlich getagten Spike-Konstrukten konnte gezeigt werden, daß Spike mit sich selbst interagiert (siehe Abb. 2.2.11). Dabei ist diese Interaktion offensichtlich unabhängig von der BH3-Domäne, da die Deletionsmutante ΔC154 ohne BH3-Domäne dennoch mit WT-Spike

immunpräzipitiert werden kann. Dagegen scheinen beide *coiled-coil*-Domänen bei der Homomerbildung von Spike eine Rolle zu spielen, da bereits das Fehlen einer der zwei *coiled-coil*-Domänen in $\Delta N92$ bzw. $\Delta C93$ eine Co-Immünpräzipitation mit WT-Spike verhindert (siehe Abb. 2.2.11).

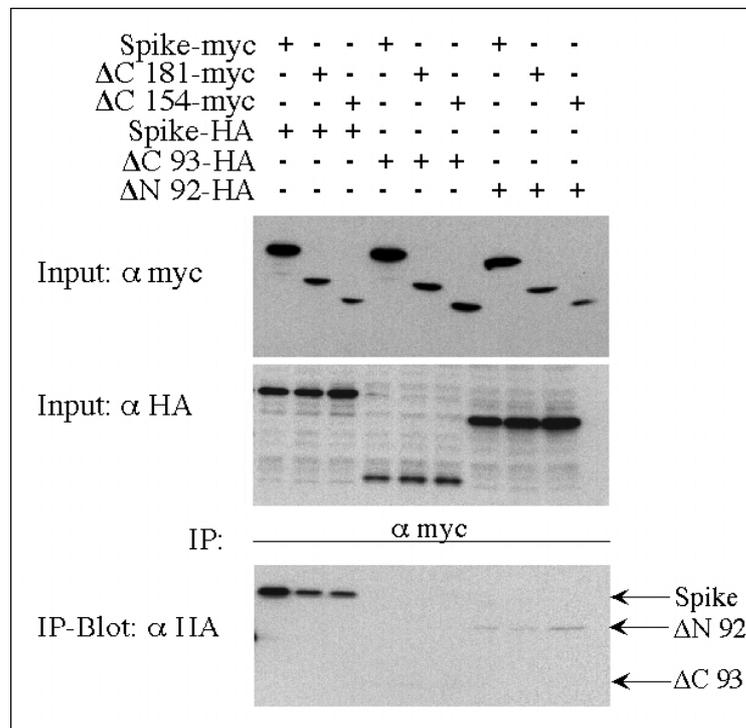


Abb. 2.2.11: Co-Immünpräzipitation verschiedener Spike-Konstrukte. Mit myc und HA getagte Spike-Konstrukte wurden wie angegeben in 293T-Zellen transfiziert und mit einem Anti-myc Antikörper immunpräzipitiert. Der Nachweis erfolgte über Immunoblot-Analysen mit den angegebenen Antikörpern.

2.2.12 *Spike interagiert mit Bap31 am ER*

Die Lokalisation von Spike am ER und die Hinweise eines Apoptose-regulatorischen, durch anti-apoptische Mitglieder der Bcl-2-Familie kontrollierten Komplexes von Bap31 am ER, veranlaßten einen Test, ob Spike in die Regulation dieses Komplexes eingreift. In Immunfluoreszenz-Experimenten mit stabil Bap31-myc exprimierenden MCF-7-Zellen wird eine teilweise Colokalisation zwischen endogenem Spike und Bap31 deutlich (siehe Abb. 2.2.12.2).

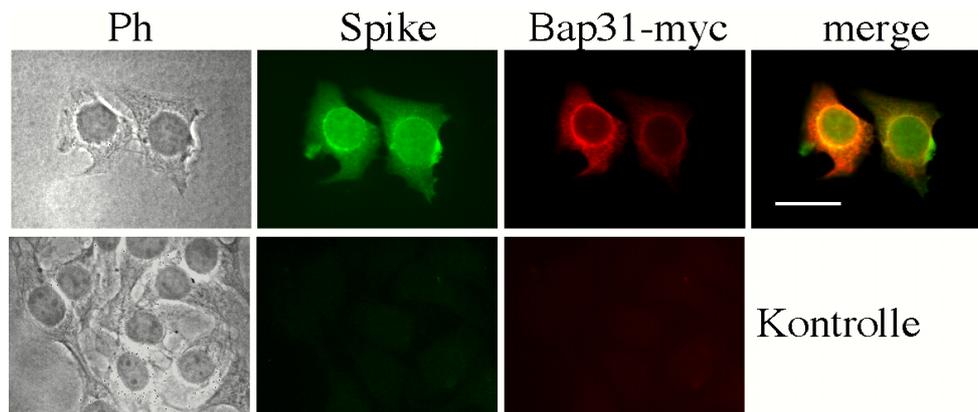


Abb. 2.2.12.1: Test auf Colokalisation von Spike und Bap31 mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Dargestellt sind MCF-7-Zellen mit stabil integriertem myc getagtem Bap31 als Phasenkontrastaufnahme (Ph, links), welche mit dem Spike-Antiserum (Spike, grün) und einem Anti-myc Antikörper (rot) getestet wurden. Zur Detektion wurden mit AlexaGreen (Spike) und Rhodamine (Bap31) fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper verwendet. Rechts ist jeweils eine Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen dargestellt (*merge*). Als Kontrolle (unten) wurde kein Primärantikörper verwendet. Der Balken entspricht 50 μm .

Interessanterweise konnte eine Assoziation von Spike mit Bap31 in Immunpräzipitationen nachgewiesen werden (siehe Abb. 2.2.12.1). Dabei war es möglich einerseits mit Spike Bap31 zu präzipitieren und umgekehrt konnte mit Bap31 auch Spike copräzipitiert werden.

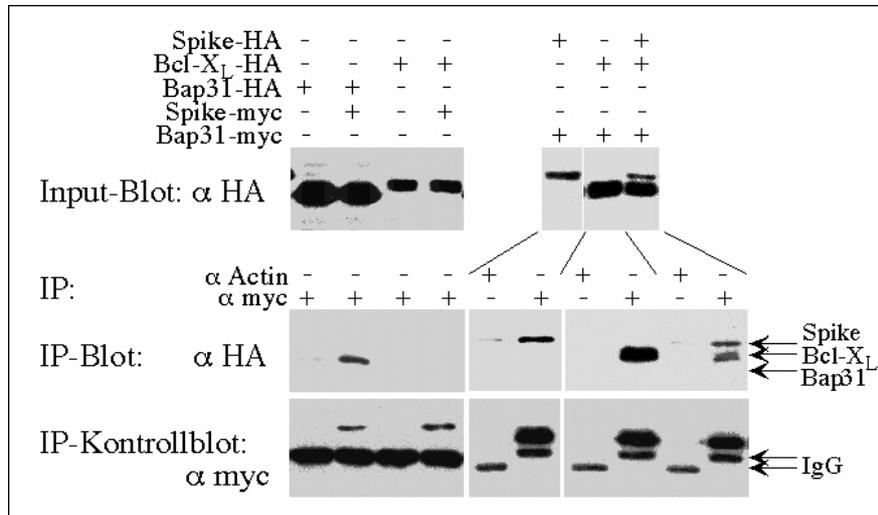


Abb. 2.2.12.2: Test einer Spike-Interaktion mit Bap31 durch Co-Immunpräzipitation. Die jeweiligen Konstrukte wurden wie oben gekennzeichnet in 293T-Zellen transfiziert und mit den angegebenen Antikörpern (Mitte) immunpräzipitiert. Der Nachweis erfolgte jeweils über Immunoblot-Analyse. Als Negativ-Kontrolle diente in den meisten Fällen der Anti-Aktin-Antikörper.

2.2.13 Apoptose-induzierende Spike-Deletionsmutanten interagieren mit Bap31 in Abhängigkeit vom N-Terminus und unabhängig von der BH3-Domäne

Um zu untersuchen, welche Sequenzbereiche von Spike für eine Assoziation mit Bap31 verantwortlich sind, wurden Immunpräzipitationen mit verschiedenen Deletionsmutanten von Spike durchgeführt. Dabei interagieren neben WT-Spike auch $\Delta C181$ und $\Delta C154$ mit Bap31, nicht jedoch die N-terminal um 19 Aminosäurereste verkürzte Variante $\Delta N19$ (siehe Abb. 2.2.13).

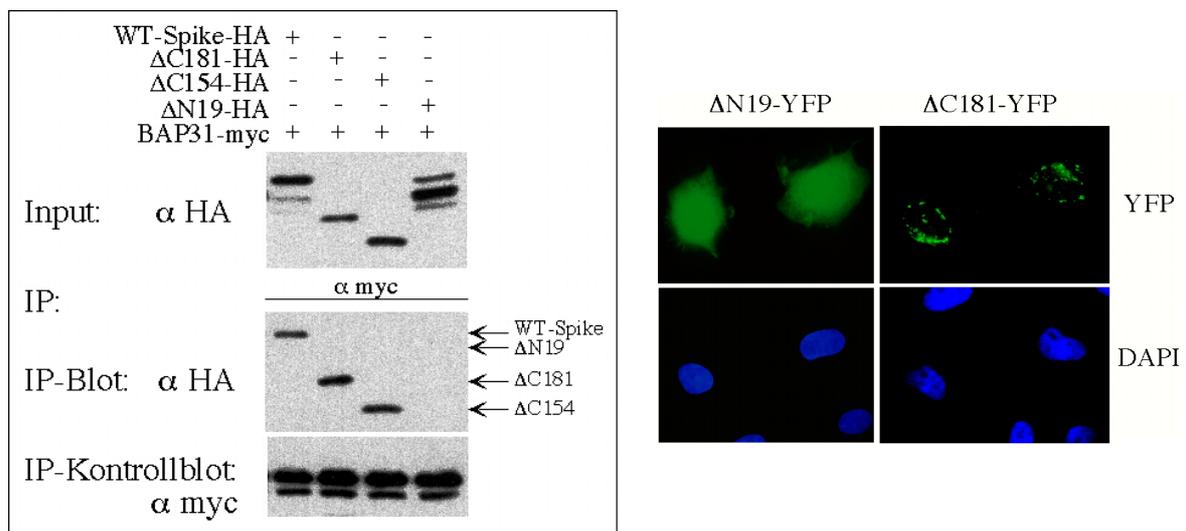


Abb. 2.2.13: Test verschiedener Spike-Deletionsmutanten auf Assoziation mit Bap31 durch Co-Immunpräzipitation und subzelluläre Lokalisation. Links, Die jeweiligen Konstrukte wurden wie oben gekennzeichnet in 293T-Zellen transfiziert und mit einem Anti-myc Antikörper immunpräzipitiert. Der Nachweis erfolgte über Immunoblot-Analysen. **Rechts,** Die C-terminal mit YFP fusionierten Konstrukte wurden wie angegeben in HeLa-Zellen transfiziert. 18 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit DAPI gefärbt.

Obwohl $\Delta C154$ im Vergleich zu WT-Spike und $\Delta C181$ deutlich schwächer Apoptose induziert (siehe Abb. 2.2.9.1), ist eine Korrelation zwischen einer Interaktion mit Bap31 und der Zelltodaktivität der Spike-Deletionsmutanten erkennbar. Im Gegensatz zu den anderen hier getesteten Konstrukten induziert $\Delta N19$ keine Apoptose und ist nicht mit Bap31 assoziiert. Diese Ergebnisse werden auch durch die subzelluläre Lokalisation der Konstrukte unterstützt. So ist die Deletionsmutante $\Delta N19$ als YFP-Fusionsprotein gleichmäßig in der Zelle verteilt, wohingegen beispielsweise $\Delta C181$ -YFP mit intaktem N-

Terminus eine punktierte perinukleäre Verteilung zeigt (siehe Abb. 2.2.13/rechts). Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß eine Interaktion am ER mit Bap31 eine Voraussetzung für Spike-vermittelten Zelltod ist.

2.2.14 Spike induziert die caspase-abhängige Prozessierung von Bap31

Der C-terminale cytoplasmatische Teil von Bap31 enthält eine *coiled-coil*-Domäne mit Sequenzhomologien zu den *death effector*-Domänen von Procaspase-8 und -10 (siehe Kap. 1.4.1 und Abb. 1.3.1). Es konnte gezeigt werden, daß Bap31 nach Apoptosestimulation eine ER-spezifische Isoform von Caspase-8 (Procaspase-8L) bindet (Breckenridge et al., 2002). Procaspase-8L wird durch einen Mechanismus prozessiert, der durch Bcl-2 inhibierbar und abhängig von Bap31 ist. Dabei ist Bap31 selbst ein Caspase-8-Substrat. Es enthält zwei identische Caspaseschnittstellen im C-terminalen cytoplasmatischen Teil (siehe Abb. 2.2.14). Ein nach Prozessierung durch Caspase-8 entstehendes 20 kD Fragment von Bap31 besitzt pro-apoptotische Eigenschaften und trägt somit vermutlich zur Amplifikation des Apoptosesignals bei (Ng et al., 1997; Nguyen et al., 2000).

Um die Relevanz der Spike-Interaktion mit Bap31 bezüglich des Spike-vermittelten Zelltods genauer zu untersuchen, wurde getestet, ob Bap31 bei Spike-Expression proteolytisch prozessiert wird. Da die Caspaseschnittstellen in Bap31 im C-terminalen Teil lokalisiert sind, wurde zum Nachweis des Abbauproduktes ein Bap31-YFP-Fusionskonstrukt verwendet, wie in Abb. 2.2.14/A ersichtlich. Zu einem Zeitpunkt, bei dem unter den experimentellen Bedingungen durch Spike noch keine signifikante Apoptoseinduktion bezüglich DNA-Degradation nachweisbar war, konnte jedoch bereits eine deutliche Prozessierung von Bap31 nachgewiesen werden (siehe Abb. 2.2.14/B). Indirekt wurde damit auch die Aktivierung von Bap31-spezifischen Caspasen nachgewiesen, nach dem derzeitigen Wissen vermutlich Caspase-8L (Breckenridge et al., 2002). Als Kontrolle diente das (soweit bekannt) Mitochondrien-spezifische Bax, welches trotz signifikanter Apoptoseinduktion kaum zur Prozessierung von Bap31 führt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Caspase-vermittelte Prozessierung von Bap31 ein

kinetisch frühes Ereignis bei der Spike-induzierten Apoptose darstellt. Dies unterstreicht die Relevanz der Interaktion von Spike mit Bap31 für den Spike-vermittelten Zelltod.

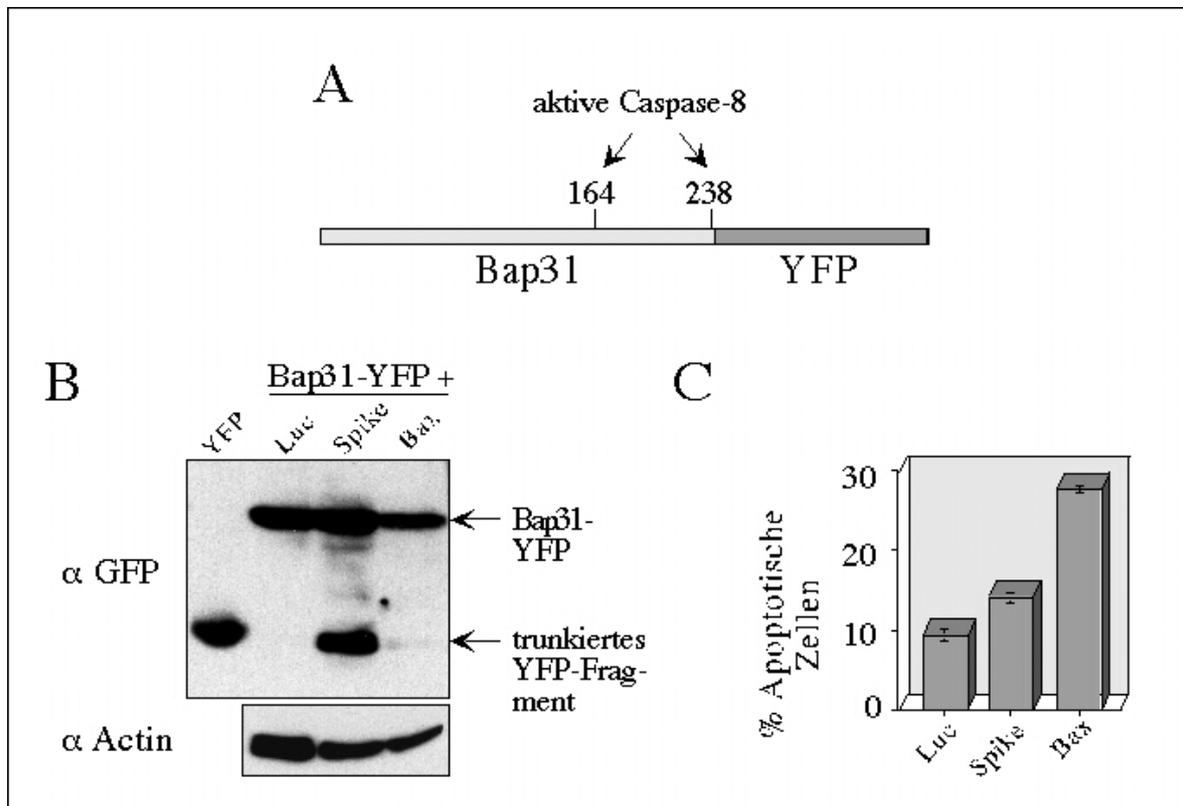


Abb. 2.2.14: Spike induziert die caspase-abhängige Prozessierung von Bap31. (A), Schematische Darstellung des verwendeten Bap31-YFP-Konstruktes und Lage der Caspaseschnittstellen in der Bap31-Sequenz. (B), Die jeweiligen Konstrukte (1 μ g) wurden wie oben gekennzeichnet in HeLa-Zellen (10cm Gewebekulturschalen) mit Bap31-YFP (100ng) kotransfiziert und mittels Immunoblot mit einem GFP-Antikörper (Santa Cruz) analysiert. Als Ladekontrolle diente ein α Aktin-Immunoblot. Als Größenmarker diente YFP. (C), Die quantitative Auswertung des Anteils apoptotischer Zellen dieses Versuches erfolgte durch FACS-Analyse 18 h nach der Transfektion. Die quantitativen Angaben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei Messungen.

2.2.15 *Spike verhindert die Komplexbildung zwischen Bcl-X_L und Bap31*

Neben Spike interagieren wie bereits erwähnt die anti-apoptotischen Bcl-2 und Bcl-X_L mit Bap31. Dabei war es interessant herauszufinden, ob Spike in einem von Bcl-2 oder Bcl-X_L inhibierten Komplex mit Bap31 zu finden ist oder unabhängig mit Bap31 interagiert. Wie

in Abb. 2.2.15.1 ersichtlich, konnten mit Bap31 sowohl Spike als auch Bcl-X_L gleichzeitig präzipitiert werden, wobei jedoch die Menge an präzipitiertem Bcl-X_L im Vergleich zur IP ohne Spike drastisch verringert war. Um diesen Sachverhalt genauer zu untersuchen, wurden steigende Mengen der mit Bap31 interagierenden Spike-Konstrukte (WT, ΔC181 und ΔC154) zusammen mit einer konstanten Menge an Bcl-X_L für Immunpräzipitationsexperimente transfiziert. Abb. 2.2.15.1 verdeutlicht, daß die Assoziation von Bcl-X_L mit Bap31 signifikant reduziert wird, wenn bei gleichbleibender Bcl-X_L-Expression steigende Mengen der getesteten Spike-Konstrukte transfiziert werden. Gleichzeitig nimmt die Interaktion zwischen den Spike-Konstrukten und Bap31 zu.

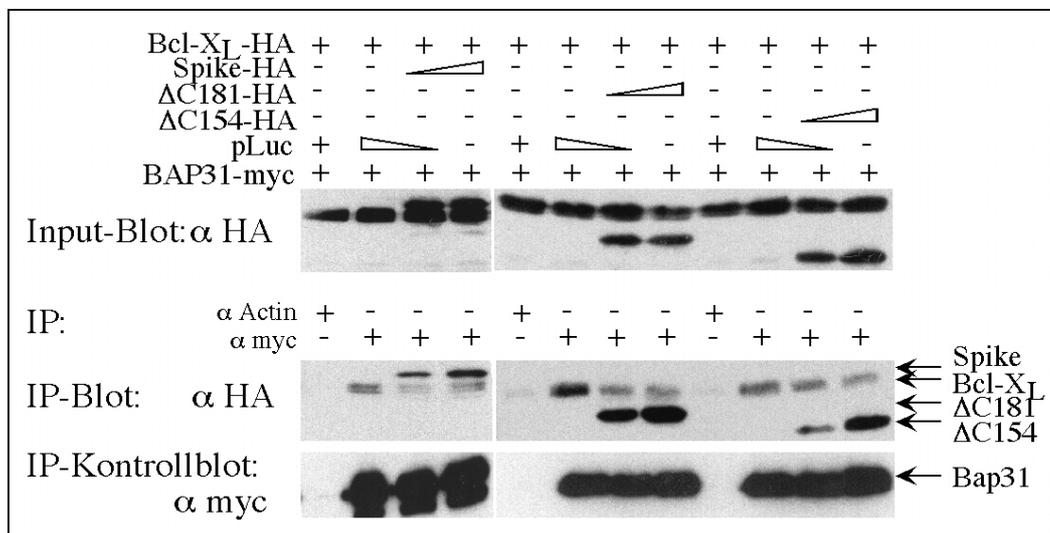


Abb. 2.2.15.1: Spike verhindert die Komplexbildung zwischen Bcl-X_L und Bap31. Die jeweiligen Konstrukte wurden wie oben gekennzeichnet in 293T-Zellen transfiziert und mit den angegebenen Antikörpern (Mitte) immunpräzipitiert. Die steigenden Mengen transfizierter Spike-Konstrukte (3 bzw. 10 μg) wurden jeweils durch geringere Mengen transfizierter Luciferase (10 bzw. 7 μg) ausgeglichen. Der Nachweis erfolgte jeweils über Immunoblot-Analyse. Als Negativkontrolle diente der Anti-Actin-Antikörper. (pLuc-Luciferase-Plasmid)

Die Tatsache, daß Spike die Komplexbildung zwischen Bcl-X_L und Bap31 verhindert, eröffnet eine mechanistische Erklärungsmöglichkeit, wie Spike bei Überexpression Apoptose induzieren kann. So könnte durch Überexpression aktiviertes Spike Bcl-X_L von Bap31 verdrängen und mit Bap31 einen pro-apoptotischen Komplex formen. Demnach müßte Bcl-X_L ein potenter Inhibitor für Spike-induzierte Apoptose sein. Bei einer

Kotransfektion mit Spike kann Bcl-X_L wie erwartet den Spike-induzierten Zelltod komplett inhibieren (siehe Abb. 2.2.15.2).

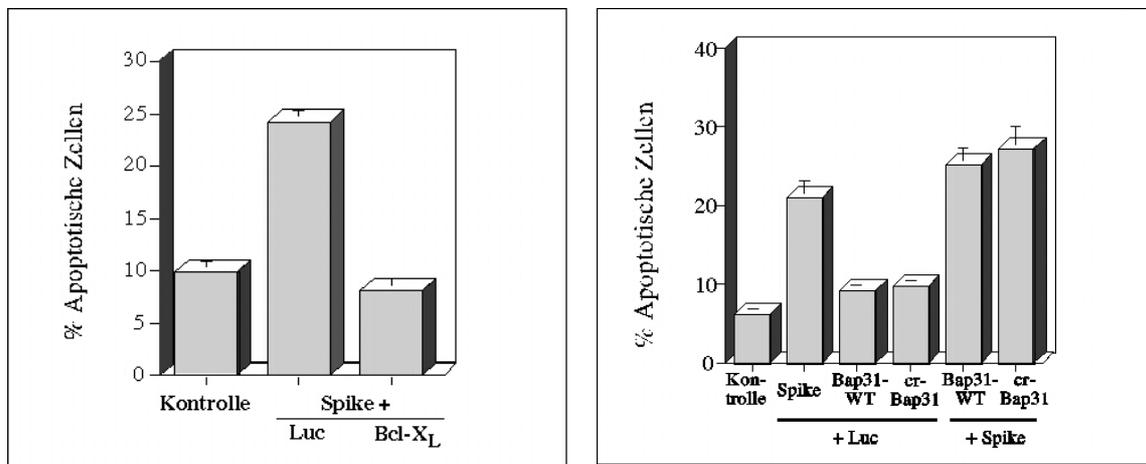


Abb. 1.2.15.2: Inhibition Spike-vermittelter Apoptose durch Bcl-X_L, jedoch nicht mit caspase-resistentem Bap31. Links, *Inhibition Spike-vermittelter Apoptose durch Bcl-X_L* Rechts, *Keine Inhibition von Spike-induziertem Zelltod mit Bap31 oder caspase-resistentem Bap31*. HeLa-Zellen wurden mit Luciferase (Kontrolle), sowie Spike mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. Die quantitative Auswertung des Anteils apoptotischer Zellen erfolgte durch FACS-Analyse 36 h (links) bzw. 24 h (rechts) nach der Transfektion. Die quantitativen Angaben sind Mittelwerte +/- Standardabweichung aus mindestens drei Experimenten. (Luc-Luciferase, cr-caspase-resistent)

Wie bereits erwähnt enthält Bap31 als Caspase-8-Substrat zwei identische Caspaseschnittstellen im C-terminalen cytoplasmatischen Teil. Es wurde gezeigt, daß eine caspase-resistente Bap31-Mutante (cr-Bap31), die stabil in KB-Zellen exprimiert wird, zwar nur einen geringen Einfluß auf die Fas-induzierte Caspase-Aktivierung und Spaltung von Caspasesubstraten hatte, jedoch inhibierte sie den Cytochrome c-Austritt, die Mitochondriendepolarisation, sowie die Reorganisation des Zytoskeletts und verhinderte somit die Bildung sogenannter apoptotischer Körperchen (siehe Kap. 1.8.4, Nguyen et al., 2000). Wie in Abb. 2.2.15.2 dargestellt, kann eine solche caspase-resistente Bap31-Mutante unter den angewendeten Bedingungen jedoch nicht die von Spike induzierte Apoptose inhibieren. Der durch Spike initiierte Zelltod scheint demnach unabhängig von Caspase-prozessierten Bap31-Fragmenten zu sein und wird vermutlich unter anderem von Spike-aktivierter Caspase-8L vermittelt (siehe Abb. 2.2.14).

2.2.16 Spike ist an der Fas-induzierten Apoptose beteiligt

2.2.16.1 Die Deletionsmutante $\Delta N19$ inhibiert effizient Spike-vermittelten Zelltod

Um die Wirkungsweise von Spike und dessen Beteiligung an bekannten Apoptosewegen untersuchen zu können, war es notwendig, spezifisch endogenes Spike zu inhibieren oder dessen Expression zu reprimieren. Eine Möglichkeit dafür ist die Transfektion einer dominant-negativen Form. Da Spike mit sich selbst interagiert und Homomere bildet, lag es Nahe, die zur Verfügung stehenden nicht-apoptotischen Spike-Deletionskonstrukte bei der Suche nach einer dominant-negativen Variante einzusetzen. Dabei wurde zunächst versucht, die von Spike selbst induzierte Apoptose mit einem der Konstrukte zu reprimieren. Überraschenderweise erwies sich die N-terminal um 19 Aminosäurereste verkürzte Variante $\Delta N19$ (Abb. 2.2.13) als effizienter Inhibitor Spike-vermittelten Zelltods (siehe Abb. 2.2.16.1/links). Die Mutante $\Delta N92$ zeigte ebenfalls einen (wenn auch geringeren) inhibitorischen Effekt, $\Delta C93$ war dagegen wirkungslos.

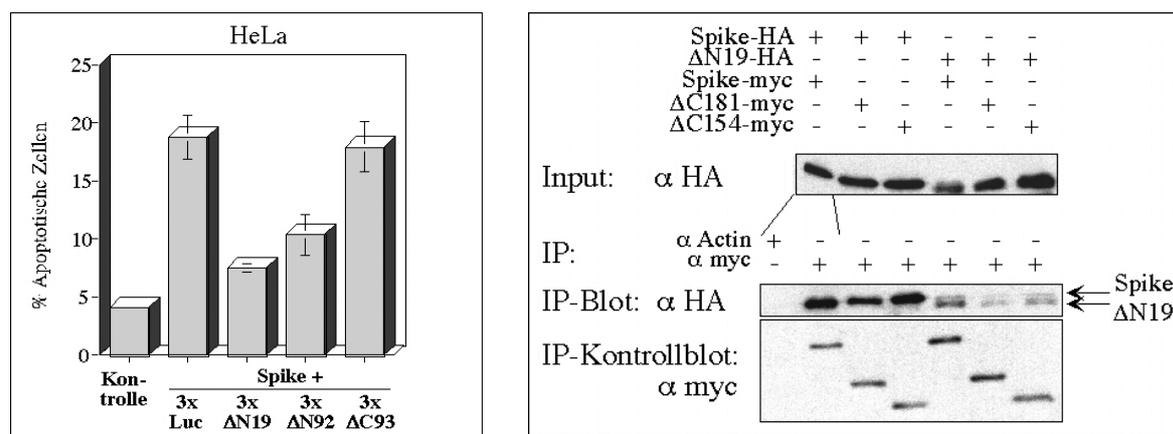


Abb. 2.2.16.1: Inhibition Spike-vermittelter Apoptose durch $\Delta N19$. Links, HeLa-Zellen wurden mit Luciferase (Kontrolle), sowie Spike mit einem dreifachen Überschuß der angegebenen Konstrukte transfiziert. Die quantitative Auswertung des Anteils apoptotischer Zellen erfolgte durch FACS-Analyse 24 h nach der Transfektion. Die quantitativen Angaben sind Mittelwerte +/- Standardabweichung aus mindestens drei Experimenten. (Luc-Luciferase) Rechts, Interaktionstest von $\Delta N19$ mit WT-Spike, $\Delta C181$ und $\Delta C154$ mittels Ko-Immünpräzipitation. Die jeweiligen Konstrukte wurden wie oben gekennzeichnet in 293T-Zellen transfiziert und mit den angegebenen Antikörpern (Mitte) immunpräzipitiert. Der Nachweis erfolgte jeweils über Immunoblot-Analyse. Als Negativ-Kontrolle diente der Anti-Aktin-Antikörper.

Eine mögliche Erklärung für die dominant-negative Eigenschaft von $\Delta N19$, obwohl diese Mutante nicht mit Bap31 am ER assoziiert ist, könnte die Tatsache liefern, daß $\Delta N19$ dennoch mit allen Apoptose-induzierenden Spike-Konstrukten (WT, $\Delta C181$ und $\Delta C154$) di- oder oligomerisieren kann, wie in Immunpräzipitationen (Abb. 2.2.16.2/ rechts) nachgewiesen wurde.

2.2.16.2 *Repression der Spike-Expression mit Hilfe eines Antisense-Oligonukleotids*

Die Analyse einer Beteiligung von Spike an spezifischen Apoptosewegen wurde ebenfalls durch die Identifizierung eines Antisense-Oligonukleotids möglich, welches effektiv die Spike-Expression reprimiert. Nur eines von vier getesteten Antisense-Oligonukleotide war wirksam (siehe Abb. 2.2.16.2).

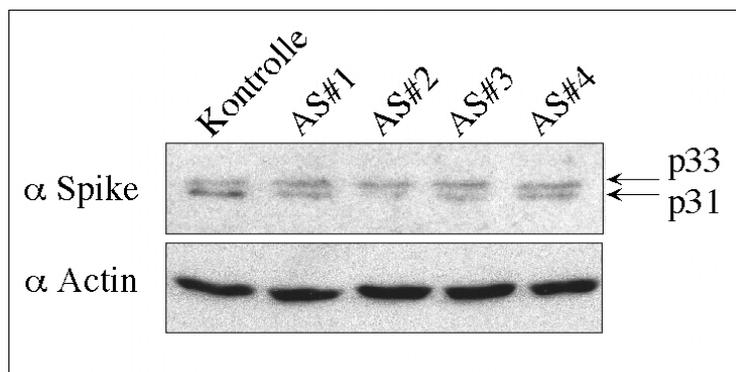


Abb. 2.2.16.2: Test verschiedener Antisense-Oligonukleotide auf Repression endogener Spike-Expression. Die angegebenen Antisense-Oligonukleotide wurden mit der Calciumphosphat-Präzipitationsmethode in HeLa-Zellen transfiziert und 24 h nach der Transfektion mittels Immunoblot mit dem Spike-Antiserum analysiert (oben). Als Ladekontrolle wurde der gleiche Blot mit einem Aktin-Antikörper getestet (unten).

2.2.16.3 *Loss-of-function von Spike reduziert Fas-induzierte Apoptose*

Wie bereits erwähnt (Kap. 1.8.4) ist der Bap31-Komplex auch an der Apoptoseinduktion durch den Fas-Rezeptor beteiligt, zumindest in einigen Zelltypen (Typ II), die eine Beteiligung von Mitochondrien benötigen. Mit Hilfe der dominant-negativen Spike-Mutante $\Delta N19$ und des Antisense-Oligonukleotids #2 war es möglich, eine Beteiligung von Spike an bekannten Apoptosewegen zu analysieren. Hierzu wurden HeLa-Zellen verwendet, welche sich aus anderen Versuchen im Labor als Typ II-Zellen herausstellten.

Bei der Transfektion von HeLa-Zellen mit $\Delta N19$ konnte festgestellt werden, daß $\Delta N19$ im Gegensatz zum allgemeinen Apoptoseinhibitor Bcl-X_L und einer dominant-negativen (dn) Form von FADD, bei der die DED deletiert ist (Grimm et al., 1996), spezifisch die Fas-, nicht jedoch die TNF α -induzierte Apoptose reduziert (siehe Abb. 2.2.16.3).

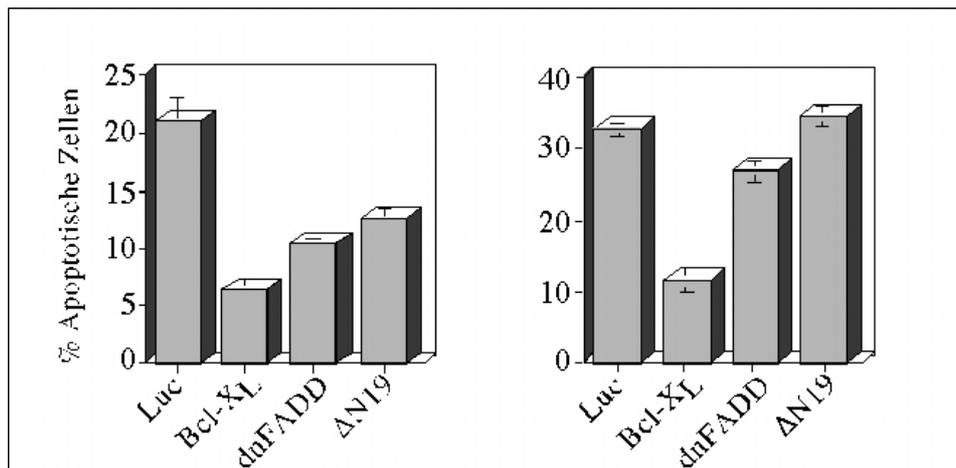


Abb. 2.2.16.3: Spike- $\Delta N19$ reduziert Fas-induzierte Apoptose. HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und nach Stimulation mit Fas (100 ng/ml, IFN γ 100 U/ml, 8 h) oder TNF α (50 ng/ml, Act.D 0,2 μ g/ml, 24h) unter den in der Abbildung ersichtlichen Bedingungen wurde der Anteil apoptotischer Zellen über FACS-Analyse quantifiziert. Die quantitativen Angaben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei Experimenten.

Eine Spezifität von Spike für den Fas-Rezeptorweg konnte auch mit dem Antisense-Oligonukleotid #2 demonstriert werden. HeLa-Zellen wurden mit dem Antisense-Oligonukleotid #2 bzw. einem mit fünf Basenaustauschen versehenen Kontrolloligonukleotid transfiziert und anschließend mit einem Fas-Antikörper, TNF α bzw. Anisomycin stimuliert. Die quantitative Auswertung des Anteils apoptotischer Zellen mittels FACS-Analyse ergab eine Reduktion Fas-induzierter Apoptose bei gleichzeitiger Kontrolle auf Spike-Repression durch einen Immunoblot (siehe Abb. 2.2.16.4). Dagegen konnte keine (Anisomycin) bzw. nur eine sehr geringe (TNF α) Reduktion anderer Apoptosesignale nach einer Repression der Spike-Expression beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine spezifische Beteiligung von Spike an Fas-vermittelten Zelltodwegen hin.

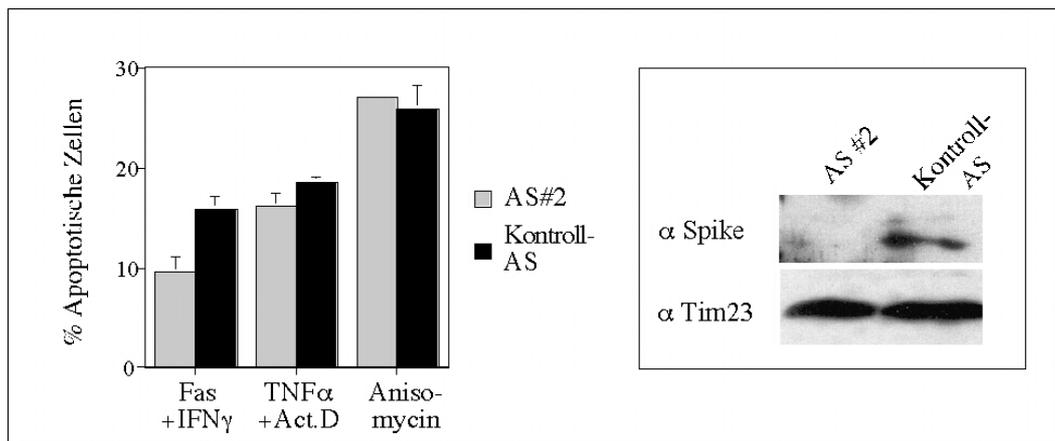


Abb. 2.2.16.4: Spike-Antisense-Oligonukleotid #2 reduziert Fas-induzierte Apoptose. Links, Spezifische Reduktion Fas-induzierter Apoptose. HeLa-Zellen wurden mit dem Antisense-Oligonukleotid #2 und einem Kontrolloligonukleotid, welches 5 Basenaustausche zum Referenzoligonukleotid enthält, transfiziert und nach Stimulation mit Fas (100ng/ml,) / IFN γ (75 U/ml), TNF α (50ng/ml) / Act.D (0,25 μ g/ml) oder Anisomycin (0,75 μ g/ml) wurde der Anteil apoptotischer Zellen 20 h nach der Transfektion und 4 h nach dem Mediumwechsel über FACS-Analyse quantifiziert. Die quantitativen Angaben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung minus Hintergrund aus drei Experimenten. **Rechts, Kontrolle auf Repression der Spike-Expression.** Die mit dem Antisense-Oligonukleotid #2 und dem Kontrolloligonukleotid transfizierten HeLa-Zellen aus dem links dargestellten Experiment wurden mittels Immunoblot mit dem Spike-Antiserum analysiert. Als Ladekontrolle wurde der gleiche Blot mit einem Tim 23-Antikörper getestet.

2.2.17 Verringerte Spike-Expression in spezifischen Tumoren

Zahlreiche Hinweise deuten verstärkt darauf hin, daß bei der Tumorgenese die Vermehrung eines transformierten Klonen nicht nur durch dessen erhöhte Proliferationsrate erreicht wird, sondern daß zusätzlich eine Resistenz in der Apoptoseinduktion für die meisten, wenn nicht sogar aller Tumore entscheidend ist (Strasser et al., 1997; Jäättelä et al., 1999; Hanahan und Weinberg, 2000). Aus diesem Grund wurde ein Northern-Blot mit einer Gegenüberstellung von RNA aus normalem zu Tumorgewebe von einer Vielzahl von Patienten auf Spike-Expression getestet (siehe Abb. 2.2.17.1).

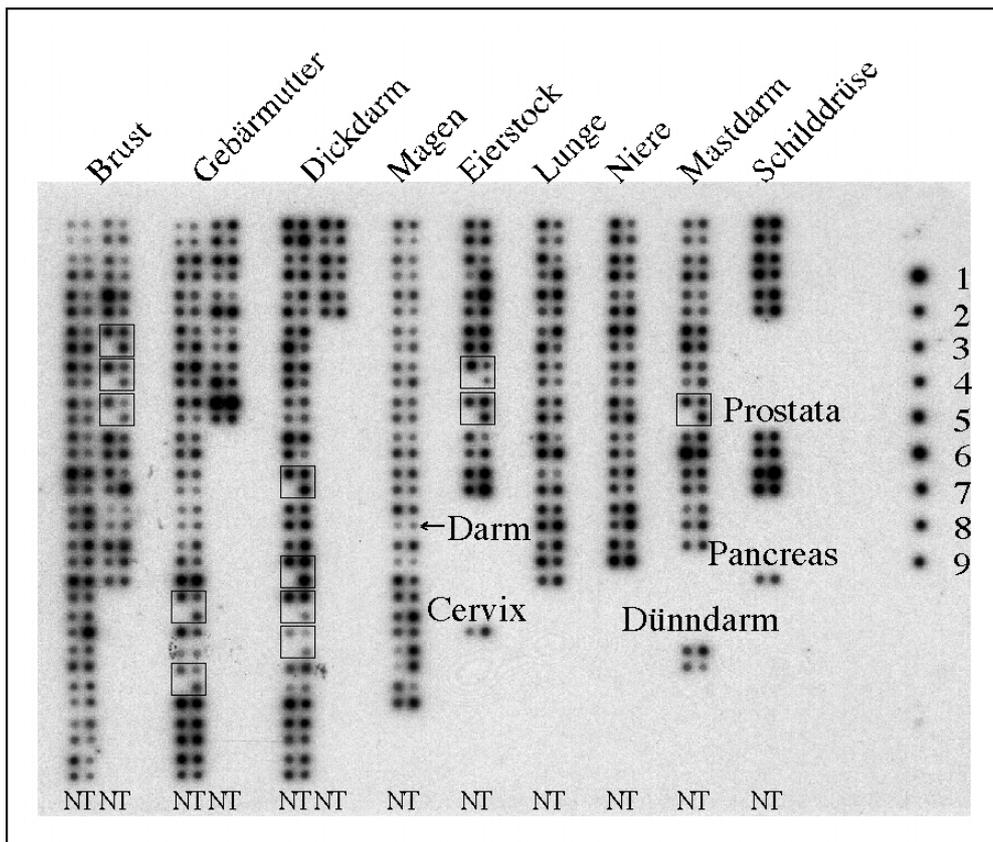


Abb. 2.2.17.1: Spike-Expression in einer Gegenüberstellung von Normal- (links, N) zu Tumorgewebe (rechts, T). Der Northern-Blot (Clontech) wurde mit ^{32}P -markierter Spike-Probe inkubiert und Spike-mRNA mittels Autoradiographie detektiert. Mit einem Quadrat umrandete Signale stammen aus einem Patienten, wobei die untere Probe jeweils aus Metastasengewebe isoliert wurde. Rechts sind Proben verschiedener Tumorzelllinien aufgetragen. (1, HeLa; 2, Daudi-Burkitt's Lymphom; 3, K562-Chronische myelogenöse Leukämie; 4, HL60-Promyelocytische Leukämie; 5, G361-Melanom; 6, A549-Lungencarcinom; 7, MOLT-4-Lymphoblastische Leukämie; 8, SW480-Colorectales Adenocarcinom; 9, Raji-Burkitt's Lymphom)

Interessanterweise variiert die Menge an Spike auch innerhalb eines Gewebes sehr stark. Deutlich wird auch, daß es in vielen Fällen Unterschiede zwischen den Proben von Normal- und Tumorgewebe der einzelnen Patienten gibt, sowohl mit stärkeren Spike-Signalen im Normalgewebe, wie auch umgekehrt. Um die Signalstärken genauer analysieren zu können, wurde die Membran auf einem PhosphoImiger (Fuji BAS-2500, Fujifilm) exponiert und die Signale mit Hilfe der Image Gauge V 3.01-Software densitometrisch quantifiziert. Zur besseren Veranschaulichung wurde vom Verhältnis der Signalstärken Tumor-/Normalgewebe jedes Patienten der natürliche Logarithmus gebildet und für die einzelnen Gewebearten ausgewertet.

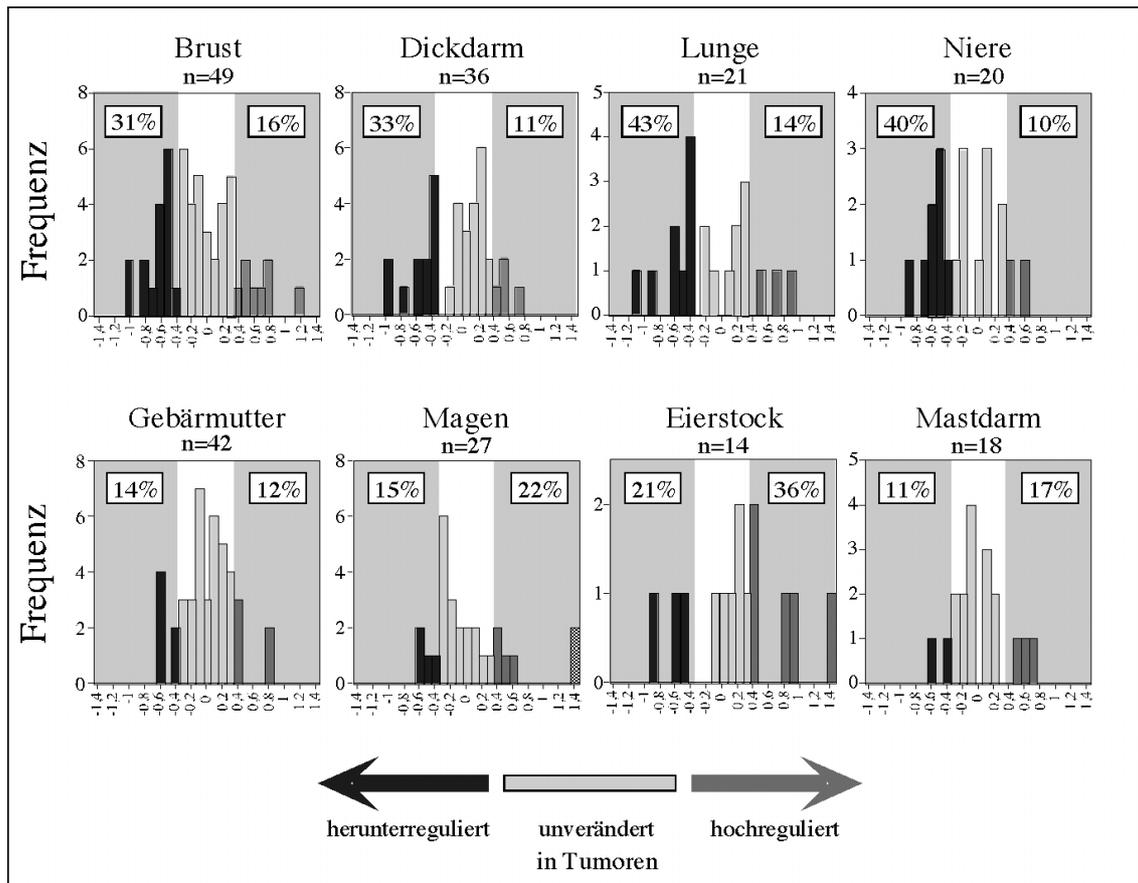


Abb. 2.2.17.2: Densitometrische Auswertung und graphische Darstellung des Spike-Signals aus dem Normal/Tumor-Northern. Aufgetragen ist die Häufigkeit der Signalstärkeverhältnisse zwischen Tumor- und Normalgewebe. Dieser Quotient ist als natürlicher Logarithmus dargestellt, wobei negative Werte ein Verhältnis kleiner als 1 verdeutlichen, also eine Abnahme des Spike-Signals in Tumoren. Als signifikant wurde ein densitometrischer Unterschied von mindestens 1,5-fach eingestuft, der in der Abbildung grau unterlegt und mit dem jeweiligen prozentualen Anteil angegeben wurde.

Die graphische Darstellung in Abb. 2.2.17.2 verdeutlicht, daß in vier der statistisch ausgewerteten acht Gewebe das Spike-Signal signifikant in Tumoren abnimmt. Als statistisch signifikant wurde ein densitometrischer Unterschied von mindestens 1,5-fach angesehen. Neben einer deutlichen Abnahme des Spike-Signals in Nierentumoren, kann dieses Phänomen auch in Brust-, Dickdarm- und Lungentumoren beobachtet werden. Keine statistischen Veränderungen des Spike-Transkriptes zwischen Normal- und Tumorgewebe wurden in Proben aus Gebärmutter, Magen, Eierstock oder Mastdarm gefunden (siehe Abb. 2.2.17.2).

3 Diskussion

3.1 Expressionsscreen nach dominant Apoptose-induzierenden Genen

Nach der Durchsequenzierung des humanen Genoms im Rahmen des humanen Genomprojektes, liegen enorme Sequenzinformationen vor, bezüglich kodierender und nicht-kodierender Bereiche. Von den etwa 34.000 identifizierten Genen sind bisher vergleichsweise nur wenige funktionell genauer charakterisiert (Venter et al., 2001). Demnach stellt es eine enorme Herausforderung für die heutige biologische Forschung dar, der wachsenden Sequenzinformation entsprechende Protein- und letztendlich Funktionsinformationen zuzuordnen.

Eine Möglichkeit zur Funktionsanalyse besteht in der sogenannten Expressionsklonierung. Hierfür existieren zwei klassische Ansätze (Simonsen und Lodish, 1994). Die erste Möglichkeit besteht in der Transfektion eines Klonpools, also einer unselektionierten Ansammlung von cDNAs, wobei transfizierte Zellen bezüglich einer bestimmten Funktion hin selektioniert und physikalisch von der Gesamtpopulation getrennt werden. Nach mehreren Selektions- und Isolationsrunden der Zellen werden die verantwortlichen Gene angereichert und können schließlich als Einzelklone genauer untersucht werden. Eine zweite Möglichkeit (*sib selection*) beinhaltet eine zunehmende Aliquotierung einer cDNA Bibliothek, wobei eine transfizierte Zellpopulation auf die Ausprägung einer bestimmten Funktion hin untersucht wird. Die Aliquotierung mit anschließender Reisolierung der Plasmid-DNA erfolgt solange, bis das für diese Funktion verantwortliche Gen angereichert ist und als Einzelklon vorliegt.

Bei beiden Ansätzen zur Expressionsklonierung wird von einer komplexen cDNA Bibliothek ausgegangen und die Zahl der Kandidatengene wird reduziert, indem transfizierte Zellen selektioniert und aus der Gesamtpopulation isoliert werden oder die Ausprägung einer bestimmten Funktion beobachtet wird und eine Anreicherung durch Reisolierung, Aliquotierung und Retransfektion der Plasmid-DNA erfolgt. Jede Transfektion

setzt jedoch eine vorherige Isolation von Plasmid-DNA voraus. Daher wäre die Transfektion einzelner cDNAs sehr aufwendig. Aus diesem Grund werden bei beiden Methoden zahlreiche Gene zeitgleich transfiziert. Ein Nachteil beider Methoden besteht in der daraus resultierenden geringen Sensitivität. Außerdem sind beide Methoden weniger für die Untersuchung von Apoptose-induzierenden Genen geeignet, da als Folge des Zelltods die apoptotischen Zellen aus der Gesamtpopulation verschwinden und sich daher nicht isolieren lassen. Mit den apoptotischen Zellen gehen dann auch diejenigen cDNAs verloren, die für die Induktion des Zelltods verantwortlich sind.

Aus diesem Grund wurde ein genetischer Expressionsscreen entwickelt, der speziell zur Identifikation dominanter, Apoptose-induzierender Gene geeignet ist (Grimm und Leder, 1997). Im Unterschied zu den klassischen Expressionsklonierungen werden bei dieser Methode einzelne cDNAs in Zellen transfiziert. Da keine cDNA-Pools transfiziert werden, erübrigt sich eine Selektion des gesuchten Gens. Die Untersuchung einer cDNA-Bibliothek setzt sehr viele solcher Transfektionen voraus. Da die notwendige Plasmid-DNA aber für jede Transfektion vorher isoliert werden muss, wurde hierfür ein einfach durchführbares Protokoll benutzt, welches die simultane Isolation von 96 cDNAs ermöglicht (Neudecker und Grimm, 2000).

Bei der Durchführung des *screens* wird ausgenutzt, dass Protein-Protein Interaktionen für die Induktion der Apoptose verantwortlich sind und die meisten Proteine proapoptotischer Signalwege die Eigenschaft haben, nach Überexpression dominant Apoptose zu induzieren (Yang et al., 1998). So wurde mit Hilfe dieses *screens* beispielsweise das Adaptorprotein FADD des Fas- und TNF-Rezeptorkomplexes isoliert (Chinnaiyan et al., 1996; Boldin et al., 1995). Neben zahlreichen mitochondrialen Proteinen wurden unter anderem auch die Bestandteile der *permeability transition pore* (PT-Pore) Ant-1 und VDAC-2 mit diesem *screen* identifiziert (Albayrak et al., 2002; Bauer et al., 1999; Martinou und Green, 2001; Zhoratti und Szabo, 1995). Zusätzlich wurden weitere Apoptose-relevante Gene gefunden, die Komponenten bekannter proapoptotischer Signalkaskaden sind, wie CIDE A (Nicole Schönfeld), CIDE B (Erik Braziulis) oder Bnip-3 (Ulla Cramer) (Inohara et al., 1998; Chen et al., 1997). CIDE-A und -B sind Mitglieder einer Familie von Apoptose-induzierenden

Proteinen, die Homologien zur N-terminalen Region des DNA Fragmentierungsfaktors (DFF) haben und im Zellkern DNA-Fragmentierung bewirken (Inohara et al., 1998). Bei Bnip-3 handelt es sich um ein proapoptotisches Protein der Bcl-2-Familie, ein BH3-*only*-Protein (Chen et al., 1997).

Durch diesen *screen* konnten Gene isoliert werden, die als Komponenten unterschiedlichster apoptotischer Signalwege wirken: sie sind Bestandteil von Rezeptorkomplexen an der Plasmamembran (FADD), der PT-Pore (z.B. Ant-1), oder aber sie vermitteln Zelltod im Zellkern (CIDE-A und -B). Mit Bnip-3 wurde sogar ein Mitglied der sehr vielseitig wirkenden Gruppe der BH3-*only*-Proteine identifiziert. Aufgrund dieser Gene war es sehr wahrscheinlich, mit Hilfe dieses *screens* noch weitere, unbekannte Komponenten dieser Signalwege zu identifizieren. Die Entdeckung unbekannter proapoptotischer Gene könnte außerdem dazu beitragen, noch nicht genauer charakterisierte proapoptotische Signalkomplexe aufzuklären.

Wie sich herausstellte, war das Potenzial des *screens* für die Entdeckung neuer unbekannter Apoptose-relevanter Komponenten enorm. Die zur genaueren Charakterisierung im Rahmen dieser Arbeit ausgewählte cDNA war so ein bislang nicht genauer beschriebenes Gen, welches einerseits evolutiv sehr stark konserviert war und andererseits ein neues, unbekanntes BH3-*only*-Protein darstellte: Spike (*Small protein with inherent killing effect*).

3.2 Evolutive Aspekte

Entfernte Spike-Homologe existieren in einer Vielzahl von Organismen (zB. in Hefen oder Pflanzen). Allerdings ist diese Homologie oftmals nur auf einen Sequenzbereich von zwei putativen *coiled coil*-Domänen begrenzt. Homologe Proteine, bei denen sich die Sequenzhomologien über die gesamte Spikesequenz inklusive der BH3-Domäne erstreckt, existieren neben den Homologen Proteinen in Vertebraten auch im Nematoden *Caenorhabditis elegans* und in der Taufliege *Drosophila melanogaster*. In diesen Organismen ist Spike evolutiv erstaunlich stark konserviert. So ist das *C. elegans*-Homolog zu 60% und das *D. melanogaster*-Homolog zu 63% mit dem Maus-Spike identisch. Das humane und murine Spike unterscheiden sich sogar nur in drei von 219 Positionen

voneinander. Anhand der Analyse der Aminosäuresequenzen von homologen Proteinen verschiedener Arten lassen sich Funktionsaussagen über diese Proteine ableiten. Die Anzahl der Aminosäureaustausche pro Zeiteinheit erfolgt über den gesamten Evolutionszeitraum eines Proteins hinweg mit konstanter und für jedes Protein mit charakteristischer Geschwindigkeit (Wehner und Gehring, 1990; Maynard Smith, 1989). Die Proteine unterscheiden sich in der Zahl der tolerierbaren Sequenzen. Spike ist eines der Proteine, die (vergleichbar mit Cytochrome c) über einen sehr großen evolutiven Zeitraum nur relativ geringe Sequenzveränderungen erfahren haben. Spike scheint also evolutionsgeschichtlich schon sehr früh eine Funktionsstruktur erreicht zu haben, die nur wenige Veränderungen zuließ. Stärkere Aminosäureaustauschraten wären mit nicht tolerierbaren Funktionseinbußen einhergegangen. Da auch die *C. elegans*- und *D. melanogaster*-Homologa von Spike bei transienter Transfektion in Säugerzellen Apoptose verursachen, scheint der Mechanismus evolutiv konserviert zu sein (Wehner und Gehring, 1990; Maynard Smith, 1989).

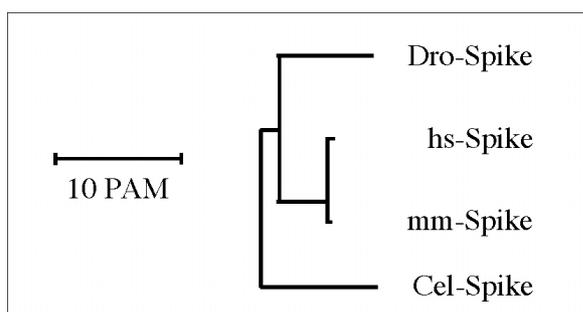


Abb. 3.2: Phylogenetische Beziehungen zwischen den verschiedenen Spike-Homologa. Der Stammbaum wurde mit Hilfe von ProDomV.2001.3 (<http://prodes.toulouse.inra.fr/prodom/doc/prodom.html>) erstellt (nach Corpet et al., 2000; Bateman et al., 2000). (Dro-*Drosophila*, hs-Mensch, mm-Maus, Cel-*Caenorhabditis*, PAM=Zahl zugelassener Punktmutationen pro 100 Aminosäurereste)

C. elegans und *D. melanogaster* sind Modellorganismen für die Untersuchung von programmiertem Zelltod, da viele Mechanismen und Signalmoleküle evolutiv konserviert sind. Diese Organismen können leichter genetisch manipuliert werden, was die Identifizierung von Apoptose-relevanten Genen erleichtert. Während der Entwicklung werden zahlreiche Zellen durch Zelltod eliminiert. Insbesondere Studien an *C. elegans* haben entscheidend zum Verständnis von programmiertem Zelltod beigetragen. Es konnten Gene identifiziert werden, dessen Homologa wichtige Bestandteile von apoptotischen Signalwegen in Säugern sind (Sulston und Horvitz, 1977; Ellis et al., 1991). Auch wenn die Komplexität und die Regulationsmechanismen apoptotischer Prozesse in Säugern enorm

zugenommen haben, sind die ursprünglichen Prinzipien aus *C. elegans* oder *D. melanogaster* erhalten geblieben. So sind von der erstmals in *C. elegans* mit Apoptose in Verbindung gebrachten Bcl-2-Familie im Nematoden bisher nur das Bcl-2-Homolog *Ced-9* und die proapoptotischen BH3-*only*-Proteine *Egl-1* und *ceBnip3* identifiziert worden (Hengartner et al., 1992; Conradt und Horvitz, 1998; Cizeau et al., 2000). Spike ist somit erst das dritte in *C. elegans* identifizierte BH3-*only*-Protein. Eine genauere Charakterisierung von Spike wurde besonders spannend, da dieses Protein bei transienter Transfektion in Säugerzellen deren Tod verursacht und somit wahrscheinlich auf einen evolutiv konservierten Mechanismus zurückgreift. Gleiches gilt auch für die Nematoden-Caspase *Ced-3*. Die Substratspezifität für *Ced-3* und Säugercaspasen ist so konserviert, daß die Überexpression von *Ced-3* in Säugerzellen zur Apoptoseinduktion führt (Miura et al., 1993). Da das *C. elegans*-Spike im Nematoden bisher noch nicht als Apoptose-relevantes Gen identifiziert wurde, ist es mit der genaueren Charakterisierung von Spike im Säugermodell möglich, nicht nur fundamentale Zelltod-Mechanismen in Säugern aufzuklären, sondern auch das Verständnis für die Apoptoseregulation in weniger komplexen Organismen wie *Caenorhabditis elegans* oder *Drosophila melanogaster* zu erweitern.

3.3 Spike induziert Caspase-abhängige Apoptosesignale

Wie viele andere proapoptotische Faktoren (wie FADD oder Bax) besitzt Spike die dominante Eigenschaft, bei Überexpression Apoptose zu induzieren. So führt die Überexpression von Spike bei transienter Transfektion zu typischen apoptotischen Merkmalen in den transfizierten Zellen. Es kommt zu phänotypischen Veränderungen wie die Bildung apoptotischer Körperchen (*membrane blebbing*), DNA-Fragmentierung, Caspase-Aktivierung, Cytochrome c-Austritt und zu einer Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials. Aktivierte Caspasen sind für die meisten charakteristischen, mit Apoptose einhergehenden morphologischen und biochemischen Merkmale verantwortlich (siehe Kap. 1.3). Dennoch scheinen beim Spike-induzierten Zelltod auch Caspase-unabhängige Prozesse eine Rolle zu spielen. Die Caspasen-abhängigen Merkmale der Spike-vermittelten Apoptose (wie DNA-Fragmentierung) können mit dem Caspaseinhibitor zVADfmk vollständig unterbunden werden. Dennoch

kommt es zur Ausbildung eines in Abb. 2.2.2.2 ersichtlichen Phänotyps in HeLa-Zellen. Von den transfizierten Zellen scheint der zytoplasmatische Anteil zu schrumpfen, jedoch ist kein typisches apoptotisches fragmentieren („*blebbing*“) der Membranen zu beobachten.

Dieses Phänomen des Caspase-unabhängigen Zelltods wird mit den proapoptischen mitochondrialen Faktoren AIF und EndoG in Verbindung gebracht. Sie treten nach einer Schädigung der Mitochondrien aus dem Intermembranraum aus und vermitteln unabhängig von aktivierten Caspasen im Zellkern DNA-Fragmentierung. Dieses Phänomen eines parallelen, ohne Caspasenaktivierung ablaufenden Apoptoseprogrammes, ist unter anderem auch für Bax beschrieben worden (Fitch et al., 2000). Es sollte für alle Apoptosewege gelten, welche eine Schädigung und Porenbildung der äußeren Mitochondrienmembran verursachen.

Eine Beteiligung der Mitochondrien ist auch bei dem von Spike initiierten Zelltod nachgewiesen worden. Es wurden die für eine Schädigung der äußeren Mitochondrienmembran charakteristischen Merkmale detektiert: eine Reduktion des Membranpotentials und der Austritt von Cytochrome c (siehe Abb. 2.2.8.1). Demnach könnten AIF und EndoG auch bei der Spike-vermittelten Apoptose aus den Mitochondrien austreten und Caspase-unabhängige Signalwege einleiten. Zwar wurde bei mit Spike transfizierten HeLa-Zellen, die mit dem Caspaseinhibitor zVADfmk behandelt wurden, keine DNA-Fragmentierung gemessen, jedoch eine phänotypische Veränderung festgestellt. Daß dieser Phänotyp von zVADfmk allein verursacht wird, kann ausgeschlossen werden, wie Experimente von kontrolltransfizierten und mit zVADfmk behandelten HeLa-Zellen verdeutlichen (nicht gezeigt). Eine Beteiligung von AIF und EndoG ist trotzdem möglich, da die molekularen Mechanismen der durch diese Faktoren ausgelösten DNA-Fragmentierung nicht bekannt sind. AIF besitzt selbst keine meßbare DNase-Aktivität und es ist nicht klar, wie AIF im Zellkern DNA-Fragmentierung vermittelt (Susin et al., 1999). Vermutlich werden bei der Spike-induzierten Apoptose noch unbekannte Signale aktiviert, die unabhängig von Caspasen verantwortlich für den beschriebenen Phänotyp sind.

3.4 Wirkt Spike als genereller Apoptoseregulator?

Die Analyse von EST-Datenbanken ergibt für die Spike-mRNA ein breitgefächertes Expressionsspektrum. Genauere experimentelle Analysen der Spike-Expression über Northern- und Immunoblot ergaben, daß Spike in den meisten der getesteten Gewebe und Zelltypen exprimiert wird, obwohl die Expressionsstärke sehr stark variiert. Im Northern-Blot konnten sehr hohe Expressionslevel an Spike-mRNA in Niere, Placenta, Herz und Leber detektiert werden. Schwächere Signale zeigten dagegen Dick- und Dünndarm, sowie Thymus. Unter diesen Bedingungen wurde kein Signal in peripheren Blut-Leukozyten deutlich (siehe Abb. 2.2.6.1). Auffällig ist, daß neben dem prominenten Signal in der zu erwartenden Größe von etwa 1,4 kb, eine deutlich schwächere Bande bei etwa 1,2 kb erschien. Hierbei könnte es sich um eine kürzere Isoform handeln. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß es sich um eine Abbaubande der Spike-mRNA handelt, da sie in ihrer Intensitätsstärke sehr auffällig mit der prominenten Bande korreliert.

Bei Immunoblot-Analysen von Rohextrakten verschiedener Zelltypen konnte eine Spike-Expression in fast allen getesteten Zelllinien detektiert werden. Eine Ausnahme waren NRK-Zellen, dort wurde kein Signal sichtbar (siehe Abb. 2.2.6.2/C). Interessanterweise sind NRK-Zellen spezifische Nierenzellen und dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Northern-Blot-Analysen, welche das stärkste Signal in der Niere detektierten. Da jedoch die anderen Nierenzelllinien 293T und BHK Spike exprimieren, sind NRK-Zellen offensichtlich aus einem Nierensubgewebe hervorgegangen, die kein Spike enthalten oder aber sie haben durch fortlaufendes Passagieren unter Zellkulturbedingungen Mutationen angesammelt, die eine Spike-Expression unterbinden.

Auffällig ist auch das Auftreten eines 33 kD-Signals, welches in seiner Intensitätsstärke von p33 zu p31 in Abhängigkeit vom Zelltyp variiert (siehe Abb. 2.2.6.2/C). Transfiziertes Spike ergibt bei einer Immunoblot-Analyse mit dem Spike-Antiserum ein Signal bei 31 kD. Da es laut Northern-Blot keinen Hinweis auf eine größere Spike-Isoform gibt, könnte p33 eine modifizierte Variante von Spike darstellen. Ob es sich dabei um eine der vorhergesagten potentiellen Phosphorylierungen (siehe Tab. 2.2.4.1) oder um eine andere Modifikation handelt, ist unklar.

Das breite Expressiosspektrum in den meisten getesteten Geweben und aufgrund der EST-Daten offensichtlich auch in allen Entwicklungsstadien unterstreicht das Potenzial von Spike, als genereller Apoptoseregulator zu wirken. Apoptose spielt besonders in der Entwicklung eine essentielle Rolle (siehe Kap. 1.2.1). Jedoch auch bei der Regulation der Zellhomeostase eines vielzelligen Organismus ist Apoptose bei der kontrollierten Eliminierung überflüssiger und gealterter Zellen von entscheidender Bedeutung. Da Spike in den Geweben und Entwicklungsstadien bereits detektierbar ist, findet eine Regulation der Spike-Aktivität vermutlich hauptsächlich auf posttranslationeller Ebene über Modifikationen statt. Eine transkriptionelle Induktion in spezifischen Geweben oder auf spezifische Signale kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Nach Stimulation von HeLa-Zellen mit UV, p53, Fas oder TNF α konnte jedoch keine Anreicherung von endogenem Spike in diesen Zellen detektiert werden (nicht gezeigt). Im Gegensatz zu einer transkriptionellen Aktivierung (wie bei den BH3-*only*-Proteinen Noxa oder Puma), ist die Spike-Regulation daher vermutlich eher vergleichbar mit der Regulation von Bad, Bim oder Bmf, die jeweils von spezifische Apoptosesignalen aus ihrem inaktiven Zustand in einen aktiven proapoptotischen überführt werden (Han et al., 2001; Nakano und Wousden, 2001; Oda et al., 2000; Yu et al., 2001; Datta et al., 1997; del Peso et al., 1997; Harada et al., 1999; Zha et al., 1996; Puthalakath et al., 1999; Puthalakath et al., 2001) Es gibt einige (wenn auch theoretische) Hinweise, die eine solche posttranslationelle Regulation der Spike-Aktivität vermuten lassen (siehe Kap. 3.5).

3.5 Strukturelle und funktionelle Sequenzanalyse von Spike

Neben dem BH3-Motiv nehmen auch die von verschiedenen Sequenzanalyseprogrammen vorhergesagten *coiled-coil*-Domänen in der Spike-Sequenz vermutlich eine α -helikale Sekundärstruktur ein. Dabei vermitteln die *coiled-coil*-Domänen sehr wahrscheinlich auch die Multimerisierung der Spike-Monomere. Das MultiCoil-Programm analysiert die Multimerisierungswahrscheinlichkeit der *coiled-coil*-Domänen und postuliert eine Trimerisierung von Spike (siehe Abb. 2.2.4.3). In Immunpräzipitationen konnte

experimentell nachgewiesen werden, daß Spike mit sich selbst interagiert (siehe Abb. 2.2.11). Dabei scheint diese Assoziation unabhängig von der BH3-Domäne und dem C-Terminus zu sein, denn die Spike-Deletionsmutante $\Delta C154$ (ohne BH3) kann mit WT-Spike noch in gleicher Weise coimmunpräzipitiert werden wie $\Delta C181$ (mit BH3). Die N-terminalen 19 Aminosäurereste sind für eine Interaktion mit WT-Spike ebenfalls unerheblich, da die Deletionsmutante $\Delta N19$ (wenn auch schwächer) noch mit Spike coimmunpräzipitiert (siehe Abb. 2.2.15.2/rechts). Ist jedoch eine der beiden *coiled-coil*-Domänen deletiert, kann keine Interaktion mit WT-Spike mehr beobachtet werden. Beide *coiled-coil*-Domänen sind also bei der Vermittlung dieser Homomerisierung notwendig. Es kann keine Aussage getroffen werden, in welchem Verhältnis Spike oligomerisiert. Da auch alle Interaktionsversuche mit überexprimiertem Spike durchgeführt wurden, kann nicht gesagt werden, ob endogenes Spike normalerweise oligomerisiert vorliegt oder ob diese Interaktion Teil eines proapoptotischen Aktivierungsprozesses ist. Dies wurde bereits für die proapoptotischen Bcl-2-Mitglieder Bax und Bak gezeigt, welche nach Aktivierung und einer damit einhergehenden Konformationsänderung multimerisieren (Korsmeyer et al., 2000; Nechushtan et al., 2001). Eine Homodi- bzw. oligomerisierung ist bisher auch für die BH3-only Proteine Bid () und Bnip3 () gefunden worden.

Beim Vergleich der Proteinsequenzen zwischen den Mensch-, Maus-, *C. elegans*- und *D. melanogaster*-Homologen von Spike miteinander fällt auf, daß neben sehr konservierten identischen Blöcken im Bereich der *coiled coil*-Domänen und der BH3-Domäne sich C-terminal an das BH3-Motiv ein sehr variabler Sequenzbereich anschließt. Dieser sehr unkonservierte Bereich endet in einem identischen Block von sechs Aminosäureresten am C-Terminus (siehe Abb. 3.5). Da der C-Terminus sowohl für die Apoptose-induzierende Funktion als auch für eine Selbstassoziation von Spike unerheblich ist, könnte dieser konservierte Bereich eine regulatorische Funktion übernehmen. Möglicherweise wirkt dieser Block inhibitorisch auf die proapoptotische Aktivität von Spike, denn eine Deletion dieses Bereiches (wie in $\Delta C181$) führt zu einer signifikanten Verstärkung des Zelltods. Wenn man davon ausgeht, daß die Überexpression eine Aktivierung der proapoptotischen Aktivität von Spike bewirkt, kann das Fehlen einer natürlichen „Sperre“ (wie in $\Delta C181$)

eine beschleunigte Zelltodkinetik zur Folge haben und in einer verstärkten Apoptoserate quantitativ meßbar werden (siehe Abb. 2.2.9.1).

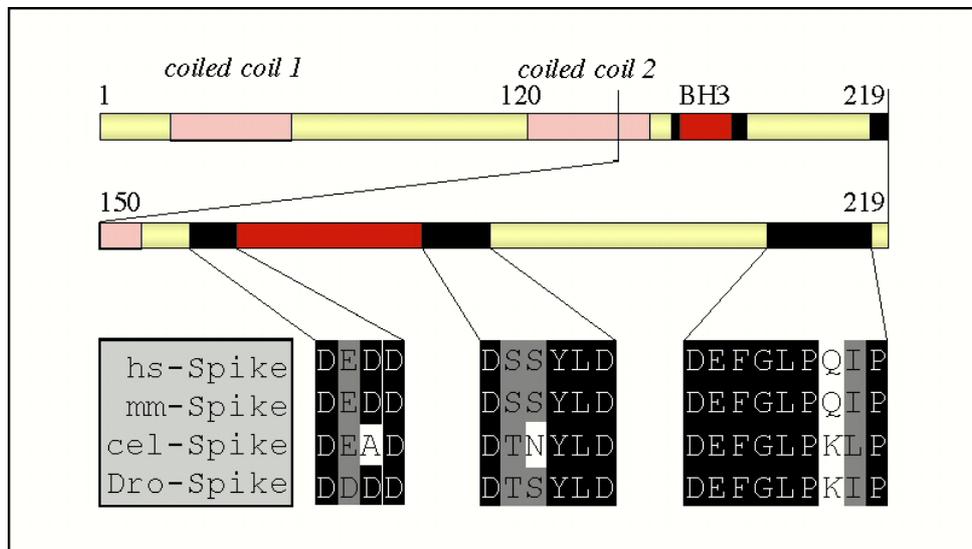


Abb. 3.5: Schematische Darstellung der Spike-Proteinsequenz. Konservierte und putativ regulatorische Sequenzbereiche sind bezüglich ihrer Lage zur BH3-Domäne abgebildet. **Links**, Bereich von vier bzw. drei aufeinanderfolgenden negativ geladenen Resten; **Mitte**, konservierte phosphorylierbare Reste; **Rechts**, identischer C-terminaler Sequenzbereich.

Direkt N-terminal an die BH3-Domäne grenzt ein anderes sehr auffälliges Sequenzmotiv. Dieses in der Spike-Sequenz konservierte Motiv besteht aus vier aufeinanderfolgenden negativ geladenen Aminosäureresten (DEDD). Es ist durchaus denkbar, daß dieses stark negativ geladene Motiv über Protein-Protein-Wechselwirkungen Einfluß Spike-Aktivität nehmen könnte. Diese Wechselwirkungen könnten auch intramolekular auf Sequenzbereiche innerhalb der Spike-Sequenz wirken und somit Einfluß auf die Gesamtkonformation des Spike-Moleküls haben.

Ein anderes Sequenzmotiv, das regulatorisch die Spike-Aktivität beeinflussen könnte, schließt sich direkt C-terminal an die BH3-Domäne an. Durch das Sequenzanalyseprogramm NetPhos 2.0 (Blom et al., 1999) wurden insgesamt acht Serin-, drei Threonin- und zwei potentielle Tyrosinphosphorylierungsstellen bei einer Wahrscheinlichkeit von über 50% in der Spike-Sequenz postuliert. Wenn man von einer über 95%igen Wahrscheinlichkeit ausgeht, reduzieren sich die potentiell

phosphorylierbaren Aminosäurereste auf Serin-16, -30, -36, -98, -150 und -181, sowie auf Tyrosin-182. Interessanterweise liegen zwei dieser potentiell sehr wahrscheinlichen Phosphorylierungsstellen genau in diesem Bereich in unmittelbarer Nachbarschaft zur BH3-Domäne: Serin-181 (99,2%) und Tyrosin-182 (97,5%), welche somit regulatorisch Einfluß auf die Spike-Funktion nehmen könnten. Eine derartige Regulation ist bereits für das BH3-*only* Protein Bad beschrieben worden. Die Phosphorylierung von Serin-155 in der BH3-Domäne von Bad verhindert dessen Interaktion mit Bcl-X_L, was in einer Inhibition der proapoptotischen Aktivität von Bad resultiert (Datta et al., 2000).

Die Vermutung einer solchen phosphorylierungsabhängigen Regulation der Spike-Aktivität wird dadurch unterstützt, daß die an diesen Positionen phosphorylierbaren Reste auch in den *C. elegans* und *Drosophila* Homologa konserviert sind (siehe Abb. 3.5). Eine Phosphorylierung könnte aber auch die Konformation des Spike-Moleküls beeinflussen und im Zusammenspiel mit der konservierten C-terminalen Domäne Einfluß auf eine strukturbedingte Zugänglichkeit der BH3-Domäne nehmen. Phosphorylierungsabhängige Konformationsänderungen sind beispielsweise ein bekanntes Phänomen für die Regulation der Aktivität von Rezeptortyrosinkinasen (Schlessinger und Ullrich, 1992).

Daß eine Modifikation von Spike stattfindet, wird in den p31 und p33-Signalen mit dem Spike-Antiserum deutlich, da es keine Hinweise auf eine größere Isoform gibt. Diese Modifikation, welche den Elektromobilitätssprung von 31 auf 33 kD zur Folge hat, scheint jedoch keinen direkten Einfluß auf die proapoptotische Funktion von Spike zu haben, da die Intensitätsstärke von p33 zu p31 in Abhängigkeit vom Zelltyp variiert und somit offensichtlich unabhängig von apoptotischen Signalen ist (siehe Abb. 2.2.6.2/C). Die Anzahl sehr wahrscheinlicher Phosphorylierungsstellen in der Spike-Sequenz läßt jedoch Apoptose-relevante regulatorische Modifikationen vermuten.

3.6 Das BH3-Motiv ist notwendig für die proapoptotische Aktivität von Spike

Bei der Vermittlung von Apoptose spielen Protein-Protein-Interaktionen durch homotypische Interaktionsmodule wie der *Death Domain* (DD), der *Death Effector Domain* (DED) oder der *Caspase Recruitment Domain* (CARD) eine essentielle Rolle (Kaufmann und Hengartner, 2001). Um abschätzen zu können, welche Sequenzbereiche innerhalb der Spike-Sequenz notwendig und ausreichend für dessen proapoptotische Funktion sind, wurden Deletionsmutanten von Spike generiert und auf deren Apoptose-induzierenden Eigenschaften mittels FACS-Analyse untersucht. Bei der Auswertung dieser Daten konnte jedoch nicht berücksichtigt werden, ob die ohne genaue Kenntnisse der Struktur hergestellten Mutanten korrekt gefaltet sind oder inwieweit die Deletionen Einfluß auf die Proteinstabilität haben. Bedenken wegen der Stabilität der Mutanten konnten größtenteils mit Hilfe eines Immunoblots zur Kontrolle einer effizienten Expression mit vergleichbaren Proteinleveln ausgeschlossen werden (siehe Abb. 2.2.9.1/ unten).

Bei der quantitativen Auswertung dieser Deletionsmutanten bezüglich ihrer Apoptose-induzierenden Aktivität konnte festgestellt werden, daß die Deletion des C-Terminus ($\Delta C181$) zu einer leichten Verstärkung der Apoptose führt, wogegen eine weitere Deletion der dem BH3-Motiv entsprechenden Sequenz ($\Delta C154$) in einer drastischen Reduktion der proapoptotischen Aktivität resultiert (siehe Abb. 2.2.9.1). Interessanterweise führt die Deletion der N-terminalen 19 Aminosäurereste ($\Delta N19$) zu einem kompletten Verlust der proapoptotischen Aktivität. Es zeigte sich also, daß nur zwei Sequenzbereiche bei der Vermittlung des Spike-induzierten Zelltods eine entscheidende Rolle spielen: das BH3-Motiv und die N-terminalen 19 Aminosäurereste.

Im Gegensatz zum BH3-Motiv führt die Deletion der N-terminalen 19 Aminosäurereste vermutlich nur indirekt zum Verlust der proapoptotischen Aktivität. Diese Deletion verhindert eine für die proapoptotische Wirkung von Spike notwendige korrekte Lokalisation des Konstruktes am Endoplasmatischen Retikulum (ER). Ein $\Delta N19$ -YFP-Fusionsprotein zeigt eine gleichmäßige zelluläre Verteilung, die eine ER-spezifische Lokalisation ausschließt (siehe Abb. 2.2.13/rechts). Obwohl mit gängigen

Sequenzanalyseprogrammen kein ER-spezifisches Lokalisationssignal in der Spikesequenz detektiert wurde, sind die N-terminalen 19 Aminosäurereste verantwortlich für eine korrekte Apoptose-relevante Lokalisation des Proteins.

Um die Bedeutung des für die Apoptose-Induktion von Spike notwendigen BH3-Motivs genauer zu analysieren, wurden Punktmutanten von kritischen und in Bezug auf andere Bcl-2-Familienmitglieder konservierte Aminosäurereste hergestellt. Wie in Abb. 2.2.9.2 ersichtlich, resultiert jede Mutation zu einem ungeladenen Aminosäurerest in einer Reduktion der Apoptose, was die Bedeutung dieser Domäne für die Zelltodaktivität von Spike eindrucksvoll unterstreicht. Wieso der Austausch der konservierten Aminosäurereste zu geladenen Resten offensichtlich keinen Einfluß auf proapoptotische Aktivität hat, ist unklar. Da jedoch das BH3-Motiv Protein-Protein-Interaktionen von BH3-*only*-Proteinen mit antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie vermittelt (Huang und Strasser, 2000), scheint ein solcher Austausch diese Interaktion nicht entscheidend zu beeinflussen.

Überraschenderweise konnte eine Assoziation von Spike mit den antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie Bcl-2 oder Bcl-X_L und dem proapoptotischen Mitglied Bax nicht detektiert werden (siehe Abb. 2.2.10). Überraschend ist dies deshalb, weil von allen bisher bekannten BH3-*only*-Proteinen eine Heterodimerisierung mit antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie nachgewiesen wurde. Dennoch hat Spike mit allen anderen bisher bekannten BH3-*only*-Proteinen die Gemeinsamkeit, daß die BH3-Domäne notwendig für deren proapoptotische Aktivität ist (Chittenden et al., 1995, Hunter und Parslow, 1996). Wie die BH3-Domäne von Spike zusammen mit weiteren Daten in ein Modell zum molekularen Mechanismus der proapoptotischen Wirkungsweise von Spike einfließt, ist im Kapitel 3.8.2 dargestellt.

3.7 Spike interagiert am ER mit Bap31

Damit eine Zelle effizient auf die unterschiedlichsten Apoptosesignale reagieren kann, existieren Procaspasen-enthaltende Proteinkomplexe an strategisch wichtigen subzellulären Strukturen. Neben dem DISC an der Plasmamembran (Kischkel et al., 1995) und dem cytosolischen Apoptosom zur Vermittlung mitochondrialer Zelltodsignale (Zou et al.,

1999), rückt ein Apoptose-relevanter Proteinkomplex am Endoplasmatischen Retikulum immer mehr in den Vordergrund, der eine wichtige Rolle bei der Integration und Vermittlung proapoptotischer Signale spielt: der Bap31-Komplex (Ng et al., 1997; Breckenridge et al., 2002; Ferri und Kroemer, 2001). Dieser Proteinkomplex am ER enthält nach derzeitigem Wissen die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie Bcl-2 oder Bcl-X_L und das ER-Membranprotein Bap31, welches nach Apoptosestimulation eine ER-spezifische Isoform von Caspase-8 bindet: Procaspase-8L (Breckenridge et al., 2002).

Immunfluoreszenzdaten in MCF-7-Zellen verdeutlichen, daß endogenes Spike mit einem ER-spezifischen Marker kolokalisiert. Obwohl eine teilweise mitochondriale Verteilung auf Grund der Immunfluoreszenzbilder mit dem Mitochondrienmarker (MitoTracker) nicht ausgeschlossen werden kann, deutet doch die komplette Übereinstimmung mit der Verteilung des ER-Markers (ER-Tracker) eindeutig auf eine ER-spezifische Lokalisation von Spike hin (siehe Abb. 2.2.8.1).

Wie bereits erwähnt, ergibt die Aminosäuresequenz von Spike keine Hinweise auf eine ER-Spezifität. Es existieren weder hydrophobe Sequenzbereiche, die auf eine Membrandomäne hindeuten, noch gibt es das für luminaire ER-Proteine typische ER-Retentionssignal, welches den retrograden Transport aus dem Golgi zurück ins ER vermittelt. Die Lokalisation von Spike am ER kann demnach nur über Protein-Protein-Interaktionen auf der cytoplasmatischen Seite des ER zustande kommen. Interessanterweise ist es in Immunpräzipitationen möglich, eine Interaktion von Spike mit dem ER-Membranprotein Bap31 nachzuweisen. Auch in Immunfluoreszenzen konnte eine (wenn auch nicht vollständige) Colokalisation von Spike mit Bap31 demonstriert werden (siehe Abb. 2.2.12.1 und 2.2.12.2).

Die Überexpression von Spike führt schon zu einem kinetisch frühen Zeitpunkt in der Apoptoseinduktion zu einer Caspase-abhängigen Prozessierung von Bap31, was indirekt auf eine Aktivierung von Caspase-8 oder der ER-Isoform-8L hindeutet (siehe Abb. 2.2.14). Dies unterstreicht die Relevanz der Bap31-Interaktion für die Spike-induzierte Apoptose. Neben WT-Spike interagieren auch die Deletionsmutanten $\Delta C181$ und $\Delta C154$ mit Bap31,

nicht jedoch die N-terminal um 19 Aminosäurereste verkürzte Variante $\Delta N19$ (siehe Abb. 2.2.13). Die N-terminalen 19 Aminosäurereste sind somit verantwortlich für eine korrekte Apoptose-relevante Lokalisation des Proteins am ER mit Bap31. Der von Bap31 auf der cytoplasmatischen Seite des ER gebildete und auch für Apoptose relevante Proteinkomplex liefert eine ideale Erklärung für die ER-Lokalisation von Spike und bietet gleichzeitig einen Ansatzpunkt zur Untersuchung der Spike-vermittelten Apoptose (siehe folgendes Kap.).

3.8 Potentielle Modelle zum molekularen Mechanismus der Spike-vermittelten Apoptose

3.8.1 Das „*C. elegans*-Modell“

Einen Ansatzpunkt für eine mögliche Erklärung der Spike-induzierten Apoptose auf molekularer Ebene ergab die Entdeckung, daß die Assoziation von Spike mit Bap31 eine gleichzeitige Interaktion von Bcl-X_L mit Bap31 drastisch reduziert (siehe Abb. 2.2.15.1). Eine gleichzeitige Assoziation von Spike und Bcl-X_L mit Bap31 ist demnach unwahrscheinlich, wenn auch nicht ausgeschlossen, da eine Bap31-Bcl-X_L-Interaktion nicht vollständig unterbunden werden konnte. Übertragen in ein Modell wäre es möglich, daß analog zu den Erkenntnissen anderer BH3-*only*-Proteine eine Aktivierung von Spike auf einen spezifischen Apoptosestimulus hin zu einer Verdrängung von Bcl-X_L am Bap31-Komplex führt.

Ein analoges Modell wurde in *C. elegans* postuliert. Nach dem derzeitigen Modell bindet *Ced-9*, ein Bcl-2-Homolog, das Apaf-1-Homolog *Ced-4*, welches dadurch nicht in der Lage ist, die Caspase *Ced-3* zu aktivieren. Zelltodsignale führen zur Expression des bisher einzigen in *C. elegans* beschriebenen BH3-*only*-Proteins Egl-1, welches mit *Ced-9* heterodimerisiert und somit *Ced-4* verdrängt, was zur Aktivierung von *Ced-3* führt (Chen et al., 2000; Conradt and Horvitz, 1998; Metzstein et al., 1998; Kaufmann und Hengartner, 2001). Die Verdrängung eines inhibitorischen Proteins (*Ced-9*) durch ein BH3-*only*-Protein (Egl-1) resultiert also in der Aktivierung von Caspasen und wirkt somit proapoptotisch.

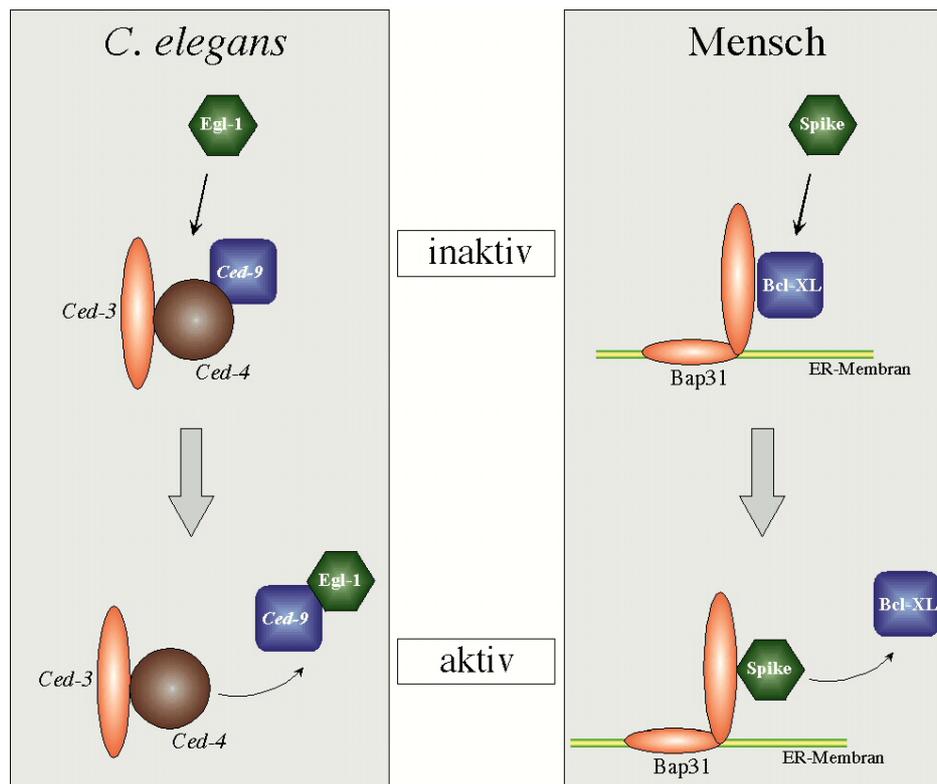


Abb. 3.8.1: Schematische Darstellung eines analogen Modells zur Wirkungsweise von Egl-1 in *C. elegans* und Spike am Bap31-Komplex (Modell I).

Übertragen in das Säugermodell des Bap31-Komplexes wäre es möglich, daß Bcl-2 oder Bcl-X_L den Bap31-Komplex in einem inaktiven Zustand halten und erst auf ein spezifisches Apoptosesignal wird Spike aktiviert und an den Bap31-Komplex rekrutiert. Die daraus resultierende Verdrängung von Bcl-2 oder Bcl-X_L führt anschließend zur Aktivierung dieses Komplexes.

Ganz so einfach scheint die Erklärung für die Spike-induzierte Apoptose jedoch nicht zu sein. Die Spike-Deletionsmutante $\Delta C154$ interagiert einerseits mit Bap31 und reduziert die Assoziation von Bcl-X_L in gleicher Weise, wie WT-Spike. Dennoch vermittelt diese Mutante deutlich schwächer Zelltod als WT-Spike oder die Mutante $\Delta C181$. Der einzige Unterschied zwischen den Konstrukten $\Delta C154$ und $\Delta C181$ liegt im Fehlen der BH3-Domäne in $\Delta C154$.

3.8.2 Bedeutung der BH3-Domäne und das „Faktor X-Modell“

Die 12-15 Aminosäurereste umfassende und mit Ausnahme des Kernmotivs sehr variable BH3-Domäne (siehe Abb. 2.2.5) ist die einzige erkennbare Gemeinsamkeit mit Mitgliedern der Bcl-2-Familie, jedoch entscheidend für die proapoptotische Wirkung der BH3-*only*-Proteine. Derzeitige Theorien zur Wirkungsweise der BH3-*only*-Proteine konzentrieren sich auf diese Domäne. Das BH3-Motiv bildet eine amphipathische Helix, welche notwendig für die Interaktion mit anderen Bcl-2-Mitgliedern ist (Huang und Strasser, 2000). Es interagiert direkt mit einem Motiv, das durch die BH1-, BH2- und BH3-Domäne anderer Bcl-2-Mitglieder gebildet wird (Cory und Adams, 2002).

Die Wirkungsweise der BH3-*only*-Proteine richtet sich nach derzeitigem Wissensstand hauptsächlich auf die Mitochondrien. Die normalerweise in nicht-mitochondrialen Kompartments der Zelle lokalisierten BH3-*only*-Proteine relokalisieren auf einen apoptotischen Stimulus und sind daraufhin in der Lage, mit den antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie (wie Bcl-2 oder Bcl-X_L) zu heterodimerisieren. Dies führt zu einer Aktivierung und Oligomerisierung der zuvor durch Heterodimere mit Bcl-2 oder Bcl-X_L in inaktivem Zustand gehaltenen Multi-BH-Domänenproteine Bax und Bak. Es wird allgemein angenommen, daß Bax und Bak durch ihre Fähigkeit Kanäle zu bilden, die Freisetzung proapoptotischer mitochondrialer Faktoren bewirken (siehe Kap. 1.6 und Abb. 1.6.2) (Gross et al., 1998; Martinou und Green, 2001; Wang, 2001).

Bezüglich der Wirkungsweise von Mitgliedern der Bcl-2-Familie gibt es jedoch eine Reihe von Unklarheiten und Abweichungen. So hat das *C. elegans* Bcl-2-Homolog *Ced-9* sowohl anti- als auch proapoptotische Eigenschaften, je nach genetischem Kontext. Bei mutiertem *Ced-3*, der *C. elegans*-Caspase, die zusammen mit *Ced-4* und *Ced-9* einen inaktiven Komplex bildet, wirkt *Ced-9* im Gegensatz zu seiner sonstigen Funktion proapoptotisch (Hengartner et al., 1992). Ein ähnliches Phänomen wurde unter anderem auch bei dem Säugerhomolog Bcl-2 beobachtet, welches nach Überexpression proapoptotisch wirkt (Uhlmann et al., 1998). Desweiteren wurden Bcl-X_L-Mutanten identifiziert, welche, obwohl sie nicht mit proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie heterodimerisieren

konnten, dennoch antiapoptotisch wirkten (O'Connor et al., 1998; Cheng et al., 1996). Andererseits heterodimerisiert das proapoptotische Bcl-2-Mitglied Bok nicht mit allen antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen. Es heterodimerisiert selektiv mit Mcl-1, BHRF1 und Bfl-1, jedoch nicht mit Bcl-2, Bcl- X_L und Bcl-w (Hsu et al., 1997). Eine pro- oder antiapoptotische Wirkung der Bcl-2-Mitglieder scheint also nicht generell (Bcl- X_L) oder nur selektiv (Bok) mit einer Heterodimerisierung mit anderen Familienmitgliedern gekoppelt zu sein.

Bei Spike konnte mit den getesteten Bcl-2, Bcl- X_L und Bax keine Interaktion festgestellt werden. Das schließt nicht aus, daß Spike (wie Bok) möglicherweise nur selektiv mit bisher nicht getesteten spezifischen Bcl-2-Mitgliedern interagiert, denn die BH3-Domäne von Spike ist entscheidend für dessen proapoptotische Aktivität. Sowohl eine Deletion dieses Motivs, sowie Punktmutationen konservierter Reste reduzieren drastisch die Zelltod-induzierende Wirkung (siehe Abb. 2.2.9.1 und Abb. 2.2.9.2). Keinen detektierbaren Einfluß hat dagegen das BH3-Motiv von Spike auf dessen Homomerisierungsaktivität und die Interaktion von Spike mit Bap31 (siehe Abb. 2.2.11 und Abb. 2.2.13). Notwendig für die proapoptotische Wirkung dieser Domäne erscheint allerdings eine Lokalisation am ER zu sein, denn die Deletionsmutanten $\Delta N19$ und $\Delta N92$, die dieses Motiv enthalten, wirken nicht proapoptotisch und sind auch nicht am ER mit Bap31 assoziiert (für $\Delta N92$ nicht gezeigt). Eine gleichmäßige zelluläre Verteilung schließt eine ER-spezifische Lokalisation aus (siehe Abb. 2.2.13/rechts). Eine Interaktion mit Bap31 am ER scheint demnach eine Grundvoraussetzung für die proapoptotische Wirkung der Spike-BH3-Domäne zu sein.

Versuche mit $\Delta C154$ demonstrieren jedoch, daß dieses Motiv auch keinen Einfluß auf die Reduktion der Assoziation von Bcl- X_L mit dem Bap31-Komplex hat (siehe Abb. 2.2.14.1). Aus diesen Daten ergibt sich ein Modell, nach dem das BH3-Motiv von Spike entweder über die Rekrutierung eines spezifischen Co-Faktors an den Bap31-Komplex Apoptoseinduktion vermittelt, oder aber direkt ein mit Bap31 assoziiertes proapoptotisches Protein aktiviert.

Bei diesem Co-Faktor könnte es sich entweder um ein im Rahmen dieser Arbeit nicht getestetes, oder um ein noch unbekanntes Mitglied der Bcl-2-Familie handeln, da die BH3-Domäne von Spike ebenso wie die BH3-Domänen anderer Faktoren wegen seiner Peptidstruktur vermutlich über Protein-Protein-Interaktionen Apoptose vermittelt. Sehr interessant in seinem Mechanismus erscheint dagegen die Möglichkeit, daß dieser proapoptotische Co-Faktor bereits am ER mit Bap31 assoziiert ist und durch die BH3-Domäne von Spike und möglicherweise anderer BH3-Domänen-Proteine aktiviert wird. Ein ähnlicher molekularer Mechanismus wurde bereits für die Aktivierung von Bax durch tBid demonstriert. Das durch Caspase-8 am Fas-Rezeptorkomplex trunkierte und dadurch aktivierte BH3-*only*-Protein tBid induziert eine Konformationsänderung mit einhergehender Multimerisierung des in inaktivem Zustand cytoplasmatischen Bax. Aktiviertes Bax relokalisiert zu den Mitochondrien und ermöglicht über Porenbildung in der äußeren Membran die Freisetzung proapoptotischer Faktoren wie Cytochrome c oder Smac/Diablo (Gross et al., 1998; Martinou und Green, 2001; Wang, 2001).

Im Fall von Spike könnte dessen BH3-Domäne ein Bax-ähnliches, mit dem Bap31-Komplex assoziiertes, proapoptotisches Multi-BH-Domänenprotein aktivieren, indem dessen Inhibitor Bcl-2 oder Bcl-X_L verdrängt wird. Dieses durch Spike und das Fehlen seines Inhibitors aktivierte Protein (Faktor X) könnte entweder lokal am ER wirken und zur Prozessierung der ER-ständigen mit Bap31 assoziierten Procaspase-8L beitragen, oder aber wie im Fall von Bax zu den Mitochondrien relokalisieren und die Freisetzung proapoptotischer mitochondrialer Faktoren bewirken. Eine solche proapoptotische Verbindung zwischen ER und Mitochondrien wurde bereits beschrieben, sie konnte jedoch auf molekularer Ebene nicht geklärt werden (Häcki et al., 2000). Dies würde auch die von Spike induzierten mitochondrialen Ereignisse erklären, den Austritt von Cytochrome c und die Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials. Ebenso würde klar, warum Bcl-X_L die Spike-induzierte Apoptose komplett inhibieren kann. Ein Überschuß an Bcl-X_L kann mechanistisch eine Verdrängung durch Spike aufheben. Obwohl indirekt eine Aktivierung von Caspase-8 bzw. -8L bei Spike-vermitteltem Zelltod nachgewiesen werden konnte, hat die Caspase-resistente Bap31-Variante jedoch keinen Einfluß auf die Stärke des

Spike-vermittelten Zelltods (siehe Abb. 2.2.14 und 2.2.15.2). Das durch Caspasen prozessierbare Bap31 spielt nach diesem Modell keine Rolle. Es wirkt hiernach nur als Adaptor zur Assemblierung des Proteinkomplexes.

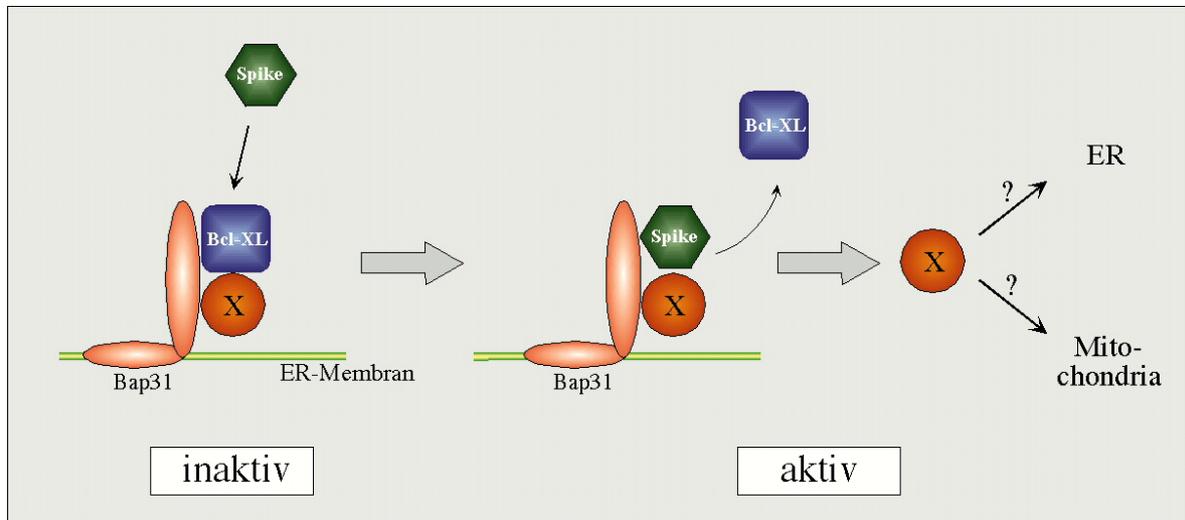


Abb. 3.8.2: Schematische Darstellung des "Faktor X-Modells" (Modell II). Spike aktiviert einen Faktor X am Bap31-Komplex, indem es dessen Inhibitor verdrängt. Der aktivierte Faktor X initiiert daraufhin proapoptotische Signalwege, entweder lokal am ER oder analog zu Bax in den Mitochondrien.

Jedoch reicht nach diesem Modell eine einfache Verdrängung von Bcl-2 oder Bcl-X_L nicht zu einer effizienten Aktivierung von Faktor X aus, wie Versuche mit der BH3-losen Spike-Deletionsmutante $\Delta C154$ zeigen, die trotz proapoptotischer Restaktivität deutlich schwächer Zelltod initiiert wie WT und $\Delta C181$ (siehe Abb. 2.2.9.1). Erst die Anwesenheit des BH3-Motivs ermöglicht eine effiziente Aktivierung von Faktor X.

3.9 Beteiligung von Spike an Fas-induzierter Apoptose

Wie durch Nguyen et al. (2000) gezeigt wurde, ist der Bap31-Komplex auch an der Apoptoseinduktion durch den Fas-Rezeptor beteiligt. In KB-Zellen, die eine Beteiligung von Mitochondrien zur Vermittlung des apoptotischen Signals benötigen und nicht direkt am Fas-Rezeptorkomplex über Caspase-8-Aktivierung Apoptose induzieren können (Typ II-Zellen), kann eine Caspase-resistente Bap31-Variante (crBap31) den Cytochrome c-

Austritt, die Mitochondriendepolarisation, sowie die Reorganisation des Zytoskeletts und somit phänotypische Veränderungen inhibieren. Dagegen hatte crBap31 in diesen Zellen nur einen geringen Einfluß auf die Fas-induzierte Caspase-Aktivierung und die Spaltung von Caspasesubstraten.

Mit Hilfe eines dominant-negativ wirkenden Spike-Konstrukts ($\Delta N19$) und eines die Spike-Expression reprimierenden Antisense-Oligonukleotids kann die Apoptose-relevante Funktion von Spike inhibiert werden. $\Delta N19$, welches nicht mit Bap31 interagiert aber mit WT-Spike assoziieren kann, verhindert offenbar die nach Apoptosestimulation notwendige richtige Lokalisation von endogenem Spike am ER. Es stellte sich heraus, daß Spike in HeLa-Zellen an der Fas-induzierten, nicht jedoch an der TNF α -vermittelten Apoptose beteiligt ist (Abb. 2.2.16.3 und 2.2.16.4). Über FACS-Analyse wurde eine verringerte DNA-Fragmentierung gemessen, die vermutlich Ursache einer verzögerten oder verringerten Caspasen-Aktivierung ist. Diese Daten, daß nach Fas-Stimulation eine Inhibition der Spike-Funktion einerseits eine verringerte Caspasen-Aktivität zur Folge hat und andererseits Caspase-resistentes Bap31 keinen Einfluß auf Spike-induzierten Zelltod hat, stehen in scheinbarem Widerspruch zu den Ergebnissen Fas-vermittelter Apoptose mit crBap31 in KB-Zellen (Nguyen et al., 2000). Bei Spike-vermitteltem Zelltod spielen mitochondriale Ereignisse eine Rolle, die offenbar mit crBap31 nicht quantitativ meßbar inhibiert werden können, bei Fas-Induktion in KB-Zellen aber schon. *Loss of function*-Spike führt nach Fas-Stimulation in HeLa-Zellen offensichtlich zu einer verringerten oder verzögerten Caspasen-Aktivierung, wogegen crBap31 in KB-Zellen nach Fas-Stimulation hierauf keinen Einfluß hat. Diese Ergebnisse lassen nur auf mechanistisch unabhängige Apoptosewege schließen, die von Spike und durch Caspasen prozessiertes Bap31 eingeleitet werden.

In Abb. 3.9.1 ist ein mögliches Modell dargestellt, das die oben erläuterten Phänomene erklären könnte. Demnach kann der Bap31-Komplex nach Fas-Stimulation durch zwei separate Wege aktiviert werden. Procaspase-8L am Bap31-Komplex kann einerseits direkt von Fas aktiviert werden, aber andererseits vermittelt auch Spike dessen Aktivierung. Der Spike-Weg induziert diesem Modell nach jedoch parallel und unabhängig von einer

Aktivierung von Procaspase-8L und damit auch unabhängig von einer Prozessierung von Bap31 über den Faktor X einen Signalweg, der zur Aktivierung der Mitochondrien führt. Wie unter Kap. 3.8.2 dargestellt, führt eine Aktivierung von Spike zu einer Verdrängung von antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie von Bap31 und damit einhergehend zu einer Aktivierung von Faktor X. Dieser würde (dem Modell nach) in den Mitochondrien die Freisetzung proapoptotischer Faktoren und eine Caspasenaktivierung über das Apoptosom bewirken.

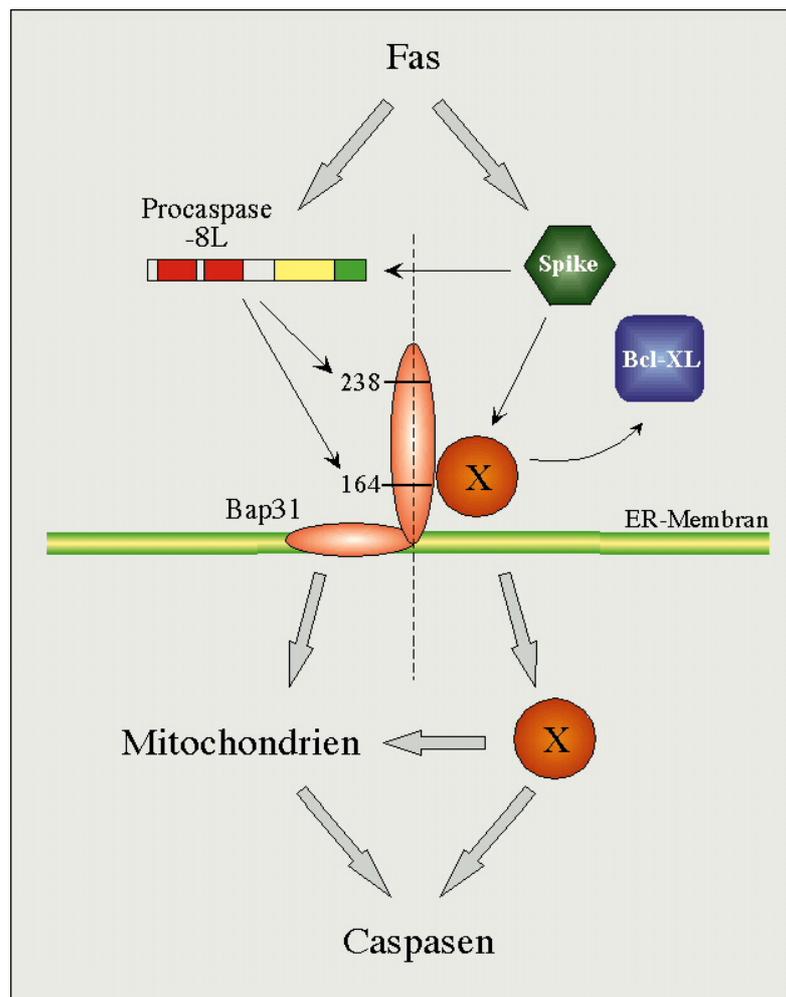


Abb. 3.9.1: Schematische Darstellung eines Modells zur Wirkungsweise von Spike bei Fas-induzierter Apoptose (Modell III). Demnach initiiert Fas zwei mechanistisch unabhängige Apoptosewege zur Aktivierung der Mitochondrien, die von Spike und durch Caspase-prozessiertes Bap31 eingeleitet werden.

Entsprechend dem Modell initiiert Fas einen von Spike separaten Apoptoseweg, der zur Aktivierung der ER-spezifischen Procaspase-8L führt. Erst die Prozessierung von Bap31 würde mitochondriale Ereignisse stimulieren.

Dieses Modell würde erklären, warum nach Fas-Stimulation eine Inhibition der Spike-Funktion eine verringerte Caspasen-Aktivität zur Folge hat. Ein Fehlen des Spike-Weges reduziert die Aktivierung von Procaspase-8L und hat den Wegfall der zusätzlichen Amplifikation des Apoptosesignals über Mitochondrien und das Apoptosom zur Folge, was in einer verringerten oder kinetisch verzögerten DNA-Fragmentierung quantitativ meßbar ist (siehe Abb. 2.2.16.3 und 2.2.16.4). Andererseits hat caspase-resistentes Bap31 wegen der Unabhängigkeit der Signalwege keinen Einfluß auf Spike-induzierten Zelltod (siehe Abb. 2.2.15.2).

Doch warum kann Spike in KB-Zellen bei einer Blockade des mitochondrialen Weges durch crBap31 nicht Caspase-8L-unabhängig Mitochondrien aktivieren? Im Gegensatz zu HeLa-Zellen ist nicht bekannt, ob Spike in KB-Zellen exprimiert ist. Es wäre ein Modell möglich, das analog dem Modell der Typ I und II-Zellen (siehe Kap. 1.4.1) unterschiedliche Wege bei der Fas-induzierten Aktivierung der Mitochondrien über den Bap31-Komplex postuliert. Eine unterschiedliche Gewichtung der durch Fas initiierten Aktivierung des Bap31-Komplexes in Abhängigkeit von Gewebe und Zelltyp, der zu integrierenden Apoptosesignale oder der Spike-Expression könnte für das oben beschriebene Phänomen eine Erklärung liefern. Während in HeLa-Zellen beide der in diesem Modell postulierten Wege möglicherweise gleichermaßen aktiviert werden, liegt in KB-Zellen (zum Beispiel wegen des Fehlens von Spike) eine Gewichtung des Spike-unabhängigen Weges der Aktivierung des Bap31-Komplexes vor (siehe Abb. 3.9.2). Dies würde ansatzweise erklären, warum crBap31 eine offensichtlich deutliche Inhibition mitochondrialer Ereignisse in KB-Zellen bewirkt.

Unklar bleibt allerdings, wieso crBap31 in KB-Zellen bei unveränderter Caspasen-Aktivierung und Spaltung von Caspasesubstraten die Ausbildung eines apoptotischen Phänotyp verhindert (Nguyen et al., 2000), obwohl aktivierte Caspasen normalerweise

durch die Spaltung von Strukturproteinen genau hierfür verantwortlich sind. Dennoch erklärt dieses Modell auf molekularer Ebene, wie Spike im Zusammenspiel mit dem Bap31-Komplex Zelltod vermitteln und in den durch Fas induzierten Apoptoseweg eingreifen könnte.

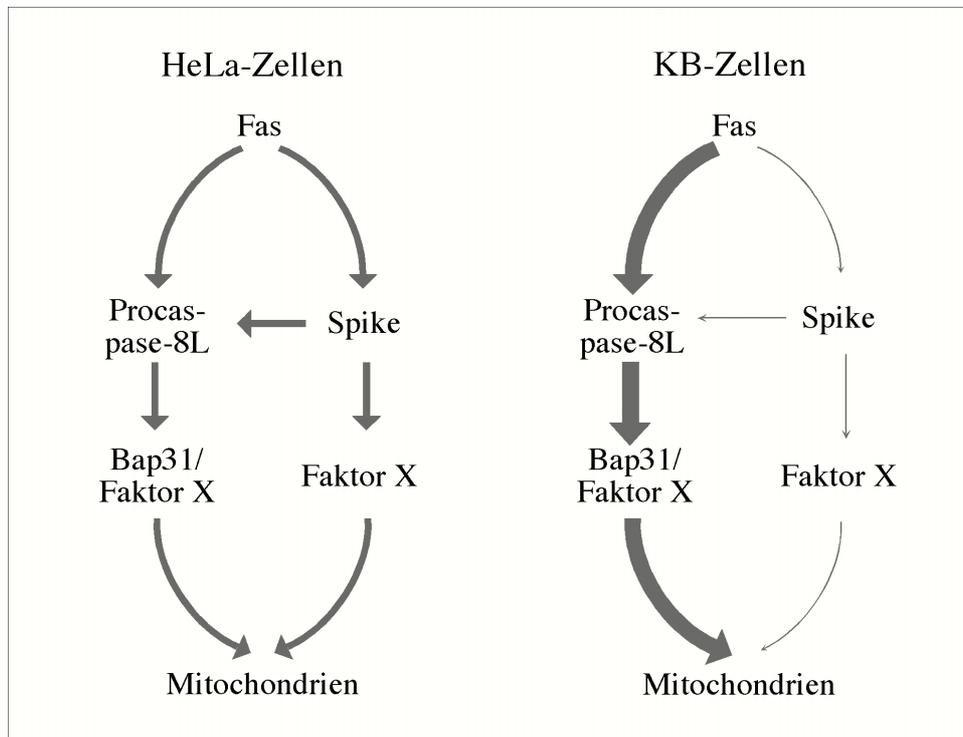


Abb. 3.9.2: Modell zur Zelltyp-spezifischen Gewichtung einer Beteiligung von Spike an der Fas-induzierten Aktivierung der Mitochondrien über den Bap31-Komplex.

Die Präsenz eines Faktor X am ER wird dadurch unterstützt, daß kürzlich einem anderen BH3-*only*-Protein eine ER-spezifische Wirkungsweise zugeordnet wurde: Bik (Germain et al., 2002). Nach transkriptioneller Hochregulation durch p53, sowie nach onkogenem oder genotoxischem Streß akkumuliert Bik fast ausschließlich an der ER-Membran. Bik ist trotz seiner Lokalisation am ER in der Lage, Caspase-unabhängig in den Mitochondrien den Austritt von Cytochrome c zu initiieren (Germain et al., 2002; Breckenridge und Shore, 2002). Obwohl der Aktivierungsmechanismus von Spike noch unbekannt ist, sind die Wirkungsweisen von Spike und Bik am ER möglicherweise ähnlich. Die bisher gewonnenen Daten von Bik passen zu dem oben postulierten Modell des Spike-induzierten Zelltods über einen Faktor X, der die Verbindung zwischen ER und Mitochondrien

vermittelt und über einen Bax/Bak-ähnlichen Mechanismus den Austritt proapoptotischer mitochondrialer Faktoren bewirkt.

3.10 Ist Spike ein Tumorsuppressor?

Eine Resistenz gegenüber Apoptose ist für die Vermehrung eines transformierten Klonen bei der Tumorgenese für die meisten, wenn nicht sogar aller Tumore entscheidend (Strasser et al., 1997; Jäättelä et al., 1999; Hanahan und Weinberg, 2000). Beim Test der Spike-Expression von RNA aus normalem Gewebe im Vergleich zu Tumorgewebe (siehe Abb. 2.2.17.1) konnte eine signifikante, tumorspezifische Reduktion des Spike-Signals in vier der statistisch ausgewerteten acht Gewebe beobachtet werden (Abb. 2.2.17.2). Läßt dieses Ergebnis auf tumorsuppressorische Eigenschaften von Spike schließen?

Es gibt Hinweise, daß Mitglieder der Bcl-2-Familie durch ihre pro- oder antiapoptotischen Eigenschaften Einfluß auf das Tumorwachstum nehmen können. So wurde das antiapoptotische Bcl-2 ursprünglich in B-Zell-Lymphomen identifiziert, dessen Expression durch eine Gentranslokation hinter den Immunglobulinpromotor um ein Vielfaches verstärkt wurde (Tsujimoto et al., 1985). In einigen Tumoren wurde ein Anstieg der Expression antiapoptotischer Bcl-2-Proteine gefunden, in anderen eine Abnahme proapoptotischer Proteine. Bax beispielsweise besitzt Tumorsuppressor-Aktivität, indem es Apoptose induziert (Yin et al., 1997; Antonsson, 2001). Eine große Anzahl von Tumoren enthalten mutiertes p53, das bei der transkriptionellen Regulation der Bax-Expression beteiligt ist (Hussain und Harris, 2000). Etwa ein Drittel der Brustadenocarcinome zeigen eine reduzierte Bax-Expression, die mit einer verringerten Reaktion auf Chemotherapeutika und Überlebenschancen der Patienten korreliert (Krajewski et al., 1995). Eine verringerte Bax-Expression verbunden mit einer Verstärkung der Expression antiapoptotischer Bcl-2-Mitglieder wurde in Patienten mit Dickdarmkrebs detektiert (Krajewska et al., 1996). Außerdem enthalten mehr als 50% einer bestimmten Form von Dickdarmkrebs (MMP) inaktivierende *frameshift*-Mutationen im Bax-Gen (Rampino et al., 1997).

Interessanterweise konnte wie bei Bax eine Verringerung der Spike-Expression in Brust- und Dickdarntumoren festgestellt werden. 31% der getesteten Brust- und 33% der

Dickdarntumore zeigen eine signifikant reduzierte Spike-Expression. Noch deutlicher waren die Daten in Lunge (43%) und Niere (40%). Dennoch sollten diese Daten nur als Anhaltspunkte zur Verdeutlichung eines generellen Trends dienen. Es ist unklar, ob es bei der Aufarbeitung der Proben für diesen Northern-Blot überhaupt möglich ist, eine exakte Vergleichbarkeit der Signale zu gewährleisten. Wenn die Expression eines Genes in spezifischen Subgeweben (beispielsweise der Niere) variiert, kann der Expressionsvergleich zu Tumorgewebe, das aus einem einzelnen dieser Subgewebe hervorgegangen ist, zu falschen Ergebnissen führen. Auch das Auftreten von Isoformen verfälscht die Daten eines solchen Blottes, obwohl es keine Hinweise für verschiedene Spike-Isoformen gibt. Andererseits werden mit dieser Methode nur transkriptionelle Veränderungen getestet. Potentielle Mutationen, die eine Inaktivierung von Spike bewirken, gehen in diese Auswertung nicht ein. Der prozentuale Anteil des durch Expressionsreduktion und Mutationen inaktivierten Spikes in Tumoren könnte also auch noch höher sein.

Auf der anderen Seite zeigt ein zwar statistisch geringer, aber dennoch signifikanter Anteil der Tumore aller hier getesteter Gewebe eine verstärkte Spike-Expression: 10-20% (Ausnahme: Eierstöcke, 36%). Dies könnte aus der oben beschriebenen teilweise nicht 100%igen Vergleichbarkeit der aufgearbeiteten Gewebeproben resultieren. Andererseits wäre es möglich, daß dies eine Reaktion auf das Tumorstadium darstellt und mittels Aktivierung proapoptotischer Prozesse unter anderem über eine verstärkte Spike-Expression ein Fortschreiten des Tumorstadiums unterbunden werden sollte. Dabei waren die Spike-vermittelten Apoptosewege entweder blockiert und dadurch unwirksam oder die Apoptose hatte zum Zeitpunkt der Probenentnahme noch nicht eingesetzt. Eine derartige Reaktion der Zelle wurde beispielsweise in Patienten mit dilatierter Cardiomyopathie und Herzinfarkt beobachtet. In beiden Fällen sind in den betroffenen Zellen die Proteinlevel der proapoptotischen Bcl-2-Mitglieder Bax und Bak erhöht, was mit einer verstärkten Zelltodrate korreliert (Latif et al., 2000; Antonsson, 2001).

Die chromosomale Position von humanem Spike auf dem kurzen Arm des Chromosom 9 (p12) läßt keine Aussagen über die Tumorigenität einer Spike-Inaktivierung analog der

Situation von Bcl-2 in B-Zell-Lymphomen zu. Die Chromosomenregion 9p12 ist kein bekannter sogenannter *hot spot* für Chromosomaberrationen. Dennoch werden eine Anzahl von Tumoren mit dieser Region in Verbindung gebracht, wie aus statistischen Erhebungen einer Korrelation von Tumoren mit chromosomalen Regionen ersichtlich ist (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/HsChr9.shtml>) (Mitelman et al., 1997).

Insgesamt wäre es durchaus möglich, daß Spike in bestimmten Tumoren direkt oder indirekt als Tumorsuppressor wirkt. Eine Reduktion der Spike-Expression oder auch eine Inaktivierung von Spike über Mutationen ist denkbar. Wie in dieser Arbeit demonstriert wurde, resultiert dies in einer verringerten Sensitivität der Zelle auf extrazelluläre Todessignale wie Fas. Im Zusammenspiel mit anderen tumorigenen Signalen und inaktivierten Apoptosewegen kommt es dadurch zu einer Förderung, bzw. zur fehlenden Hemmung des Tumorwachstums.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine bislang nicht genauer beschriebene cDNA biochemisch und molekularbiologisch genauer charakterisiert, die mit Hilfe eines speziell zur Identifikation dominanter, Apoptose-induzierender Gene entwickelten genetischen Expressionsscreens detektiert wurde (Grimm und Leder, 1997). Der ORF kodiert für ein unbekanntes BH3-*only*-Protein von 219 Aminosäureresten (Spike), das in humanen Zellen schnell und effizient Apoptose induzieren kann.

Die Apoptose-induzierende Funktion von Spike greift vermutlich auf einen evolutiv konservierten Mechanismus zurück, da auch die homologen *C. elegans*- und *D. melanogaster*-Proteine nach transienter Transfektion in Säugerzellen deren Tod verursachen. Dabei induziert Spike Caspase-abhängige Apoptosewege. Nach der Hemmung Caspase-vermittelter Merkmale wie die Bildung apoptotischer Körperchen (*membrane blebbing*), DNA-Fragmentierung oder Caspase-3-Aktivierung mit zVADfmk, wird außerdem die Ausprägung eines Caspase-unabhängig initiierten Phänotyps deutlich. Zusätzlich aktiviert Spike proapoptotische mitochondriale Ereignisse, es kommt zu einer Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials und zum Austritt von Cytochrome c.

Spike wird in den meisten der getesteten Gewebe und Zelltypen exprimiert, obwohl die Expressionsstärke sehr stark variiert. Im Northern-Blot konnten vergleichsweise hohe Expressionslevel an Spike-mRNA in Niere, Placenta, Herz und Leber detektiert werden, kein Signal wurde in peripheren Blut-Leukozyten deutlich. Das breite Expressionspektrum unterstreicht das Potenzial von Spike, als genereller Apoptoseregulator zu wirken und läßt eine Regulation der Spike-Aktivität auf posttranslationeller Ebene vermuten. Unterstützt wird diese Vermutung durch das Auftreten eines 33 kD-Signals in Immunoblot-Analysen, welches in seiner Intensitätsstärke zu p31 in Abhängigkeit vom Zelltyp variiert.

Die N-terminalen 19 Aminosäurereste sind für die subzelluläre Verteilung von Spike am ER verantwortlich, die zwei *coiled-coil*-Domänen in der Spike-Sequenz vermitteln dessen Selbstassoziation. Das BH3-Motiv ist für die proapoptotische Aktivität von Spike

notwendig. Die Deletion dieses Motivs bzw. Punktmutationen konservierter Reste reduzieren drastisch die Zelltod-induzierende Wirkung von Spike. Obwohl die BH3-Domäne notwendig für die proapoptotische Aktivität ist, wurde im Gegensatz zu anderen BH3-only-Proteinen keine Assoziation von Spike mit den antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie Bcl-2 oder Bcl-X_L detektiert. Spike könnte wie Bok selektiv nur mit bestimmten (hier nicht getesteten) Bcl-2-Mitgliedern interagieren.

Spike interagiert mit Bap31, welches am ER einen Proteinkomplex bildet, der Procaspase-8L sowie die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie Bcl-2 bzw. Bcl-X_L enthält. Die Spike-vermittelte Apoptose beinhaltet eine Caspase-abhängige Prozessierung von Bap31, was indirekt eine Aktivierung von Procaspase-8L hindeutet. Die Assoziation von Spike mit Bap31 reduziert drastisch eine gleichzeitige Interaktion von Bcl-X_L mit Bap31. Dies führte zur Postulierung eines Modells, wonach eine Aktivierung von Spike auf einen spezifischen Apoptosestimulus hin zu einer Verdrängung von Bcl-X_L am Bap31-Komplex führt, das diesen Komplex in einem inaktiven Zustand gehalten hatte. Da jedoch diese Verdrängung unabhängig vom BH3-Motiv stattfindet, aber ein Großteil der Apoptose-induzierenden Aktivität durch diese Domäne vermittelt wird, kommt es möglicherweise zur BH3-abhängigen Aktivierung eines „Faktor X“, der das auf molekularer Ebene bisher nicht identifizierte Bindeglied zwischen Endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien darstellen könnte.

Spike ist in HeLa-Zellen an der Fas-induzierten, nicht jedoch an der TNF α -vermittelten Apoptose beteiligt, wie mit Hilfe eines dominant-negativ wirkenden Spike-Konstruktes (Δ N19) und eines Antisense-Oligonukleotids gegen Spike nachgewiesen wurde. Zusätzlich konnte eine signifikante, tumorspezifische Reduktion des Spike-Signals in spezifischen Tumoren beobachtet werden, welches in einer verringerten Sensitivität der Zellen auf extrazelluläre Todessignale wie Fas resultiert und somit zu einer Förderung, des Tumorwachstums beitragen kann.

5 Material

5.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien und Feinchemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in Analyse-Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), SERVA (Heidelberg) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Das in dieser Arbeit verwendete Wasser wurde über eine „Purelab Plus UV/UF“-Filteranlage der Firma USF (Ransbach-Baumbach) aufbereitet. Es wird im folgenden als ddH₂O bezeichnet.

5.1.1 Radiochemikalien

Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen: Cytosine 5'-[α -³²P]triphosphat, Triethylammoniumsalz, 3000 Ci/mmol, 50 μ Ci/ μ l

5.1.2 Verbrauchsmaterial

Einmalkunststoffwaren wurden von den Firmen B. Braun (Melsungen), Becton Dickinson (Heidelberg), Biozym Diagnostik (Hess. Oldendorf), Brand (Wertheim), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickenhausen), Josef Peske (Aindling-Pichl), Sarstedt (Nümbrecht), und Zinsser Analytic (Frankfurt) bezogen. Lieferanten für Gewebekulturgefäße waren die Firmen Becton Dickinson (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen) und Nunc (Wiesbaden). Eimalkanülen wurden von der Firma Terumo (Frankfurt), Einmalhandschuhe von der Firma Semperit (Wien) geliefert. Sterilfilter stammten von den Firmen Millipore (Eschborn), Pall (Dreieich) und Renner (Dannstadt). Die Transfermembran (PVDF-Membran) war von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg). Es wurden verschiedene Röntgenfilmtypen der Firma Kodak (Stuttgart) eingesetzt: BioMax MS und BioMax MR.

5.2 Plasmide

pcDNA3 Eukaryontischer Expressionsvektor, CMV-Promoter ermöglicht die Expression rekombinanter DNA in eukaryontischen Zellen (Invitrogen, Heidelberg)

pcDNA3HA	Eukaryontischer Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für einen C-terminalen HA-Tag
pcDNA3myc	Eukaryontischer Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für einen C-terminalen myc-Tag
pcDNA3-YFP	Eukaryontischer Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für einen C-terminalen YFP-Tag (Alexis Schubert, Clontech)
pGEX4-T1	Prokaryontischer Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für einen N-terminalen GST-Tag (Amersham-Pharmacia)
pBTM116	<i>Yeast-Two-Hybrid</i> -Vektor, trägt die kodierenden Sequenzen für die DNA-Bindungsdomäne des Hefe-Transkriptionsfaktors LexA (Stratagene)
pVP16	<i>Yeast-Two-Hybrid</i> -Vektor, trägt die kodierenden Sequenzen für die Aktivierungsdomäne des Hefe-Transkriptionsfaktors LexA (Stratagene)
GFP-pLantern	Eukaryontischer Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für GFP (GibcoBRL)
Bax-HA	Eukaryontischer pcDNA3-Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für humanes Bax (Manuel Bauer)
Bcl2-HA	Eukaryontischer pcDNA3-Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für humanes Bcl2 (Thomas Mund)
Bcl-XL-HA	Eukaryontischer pcDNA3-Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für humanes Bcl-XL (Thomas Mund)
Bap31-HA/myc	Eukaryontischer pcDNA3-Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für humanes Bap31 (Thomas Mund)
pBluescript II KS (-)	Stratagene

5.3 DNA-Oligonukleotide

Die DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) und von der DNA-Oligonukleotid-Seviceeinheit am MPI für Biochemie (Abt. Oesterhelt) bezogen. Alle Konstrukte wurden sofern nicht anderweitig angegeben in den pcDNA3- oder pcDNA3Δ- (ohne Neomycin-Resistenzgen) Vektor kloniert.

Name	Herkunft	Sequenz (5' → 3')
Spike-ORF	Maus cDNA (aus <i>screen</i>)	for, CCCAAGCTTGGGGCCAAGATGAACCGATTCTTC rev, ATAGTTAGCGGCCCGCCTACGAAGCGGGAATCTG HindIII-NotI
Spike-ORF ohne ATG	Maus cDNA	for, CCCAAGCTTGGGAACCGATTCTTCGGAAAAGCG rev, ATAGTTAGCGGCCCGCCTACGAAGCGGGAATCTG HindIII-NotI
Spike-(HA,myc)	Maus cDNA	for, CCCAAGCTTGGGGCCAAGATGAACCGATTCTTC rev, TAGTGCATGCGGCCGCCCGAAGCGGGAATCTGCGGCAG HindIII-NotI
ΔN-19 (HA,myc)	Maus cDNA	for, CCCAAGCTTGGGGGCGACATGTGCATTGGGACGGTGGATAGC rev, TAGTGCATGCGGCCGCCCGAAGCGGGAATCTGCGGCAG HindIII-NotI
ΔN-92 (HA,myc)	Maus cDNA	for, CCCAAGCTTGGGGGCGACATGAATTACACCATCCAGTCACTA rev, TAGTGCATGCGGCCGCCCGAAGCGGGAATCTGCGGCAG HindIII-NotI
ΔC-181(HA,myc)	Maus cDNA	for, CCCAAGCTTGGGGCCAAGATGAACCGATTCTTC rev, TAGTGCATGCGGCCCGCTATCTTCATCAGCCAGAAG HindIII-NotI
ΔC-154(HA,myc)	Maus cDNA	for, CCCAAGCTTGGGGCCAAGATGAACCGATTCTTC rev, TAGTGCATGCGGCCCGCTAGCTGCGGCCAGGGCTTC HindIII-NotI
ΔC-93 (HA,myc)	Maus cDNA	for, CCCAAGCTTGGGGCCAAGATGAACCGATTCTTC rev, TAGTGCATGCGGCCCGCAGCTTGCTCCATGTTAAAGGA HindIII-NotI
ΔN-19/ΔC-181 (HA,myc)	Maus cDNA	for, CCCAAGCTTGGGGGCGACATGTGCATTGGGACGGTGGATAGC rev, TAGTGCATGCGGCCCGCTATCTTCATCAGCCAGAAG HindIII-NotI
ΔN-19/ΔC-154	Maus cDNA	for,

(HA,myc)		CCCAAGCTTGGGGGCGACATGTGCATTGGGACGGTGGATAGC rev, TAGTGCATGCGGCCGCCGTAGCTGCGGCCAGGGCTTC HindIII-NotI
L170A	Maus cDNA	for- intern, TTAGATGCGGCTGGCGATGAG rev-intern, CTCATCGCCAGCCGCATCTAA for-extern, CCCAAGCTTGGGGCCAAGATGAACCGATTCTTC rev-extern, CCCTCGAGGGCTACGAAGCGGGAATCTGCGG HindIII-XhoI
L170E	Maus cDNA	for- intern, TTAGATGCGGAGGGCGATGAG rev-intern, CTCATCGCCCTCCGCATCTAA for-extern, CCCAAGCTTGGGGCCAAGATGAACCGATTCTTC rev-extern, CCCTCGAGGGCTACGAAGCGGGAATCTGCGG HindIII-XhoI
G171R	Maus cDNA	for- intern, GATGCGCTGCGCGATGAGCTT rev-intern, AAGCTCATCGCGCAGCGCATC for-extern, CCCAAGCTTGGGGCCAAGATGAACCGATTCTTC rev-extern, CCCTCGAGGGCTACGAAGCGGGAATCTGCGG HindIII-XhoI
D172N	Maus cDNA	for- intern, GCGCTGGGCAACGAGCTTCTG rev-intern, CAGAAGCTCGTTGCCAGCGC for-extern, CCCAAGCTTGGGGCCAAGATGAACCGATTCTTC rev-extern, CCCTCGAGGGCTACGAAGCGGGAATCTGCGG HindIII-XhoI
L174A	Maus cDNA	for- intern, GGCGATGAGGCGCTGGCTGAT rev-intern, ATCAGCCAGCGCCTCATCGCC for-extern, CCCAAGCTTGGGGCCAAGATGAACCGATTCTTC rev-extern, CCCTCGAGGGCTACGAAGCGGGAATCTGCGG HindIII-XhoI
LL174/5RR	Maus cDNA	for- intern, CTGGGCGATGAGCGCCGGGCTGATGAAGAT rev-intern, ATCTTCATCAGCCGCGCTCATCGCCAG for-extern, CCCAAGCTTGGGGCCAAGATGAACCGATTCTTC rev-extern, CCCTCGAGGGCTACGAAGCGGGAATCTGCGG HindIII-XhoI
humane Spike cDNA	HeLa-cDNA (Thomas Mund)	for, CGGGATCCCTTCGCGGCTGCTCAAGATGA rev, CGGAATTCCAATAATGGACACAGTAACGA BamHI-EcoRI
<i>D. melanogaster</i> - Spike ORF	<i>D.melanoga- ster</i> -cDNA (Thomas Mund)	for, CCCAAGCTTGGGGGCGACATGAATCGCCTTTTGGTTCGT rev, CCCTCGAGGGCTATGTGGTCTTCAGCGATGT HindIII-XhoI

<i>C.elegans</i> -Spike ORF	<i>C.elegans</i> -cDNA (Ralf Schnabel, Braunschweig)	for, CCCAAGCTTGGGGCCAAGATGAATCGGATTTTTGGAACA rev, ATAGTTAGCGGCCGCTTATGCTGGTAATTTTCGGCAG HindIII-NotI
<i>C.elegans</i> -Spike ORF ohne ATG	dto.	for, CCCAAGCTTGGGAATCGGATTTTTGGAACAGGAAAG rev, ATAGTTAGCGGCCGCTTATGCTGGTAATTTTCGGCAG HindIII-NotI
GST-Spike	Spike-ORF ohne ATG	Subkloniert aus Spike-ORF ohne ATG HindIII-XhoI in pBluescript II KS, anschl. EcoRI-XhoI in pGEX4T-1
Bcl2 (HA,myc)	Plasmid (Stefan Grimm)	for, CGGAATTCGGAAATATGGCGCACGCTGGGAGAACA rev, TAGTGCATGCGGCCGCCCTTGTGGCCAGATAGGCACC EcoRI-NotI
Bcl-XL (HA,myc)	Plasmid (Stefan Grimm)	for, CGGAATTCGGAAATATGTCTCAGAGCAACCGGGAG rev, TAGTGCATGCGGCCGCCCTTCCGACTGAAGAGTGAGCC EcoRI-NotI
Bap31 (HA, myc, YFP)	HeLa-cDNA (Thomas Mund)	for, CGGAATTCAACAGGATGAGTCTGCAGTGG rev, TAGTGCATGCGGCCGCCCTCTTCCTTCTTGCCATG EcoRI-NotI
Caspase-resistant Bap31 (HA,myc) (D164A,D238A)	Bap31 (HA,myc)	for, CGGAATTCAACAGGATGAGTCTGCAGTGG (extern) 2, GCTGCTGTTGCAGGAGGCAAG (intern D164A) 3, CTTGCCTCCTGCAACAGCAGC (intern D164A) rev, TAGTGCATGCGGCCGCCCTCTTCCTTCTTGCCATGGGACCAG CTACTGCAGC (extern inclusive D238A) EcoRI-NotI
LexA-BclXLΔC213 (pBTM116)	Bcl-XL (HA,myc)	for, CGGAATTCTCTCAGAGCAACCGGGAG rev, CGGGATCCTCAGCGGTTGAAGCGTTCCTG EcoRI-BamHI
VP16-BclXL (pVP16)	Bcl-XL (HA,myc)	for, TAGTGCATGCGGCCGCTATCTCAGAGCAACCGGGAGCTG rev, CGGAATTCTCAGCGGTTGAAGCGTTCCTGGCC NotI-EcoRI
VP16-Bcl2 (pVP16)	Bcl-2 (HA,myc)	for, TAGTGCATGCGGCCGCTAGCGCACGCTGGGAGAACAGGG rev, CGGAATTCTCAAGTCTTCAGAGACAGCCAGGA NotI-EcoRI
BaxΔN40-ΔC172 (pBTM116)	Bax (HA,myc)	for, CGGAATTCGAGACACCTGAGCTGACCTTG rev, GACCGCTGACTCACTGCCATGTGGGGGTCCCGAA EcoRI-SalI
LexA-Spike (pBTM116)	Spike (HA,myc)	for, CGGAATTCAAGCGATTCTTCGGAAAAGCG rev, CGGGATCCTCAGCTATCTTCATCAGCCAG

		EcoRI-BamHI
VP16-Spike (pVP16)	Spike (HA,myc)	for, TAGTGCATGCGGCCGCTAAAGCGATTCTTCGGAAAAGCG rev, CGGAATTCCTACGAAGCGGGAATCTGCGG NotI-EcoRI
Spike Antisense (AS) 1		CGAAGAGTCGGTTCATCTTGAGC
Spike AS 2		GCTTGTTCATGTTGAATGACTG
Spike AS 3		CAAATCTATGAAGCAGGGATC
Spike AS 4		CTTTGGTCTTATCCAAATTTAC
Mismatch AS 2		GCTTATTTTATATTGAATAACTG

5.4 Molekulargewichts- und Längenstandards

Rainbow Protein Marker, Protein Größenstandard	Life Technologies, Karlsruhe
100 bp SmartLadder SF, DNA Größenstandard	Eurogentec, Seraing (Belgien)
1 kb SmartLadder, DNA Größenstandard	Eurogentec, Seraing (Belgien)

5.5 Reagenzien und Reaktions-Sets („Kits“)

Big Dye Terminator Cycle Sequencing RR-Mix	Applied Biosystems, Foster City ,USA
BioRad Protein Microassay	BioRad, München
Caspase-3 Activity assay	Roche, Mannheim
Complete without EDTA, Proteaseinhibitor-Mischung	Roche, Mannheim
Desoxynucleotide Set	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DiOC ₆ (3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide)	Molecular Probes, USA
Effectene Transfection Reagent	QIAGEN, Hilden
Freund's Adjuvant, incomplete	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GeneAmp RNA PCR Kit	Perkin Elmer Cetus, USA
Glow, mounting medium	Energene, Regensburg
Long Template PCR Kit	Roche, Mannheim
QIAGEN Plasmid Kit (Mini, Midi,Maxi)	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe

Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce, Rockford, USA
Sure Clone Ligation Kit	Pharmacia, Freiburg
TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
TiterMax Gold, Adjuvant	CytRxCorporation, Norcross, USA
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande

5.6 Enzyme

Enzyme wurden von den Firmen Calbiochem-Novabiochem GmbH (Bad Soden), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Promega (Mannheim), QIAGEN (Hilden), Roche (Mannheim) und Stratagene (Heidelberg) bezogen. Sofern nicht anders angegeben, wurden die vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen gewählt.

5.7 Puffer und Lösungen

Amidoschwarz-Färbelösung	0,2% Amidoschwarz 10B, 10% (v/v) Methanol, 2% (v/v) Essigsäure
Blocklösung A	5% (w/v) Milchpulver in TBS/T
Blocklösung B	2% (w/v) BSA in PBS
complete ohne EDTA, 50 x	1 Tablette „complete without EDTA“- Proteaseinhibitor-Mischung (Roche) in 1 ml ddH ₂ O
Coomassie-Färbelösung	50% (v/v) Methanol, 10% Essigsäure, 0,1% (w/v) SERVA Blue R (SERVA)
DNA-Auftragspuffer, 6 x	10 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, 1% SDS (w/v), 30% (w/v) Glycerin, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, pH 8,0
IP-Puffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,4, 0,2% (v/v), Igepal, 1 mM EDTA und 1,5 mM MgCl ₂
Lysepuffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,4, 0,2% (v/v), Igepal, 1 mM EDTA und 1,5 mM MgCl ₂
P1	50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0

P2	200 mM NaOH, 1% SDS
P3	3 M K-Azetat, pH 5,5
Paraformaldehyd-Lösung	37 % (w/v) Paraformaldehyd dunkel bei 4°C gelagert, Arbeitslösung: 3,7% in PBS
PBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 eingestellt mit NaOH
PBS-T	0,05% Tween-20 in PBS
PI-Lysepuffer:	20 µg/ml Propidium iodid, 0,1% (w/v) Na ₃ Citrat, 0,1% Triton X-100 in PBS
Ponceau-Färbelösung	0,1% Ponceau S, 1% (v/v) Essigsäure
SDS-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer, 10 x	209 mM Tris/HCl, 41% (w/v) Glycerin, 7,7% (w/v) SDS, 0,003% (w/v) Bromphenolblau, 17 % (v/v) β- Mercaptoethanol, pH 6,8
SDS-Probenpuffer, 2x	125 mM Tris/HCl, 17 % (w/v) Glycerin, 4,1% SDS, 0,001% (w/v) Bromphenolblau, 2% (v/v) β-Mercaptoethanol, pH 6,8
SDS-Sammelgelpuffer, 4 x	0,5 M Tris/HCl, 0,4% (w/v) SDS, pH 6,8
SDS-Trenngelpuffer, 4 x	1,5 M Tris/HCl, 0,4% (w/v) SDS, pH 8,8
SSC, 20 x	0,3 M Trinatriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7,0 eingestellt mit HCl
TAE-Puffer, 5 x	450 mM Tris, 450 mM Borsäure, 10 mM EDTA
TBS	20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5
TBS/T-Puffer	150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 0,05% Tween 20
TE	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
Triton-X-100-Lösung	0,2% (w/v) Triton-X-100 in PBS
Transferpuffer	47,9 mM Tris, 38,6 mM Glycin, 0,037% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol
TSS	10% (w/v) Polyethylenglykol 6000, 5% (v/v) DMSO, 50 mM MgCl ₂ in LB-Medium

Vorhybridisierungslösung 1 M NaCl, 10% (w/v) Dextransulfat, 1% (w/v) SDS,
0,01% (w/v) Heringssperma-DNA

5.8 Organismen und Zelllinien

5.8.1 Bakterienstämme

BL21 e⁻ 14⁻ (McrA⁻) Δ (*merCB-hsdS*MR-*mrr*) 171 end A1*supE44*thi-1
gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^r) *uvrC* (F⁻
proAB lacI^{q_z} Δ M15 Tn10 (Tet^r))^c

DH5α F⁻ Φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1*
hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) *supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1*

SURE BF⁻ *dcm ompT hsdS* (rB-mB-) gal

5.8.2 Eukaryontische Zelllinien

293T	Human Embryonic Kidney
B9/B30	Chinese Hamster Lung Fibroblasts
BHK	Baby Hamster Kidney
CHO	Chinese Hamster Ovary
HeLa	Cervix Carcinoma
HeLa _0	Cervix Carcinoma, ohne mitochondriale DNA
Jurkat	Human T cell Leukemia
L929	Mouse Fibroblasts
McARH7777	McArdle Rat Hepatoma
MCF7	Human Breast Adenocarcinoma
NIH3T3	Mouse Fibroblasts
NRK	Normal Rat Kidney
PC3	Prostate Carcinoma
Raji	Burkitt's Lymphoma
Rat1	Rat Fibroblasts

Die Zelllinien wurden in DMEM (LifeTechnologies) mit den Zusätzen L-Glutamin, Natriumpyruvat und Penicillin/Streptomycin kultiviert, entweder mit 5% (293T) oder 10% fötalem Kälberserum (Sigma-Aldrich) versetzt.

5.9 Medien und Medienzusätze

5.9.1 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium	1% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1%(w/v) NaCl
Superbroth-Medium	3,5% (w/v) Bactotrypton, 2% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl
SOC-Medium	2% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM Mg Cl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose

Festmedien wurden durch Zugabe von 1,5% (w/v) Agar hergestellt. Selektionsmedien enthielten 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin.

5.9.2 Medien und Lösungen für die Hefekultur

YPD: 10g Yeast Extract, 20g Peptone, 20g Glucose ad 1000 ml Bideest, für Platten: +16 g/l Bacto-Agar

10x DO:

- 300 mg/l L-Isoleucin (Sigma)
- 1500 mg/l L-Valin (Sigma)
- 200 mg/l L-Adenin hemisulfat (Sigma)
- 200 mg/l L-Arginin . HCl (Sigma)
- 200 mg/l L-Histidin . HCl (Sigma)
- 1000 mg/l L –Leucin (Sigma)
- 300 mg/l L-Lysin (Sigma)
- 200 mg/l L-Methionin (Sigma)
- 500 mg/l L-Phenylalanin (Sigma)
- 2000 mg/l L-Threonin (Sigma)
- 200 mg/l L-Tryptophan (Sigma)
- 300 mg/l L-Tyrosin (Sigma),
- 200 mg/l L-Uracil (Sigma)

Ausgehend vom 10x DO-Medium konnten die erforderlichen Selektionsmedien durch Auslassen der jeweils nicht erwünschten Aminosäuren erhalten werden:

10x DO – H:	(Histidin defizient)
10x DO – L:	(Leucin defizient)
10x DO – THULL:	(Tryptophan-, Histidin-, Uracil-, Leucin-, Lysin-defizient)
SD-Medien für die Hefekultur:	6,7 g Difco Yeast Nitrogen Base (Difco) 20 g Glucose, 100 ml 10x DO (-H; -L; -THULL; TL) in 900 ml Bidest lösen, pH 5,6 eingestellt, autoklaviert: 15 min bei 121°C
1M Lithiumacetat:	10,2 g Lithiumacetat ad 100 ml Bidest, pH zwischen 8,4 und 8,9 autoklaviert oder sterilfiltriert
50% PEG:	50 g PEG 3350 wurde mit 35 ml Bidest versetzt. Die Lösung wurde auf 100 ml mit Bidest aufgefüllt und anschließend autoklaviert.
Yeast Lysis Solution:	2% Triton X – 100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0, 1,0 mM EDTA
Carrier-DNA:	1,184 ml Sigma Salmon Testes (9,5 mg/ml), 1,316 ml Bidest, 20 min bei 100°C denaturieren und anschließend sofort auf Eis abkühlen

5.9.3 Medien für die eukaryontische Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	LifeTechnologies, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS) und L-Glutamin (100 x)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen LifeTechnologies, Karlsruhe
Natriumpyruvat (100 x)	Life Technologies, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (100 x)	Life Technologies, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (10 x)	Life Technologies, Karlsruhe

5.10 Antikörper und Antiseren

Im folgenden sind die verwendeten Antikörper und Antiseren angegeben. Auf die Herstellung und Reinigung von Antiseren wird im Methodenteil eingegangen. Sekundäre Antikörper für Western-Blots und Immunfluoreszenzmikroskopie wurden von Sigma bezogen.

Name	Antigen	Herkunft	Referenz/Hersteller
9E3	HA-Tag	Ratte, monoklonal	Roche, Mannheim
9E10	Myc-Tag	Maus, monoklonal	Roche, Mannheim
anti-Spike	Murines Spike	Kaninchen, polyklonal	diese Arbeit (4.7) Mund, T. et al., (2002)
anti-Bax	Humanes Bax	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
anti-Bcl2	Humanes Bcl2	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
anti-Cytochrome c	Humanes-Cytochrome c	Maus, monoklonal	PharminGen Europe
anti-Tim23	Humanes Tim23	Maus, monoklonal	Transfection Laboratories
anti-GFP	GFP	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
anti-Fas (CH-11)	Humanes Fas	Maus, monoklonal	Kamiya Biomedical, USA
anti-mouse IgG Peroxidase-conjugate		Ziege, polyklonal	Sigma
anti-rabbit IgG Peroxidase-conjugate		Ziege, polyklonal	Sigma
anti-rat IgG Peroxidase-conjugate		Esel, Ziege polyklonal	Roche, Sigma
anti-myc IgG Peroxidase-conjugate		Maus, monoklonal	Roche, Mannheim
anti-mouse IgG Rhodamine-conjugate		Ziege, polyklonal	Roche, Mannheim
anti-rabbit IgG AlexaGreen-conjugate		Ziege, polyklonal	Amersham Pharmacia, Freiburg

5.11 Sonstiges

Geräte	Hersteller
Brutschränke & Inkubatoren:	Heraeus, Hanau

Inkubationsschüttler / Elektrophoresekammern:	(Eigenbau) MPI-Werkstatt
Power-Supply für die Gelelektrophorese:	
Electrophoresis Power Supply EPS 600	Pharmacia Biotech
Mikroskope: Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop: Axiophot IM-35	Zeiss, Oberkochen
Kühlzentrifugen: 5417 R, 4K15, RC 5B Plus	Eppendorf, Sigma, Sorval
Pipetten:	Gilson (USA)
Tischzentrifugen: 5417 C	Eppendorf
UV-Tisch: UVT-14L, Eagle Eye	Herlolab, Stratagene
Vakuumpzentrifuge: Concentrator 5301	Eppendorf
Spektrophotometer: DU 530	Beckman
PCR: Mastercycler Gradient,	Eppendorf
Mastercycler Personal	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

6 Methoden

Die aufgeführten Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, aus Sambrook *et al.* (1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, *Current Protocols in Protein Science* und *Current Protocols in Cell Biologie* abgeleitet.

6.1 Molekularbiologische Methoden

6.1.1 Nukleinsäure-Fällung

Eine wässrige DNA-Lösung wurde mit 3 M Natriumazetat-Lösung (pH 5,2) auf eine Endmolarität von 0,3 M eingestellt und mit dem 2,5fachen Volumen Ethanol oder dem 0,7fachen Volumen Isopropanol versetzt. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte für mindestens 30 min bei -20°C. Das Präzipitat wurde durch 20minütige Zentrifugation bei 13000 g pelletiert, mit ausgefallenes Salz durch Behandlung mit 70% Ethanol aus dem DNA-Präzipitat entfernt. Die durch erneute Zentrifugation pelletierte Nukleinsäure wurde an der Luft oder im Vakuum getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH₂O oder TE-Puffer aufgenommen.

6.1.2 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die DNA-Konzentrationen einer wässriger Lösungen wurden spektralphotometrisch bestimmt. Dafür wurde die Extinktion einer verdünnten Nukleinsäurelösung bei 260 nm im Spektralphotometer (Spectrophotometer DU 530, Beckman, München) gemessen. Eine Extinktion von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/µl für doppelsträngige DNA. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm zu 280 nm ist ein Maß für die Reinheit einer Nukleinsäurelösung und sollte für DNA bei etwa 1,8 liegen (gilt für Lösungen mit pH 8,0).

6.1.3 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA aus *E.coli* wurden 2 ml LB-Medium in einem 15 ml Falcon-Gefäß mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde 5 min bei 6000 rpm abzentrifugiert. Das Bakterien-Pellet wurde in 150 µl Puffer P1 resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-

Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 150 µl alkalischer Lösung P2 wurde das Gemisch vorsichtig invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 150 µl eisgekühlter Puffer P3 zugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die ausgefallenen Proteine und die Bakteriendebris wurden abzentrifugiert (10 min, 13000 g, 4°C) und die Plasmid-DNA mit 400 µl Isopropanol aus dem Überstand ausgefällt. Die Plasmid-DNA wurde durch 10minütige Zentrifugation bei 13000 g und RT sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen, an der Luft oder im Vakuum getrocknet und in 25 µl ddH₂O gelöst.

Zur Isolierung größerer Mengen reiner, intakter Plasmid-DNA wurde das „Maxi-Plasmid Purification Kit“ der Firma QIAGEN nach den Empfehlungen des Herstellers eingesetzt. Dafür wurden 100ml Bakterienkultur verwendet. Diese DNA wurde zur Transfektion von Gewebekulturzellen eingesetzt.

6.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA für Screen

Die Isolierung der DNA wurde wie bei (Neudecker and Grimm, 2000) beschrieben ausgeführt. Es wurden Über-Nacht-Kulturen von Bakterien in 96-deep well plates (Qiagen, Hilden) angelegt. Anschließend wurden die Bakterien 5 min bei 3000g in einer Sigma-Kühlzentrifuge (Sigma 4K15) pelletiert. Die Bakterienpellets wurden in je 170 µl Puffer P1 durch vortexen resuspendiert und anschließend durch Zugabe von je 170 µl Puffer P2 lysiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Lyse durch Zusatz von 170 µl Puffer P3 unterbrochen. Die Blöcke wurden anschließend 5 min bei 6000 g zentrifugiert und der Überstand in frische 96-deep well plates eingebracht. Es wurden je 100 µl Puffer P4 zugesetzt und die Suspension bei 45 min bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die Blöcke 10 min bei 6000g zentrifugiert. Die Überstände wurden in 96-well Polyoxymethyl-Microtiterplatten eingebracht und es wurden je 150 µl Siliciumdioxidsuspension zugesetzt. Die Platten wurden 20 min bei RT inkubiert, wodurch die DNA an die Silicaoberfläche binden konnte. Anschließend wurden die Platten 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Silicapellets wurden mit je 400 µl kaltem (-20°C) Aceton gewaschen und 30 sec gevortext. Anschließend wurden die Blöcke 3 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Die Platten wurden bei RT für 5 min in Vakuumkammern getrocknet. Anschließend wurde die DNA mit je 75 µl 60°C warmem Bidest eluiert. Die Blöcke

wurden 10 min bei 6000 rpm zentrifugiert und die Überstände in 96-well Microtiterplatten überführt und anschließend bei -20°C gelagert.

6.1.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionspaltungen von DNA erfolgten unter der vom Hersteller für die jeweilige Nuklease angegebenen Puffer- und BSA-Konzentrationen. Pro $1\ \mu\text{g}$ DNA wurden 2 bis 5 U Restriktionsenzym eingesetzt. Um unspezifische Spaltaktivität der Endonuklease zu verhindern, wurde darauf geachtet, daß das Reaktionsvolumen mindestens das 10fache der in Glycerin gelösten Enzyme war. Die Dauer des Restriktionsspaltung betrug mindestens 2 h bei der vom Hersteller für das jeweilige Enzym angegebenen optimalen Temperatur. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/5 Volumen 6 x DNA-Auftragspuffer beendet. DNA-Doppelspaltungen erfolgten nach den Angaben der Hersteller oder wurden, falls dies nicht möglich war, seriell durchgeführt.

6.1.6 Dephosphorylierung von DNA-Enden mit CIAP (*cal* intestinal alkaline phosphatase)

Um bei ungerichteten Plasmid-Insert-Ligationen die Religation des Plasmids zu unterdrücken, wurden die freien Enden des Plasmids vor der Ligation möglichst vollständig dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung wurde ohne Pufferwechsel direkt an die Linearisierung durch die geeignete Restriktionsendonuklease angeschlossen. Dazu wurde die Restriktionsansatz zunächst 1:1 mit ddH_2O verdünnt und mit 1/9 Volumen 10 x CIAP-Puffer (Roche) und 3 U CIAP/ μg eingesetztes Plasmid versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 60 min bei 37°C inkubiert und die Dephosphorylierungsreaktion anschließend durch 1/5 Volumen 6 x DNA-Auftragspuffer beendet.

6.1.7 Glätten überhängender DNA-Enden

Um überhängende 5'- oder 3'-DNA-Enden, einer vorangegangenen Restriktionsendonukleasen-Spaltung zu glätten, wurde eine DNA-Polymerase I Behandlung (Klenow-Fragment) der linearisierten DNA durchgeführt. Da das Klenow-Fragment unter den Bedingungen der Restriktionsspaltung aktiv ist, wurde auf das Umpuffern der DNA verzichtet. Der Reaktionsansatz wurde auf Eis abgekühlt und auf eine Endkonzentration von $25\ \mu\text{M}$ dNTP's eingestellt. Nach Zugabe von 1 U Klenow-Fragment pro μg

eingesetzter DNA wurde der Ansatz 30 min bei 14°C inkubiert und anschließend zur Inaktivierung des Klenow-Fragments 10 min bei 75°C erwärmt. Die DNA wurde nachfolgend durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und gereinigt oder, sofern dies erforderlich war, mit einer zweiten Restriktionsendonuklease behandelt.

6.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0,8- bis 2,5%ige Agarose-Gele verwendet. Zur Präparation des Gels wurde die erforderliche Menge Agarose mit TE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis eine klare Lösung entstand. Die flüssige Agarose wurde in eine Gießkammer gegossen und ein Kamm zur Aussparung der Geltaschen eingesetzt. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit TE überschichtet. Die mit 1/5 Volumen 6 x DNA-Auftragspuffer versetzten DNA-Proben wurden in die Geltaschen pipettiert und bei 5V/cm aufgetrennt (Elektrophoresis Power Supply EPS300, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die aus der Gelelektrophorese resultierenden DNA-Banden wurden in einer Ethidiumbromidlösung (1µg/ml Ethidiumbromid in TE-Puffer) für 5 min inkubiert und anschließend 10 min in TE-Puffer entfärbt. Die DNA wurden im UV-Durchlicht sichtbar gemacht und digital aufgenommen (ImageMaster VDS 1D, Amersham Pharmacia Biotech).

6.1.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Isolierung eines DNA-Fragmentes aus einem Agarose-Gel erfolgte abgewandelt nach Tautz und Renz (1983). Die DNA-Bande wurde im UV-Durchlicht (365 nm) aus dem Gel herauspräpariert und in ein Eppendorf-Cup überführt. Anschließend wurde die DNA mit dem „Qiagen Quick Spin“-Kit nach den Angaben des Herstellers eluiert. Die gesammelte DNA-TE-Lösung wurde entweder direkt weiterverwendet (z.B. Ligation), oder einer anschließenden Isopropanolpräzipitation unterzogen.

6.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung eines DNA-Fragments mit einem Plasmidvektor über kohäsive DNA-Enden wurden 50 bis 100 ng Plasmid-DNA und ein dreifacher molarer Überschuß des DNA-Fragments mit 2 µl 10 x Ligasepuffer, 2,5 U T4-DNA-Ligase und ddH₂O zu einem Endvolumen von 20 µl pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde bei RT 1-3 Stunden oder bei

16°C über Nacht inkubiert. 5 µl der Ligationsreaktion wurden zur Transformation von Bakterien eingesetzt.

6.1.11 Gesamt-RNA-Isolation aus Säugerzellen

Gesamt-RNA aus Gewebekulturzellen wurde durch Anionenaustauschchromatographie mittels des „RNeasy Mini Kits“ der Firma Qiagen isoliert. Bei der Isolierung von Gesamt-RNA aus transient transfizierten Zellen wurde die an die Säulenmatrix gebundene RNA zusätzlich mit RNase-freier DNase I (RNase-free-DNase-Set, QIAGEN) behandelt um störende Plasmid-DNA vollständig zu entfernen. Die RNA wurde mit ddH₂O eluiert und durch Messung der Extinktion bei 260 nm quantifiziert.

6.1.12 Gesamt-RNA-Isolation aus *Drosophila melanogaster*

Adulte Fliegen (1,6 g) wurden mit flüssigem Stickstoff behandelt und mit einem Mörser homogenisiert. Nach Zugabe von 10 ml Tripure-Reagenz wurde die Suspension in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und zum Scheren der DNA 5-mal durch eine 22xg-Nadel gezogen. Das Homogenat wurde anschließend auf 2-ml-Eppendorfcups verteilt und die Gesamt-RNA extrahiert. Dazu wurden jeweils 1/5 Volumen Phenol/Chlorophorm dazugegeben und 1 min gevortext. Nach 30 min Zentrifugation bei 13.000xg wurde die DNA im Überstand mit Isopropanol für mindestens 1 h bei -20°C gefällt. Die gefällte RNA wurde bei 13.000xg für 30 min pelletiert und mit 75% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wie oben wurde die RNA für 45 min bei RT getrocknet und in frischem Millipore-Wasser gelöst (30 min auf Eis, dann vortexen). Ungelöste Bestandteile wurden durch eine 15 minütige Zentrifugation bei 13.000xg abgetrennt. Anschließend wurde die RNA-Konzentration bestimmt und bei -80°C gelagert. (Gesamtausbeute aus 1,6 g Fliegen: 3 mg Gesamt-RNA)

6.1.13 Reverse Transkription

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

Folgender Reaktionsansatz wurde jeweils verwendet:

Ansatz:

- 5 µl Gesamt-RNA (etwa 10 µg)
- 2 µl Oligo dT Primer
- 2 µl 0,1 M DTT
- 4 µl 5x Erststrangpuffer
- 1 µl dNTP-Gemisch (je 0,25 µl 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- 1 µl Reverse Transkriptase Superscript II

Dieser Ansatz wurde mit sterilem ddH₂O zu einem Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte bei 42°C für 90 min. Parallel wurden als Negativkontrolle Ansätze ohne „Reverse Transkriptase“ angesetzt, um eine eventuelle DNA-Kontamination auszuschließen. 1 µl aus den RT-Reaktionen wurde jeweils zur Klonierung spezifischer cDNA's in einer anschließenden Polymerase Kettenreaktion (*PCR*) eingesetzt.

6.1.14 Polymerase Kettenreaktion (*PCR*)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde eine Polymerase Kettenreaktion (*PCR*) durchgeführt. Für einen Standardreaktionsansatz mit einem Endvolumen von 50 µl wurden 100 ng Plasmid, je 5 pmol der beiden Primer-Oligonukleotide, je 5 nmol der vier dNTPs, 5 µl 10 x Platinum-Polymerasepuffer, 5 µl Enhancerlösung, 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), 1,5 U Platinum-DNA-Polymerase und das erforderliche Volumen ddH₂O gemischt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 94°C durchlief der Reaktionsansatz 25 bis 30 Zyklen, jeweils bestehend aus einer Denaturierungsphase von 30 s bei 94°C, einer Hybridisierungsphase von 1 min bei 52-58°C und einer Synthesephase von 2 min/kb des zu amplifizierenden DNA-Fragments bei 68°C. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt. Die jeweiligen *PCR*-Fragmente wurden anschließend über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt.

6.1.15 Gerichtete *in vitro* Mutagenese

Die gerichtete *In-Vitro*-Mutagenese von Plasmiden wurde in abgewandelter Form nach dem Protokoll des „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kits“ der Firma Stratagene über *PCR* durchgeführt. Das Plasmid, in das die Mutation eingeführt werden sollte, diente dabei

als Matrize für die Synthese des zu mutagenisierenden Plasmids. Die dabei verwendeten Primer-Oligonukleotide waren zueinander komplementär und enthielten die gewünschten Sequenzänderungen. Für einen Standardreaktionsansatz mit einem Endvolumen von 50 µl wurden 100 ng Plasmid, je 5 pmol der beiden Primer-Oligonukleotide, je 5 nmol der vier dNTPs, 5 µl 10 x Platinum-Polymerasepuffer, 5 µl Enhancerlösung, 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), 1,5 U Platinum-DNA-Polymerase und das erforderliche Volumen ddH₂O gemischt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 94°C durchlief der Reaktionsansatz 25 bis 30 Zyklen, jeweils bestehend aus einer Denaturierungsphase von 30 s bei 94°C, einer Hybridisierungsphase von 1 min bei 52-58°C und einer Synthesephase von 2 min/kb des zu amplifizierenden Plasmids bei 68°C. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt. Die jeweiligen *PCR*-Fragmente wurden anschließend über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und daraufhin direkt ohne Plasmid für eine weitere PCR eingesetzt. Der PCR-Ansatz enthielt die äußeren Primer-Oligonukleotide und durchlief zunächst 10 Zyklen mit einer jeweiligen Hybridisierungsphase von 2 min bei 40°C. Anschließend durchlief der Reaktionsansatz 25 bis 30 Zyklen bei Standardbedingungen.

6.1.16 *Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977)*

Die Sequenzierreaktion wurde mit dem „Big Dye Terminator Cycle Sequencing RR-Mix“ der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Dieses Reagenz enthält *Taq*-Polymerase, dNTPs und mit unterschiedlichen Fluorophoren markierte ddNTPs. Zu einem Standardansatz wurden 4 pmol Primer-DNA-Oligonukleotid, 0,5 µg DNA, 4 µl Mix, und das zum Endvolumen von 10 µl fehlende Volumen ddH₂O gemischt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 96°C, durchlief der Reaktionsansatz 40 Zyklen, jeweils bestehend aus einer Denaturierungsphase von 30 s bei 96°C, einer Hybridisierungsphase von 15 s bei 50°C und einer Synthesephase von 4 min bei 60°C. Die Auftrennung und Detektion der Reaktionsprodukte wurde von einem hausinternen Service oder einem kommerziellen Service-Anbieter durchgeführt.

6.1.17 Herstellung von [³²P]-markierten cDNA-Fragmenten für Northern-Blot-Analysen

Radioaktive DNA-Sonden zur Detektion spezifischer RNA-Spezies wurden durch „random prime labelling“ mit Hilfe des „Prime-a-Gene Labeling Systems“ (Promega) synthetisiert. Zu einem Volumen von 50 µl wurden 20 µl ddH₂O, 10 µl 5 x Puffer mit Zufallshexanukleotiden, 2 µl dNTP-Mix ohne dCTP (je 1,5 mM), 10 µl hitzedenaturierte DNA-Matrize (25 ng), 2 µl Nuklease freies BSA (10 mg/ml), 5 µl α-[³²P]-dCTP (50 µCi, 3000 Ci/mmol), 1 µl Klenow-Fragment (5 U) vereinigt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise wurde das *Hind*III-*Xho*I-Fragment der humanen Spike-cDNA und die humane β-Aktin-cDNA markiert. Nicht eingebaute Nukleotide und Primer-Oligonukleotide wurden mit Hilfe von „Micro BioSpin“-Säulchen (BioRad) durch Gelfiltration an Sephadex-G25 (Sigma-Aldrich) mit STE als Säulenpuffer entfernt. Das Eluat wurde auf 200 µl mit TE verdünnt. Die Inkorporation von Radioaktivität wurde durch Messung der Cherenkov-Strahlung von 1 µl des Eluats überprüft.

6.1.18 Nachweis membrangebundener RNA mit spezifischen, [³²P]-markierten cDNA-Proben

Vor der Hybridisierung wurde die Blot-Membran mit 2 x SSC benetzt und 1 h bei 65°C in Vorhybridisierungslösung im Hybridisierungssofen rotiert. Dadurch wurde die Membran mit unspezifisch bindender DNA abgesättigt. Die DNA-Sonde wurde 10 min bei 95°C denaturiert, kurz auf Eis abgeschreckt, anschließend zu der Vorhybridisierungslösung gegeben und über Nacht im Hybridisierungssofen rotierend mit der Membran bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran bei 65°C zweimal für 45 min mit 2 x SSC, 0,1% SDS und einmal für 10 min mit 1 x SSC, 0,1% SDS gewaschen. Die Membran wurde mit 2 x SSC gespült und feucht in Plastikfolie eingeschweißt. Die gebundene Radioaktivität wurde durch Autoradiographie bzw. mit einem PhosphorImager (Fuji BAS-2500, Fujifilm) sichtbar gemacht und mit der Image Gauge V3.01 Software analysiert. Die Blot-Membran wurde zur Wiederverwendung in 2 x SSC belassen und bei -80°C gelagert. Sollte die Blot-Membran mit einer weiteren Sonde untersucht werden, so wurde die erste durch 10minütige Inkubation in einer kochenden, 0,1%igen SDS-Lösung entfernt. Die Membran

wurde anschließend mit 2 x SSC gespült und zur Hybridisierung mit der zweiten Sonde verwendet.

6.2 Methoden der prokaryontischen Zellkultur

6.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli*

6.2.1.1 Herstellung chemokompetenter *E. coli*

Um transformierbare Bakterien zu gewinnen, wurden 500 µl einer stationären Kultur von *E. coli* DH5α, SURE oder BL21(DE3) mit 50 ml LB-Medium verdünnt und in einem Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 kultiviert. Die Bakterien wurden dann bei 4°C und 2000 g abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 2 ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 500 µl 87% (w/v) Glycerin vorsichtig gemischt. Die Suspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

6.2.1.2 Herstellung elektrokompeter *E. coli*

Für die Herstellung elektrokompeter 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 OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 0,7 lag. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 5000 rpm 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Pellets wurden in einem Liter eiskaltem Glycerin (10%) resuspendiert und anschließend erneut 15 min bei 5000 rpm 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.

6.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

6.2.2.1 Transformation chemokompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden entweder 5 µl einer Ligationsreaktion oder 1 µg eines Plasmids zu den Bakterien gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Das Bakterien/DNA-Gemisch wurde für 90 s bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und danach sofort für 2 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 400 µl SOC-Medium zugegeben und für 30 bis 60 min bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde kurz abzentrifugiert (1 min, 5000 rpm) und das Bakterienpellet auf vorgetrocknete Agar-Selektionsplatten ausplattiert. Die Inkubation der Selektionsplatten erfolgte bei 37°C bis zu 24h.

6.2.2.2 Transformation elektrokompetenter Bakterien

Elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und zu 50 µl Bakteriensuspension mindestens 20 ng des zu transformierenden Plasmids gegeben. Anschließend folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Die Suspension wurde in Elektroporationsküvetten mit einer Breite von 0,1 µm 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 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 50 µl LB_{Amp} resuspendiert und anschließend auf ampicillinhaltigen (25µg/ml) LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.3 Methoden der Zellkultur für Hefen

6.3.1 Zellkulturbedingungen

Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank (Heraeus, Hanau) mit sterilen Lösungen, autoklavierten Glaswaren und sterilem Kunststoffmaterial durchgeführt. Für die verschiedenen Selektionsschritte des *Yeast-Two-Hybrid* Assays wurden die Lösungen wie unter 4.2.2 beschrieben benutzt.

6.3.2 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 weggefroren.

6.3.3 Transformation von Hefezellen

6.3.3.1 Small Scale Transformation

Für das Yeast-Two-Hybrid Assay wurde der Hefestamm L40 (Stratagene) eingesetzt. Für die Small Scale Transformation wurde nach (Gietz et al., 1992) eine Kolonie in 25 ml $\text{YPD}_{\text{Amp/Tet}}$ aufgenommen und in einem 200 ml Erlebmeyerkolben bei 250 rpm und 30°C bis zu einer OD_{600} von ca. 1,2 wachsen gelassen. Anschließend wurde die Kultur mit frischem $\text{YPD}_{\text{Amp/Tet}}$ verdünnt bis sich eine OD von 0,2 einstellte. Die Kultur wurde nochmals für 3 – 6 h zu einer OD_{600} 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 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellpellet in insgesamt 0,75 ml 1 M Lithiumacetat resuspendiert. Anschließend wurden 1 μg Plasmid-DNA (bait in pBTM 116), 50 μg Carrier-DNA, 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 35 μl 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 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 μl Bidest resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 2-3 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ auf entsprechendem Selektivmedium (SD – T) ausplattiert. Die Kolonien wurden 2-3 Tage bei 30°C wachsen gelassen.

6.3.3.2 Large Scale Library Transformation

Die Large Scale Library Transformation wurde nach (Gietz et al., 1992) ausgeführt. Eine L40-Kolonie wurde gepickt, in 5 ml Selektivmedium ($\text{SD-T}_{\text{Amp/Tet}}$) angeimpft und anschließend bei 250 rpm und 30°C über Nacht wachsen gelassen. Die Über-Nacht Kultur

wurde in 200 ml SD-T_{Amp/Tet} gegeben und für 24 h bei 250 rpm und 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1,2 wachsen gelassen. Die so hergestellte Kultur diente als Vorkultur. In vier Erlenmeyerkolben wurden je 250 ml YPD_{Amp/Tet} vorgelegt und mit der Vorkultur derart versetzt, dass sich eine OD₆₀₀ von 0,3 – 0,4 ergab. Anschließend wurden die Kulturen für 4 h bei 30°C und 250 rpm geschüttelt bis sich eine OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 einstellte. Die Zellen wurden 5 min bei 2500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden in insgesamt 500 ml Bideest resuspendiert und anschließend erneut 5 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Die Pellets wurden in 20 ml 1 M Lithiumacetat resuspendiert und 10 min bei RT inkubieren gelassen. Anschließend wurde ein Mix aus 2,5 ml Carrier-DNA und 250–500 µg Library-Plasmid-DNA zugesetzt. Es wurden anschließend 140 ml 1M Lithiumacetat und 40% PEG zugesetzt und 30 min bei 30°C inkubieren gelassen. Anschließend wurden 17,6 ml DMSO zugesetzt und nach Durchmischung auf zwei 1000 ml Erlenmeyerkolben verteilt. Diese wurden für 15 min auf 42°C erhitzt und anschließend in einem Eiswasserbad abkühlen gelassen. Die Suspension wurde für 5 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 500 ml Bideest gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 1 l YPD_{Amp/Tet} resuspendiert und auf vier 1000 ml Erlenmeyerkolben verteilt. Zur Bestimmung der primären Transfektionseffizienz wurden jeweils 100 µl und 10 µl der Suspension auf SD-TL Platten ausplattiert und wachsen gelassen. Die restliche Zellsuspension wurde 8-12 h bei 30°C und 250 rpm wachsen gelassen. Anschließend wurden die Suspensionen 5 min bei 2500 rpm zentrifugiert und die Pellets zweimal mit 500 ml Bideest gewaschen. Anschließend wurden die Pellets in 10 ml Bideest resuspendiert. Von der erhaltenen Suspension wurden je 0,1 µl und 0,01 µl in 100 ml SD-TL aufgenommen und auf SD-TL Selektionsplatten zur Bestimmung der Amplifikationsrate ausplattiert. Die restliche Suspension wurde in 5x 250 µl, 5x 100 µl, 5x 50 µl und 16-20x 500 µl auf Selektionsplatten SD-THULL + 50mM 3-Aminotriazol ausplattiert und 5-10 Tage bei 30°C wachsen gelassen.

6.3.4 *β-Gal Assay*

Für die Verifizierung von potentiellen Interaktionspartnern wurde die x-Gal-Färbung auf entsprechenden Platten untersucht. Hierfür wurden folgende Platten hergestellt:

x-Gal-Platten	50 ml SD-THULL, 1g Bacto-Agar autoklavieren, auf 50°C abkühlen lassen + 20 ml 10x BU-Salts +x-Gal (Endkonzentration 80 mg/l) Amp/Tet
10 x BU – Salts:	46,5 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 34,5 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O in 900 ml Bidest lösen, pH 7 einstellen ad 1000 ml Bidest, autoklavieren

Die entsprechenden bait- und prey- Plasmide wurden in L40 transformiert und durch die Blaufärbung der Platten auf Transaktivierung hin untersucht.

6.3.5 Hefeminipreps

Für die Minipreps wurden je 3 ml SD-L mit Hefekolonien angeimpft und mindestens 20h bei 30°C und 250 rpm schütteln gelassen. Die Suspension wurde bei 1000 g für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurden 200 µl Yeast-Lysis-Solution, 200 µl Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1) und 0,3 g Acid Washed Glass Beads zugesetzt. Die Suspension wurde für 2 min gevortext und anschließend bei 14.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Eppendorf-Cups eingetragen und es wurden 1/10 Vol 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol Ethanol zugesetzt. Die Suspension wurde für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet getrocknet war, wurde es in 20 µl Bidest aufgenommen.

6.4 Methoden der eukaryontischen Zellkultur (ohne Hefen)

6.4.1 Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

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% (293T) oder 10% fötalem Kälberserum (FCS), 2mM Glutamin, 2mM Natriumpyruvat sowie 50 U/min Penicillin/Streptomycin supplementiert. 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 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml frischem DMEM resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf Zellkulturschalen in einer Verdünnung von 1:3 bis 1:6 wieder ausgebracht.

6.4.2 Einfrieren und Auftauen von Gewebekulturzellen

Die Zellen wurden aus einer logarithmisch wachsenden Population eingefroren. Zum Einfrieren wurden die Zellen trypsinisiert und in Suspension gebracht, durch Abzentrifugation bei 1000 g 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, vermischt und direkt auf -80°C abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen zur längerfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte schnell bei 37°C im Wasserbad und sofort mit frischem Medium 1:10 verdünnt. Anschließend wurden die Zellen auf Zellkulturschalen ausgebracht.

2x Einfriermedium: DMEM
20% FCS
20% DMSO

6.4.3 Transiente Transfektion von Gewebekulturzellen

6.4.3.1 Effectene Transfektion

Adhärente HeLa- und MCF7-Zellen wurden mit dem “Effectene Transfection Reagent”-Kit der Firma Qiagen transfiziert. 24 h vor der Transfektion wurden die Zellen mit einer Konfluenz von 40% ausgesät. Die Mengen an eingesetzter DNA, EC-Verdünnungspuffer, Verstärkerreagenz, Effectene und Medienmengen richtete sich dabei nach der jeweiligen Zellkulturgefäßgröße.

Platten- größe Ø	DNA- Menge	EC- Puffer	Verstärker	Effectene	DMEM-Menge zum Mix	DMEM-Menge auf der Platte
3,5 cm	0,4 µg	100 µl	3,2 µl	2,0 µl	600 µl	1,6 ml
6 cm	1,0 µg	150 µl	8,0 µl	5,0 µl	1,0 ml	4,0 ml
10 cm	2,0 µg	300 µl	16 µl	10 µl	3,0 ml	7,0 ml
15 cm	5,6 µg	840 µl	44,8 µl	28 µl	8,5 ml	15 ml

Die zu transfizierende DNA wurde in einer geeigneten Menge des EC-Verdünnungspuffer aufgenommen und mit Verstärker-Reagenz versetzt. Diese Reaktion wurde heftig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von Effectene-Reagenz wurde erneut 15 min inkubiert, die jeweilige Menge DMEM-Standardmedium zum Mix pipettiert und vorsichtig gemischt. Diese Mischung wurde sofort auf die vorbereitete Platte mit dem geeigneten Menge DMEM-Standardmedium überführt und für 3 bis 6 h auf den Zellen belassen. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden für weitere 12 h- 48h in Standardmedium weiterkultiviert.

6.4.3.2 Calciumphosphat-Präzipitation

Alle Transfektionen von 293T-Zellen wurden mit der Calciumphosphat-Methode durchgeführt. Die Zellen wurden in verschiedenen Formaten gesplittet, wachsen gelassen und beim Erreichen einer Konfluenz von ca. 70% transfiziert. Bei den 293T-Zellen wurde vor der Transfektion das Medium gewechselt und mit Chloroquin so versetzt, dass eine Endkonzentration von 10 µM erreicht wurde. Fünf Stunden nach der Transfektion bzw. nach "über Nacht"-Inkubation (10 cm-Format) wurde das Medium erneut gewechselt. Für das Präzipitat wurde jeweils DNA in Bidest vorgelegt, mit 2,5 M CaCl₂ versetzt und das gleiche Volumen 2x HBS pH 6,9-7,1 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	V (Medium)	µg DNA	add Bidest	+V (2,5M CaCl ₂)	+V(2x HBS)	V(PBS)
24-Well	1 ml	0,2-1 µg	45 µl	5 µl	50 µl	0,5 ml
12-Well	2 ml	0,5-2 µg	67,5 µl	7,5 µl	75 µl	1,0 ml
6-Well	3 ml	1-4 µg	90 µl	10 µl	100 µl	1,5 ml
10 cm	10 ml	5-10 µg	450 µl	50 µl	500 µl	5,0 ml

6.4.4 Oligonukleotid-Transfektion in HeLa-Zellen

6.4.4.1 $Ca_3(PO_4)_2$ -Transfektion der Oligonukleotide (Ghosh und Iversen, 2000)

Die Zellen wurden 1 – 2 Tage vor der Transfektion in verschiedenen Formaten ausgesät, wachsen gelassen und beim Erreichen einer Konfluenz von ca. 50-60% transfiziert. 1–2 Stunden vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Beim Ansetzen des Transfektionsansatzes ist die Reihenfolge zu beachten: Oligo \Rightarrow Bidest \Rightarrow 2,5 M $CaCl_2$ \Rightarrow 2x HBS !! Anschließend wird der Transfektionsansatz 8 – 10 Minuten bei RT inkubiert und vor Zugabe auf die Zellen je nach Volumen 2 – 5x mit einer Pipette gemischt. Die Transfektion erfolgt über Nacht (16 – 20 h). Am nächsten Morgen wurden die Zellen 2 x mit PBS waschen und neues Medium zugegeben.

Transfektionsprotokoll:

Format	V (Medium)	m (Oligo)	add Bidest	+V (2,5M $CaCl_2$)	+V(2x HBS)	V(PBS)
24-Well	1 ml	75 – 100 ng	45 μ l	5 μ l	50 μ l	0,5 ml
12-Well	2 ml	150 – 200 ng	67,5 μ l	7,5 μ l	75 μ l	1,0 ml
6-Well	3 ml	400 – 500 ng	90 μ l	10 μ l	100 μ l	1,5 ml
10 cm	10 ml	3,0 – 3,5 μ g	450 μ l	50 μ l	500 μ l	5,0 ml

6.4.4.2 Oligofectamine-Transfektion der Oligonukleotide

Kurz vor der Transfektion wurden die Zellen 1x mit OPTI-MEM (ohne Zusätze etc.) gewaschen und OPTI-MEM nachgelegt. Die Oligofectamine-Transfektion erfolgte nach dem Transfektionsprotokoll der Firma Life Technologies. Nach Zugabe des Transfektionsansatzes zu den Zellen wurde der Ansatz nach ca. 5 - 8h mit 20% FCS - OPTI-MEM aufgefüllt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, wobei die Zellen 2x mit Medium gewaschen und neues Medium nachgelegt wurde.

Transfektionsprotokoll:

Format	V (20 μ M RNAI)	V (OPTI-MEM)	V (Oligofectamine)	V (Oligofectamine in OPTI-MEM)	V (OPTI-MEM on Cells)	V (Transf.)	V (20% FCS-OPTIMEM)
24-Well	2,5 μ l	40 μ l	2 μ l	7,5 μ l	200 μ l	250 μ l	250 μ l
12-Well	5,0 μ l	85 μ l	3 μ l	10 μ l	400 μ l	500 μ l	500 μ l
6-Well	10 μ l	175 μ l	5 μ l	15 μ l	800 μ l	1000 μ l	1000 μ l
10 cm	75 μ l	825 μ l	30 μ l	100 μ l	4000 μ l	5000 μ l	5000 μ l

6.4.5 Herstellung stabiler Klonpoole

Zur Herstellung stabiler Klonpoole wurden die Zellen mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transfiziert, das die G418-Resistenz bereits enthielt (pcDNA3) oder mit diesem cotransfiziert. Die Selektion mit G418 (300-800 μM) erfolgte über mehrere Wochen, wobei in regelmäßigen Abständen das Medium gewechselt wurde. Nach Beendigung der Selektion (etwa 3-4 Wochen) erfolgte der Test auf stabile Integration des Expressionsplasmids in das Genom der Zellen mittels Immunoblot.

6.5 Proteinchemische Standardmethoden

6.5.1 Herstellung von Gesamtzell-Lysaten

Zur Präparation von Gesamt-Zelllysaten wurden die Zellen direkt im Medium vorsichtig mit einem Gummischaber abgeschabt, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, 2 min bei 750xg abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde im etwa 5fachen Volumen des Zellpellets in Lysepuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,4, 0,2% (v/v) Igepal, 1 mM EDTA und 1,5 mM MgCl_2) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Der Rohextrakt wurde anschließend für 10 min bei 13000xg und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurde vom Überstand die Proteinkonzentration bestimmt, mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 5-10 min aufgeköcht.

6.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach zwei alternativen Methoden. Die Proteinkonzentration von Gesamt-Zelllysaten wurde mit dem "BioRad Protein Microassay" der Firma BioRad (München) bestimmt. Dazu wurde die Microassay-Lösung 1:6 in ddH₂O verdünnt und 1ml davon mit je 1-5 μl der Proteinlösung versetzt. Durch Messung der Extinktion bei 595nm in Vergleich zu einem BSA-Standard konnte die Proteinkonzentration abgeschätzt werden. Die Konzentration von gereinigten, rekombinanten Proteinen wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung des Gels abgeschätzt. Als Standard diente BSA, das in definierten Mengen auf das Gel aufgetragen worden war.

6.5.3 Zellfraktionierung

Für Zellfraktionierungen zur Lokalisationsbestimmung endogener Proteine wurden 10-15 15cm-Zellkulturschalen verwendet. Die Zellen wurden direkt im Medium vorsichtig mit einem Gummischaber abgeschabt, in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, 2 min bei 750xg abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und vereint. Das vereinte Zellpelett wurde in 1 ml Sucrose-Puffer (250mM Sucrose, 20 mM Hepes pH 7,5, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin) resuspendiert und durch zehnmaliges Ziehen durch eine 22xg-Nadel wurden die Zellen homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend bei 250xg zentrifugiert, um unlysierte Zellen abzutrennen. Der Überstand wurde zum Pelletieren der Zellkerne bei 1.000xg zentrifugiert. Zur Abtrennung der Mitochondrien wurde daraufhin der 1.000xg-Überstand für 10 min bei 10.000xg zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde zur Gewinnung der Mikrosomenfraktion anschließend für 60 min bei 100.000xg zentrifugiert. Die einzelnen Fraktionen wurden mit Lysepuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,4, 0,2% (v/v) Igepal, 1 mM EDTA und 1,5 mM MgCl₂) aufgeschlossen, von den Lysaten die Proteinkonzentration bestimmt (Kap. 6.5.2) und die einzelnen Fraktionen mittels Immunoblot (Kap. 6.6.1) analysiert.

6.5.4 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der diskontinuierliche Gelelektrophorese (Laemmli et al., 1970) werden Proteine zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und anschließend in einem höherprozentigen Trenngel nach Molekulargewicht aufgetrennt. Eingesetzt wurden homogene Trenngele (10%, 12%, und 15 %). Das Trenngel war jeweils mit einem 1 cm hohen 4%igen (w/v) Sammelgel überschichtet. Nach Polymerisation wurde das Gel in eine Vertikal-Elektrophoresekammer eingebaut und die Reservoirs mit SDS-Elektrophoresepuffer gefüllt. Vor dem Auftragen wurden die zu ladenden Proteinlösungen mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min gekocht. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 bis 20 V/cm.

6.5.5 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Das Gel wurde zum Färben 15-60 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend im Entfärber (25% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure) entfärbt und digital dokumentiert.

6.5.6 Silberfärbung von Proteingelen

Zur Fixierung der Proteine wurde das Gel mindestens 3 h in 50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure, 0,0185% (w/v) Formaldehyd inkubiert. Anschließend wurde das Gel dreimal 20 min mit 50% Ethanol gewaschen. Es folgte eine einminütige Inkubation in 0,02% (w/v) Natriumthiosulfat. Das Gel wurde mit ddH₂O gewaschen (dreimal jeweils 20 s), anschließend 20 min in 0,2% (w/v) Silbernitrat, 0,028% (w/v) Formaldehyd inkubiert und nach erneutem Waschen mit ddH₂O (zweimal jeweils 20 s) zum Auslösen der Silberabscheidung mit 6% (w/v) Natriumcarbonat, 0,0185% (w/v) Formaldehyd versetzt. Nach dem Sichtbarwerden der Proteinbanden wurde das Gel kurz mit ddH₂O gespült und die Reaktion mit 50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Essigsäure abgestoppt. Zur Lagerung wurde das Gel in 25% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure überführt und dokumentiert.

6.6 Immunologische und immunbiochemische Methoden

6.6.1 Immunoblot-Analyse

6.6.1.1 Proteintransfer auf Membranen (Western-Blot)

Die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden über Elektrotransfer ("Semi-dry") auf eine PVDF-Membran transferiert. Zum Benetzen wurden die PVDF-Membran einige Sekunden in Methanol getränkt und anschließend in Transferpuffer inkubiert. Auf die Anode der Blot-Apparatur wurden zwei Lagen mit Transferpuffer gesättigtes Whatman 3MM-Papier, die Membran, das Trenngel, zwei weitere Lagen Whatman 3MM-Papier und die Kathode geschichtet. Zuvor wurden die Membran und das Whatman-Papier auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Der Transfer erfolgte für 60 min bei 1,5 mA /cm² Trenngelfläche.

6.6.1.2 Ponceau S-Färbung von Proteinen

Die Effizienz des Western-Blot Transfers wurde durch Anfärben der Proteine auf der Membran mit dem reversiblen Farbstoff Ponceau S (2,5 % in PBS) bestimmt. Dazu wurde die Membran für 1 min in der Ponceau S – Färbelösung geschwenkt und anschließend mit Wasser entfärbt. Dabei werden die Proteinbanden sichtbar. Der Farbstoff konnte durch mehrmaliges Waschen mit TBS-T quantitativ entfärbt werden.

6.6.1.3 Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern

Zur anschließenden spezifischen Proteindetektion wurde die Membran in PBS-T, 5 % (w/v) Magermilchpulver für mindestens 60 min bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde die Membran mindestens 1 h bei Raumtemperatur in einer geeigneten Verdünnung des ersten Antikörpers in TBS-T, 5 % Magermilchpulver inkubiert. Die Membran wurde dann dreimal für je 10 min in TBS-T gewaschen und mit einem gegen den ersten Antikörper gerichteten, Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper für 50-90 min inkubiert und anschließend mehrmals in TBS-T gewaschen. Die Detektion erfolgte über Inkubation mit ECL-Lösung (5 µl, 6,8 mM p-Kumarinsäure in DMSO mit 5 ml, 1,25 mM Luminol sowie 1,5 µl 30% H₂O₂) und anschließender Exposition gegen einen Röntgenfilm. Bei sehr schwachen Signalen wurde die Detektion mit dem „Supersignal West Femto“-System wiederholt.

6.6.1.4 ECL-Detektion von Proteinen

Die ECL-Methode (ECL-Kit; Amersham-Buchler, Braunschweig) ist eine Licht emittierende, nicht-radioaktive Nachweismethode zur Detektion von immobilisierten Antigenen mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern. Die Peroxidase ist mit dem sekundären Antikörper gekoppelt und katalysiert eine Chemolumineszenzreaktion, die auf einem Röntgenfilm detektiert werden kann. Nach Inkubation der Western-Blot-Membran mit dem sekundären Antikörper wurde diese mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurden in einer Dunkelkammer unter Rotlicht gleiche Teile der Detektionsreagenzien A und B (ECL-Kit) nach Angaben des Herstellers gemischt, die Membran darin für 1 min inkubieren gelassen und anschließend ein Röntgenfilm aufgelegt und entwickelt.

6.6.2 Immunpräzipitation von Proteinen

Präzipitationen mit spezifischen Antikörpern wurden durchgeführt, um ein bestimmtes Protein zu präzipitieren und die *in vivo* an dieses Protein assoziierten Proteine aus Gesamtzellextrakten zu identifizieren. Alle Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis unter Verwendung vorgekühlter Lösungen ausgeführt. Für Immunpräzipitationen wurden ausschließlich 293T-Zellen aus einer 10cm-Kulturschale verwendet. Zur Präparation von Gesamt-Zellysaten wurden die Zellen direkt im Medium vorsichtig mit einem Gummischaber abgeschabt, in ein 15ml Falcon-Röhrchen überführt, 2 min bei 1500 rpm abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Das Zellpelett wurde in 600 µl IP-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Der Rohextrakt wurde anschließend für 10 min bei 13000 g und 4°C abzentrifugiert. 30-40 µl des Rohextraktes wurden zum Testen des Inputs der Immunpräzipitation abgenommen, der Großteil des Extraktes wurde zur Bildung der Antigen-Antikörper-Komplexe anschließend mit 6 µg spezifischem Antikörper für 3-5h auf einem Überkopffrotator inkubiert. Der IP-Ansatz wurde anschließend mit 20-50 µl einer in IP-Puffer resuspendierten Protein-A-Sepharose (je nach Bedarf eine Spatelspitze Sepharose plus IP-Puffer) versetzt und der spezifische Antikörper (6 µg) 1 h auf einem Überkopffrotator gekoppelt. Nach dreimaligem Waschen mit IP-Puffer (jeweils nach 1.000g-Zentrifugation) wurden die Sepharosebeads in 25 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und nach 5-minütigem Kochen mittels SDS-PAGE/Western-Blot analysiert.

6.6.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Endogene Proteine und Proteine, die in eukaryontischen Zellen nach transienter Transfektion exprimiert wurden, können nach Fixierung der Zellen *in situ* durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Adhärente Säugerzellen, oder zuvor transfizierte Säugerzellen (24 h nach der Transfektion), wurden auf sterile Deckgläschen in 12-well-Platten ausgesät, und bis zu einer Konfluenz von 50% kultiviert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und für 5 min in 3,7 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 10 min in 0,2% Igepal in PBS permeabilisiert und anschließend 30 min mit Blocklösung (2% BSA in PBS) inkubiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Verdünnung 1:50 – 1:1000, je nach eingesetztem Antikörper, verdünnt in Blocklösung) erfolgte bei RT für 1 h. Die Zellen wurden dreimal mit Blocklösung

gewaschen und 1 h mit dem sekundären Antikörper (FITC- oder Rodamin-konjugierte Antikörper, 1:500 in Blocklösung) bei RT im Dunklen inkubiert. Abschließend wurden die Deckgläschen zweimal mit PBS gewaschen, kurz abgetropft und mit 50 µl “Glow-mounting medium” überschichtet und eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte an einem Axioskop 2- Fluoreszenzmikroskop (Zeiss).

6.6.4 DAPI-Färbung

Für die Versuche wurden adhärente Säugerzellen auf sterilen Deckgläsern in 12-Well Kulturschalen ausgesät, bis zu einer Konfluenz von etwa 40% kultiviert und anschließend transfiziert. 14-24 h nach der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 5 min in 3,7 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 15 min in 0,2% (v/v) Igepal (Sigma) in PBS permeabilisiert, erneut gewaschen und mit einer 50 µM DAPI-Lösung in Methanol für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit Methanol und dreimal mit PBS gewaschen, kurz abgetropft und mit 10 µl “Glow-mounting medium” überschichtet und eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte an einem Axioskop 2- Fluoreszenzmikroskop (Zeiss).

6.6.5 2-Dimensionale Gelelektrophorese

Alle Materialein zur isoelektrischen Fokussierung wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen. Die Fokussierung wurde in einer gekühlten (20°C) Multiphor II nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Fokussierung wurden isoelektrische Fokussierungstreifen (Immobiline DryStrip NL 3-10 oder pH 6-11) mit 0,1 mg- 2 mg Protein in 300 µl Rehydrationspuffer (8 M Harnstoff, 2% (w/v) CHAPS, 2% (v/v) IPG-Puffer (pH 3-10 oder pH 6-11), 18,5 mM DTT) über Nacht in einer ölüberschichteten Rehydrationskassette inkubiert. Die Streifen wurden anschließend in der Multiphor II mit einem steigenden Spannungsgradienten fokussiert.

Gradient:	1.Phase 300 V, 30 min	6.Phase 2200 V, 30 min
	2.Phase 600 V, 30 min	7.Phase 2700 V, 30 min
	3.Phase 900 V, 30 min	8.Phase 3200 V, 30 min
	4.Phase 1200 V, 30 min	9.Phase 3500 V für 18,5 bis 27 h
	5.Phase 1700 V, 30 min	

Insgesamt wurde, abhängig von der Proteinmenge, für 70000-100000 V/h fokussiert. Die Streifen wurden kurz mit ddH₂O gespült, bei -80°C eingefroren oder direkt für die Auftrennung in der 2. Dimension eingesetzt. Dazu wurden die Streifen dreimal 5 min in Äquilibrationpuffer I (6 M Harnstoff, 30% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 50 mM Tris/HCl pH 8,8, 10 mg/ml DTT) inkubiert, erneut kurz mit ddH₂O gespült und dreimal 5 min in Äquilibrationpuffer II (identisch Äquilibrationpuffer I, statt DTT 48 mg/ml Iodacetamid) inkubiert. Die so behandelten Streifen wurden kurz mit ddH₂O gespült, abgetropft und über einem großen SDS-PAGE Trenngel (12%, 20 X 20 cm) mit heißer 0,5% (w/v) Agarose in SDS-Elektrophoresepuffer mit Spuren von Bromphenolblau eingegossen. Die Elektrophorese der 2. Dimension fand wie unter 1.4.1.2 beschrieben statt. Die Analyse der aufgetrennten Proteine erfolgte über eine Coomassie- oder Silberfärbung oder über einen spezifischen Antikörpern nach SDS-PAGE /Immunoblot.

6.7 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

6.7.1 Expression rekombinanter Proteine in E. coli

Für die Gewinnung eines rekombinanten GST-Fusionsproteins wurde das Expressions-Kit „pGEX Expression System“ von Amersham-Pharmacia benutzt. Das Gen wurde in-frame in pGEX4-T1 kloniert. Es wurden chemokompetente *E. coli*-BL21-Zellen mit dem Plasmid transformiert und auf Agar-Platten ausgestrichen. Nach Über-Nacht-Inkubation wurden einzelne Klone gepickt und in 2 ml LB_{Amp}-Medium aufgenommen. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C geschüttelt und anschließend 100 bis 500 ml LB_{Amp}-Medium angeimpft. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 mit 1 mM IPTG die Proteinexpression induziert. Nach 2 bis 5 h bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen, direkt weiter aufgearbeitet oder bei -20°C gelagert.

6.7.2 Affinitätsreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine

Das nach Induktion und Expression des rekombinanten Proteins gewonnene Bakterienpellet wurde in Resuspensionspuffer (PBS, 2 mM EDTA) resuspendiert und für 20 min auf Eis

mit Lysozym (Endkonzentration 1 mg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5 min sonifiziert (Maximalstellung) und zur vollständigen Extraktion des rekombinanten Proteins ad 1% Triton-X 100 hinzugegeben und für 15 min bei 4°C auf einem Überkopffrotator inkubiert. Das Zell-Lysat wurde 30 min bei 45.000 g zentrifugiert. Zur Affinitätsreinigung wurde der Zentrifugationsüberstand mit ca. 1 mg Glutathion-Sepharose (Stratagene) pro 10 mg rekombinantem Protein versetzt und 1-2 h bei 4°C auf einem Überkopftaumler inkubiert. Anschließend wurde das Bakterienlysate auf eine Säule mit Filtereinsatz zur Abtrennung der GSH-Sepharose gegeben, die Sepharose dreimal mit Resuspensionspuffer gewaschen und dann mit 50 mM reduziertem Glutathion in PBS (pH 7,4) eluiert. Das Eluat wurde mittels SDS-PAGE/Immunoblot analysiert und gegebenenfalls eingeeengt (Centricon, Zentrifugeneinheiten, Ultrafiltration mit Amicon Ultrafiltrationszelle).

6.8 Herstellung eines polyklonalen Antiserum

Zur Herstellung des Antigens wurden das GST-Fusionsprotein rekombinant in *E.coli* exprimiert und nativ aufgereinigt. Das gereinigte Protein (1 mg/ml) wurde für die erste Injektion im Verhältnis 1:1 mit TiterMax Gold (Sigma) über eine Doppelkanüle intensiv emulgiert. Zur Immunisierung von Kaninchen wurde dabei 50-250 µg Protein subkutan injiziert. Nach 3 Wochen wurden jeweils, im Abstand von 14 Tagen, weitere Injektionen vorgenommen. TiterMax Gold wurde dabei durch Freund's Adjuvant (Sigma) ersetzt.

Zeitschema:

Tag 1:	Abnahme von Präimmenserum, Immunisierung
Tag 21:	1. Boost
Tag 35:	2. Boost, 1. Blutentnahme zur Testung des AK-Titers
Tag 49:	3. Boost, 2. Blutentnahme zur Testung des AK-Titers
Tag 65:	3. Blutentnahme zur Testung des AK-Titers
Tag 68:	Entbluten

Die Arbeiten mit dem Kaninchen wurden zusammen mit Mitarbeitern des Tierhauses (MPI für Biochemie) durchgeführt. Für jeden Boost wurden 0,5 ml des aufgereinigten,

rekombinanten Proteins (200 µg) mit 0,5 ml Freund's Adjuvant (Sigma) solange gevortext, bis sich eine milchige Suspension gebildet hatte. Diese Suspension wurde in einer 1 ml Einweg-Spritze (Braun) gefüllt und anschließend subcutan dem Kaninchen injiziert. Die Bestimmung des AK-Titers erfolgte über Western-Blot-Analyse mit transfizierten Zelllysaten. Das abgenommene Blut wurde nach Bennet (1992) aufgearbeitet (Bennet, 1992). Hierfür wurden die Seren zur Gerinnung zwei Stunden bei RT inkubiert, dann 5 min bei 5000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand in Eppendorf-Cups aliquotiert. Anschließend wurde für 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und die Überstände in frische Eppendorf-Cups überführt. Diese wurden zur Inaktivierung des Komplementsystems für 30 min bei 56°C inkubiert und anschließend bei -80°C gelagert.

6.9 Methoden zum Nachweis der Apoptose

6.9.1 *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 augenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 14.000 rpm 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 14.000 rpm 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 14.000 rpm 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 14.000 rpm 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 5h 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.

6.9.2 *Nachweis hypodiploider DNA mittels Durchflußcytofluorimetrie (Afanas'ev et al., 1986)*

Diese Methode wurde nach Bauer et al. (1997) ausgeführt und erlaubt die Messung apoptotischer Zellen anhand der DNA-Fragmentierung zu hypodiploider DNA. Diese Methode beruht auf dem Austreten kleiner DNA-Fragmente aus permeabilisierten apoptotischen Zellen, welche nach Anfärbung der DNA mit Propidiumiodid und anschließender Analyse im Durchflußcytometer (FACS-Analyse mit dem Programm „Cellquest“ im FACS-Calibur; Becton-Dickinson, Heidelberg) als Sub-G1-Fraktion meßbar sind. Zur Vergleichbarkeit paralleler Messungen wurde der Anteil GFP-positiver Zellen separat in der FACS bestimmt. Ein GFP-Plasmid (pLantern, Stratagene) wurde jeweils im Verhältnis 1:3 bis 1:10 zum untersuchten Expressionsplasmid cotransfiziert. Das Medium der adhärennten Zellen wurde abgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert, zu dem vorher abgenommenen Medium gegeben und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand dekantiert und die Zellen in je 200 µl PBS resuspendiert. Für die Messung der Transfektionseffizienz wurden je 100 µl Zellsuspension direkt in der FACS gemessen. Dabei geben die GFP-positiven Zellen in Bezug zur Gesamtpopulation Aufschluß über die Transfektionseffizienz. Für die Messung der hypodiploiden DNA wurden 100 µl der Zellsuspension mit 150 µl PI-Lysepuffer versetzt. Anschließend wurden die Zellen in der FACS direkt gemessen.

6.9.3 *Test auf Cytochrome c-Austritt*

HeLa-Zellen (10 cm-Format) wurden mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transfiziert und 30 h später aufgearbeitet. Dabei wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in Puffer A (250mM Sucrose, 20 mM Hepes pH 7,5, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin) resuspendiert. Die Zellen wurden durch zehnmaliges Ziehen durch eine 22xg-Nadel homogenisiert und das Homogenat anschließend bei 750xg zentrifugiert, um

die Zellkerne zu pelletieren. Zur Abtrennung der Mitochondrien wurden die Überstände für 10 min bei 10.000xg zentrifugiert und der resultierende Überstand wurde auf freigesetztes cytoplasmatisches Cytochrome c mittels Immunoblot untersucht.

6.9.4 Test auf Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta \Psi$ mittels DiOC₆

Die Messung auf Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials wurde hauptsächlich nach der Methode von Li et al. (1999) mittels DiOC₆ durchgeführt. Dabei wurden die HeLa-Zellen nach der Ernte und dem Waschen mit PBS für 30 min bei 5% CO₂ mit 100 nM 3,3'-dihexyloxacarboyanine iodide (DiOC₆, Molecular Probes) inkubiert und anschließend im Durchflußcytometer (FACS-Calibur; Becton-Dickinson, Heidelberg) analysiert.

6.9.5 Caspase-3-Aktivitätstest

Zum Test auf Caspase-3-Aktivität wurde der "Caspase-3-Activity Assay Kit" von Roche benutzt und entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. HeLa-Zellen wurden im 6-well-Format transfiziert, trypsiniert und mit PBS gewaschen. Nach der Lyse wurden jeweils 50 oder 100 µg Gesamtprotein des Lysats für den Caspase-3-Aktivitätstest eingesetzt, wobei eine zuvor mit Caspase 3-Antikörper gecoatete und mit Blocklösung B (2% BSA in PBS) abgesättigte 96-well-Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden) für mindestens 60 min mit dem Lysat inkubiert wurde. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die Caspase-3-Aktivitätsbestimmung mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Caspase-3-Substrats.

7 Abkürzungsverzeichnis

Act.D	Actinomycin D
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
AIF	<i>apoptosis-inducing factor</i>
ANT	<i>adenine nucleotide translocator</i>
Apaf	<i>apoptotic protease-activating factor</i>
Bad	<i>Bcl-2 agonist of cell death</i>
Bak	<i>Bcl-2 agonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X-factor</i>
Bcl	B-cell lymphoma
BFA	Brefeldin A
BH-Domänen	<i>Bcl-2 homology domains</i>
Bid	<i>BH3-interacting DD agonist</i>
Bik	<i>Bcl-2 interacting killer</i>
BIR	<i>baculovirus inhibitor repeat</i>
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
Bok	<i>Bcl-2-related ovarian killer</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CAD	<i>caspase-activated DNase</i>
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Ced	<i>C. elegans death</i>
CIDE	<i>cell death-inducing DFF45-like effector</i>
DcR	<i>decoy receptor</i>
DD	<i>death domain</i>
DED	<i>death effector domain</i>
DFF	<i>DNA fragmentation factor</i>
DiOC ₆	3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide
DISC	<i>death-inducing signalling complex</i>

DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DR	<i>death receptor</i>
Egl-1	<i>egg-laying defective</i>
eIF	<i>eukaryotic initiation factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EndoG	Endonuclease G
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FasL	Fas-Ligand
FLIP	<i>FLICE (Caspase-8)-inhibitory protein</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GST	Glutathion S-transferase
IAP	<i>inhibitor of apoptosis</i>
ICAD	<i>inhibitor of CAD</i>
ICE	<i>interleukin 1β converting enzyme</i>
IFN γ	interferon gamma
InP ₃ R	Inositol 1,4,5,-triphosphaterezeptor
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
MMP	<i>microsatellite mutator phenotype</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PAK	<i>p21-activated kinase</i>
PAM	Einheit der Zahl zugelassener Punktmutationen pro 100 Aminosäurereste (Dayhoff et al., 1978)
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PERK	<i>PKR (RNA-activated protein kinase)-like endoplasmic reticulum kinase</i>

PERP	<i>p53 apoptosis effector related to PMP-22</i>
PT-Pore	<i>permeability transition pore</i>
RT	Raumtemperatur
SERCA	Sarcoplasmatische / endoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase
SMAC	<i>second mitochondrial activator of caspases</i>
tBid	<i>truncated Bid</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TM	<i>transmembrane</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRADD	<i>TNF receptor associated death domain protein</i>
TRAIL	<i>TNF related apoptosis-inducing ligand</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
VDAC	<i>voltage-dependent anion channel</i>
WT	Wildtyp
XIAP	<i>X-chromosome linked IAP</i>
zVADfmk	Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone

8 Literatur

- Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW (2002). **Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation.** *Mol. Cell* 9, 423-432.
- Adams JM, Cory S (1998). **The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.** *Science* 281, 1322-6.
- Afanas'ev VN, Korol BA, Mantsygin Yu A, Nelipovich PA, Pechatnikov VA, Umansky SR (1986). **Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death.** *FEBS Lett* 194, 347-50.
- Albayrak T (2001). **Isolierung und molekularbiologische Charakterisierung von Cytochrom bL und Saip, zweier Apoptose-induzierender Gene.** Dissertation: Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Albayrak T, Scherhammer V, Schönfeld N, Braziulis E, Mund T, Bauer MKA, Scheffler IE, Grimm S (2002). **Complex II of the respiratory chain is a sensor for drug induced apoptosis: Identification by a screen for proapoptotic genes.** Manuskript eingereicht.
- Alnemri E, Livingston SDJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996). **Human ICE/CED-3 protease nomenclature.** *Cell* 87, 171-175.
- Altieri D.C. (2001). **Cytokinesis, apoptosis and survivin: three for tango?** *Cell Death Different.* 8, 4-5.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ et al. (1997). **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Annis, M. G. *et al.* (2001). **Endoplasmic reticulum localized Bcl-2 prevents apoptosis when redistribution of cytochrome c is a late event.** *Oncogene* 20, 1939-1952.
- Antonsson B (2001). **Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 “killer-proteins” and their victim, the mitochondrion.** *Cell Tissue Res.* 306, 347-361.
- Antonsson B, Martinou JC (2000). **The Bcl-2 protein family.** *Exp. Cell Res.* 256, 50-7.

- Aravind L, Dixit VM, Koonin EV (2001). **Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons.** *Science* 291, 1279-1284.
- Aravind L, Dixit VM, Koonin EV (1999). **The domains of death: evolution of the apoptosis machinery.** *Trends Biochem. Sci.* 24, 47-53.
- Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH (1990). **Apoptosis. The role of the endonuclease.** *Am. J. Pathol.* 136, 593-608.
- Arends MJ, Wyllie AH (1991). **Apoptosis: mechanisms and roles in pathology.** *Int. Rev. Exp. Path.* 32, 223-254.
- Ashkenazi A, Dixit VM (1999). **Apoptosis control by death and decoy receptors.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 255-260.
- Attardi L. D., Reczek E. E., Cosmas C., Demicco E. G., McCurrach M. E., Lowe S. W., Jacks T (2000). **PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family.** *Genes Dev.* 14, 704-718.
- Bai C., B. Connolly, M.L. Metzker, C.A. Hilliard, X. Liu, V. Sandig, A. Soderman, S.M. Galloway, Q. Liu, C.P. Austin and C.T. Caskey. (2000). **Overexpression of M68/DcR3 in human gastrointestinal tract tumors independent of gene amplification and its location in a four-gene cluster.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1230-1235.
- Banks DP, Plescia J, Altieri DC, Chen J, Rosenberg SH, Zhang H, Ng SC (2000). **Survivin does not inhibit caspase-3 activity.** *Blood* Dec 1;96 (12), 4002-3.
- Bateman A, Birney E, Durbin R, Eddy SR, Howe KL, Sonnhammer ELL (2000). **The Pfam Protein Families Database.** *Nucleic Acids Res.* 28, 263-266.
- Bauer MKA, Schubert A, Rocks O, Grimm S (1999). **Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis.** *J Cell Biol.* 147, 1493-1502.
- Belaud-Rotureau MA, Leducq N, Macouillard Poullietier de Gannes F, Diolez P, Lacoste L, Lacombe F, Bernard P, Belloc F (2000). **Early transitory rise in intracellular pH leads to Bax conformation change during ceramide-induced apoptosis.** *Apoptosis* Dec;5 (6), 551-60.
- Bennet A. (1992). **Method for preparing blood-serum.** *J. Immunol. Meth.* 153, 31-40.

- Bergeron L, PerezGI, Macdonald G, Shi L, Sun Y, Jurisicova A, Varmuza S, Latham KE, Flaws JA, Salter JC et al. (1998). **Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice.** *Genes Dev.* 12, 1304-1314.
- Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S (1999). **Sequence- and Structure-Based Prediction of Eukaryotic Protein Phosphorylation Sites.** *J. Mol. Biol.* 294(5), 1351-1362.
- 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.
- Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, Adams JM, Strasser A, (1999). **Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity.** *Science* 286:1735-8.
- Bouillet P, Strasser A, (2002). **BH3-only proteins-evolutionarily conserved pro-apoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death.** *J. Cell Sci.* 115, 1167-1174.
- Bradford MM, (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal. Biochem.* 72, 248-54.
- Bratton, S.B., Walker, G., Srinivasula, S.M., Sun, X.M., Butterworth, M., Alnemri, E.S., and Cohen, G.M. (2001). **Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes.** *EMBO J.* 20, 998-1009.
- Braun MY, Lowin B, French L, Acha-Orbea H, Tschopp J, (1996). **Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease.** *J Exp Med* 183, 657-61.
- Breckenridge DG, Nguyen M, Kuppig S, Reth M, Shore GC (2002). **The procaspase-8 isoform, procaspase-8L, recruited the Bap31 complex at the endoplasmic reticulum.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99-7, 4331-4336.
- Breckenridge DG, Shore GC, (2002). **The role of the endoplasmic reticulum in apoptosis.** (in press).
- Budihardjo I., Oliver H., Lutter M., Luo X. and Wang X. (1999). **Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 269-290.

- Cecconi, F., Alvarez-Bolado, G., Meyer, B.I., Roth, K.A., and Gruss, P. (1998). **Apaf1 (CED-4) homolog regulates programmed cell death in mammalian development.** *Cell* 94, 727-737
- Chai J., Du C., Wu J.-W., Kyin S., Wang X. and Shi Y. (2000). **Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO.** *Nature*, 406:855-862.
- Chandel NS, Schumacker PT, (1999). **Cells depleted of mitochondrial DNA (rho0) yield insight into physiological mechanisms.** *FEBS Lett* 454:173-6.
- Chen F, Hersh, B. M., Conradt, B., Zhou, Z., Riemer, D., Gruenbaum, Y. and Horvitz, H. R. (2000). **Translocation of *C. elegans* CED-4 to nuclear membranes during programmed cell death.** *Science* 287:1485-1489.
- Chen G., R. Ray, D. Dubik, L. Shi, J. Cizeau, R. C. Bleackley, S. Saxena, R. D. Gietz, and A. H. Greenberg. (1997). **The E1B 19K/Bcl-2-binding Protein Nip3 is a dimeric mitochondrial protein that activates apoptosis.** *J. Exp. Med.* 186, 1975-1983.
- Cheng E.H., D.G. Kirsch, R.J. Clem, R. Ravi, M.B. Kastan, A. Bedi, K. Ueno and J.M. Hardwick. (1997). **Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases.** *Science* 278, 1966-1968.
- Cheng EH-Y, Levine B, Boise LH, Thompson CB, Hardwick JM (1996). **Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL.** *Nature* 379, 554-56.
- Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM, (1996). **FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis.** *J Biol Chem* 271:4961-5.
- Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, Chinnadurai G, Lutz RJ (1995). **A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions.** *EMBO J.* 14, 5589-5596.
- Cikala M, Wilm B, Hobmayer E, Bottger A, David CN, (1999). **Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan *Hydra*.** *Curr Biol* 9:959-62.
- Cizeau J, Ray R, Chen G, Gietz RD, Greenberg AH (2000). **The *C. elegans* orthologue ceBNIP3 interacts with CED-9 and CED-3 but kills cells through a BH3- and caspase-independent mechanism.** *Oncogene* 19, 5453-63.

- Conradt, B. and Horvitz, H. R. (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.
- Corpet F, Servant F, Gouzy J, Kahn D (2000). **ProDom and ProDom-CG: tools for protein domain analysis and whole genome comparisons.** *Nucleic Acids Res.* 28:267-269.
- Cory S, Adams JM (2002). **The Bcl2-family: regulators of the cellular life-or-death switch.** *Nature Cell Biol* 2, 647-656.
- Cote J, Ruiz-Carillo A, (1993). **Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G.** *Science* 261, 765-769.
- Cryns V. and J. Yuan. (1998). **Proteases to die for.** *Genes Dev.* 12. 1551-1570.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME, (1997). **Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery.** *Cell* 91, 231-41.
- Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB, Greenberg ME (2000). **14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate Bad by BH3 domain phosphorylation.** *Mol Cell* 6, 41-51.
- Dawkins JL, Hulme DJ, Brahmabhatt SB, Auer-Grumbach M, Nicholson GA. (2001). **Mutations in SPTLC1, encoding serine palmitoyltransferase, long chain base subunit-1, cause hereditary sensory neuropathy type I.** *Nat Genet.* Mar; 27 (3), 309-12.
- Dayhoff MO, Schwarz RM, Orcutt BC (1978). **A model of evolutionary change in proteins. In: Atlas of protein sequence and structure.** Vol.5, Suppl.3. National Biomedical Research Foundation, Washington DC, 345-352.
- del Peso L, Gonzalez VM, Nunez G (1998). ***Caenorhabditis elegans* EGL-1 disrupts the interaction of CED-9 with CED-4 and promotes CED-3 activation.** *J. Biol. Chem.* 273, 33495-500.
- del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G (1997). **Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt.** *Science* 278, 687-9.
- Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC (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. and Reed J.C. (1999). **IAP family proteins-suppressors of apoptosis.** *Genes Dev.*, 13:239-252.
- Deveraux, Q. 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.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). **Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition.** *Cell* 102: 33-42.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999). **Mammalian caspases: structure, activation, substrates and function during apoptosis.** *Annu. Rev. Biochem.* 68, 383-424.
- Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR. (1991). **Mechanisms and functions of cell death.** *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:663-98.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S, (1998). **A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD.** *Nature* 391:43-50.
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC, (2000). **Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane.** *Mol Cell Biol* 20:929-35.
- Esteve P, del Peso L, Lacal JC (1995). **Induction of apoptosis by rho in NIH3T3 cells requires two complementary signals. Ceramides function as a progression factor for apoptosis.** *Oncogene* 11, 2657-2665.
- Ferri KF, Kroemer G (2001). **Organelle-specific initiation of cell death pathways.** *Nature Cell Biol.* 3, E255-E263.
- Fesik SW (2000). **Insights into programmed cell death through structural biology.** *Cell* 103, 273-282.
- Fitch ME, Chang CM, Parslow TG (2000). **The BH3 domain is required for caspase-independent cell death induced by Bax and oligomycin.** *Cell Death Differ* Apr;7(4):338-49.

- Garnier J, J.-F. Gibrat, B. Robson, (1996). **GOR secondary structure prediction method version IV** *Methods in Enzymology*, R.F. Doolittle Ed. 266, 540-553,
- Geourjon, C., Del'age, G., (1994). **SOPM: a self-optimised method for protein secondary structure prediction**. *Protein Engineering* 7, 157-164
- Germain M, Mathai JP, Shore GC 2002. **BH3-only Bik functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome c release from mitochondria**. *J. Biol. Chem.* May 17; 277(20):18053-60.
- 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.* v. 20, p. 1425 ff.
- Ghosh C, Iversen PL (2000). **Intracellular delivery strategies for antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers**. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10, 263-274.
- Griffiths, G. J., Dubrez, L., Morgan, C. P., Jones, N. A., Whitehouse, J., Corfe, B. M., Dive, C. and Hickman, J. A. (1999). **Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis**. *J. Cell Biol.* 144, 903 –914.
- 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.
- Grimm S, Stanger BZ, Leder P (1996). **RIP and FADD: two “death domain”-containing proteins can induce apoptosis by convergent, but dissociable, pathways**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10923-7.
- Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ, (1998). **Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis**. *EMBO J* 17:3878-85.
- Häcki, J. L. Egger, L. Monney, S. Conus, R. Rossé, I. Fella, and C. Borner. (2000). **Apoptotic crosstalk between the endoplasmic Retikulum and mitochondria controlled by Bcl-2**. *Oncogene.* 19, 2286-2295.
- Han Z et al. (1997). **A sequential two-step mechanism for the production of the mature p17: p12 form of caspase-3 in vitro**. *J Biol. Chem.* 272, 13432-13436.

- Han, J., Flemington, C., Houghton, A. B., Gu, Z., Zambetti, G. P., Lutz, R. J., Zhu, L. and Chittenden, T. (2001). **Expression of *bbc3*, a proapoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98,11318 -11323.
- Hanahan D, Weinberg RA, (2000). **The hallmarks of cancer.** *Cell* 100:57-70.
- Harada H, Becknell B, Wilm M, Mann M, Huang LJ, Taylor SS, Scott JD, Korsmeyer SJ, (1999). **Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A.** *Mol Cell* 3:413-22.
- Haraguchi, M., Torii, S., Matsuzawa, S., Xie, Z., Kitada, S., Krajewski, S., Yoshida, H., Mak, T.W., and Reed, J.C. (2000). **Apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1)-independent cell death suppression by Bcl-2.** *J. Exp. Med.* 191: 1709-1720.
- Harris, C. A. and Johnson, E. M., Jr (2001). **BH3-only Bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require Bax to induce apoptosis in neurons.** *J. Biol. Chem.* 276, 37754-37760.
- Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR (1992). ***Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death.** *Nature* 356, 494-99.
- Honarpour, N., Du, C., Richardson, R J.A., Hammer, E., Wang, X., and Herz, J. (2000). **Adult Apaf-1-deficient mice exhibit male infertility.** *Dev. Biol.* 218: 248-258.
- Honarpour, N., Gilbert, S., Lahn, B., Wang, X., and Herz, J. (2001). **Apaf-1 deficiency and neural tube closure defects are found in fog mice.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Aug 14;98(17):9683-7.
- Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M, Hsueh AJ (1997). **Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members.** *Proc Natl Acad Sci U S A* Nov 11; 94 (23):12401-6.
- Huang, D. C. S. und Strasser, A. (2000). **BH3-only proteins — essential initiators of apoptotic cell death.** *Cell* 103, 839–842.
- Hunter JJ, Parslow TG (1996). **A peptide sequence from Bax that converts Bcl-2 into an activator of apoptosis.** *J. Biol. Chem.* 271, 8521-8524.
- Huseyin, M. (2000). **Apoptosis: Caspases find a new place to hide.** *Nature.* 403, 29-30.

- Hussain SP, Harris CC (2000). **Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens.** *Mutat. Res.* 462, 311-322.
- Inohara N, Nunez G, (2000). **Genes with homology to mammalian apoptosis regulators identified in zebrafish.** *Cell Death Differ* 7:509-10.
- 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.
- Iwawaki, T. *et al.* (2001). **Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress.** *Nature Cell Biol.* 158-164.
- Jäättelä M. (1999). **Escaping cell death: survival proteins in cancer.** *Exp. Cell Res.* 248, 30-43.
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM, (2001). **Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death.** *Nature* 410:549-54.
- Kagi D, Ledermann B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM, Hengartner H, (1994a). **Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice.** *Nature* 369:31-7.
- Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P, (1994b). **Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity.** *Science* 265:528-30.
- Kaufmann SH, Hengartner MO (2001). **Programmed cell death: alive and well in the new millennium.** *Trends in Cell Biol.* 11 / 12, 526-534.
- Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV, (1994). **Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy.** *Cancer* 73:2013-26.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR, (1972). **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** *Br. J. Cancer* 26:239-57.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995). **Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor.** *EMBO J.* 14, 5579-5588.

- Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J., and Schlesinger, P.H. (2000). **Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c.** *Cell Death Differ.* 7: 1166-1173.
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kohts K, Kwiatkowski DJ, Williams LT, (1997). **Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis.** *Science* 278, 294-298.
- Krajewski S, Blomqvist C, Franssila K, Krajewska M, Wasenius VM, Niskanen E, Nordling S, Reed JC (1995). **Reduced expression of proapoptotic gene Bax is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in woman with metastatic breast adenocarcinoma.** *Cancer Res.* 55, 4471-4478.
- Krajewska M, Moss SF, Krajewski S, Song K, Holt PR, Reed JC (1996). **Elevated expression of Bcl-X and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinomas.** *Cancer Res.* 56, 2422-2427.
- Krammer PH, (2000). **CD95's deadly mission in the immune system.** *Nature* 407:789-95.
- Kroemer G, Zamzami N, Susin SA, (1997). **Mitochondrial control of apoptosis.** *Immunol Today* 18:44-51.
- Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M.S., Rakic, P., and Flavell, R.A. (1998). **Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9.** *Cell* 94: 325-337
- Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., and Flavell, R.A. (1996). **Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice.** *Nature* 384: 368-372
- Laemmli UK, (1970). **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 227:680-5.
- Lai CH, Chou CY, Ch'ang LY, Liu CS, Lin W. (2000). **Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics.** *Genome Res.* May;10(5):703-13.
- Latif N, Khan MA, Birks E, O'Farrell E, Westbrook J, Dunn MJ, Yakoub MH (2000). **Upregulation of the Bcl-2 family of proteins in end stage heart failure.** *J. Am. Coll. Cardiol.* 35, 1769-1777.

- 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.
- Lebowitz Fr, Sakamuro D, Prendergast GC (1997). **Farnesyl transferase inhibitors induce apoptosis of Ras-transformed cell denied substratum allachment.** *Cancer Res*. 57, 708-713.
- Lee, S. T. K. P. Hoeflich, G. W. Wasfy, J. R. Woodgett, B. Leber, D. W. Andrews, D. W. Hedley, and L. Z. Penn. (1999). **Bcl-2 targeted to the endoplasmic Retikulum can inhibit apoptosis induced by Myc but not etoposide in Rat-1 fibroblasts.** *Oncogene*. 18, 3520-3528.
- Letunic I, Goodstadt L, Dickens NJ, Doerks T, Schultz J, Mott R, Ciccarelli F, Copley RR, Ponting CP and Bork P (2002). **Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource.** *Nucl Acids Res* Vol. 30, No. 1, 242-244.
- Li F., Ambrosini G., Chu E.Y., Plescia J., Tognin S., Marchisio P.C. and Altieri D.C. (1998) **Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin.** *Nature*, 396:580-584.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J, (1998). **Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis.** *Cell* 94:491-501.
- Li LY, Luo X, Wang X, (2001). **Endonuclease G (EndoG) is an apoptotic Dnase when released from mitochondria.** *Nature* 412, 95-99.
- Li PF, Dietz R, von Harsdorf R, (1999). **p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2.** *EMBO J*. 18:6027-36.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X, (1996). **Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c.** *Cell* 86:147-57.
- Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X, (1997). **DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis.** *Cell* 89:175-184.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X, (1998). **Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors.** *Cell* 94:481-90.

- Lupas, A., Van Dyke, M., and Stock, J. (1991). **Predicting Coiled Coils from Protein Sequences.** *Science* 252:1162-1164.
- Lutter M, Fang M, Luo X, Nishijima M, Xie X, Wang X, (2000). **Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria.** *Nature Cell Biol.* 2, 754-761.
- Martinou JC, Desagher S, Antonsson B. (2000). **Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing.** *Nature Cell Biol.* 2, E41-E43.
- Martinou JC, Green DR, (2001). **Breaking the mitochondrial barrier.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:63-7.
- Maynard Smith J. (1989). **Evolutionary Genetics.** *Oxford University Press*, Oxford.
- McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L. O., Aw, T. Y. & Holbrook, N. J. (2001). **Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulation Bcl-2 and perturbing the cellular redox state.** *Mol. Cell. Biol.* 21, 1249-1259.
- McLaughlin R, Kelly CJ, Kay E, Bouchier-Hayes D, (2001). **The role of apoptotic cell death in cardiovascular disease.** *Ir J Med Sci* 170:132-40.
- Meier P, Finch A, Evan G, (2000). **Apoptosis in development.** *Nature* 407:796-801.
- Metzstein M.M, G.M. Stanfield and H.R. Horvitz (1998). **Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future.** *Trends Genet.* 14:410-416.
- Miller L.K. (1999) **An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs.** *Trends Cell Biol.* 9:323-328.
- Milligan CE, Schwartz LM, (1997). **Programmed cell death during animal development.** *Br Med Bull* 53:570-90.
- Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, Penninger JM, Peleato ML, Kroemer G, Susin SA, (2001). **NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor.** *J. Biol. Chem.* 276, 16391-16398.
- Mitelman, *et al.* (1997). **A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia.** *Nature Genet.* Apr 15 Suppl., 417-474.

- Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartweg EA, Yuan J. (1993). **Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 β -converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*.** *Cell* 75:653–60.
- Nakagawa, T. & Yuan, J. (2000). **Cross-talk between two cysteine protease families: activation of caspase-12 by calpain in apoptosis.** *J. Cell Biol.* 150, 887-894.
- Nakagawa, T. H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B. A. Yankner, and J. Yuan. (2000). **Caspase-12 mediates endoplasmic Retikulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta.** *Nature.* 403, 98-103.
- Nakai K and Kanehisa M (1992). **A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells.** *Genomics* 14, 897-911.
- Nakano, K. and Wousden, K. H. (2001). **PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53.** *Mol. Cell* 7,683 -694.
- Nechushtan, A., Smith, C.L., Lamensdorf, I., Yoon, S-H. and Youle, R. (2001). **Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis.** *J. Cell Biol.* 153: 1265-1276.
- Neudecker, F. und S. Grimm. (2000). **High-throughput method for isolating plasmid DNA with reduced lipopolysaccharide content.** *Biotechniques.* 28, 107-109.
- Ng FWH, Nguyen M, T. Kwan, P. E. Branton, W. D. Nicholson, J. A. Cromlish, and G. C. Shore. (1997). **p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-x_L- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic Retikulum.** *J. Cell Biol.* 139, 327-338.
- Ng, FWH, Shore GC. (1998). **Bcl-X_L Cooperatively Associates with the Bap31 Complex in the Endoplasmic Retikulum, Dependent on Procaspase-8 and Ced-4 Adaptor.** *J. Biol. Chem.* 273, 3140-3143.
- Nguyen, M. A. D. Breckenridge, and G. C. Shore. (2000). **Caspase-Resistant BAP31 Inhibits Fas-Mediated Apoptotic membrane Fragmentation and Release of Cytochrome c from Mitochondria.** *Molecular and Cellular Biology.* 20, 6731-6740.
- Niwa, M., Sidrauski, C., Kaufman, R. J. & Walter, P. (1999). **A role for presenilin-1 in nuclear accumulation of Ire1 fragments and induction of the mammalian unfolded response.** *Cell* 99, 691-702.
- O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM (1998). **Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis.** *EMBO J.* 17, 384-95.

- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. and Tanaka, N. (2000). **Noxa, a BH3-only member of the bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis.** *Science* 288,1053 - 1058.
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ, (1993). **Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death.** *Cell* 74:609-19.
- Orth K, Chinnaiyan AM, Garg M, Froelich CJ, Dixit VM (1996). **The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A.** *J Biol. Chem.* 271, 16443.
- Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X, Xue D, (2001). **Identification of *C. elegans* endonuclease G as a mitochondrial nuclease important for DNA fragmentation and proper execution of apoptosis.** *Nature* 412, 90-94.
- Parry DA, Steinert PM (1992). **Intermediate filament structure.** *Curr. Opin. Cell. Biol.* 4, 94-98.
- Patil, C. & Walter, P. (2001). **Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 349-356.
- Peitsch, M. C. H. G. Mannherz, and J. Tschoop, (1994). **The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death?** *Trends Cell Biol.* 4, 37-41.
- Perry DK, Carton J, Shah AK, Meredith F, Uhlinger DJ, Hannun YA. (2000). **Serine palmitoyltransferase regulates de novo ceramide generation during etoposide-induced apoptosis.** *J Biol Chem.* 275(12):9078-84.
- Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT et al., (1998). **Genomic amplification of a decoy receptor for fas ligand in lung and colon cancer.** *Nature* 396, 699-703.
- Putchala, G. V., Moulder, K. L., Golden, J. P., Bouillet, P., Adams, J. M., Strasser, A. and Johnson, E. M. J. (2001). **Induction of Bim, a proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member, is critical for neuronal apoptosis.** *Neuron* 29, 615 -628.
- Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A, (1999). **The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex.** *Mol Cell* 3:287-96.

- Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, Huang DC, Strasser A, (2001). **Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis.** *Science* 293:1829-32.
- Raff, M. C. (1992). **Social controls on cell survival and cell death.** *Nature* 356, 398-400.
- Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M. (1997). **Somatic frameshift mutations in the *bax* gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype.** *Science* 275:967-69.
- Ranger AM, Malynn BA, Korsmeyer SJ, (2001). **Mouse models of cell death.** *Nature Gen.* 28, 113-118.
- Ray R, Chen G, Vande Velde c, Cizeau J, Park JH, Reed JC, Gietz RD, Greenberg AH, (2000). **BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-XL and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites.** *J. Biol. Chem.* 275, 1439-1448.
- Rehm M, Dussmann H, Janicke RU, Tavaré JM, Kogel D, Prehn JH. (2002). **Single-cell fluorescence resonance energy transfer analysis demonstrates that caspase activation during apoptosis is a rapid process. Role of caspase-3.** *J Biol Chem* Jul 5;277(27):24506-14.
- Renatus M, Stennicke H.R., Scott F.L., Liddington R.C. and Salvesen G.S. (2001). **Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 14250-14255.
- Rheaume E, Cohen LY, Uhlmann F, Lazure C, Alam A, Hurwitz J, Sekaly RP, Denis F. (1997). **The large subunit of replication factor C is a substrate for caspase-3 in vitro and is cleaved by a caspase-3-like protease during Fas-mediated apoptosis.** *EMBO J.* Nov 3;16(21):6346-54.
- Rodriguez J, Lazebnik Y, (1999). **Caspase-9 and Apaf-1 form an active holoenzyme.** *Genes Dev* 13, 3179-3184.
- Rudel T, Bokoch GM, (1997). **Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2.** *Science* 276:1571-4.
- Salvesen GS, Dixit VM (1999). **Caspase activation: the induced-proximity model.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10964-10967.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). **Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edition)**. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Scaffidi C, Kirchhoff S, Krammer PH, Peter ME (1999/a). **Apoptosis signaling in lymphocytes**. *Curr. Op. Imm.* 11, 277-285.
- Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME (1999/b). **The role of c-Flip in modulation of CD95-induced apoptosis**. *J. Biol. Chem.* 274, 1541-1548.
- Schlessinger J, Ullrich A (1992). **Growth factor signalling by receptor tyrosin kinases**. *Neuron* 9, 383-391.
- Schönfeld N (2002). **Molekularbiologische Charakterisierung des Tumorsuppressorgens CD82/C33**. Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998). **SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains**. *Proc Natl Acad Sci U S A* May 26, 95 (11), 5857-64.
- Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ, (1995). **Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7834-8.
- Shi Y (2002). **Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis**. *Mol. Cell* 9, 456-470.
- 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.
- 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.

- Srinivasula S.M., Saleh A., Hedge R., Datta P., Shiozaki E., Chai J., Robbins P.D., Fernandes-Alnemri T., Shi Y. and Alnemri E.S. (2001). **A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO mediates opposing effects on caspase activity and apoptosis.** *Nature* 409, 112-116.
- Stennicke HR, Ryan CA, Salvesen GS (2002). **Reprieval from execution: the molecular basis of caspase inhibition.** *Trends Bioch. Sci.* 27-2, 94-101.
- Strasser A, Huang DC, Vaux DL (1997). **The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumourigenesis and resistance to chemotherapy.** *Biochim. Biophys. Acta* 1333:F151-F178.
- Strasser A, O'Connor L, Dixit VM, (2000). **Apoptosis signaling.** *Annu Rev Biochem* 69:217-45.
- Sulston JE, Horvitz HR. (1977). **Post-embryonic cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*.** *Dev. Biol.* 82, 110–56.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G, (1999). **Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor.** *Nature* 397, 441-446.
- Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R, (2001/a). **A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death.** *Mol. Cell* 8, 613-621.
- Suzuki Y., Nakabayashi Y. and Takahashi R. (2001/b) **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.
- Tagami, S., Eguchi, Y., Kinoshita, M., Takeda, M. & Tsujimoto, Y. (2000). **A novel protein, RTN-XS, interacts with both Bcl-XL and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity.** *Oncogene* 19, 5736-5746.
- Takahashi A, E.S. Alnemri, Y.A. Lazebnik, T. Fernandes-Alnemri, G. Litwack, R.D. Moir, R.D. Goldman, G.G. Poirier, S.H. Kaufmann and W.C. Earnshaw (1996). **Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 8395-8400.

- Tautz D, Renz M. (1983). **An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels.** *Anal Biochem.* Jul 1, 132 (1), 14-9.
- 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. Krammer, M. E. Peter, and J. Tschopp. (1997). **Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors.** *Nature* 386, 517-521.
- Thompson CB, (1995). **Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.** *Science* 267, 1456-62.
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998). **Caspases: enemies within.** *Science* 281, 1312-6.
- Tiranti V, Rossi E, Ruiz-Carrillo A, Rossi G, Rocchi M, DiDonato S, Zuffardi O, Zeviani M (1995). **Chromosomal localization of mitochondrial transcription factor A (TCF6), single-stranded DNA-binding protein (SSBP), and endonuclease G (ENDOG), three human housekeeping genes involved in mitochondrial biogenesis.** *Genomics.* Jan 20, 25 (2), 559-64.
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1985). **Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma.** *Science* 228, 1440-1443.
- Udagawa T, McIntyre BW (1996). **ADP-ribosylation of the g protein Rho inhibits integrin regulation of tumor cell growth.** *J. Biol. Chem.* 271, 12542-12548.
- Uhlmann EJ, T. Subramanian, Carol A. Vater, Robert Lutz, and G. Chinnadurai (1998). **A Potent Cell Death Activity Associated with Transient High Level Expression of BCL-2.** *J. Biol. Chem.* 273, 17926-17932.
- Urano, F. *et al.* (2000). **Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1.** *Science* 287, 664-666.
- Vaughn DE *et al.* (1999). **Crystal structure of Apaf-1 caspase recruitment domain: an alpha-helical greek key fold for apoptotic signaling.** *J. Mol. Biol.* 293, 439-447.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO *et al.* (2001). **The sequence of the human genome.** *Science.* 2001 Feb 16, 291 (5507), 1304-51.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., and Vaux, D.L. (2000). **Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins.** *Cell* 102, 43-53.

- Virchow R (1871). **Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische Gewebelehre.** 4. Auflage. Hirschwald, Berlin.
- Wang J, L. Zheng, A. Lobito, F.K. Chan, J. Dale, M. Sneller, X. Yao, J.M. Puck, S.E. Straus and M.J. Lenardo. (1999). **Inherited human caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II.** *Cell* 98, 47-58.
- Wang X, (2001). **The expanding role of mitochondria in apoptosis.** *Genes Dev.* 15, 2922-2933.
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S, (1992). **Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis.** *Nature* 356, 314-7.
- Wehner R, Gehring W, (1990). **Zoologie.** Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ, (2001). **Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death.** *Science* 292, 727-30.
- Wen LP, J.A. Fahrni, S. Troie, J.L. Guan, K. Orth and G.D. Rosen (1997). **Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis.** *J. Biol. Chem.* 272, 26056-26061.
- Whitfield, J., Neame, S. J., Paquet, L., Bernard, O. and Ham, J. (2001). **Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release.** *Neuron* 29, 629-643.
- Wolf E, Kim PS, Berger B (1997). **MultiCoil: A Program for Predicting Two- and Three-Stranded Coiled Coils.** *Protein Science* 6, 1179-1189.
- Xue D and H.R. Horvitz. (1997). **Caenorhabditis elegans CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor.** *Nature* 390, 305-308.
- 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.
- Yang, X. Chang, H. Y. Baltimore, D. (1998). **Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization.** *Mol. Cell.* 1, 319-325

- Yin C, Knudsen CM, Korsmeyer SJ, Van Dyke T (1997). **Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis *in vivo***. *Nature* 385, 637-640.
- Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M. (2001). **Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanisms in response to ER stress**. *J. Biol. Chem.* 276, 13935-13940.
- Yoshida, H., Kong, Y.Y., Yoshida, R., Elia, A.J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J.M., and Mak, T.W. (1998). **Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development**. *Cell* 94, 739-750
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (2001). **PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells**. *Mol. Cell* 7, 673-682.
- Zamzami N, Kroemer G (2001). **The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 67-71.
- Zha H and J C. Reed (1997). **Heterodimerization-independent Functions of Cell Death Regulatory Proteins Bax and Bcl-2 in Yeast and Mammalian Cells**.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ, (1996). **Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)**. *Cell* 87, 619-28.
- 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 QH, Ye M, Wu XY, Ren SX, Zhao M, Zhao CJ, Fu G, Shen Y, Fan HY, Lu G, Zhong M, Xu XR, Han ZG, Zhang JW, Tao J, Huang QH, Zhou J, Hu GX, Gu J, Chen SJ, Chen Z. (2000). **Cloning and functional analysis of cDNAs with open reading frames for 300 previously undefined genes expressed in CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells**. *Genome Res.* Oct 10 (10), 1546-60.
- Zhoratti, M. und I. Szabo (1995). **The mitochondrial permeability transition**. *Biochim. Biophys. Acta.* 1241, 139-176.
- Zörnig M, Hueber A-O, Baum W, Evan G (2001). **Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis**. *Biochim. Biophys. Acta* 1551:F1-F37.

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X (1999). **An Apaf-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosom that activates procaspase-9.** *J. Biol. Chem.* 274, 11549-11556.

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

9 Veröffentlichungen

Thomas Mund, Andreas Gewies, Nicole Schönfeld, Manuel K.A. Bauer, Stefan Grimm (2001). **A novel dominant apoptosis-inducing factor: a possible mediator of stress-induced signalling pathways.** Posterpräsentation beim FEBS-Meeting 2001 in Lissabon.

Thomas Mund, Andreas Gewies, Nicole Schönfeld, Manuel K.A. Bauer, Stefan Grimm (2003). **Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum.** *FASEB J.* 17 (6), 696-698.

Timur Albayrak, Volker Scherhammer, Nicole Schönfeld, Erik Braziulis, Thomas Mund, Manuel K.A. Bauer, Immo E. Scheffler, Stefan Grimm (2003). **The tumor suppressor cybL, a component of the respiratory chain, mediates apoptosis induction.** *Mol Biol Cell* 14 (8), 3082-3096.

Patentbeteiligung

Stefan Grimm, Nicole Schönfeld, Erik Braziulis, Thomas Mund, Ulla Cramer, Andreas Gewies, Frank Voß, Timur Albayrak: **Apoptose-induzierende DNA-Sequenzen.** Deutsche Anmeldung DE 10126344.9, 30.05.2001, Veröffentlichung: 24.01.2002; PCT-Anmeldung EP 01/08170, 13.07.2001

10 Erklärung

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

München, 16. 12. 2002

(Thomas Mund)

11 Lebenslauf

Name:	Thomas Mund	
Geburtsdatum:	16.09.1971	
Geburtsort:	Teterow (Mecklenburg-Vorpommern)	
Nationalität:	deutsch	
Schulbildung:	1978-1988	Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule Rostock
Hochschulreife:	1988-1990	Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, Institut zur Vorbereitung auf das Auslandsstudium (ABF, IVA)
	30.06.1990	Abitur
Grundwehrdienst:	10/1990 - 09/1991	NVA, Bundeswehr
Biologiestudium:	1991-1997	Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Fakultät für Biologie
	09/1994-06/1995	University of Aberdeen, Faculty of Biology
	09/1996-08/1997	Diplomarbeit am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg
	Thema:	“Heterologe Expression von VASP mit Hilfe des Sf21- Baculovirussystems: Reinigung und Charakterisierung des rekombinanten Proteins.”
	Diplomprüfungen:	Biochemie (Hauptfach) Zoologie (Schwerpunkt Tierphysiologie) Genetik
	1998	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg
Promotion	1999-2002	Ludwig-Maximilians-Universität München und Max- Planck-Institut für Biochemie Martinsried, Arbeitsgruppe „Programmierter Zelltod“