

**Funktionelle Charakterisierung des IAP-verwandten, Ubiquitin-  
konjugierenden Enzyms BRUCE *in vivo* durch die  
phänotypische Analyse eines Maus-*Knockout*-Modells**

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

2004

vorgelegt von  
Diplom-Biologin Kristina Lotz  
aus Greifswald

Ehrenwörtliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation oder Teile einer Dissertation einzureichen bzw. einer Prüfungskommission vorzulegen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

München, den 20.12.2004

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Februar 2000 und Dezember 2004 unter Anleitung von Prof. Dr. Stefan Jentsch am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinried durchgeführt.

Teile dieser Dissertation sind in folgender Publikation veröffentlicht:

**Lotz K.**, G. Pyrowolakis and S. Jentsch (2004). BRUCE, a Giant E2/E3 Ubiquitin Ligase and Inhibitor of Apoptosis Protein of the *trans*-Golgi Network, Is Required for Normal Placenta Development and Mouse Survival. *Mol Cell Biol.* 24(21). 9339-9350.

Dissertation eingereicht am: 10.01.2005

Tag der mündlichen Prüfung: 02.06.2005

Erster Gutachter: Prof. Dr. Stefan Jentsch

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Charles N. David

**Für meine Eltern  
und meine Lehrer**

## **Danksagung**

Ich möchte mich an erster Stelle bei Prof. Dr. Stefan Jentsch bedanken. Dieser Dank bezieht sich nicht nur auf die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der notwendigen Mittel sondern vor allem auch auf die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die wissenschaftliche Freiheit bei der Bearbeitung der Dissertationsproblematik.

Herrn Prof. Dr. Charles N. David aus der Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München gebührt mein Dank für die bereitwillige Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Während der letzten Jahre habe ich von zahlreichen Personen Beistand erhalten. Vor allem gegenüber folgenden Kollegen möchte ich meine Dankbarkeit zum Ausdruck bringen: Cordula Heske, Margareta Kyrezoglou sowie der Besatzung des Tierhauses für tatkräftige technische Assistenz, Klara Schwander und Dirk Kempe für Hilfe in zahlreichen organisatorischen Fragen, Sigurd Braun für erheiternde Gespräche wissenschaftlicher und privater Natur sowie Darja Schmidt für die kleinen kreativen Pausen, ihr offenes Ohr und den moralischen Beistand vor allem während der Endphase dieser Arbeit.

Des Weiteren sei Thomas Floss und Christiane Hitz vom Forschungszentrum der GSF in Neuherberg sowie Dr. Markus Moser aus der Abteilung Molekulare Medizin des MPI für Biochemie für technische Hilfe, wertvolle Kritik und intensive Diskussionen gedankt.

Größter Dank gilt auch meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung in allen Lebenslagen und Entscheidungen sowie meinem Lebenspartner, von dessen Verständnis, Erfahrung und Hilfe ich nicht nur privat profitieren konnte.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	1
<b>1. Einleitung</b>	2
1.1. Das Ubiquitin/Proteasom-System	3
1.1.1. Komponenten des Ubiquitin/Proteasom-Systems	3
1.1.1.1. Das Ubiquitin-Konjugationssystem	4
- E1-Enzyme	4
- E2-Enzyme	4
- E3-Enzyme	5
- E4-Proteine	5
1.1.1.2. Das 26S-Proteasom	7
1.1.2. Funktionen des Ubiquitin/Proteasom-Systems	7
1.2. BRUCE – Ein neuartiges Ubiquitin-Konjugationsenzym	9
1.2.1. <i>BRUCE</i> – Gen und Protein	9
1.2.2. Die E2-Komponente in BRUCE	9
1.2.3. Die IAP-Komponente in BRUCE	10
1.3. IAPs – Inhibitoren des programmierten Zelltods	11
1.3.1. Der programmierte Zelltod	11
1.3.2. Caspasen – Proteasen des programmierten Zelltods	12
1.3.3. IAPs als Regulatoren der Caspase-Aktivität	14
1.3.4. Weitere Funktionen der IAPs	15
1.4. BRUCE und seine Homologen	16
1.5. Die Funktion des BRUCE/Apollon-Proteins	17
1.6. Zielsetzung der Arbeit	20
<b>3. Ergebnisse</b>	21
2.1. Das <i>in vivo</i> -Modell	21
2.2. Die Inaktivierung des <i>BRUCE</i> -Gens in der Maus	22
2.3. Die Bestimmung des Genotyps der transgenen Tiere	24
2.3.1. <i>Southern blot</i> -Analyse	24
2.3.2. PCR-Analyse	25
2.4. Die Charakterisierung des Phänotyps der <i>BRUCE</i> <sup>-/-</sup> -Mäuse	25
2.4.1. Embryonales Wachstum und perinatale Letalität	26
2.4.2. Die Ursachen der perinatalen Letalität	31
2.4.2.1. Phänotyp-Analyse des Embryos	31
- Die <i>BRUCE</i> -Expression während der Embryonalentwicklung	31
- Die histologische Analyse des Embryos	34
2.4.2.2. Phänotyp-Analyse der extra-embryonalen Gewebe	39
- Eine Einführung in Morphologie und Funktion	39
- Die <i>BRUCE</i> -Expression	41
- Die histologische Analyse	42

2.4.3. Charakterisierung embryonaler Fibroblasten	47
2.4.3.1. Das Wachstum unter Kulturbedingungen	48
2.4.3.2. Apoptose und Proliferation	49
2.4.4. Apoptose und Proliferation im embryonalen und extra-embryonalen Gewebe	57
<b>3. Diskussion</b>	<b>61</b>
3.1. Der vollständige BRUCE-Verlust führt zu perinataler Letalität	61
3.2. BRUCE ist essentiell für die Entwicklung und den funktionellen Erhalt der extra-embryonalen Gewebe	62
3.3. Vom Phänotyp des <i>Knockout</i> -Modells zur Aktivität des BRUCE-Proteins – Einblicke in die komplexe Funktion des Proteins innerhalb der Zelle	65
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>72</b>
4.1. Material	72
4.2. Mikrobiologische und molekularbiologische Techniken	73
4.3. Proteinbiochemische Techniken	83
4.4. Methoden im Umgang mit eukaryontischen Zellen	88
4.5. Tierhaltung	94
4.6. Histologische Techniken	94
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>107</b>

## Zusammenfassung

BRUCE (*BIR repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme*) ist ein konserviertes, 528 kDa großes, peripheres Membranprotein des *trans*-Golgi-Netzwerks und ein strukturell neuartiges Ubiquitin-Konjugationsenzym (UBC) der Maus. Zusätzlich zu der am C-Terminus befindlichen UBC-Domäne enthält BRUCE im N-terminalen Bereich ein BIR (*baculovirus inhibitor of apoptosis repeat*)-Motiv, die charakteristische Domäne aller BIRPs (*BIR-domain containing proteins*). Die meisten dieser Proteine haben anti-apoptotische Eigenschaften und werden deshalb in der IAP (*inhibitor of apoptosis proteins*)-Familie zusammengefasst. Auch BRUCE konnte *in vitro* als Inhibitor apoptotischer Prozesse beschrieben werden. Um die Funktion von BRUCE *in vivo* zu untersuchen, wurde eine *BRUCE*-defiziente Mauslinie etabliert und im Rahmen dieser Arbeit phänotypisch charakterisiert. Die vollständige Inaktivierung des *BRUCE*-Gens führte zu einer Verzögerung des embryonalen Wachstums sowie zum perinatalen Tod der *Knockout*-Organismen. *BRUCE* wird in fast allen embryonalen Geweben exprimiert, deutlich sichtbare morphologische Veränderungen in Folge seiner Deletion traten jedoch hauptsächlich im extra-embryonalen Gewebe der Plazenta auf. Nach störungsfreier Initiierung der Organogenese zeigte sich mit zunehmender Reifung der Plazenta eine Verzögerung der Ausbildung des Labyrinthsystems sowie eine deutliche Reduktion der Spongiotrophoblast-Schicht. Dieses Entwicklungsdefizit kann Ursache einer stark eingeschränkten Effizienz der Nähr- und Sauerstoffversorgung des Embryos sein und sowohl zu Wachstumsretardierung als auch zu perinataler Letalität der transgenen Organismen führen. Die morphologischen Veränderungen im Gewebe wurden nicht, wie ursprünglich angenommen, durch eine erhöhte Apoptoserate der Zellen hervorgerufen. Stattdessen konnten in den defekten plazentalen Geweben drastische Veränderungen in Proliferationsverhalten und Differenzierungsstatus der Trophoblast-Zellen beobachtet werden. Die in dieser Arbeit beschriebenen Auswirkungen des *BRUCE*-Verlusts auf den Modellorganismus zeigen einerseits die essentielle Bedeutung von *BRUCE* für die Entwicklung sowie den funktionellen Erhalt der Plazenta und damit für die gesamte Embryonalentwicklung der Maus. Andererseits geben die Ergebnisse Hinweise darauf, dass dieses ungewöhnliche Enzym möglicherweise eine überlebensnotwendige regulative Funktion der Inhibition Apoptose-induzierter oder nicht-apoptotischer Caspase-Aktivität bei Proliferations- und/oder Differenzierungsereignissen bestimmter Zelltypen besitzt.

## 1. Einleitung

*“Jedes Tier erscheint als die Summe lebender Untereinheiten, von denen jede einzelne die vollständigen Charakteristika des Lebens in sich trägt.”*

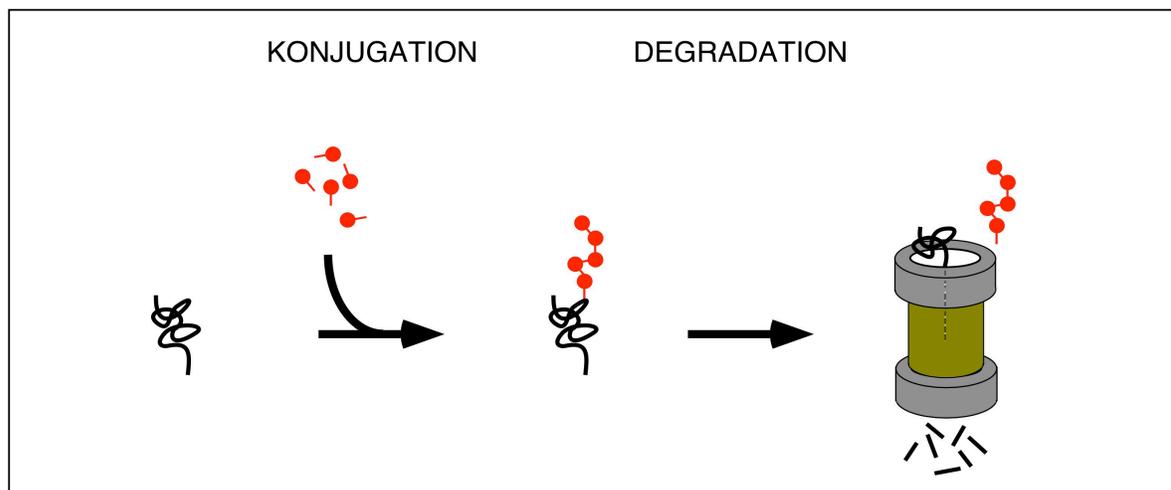
*Rudolf Virchow (1858)*

Lebende Systeme bilden Strukturen, die in engen Wechselwirkungen zueinander stehen. So bestehen Organismen aus Organen, die ihrerseits aus Geweben zusammengesetzt sind. Gewebe bestehen wiederum aus autonomen biologischen Einheiten, den Zellen, welche schließlich aus Molekülen aufgebaut sind, von denen die Proteine die vielseitigste Gruppe bilden. Die Zellen eines Organismus müssen auf Signale ihrer Umwelt in angemessener Form reagieren können. Sie müssen z. B. in der Lage sein, sich auf veränderte Umweltbedingungen einzustellen, auf Signale anderer Zellen zu reagieren oder differenzierungs- und entwicklungsbedingte intrinsische zelluläre Regulationsprogramme abzuwandeln. Solche Veränderungen setzen den schnellen Umbau komplexer Netzwerke voraus. Nicht mehr benötigte oder beschädigte Enzyme werden inaktiviert und neue Faktoren bereitgestellt. Die Aktivität von Enzymen kann z. B. durch posttranslationale Modifikationen, Interaktionen mit spezifischen Bindungspartnern oder durch die Änderung der subzellulären Lokalisierung reguliert werden. Die Regulation der Konzentration eines Proteins erfolgt über Veränderungen in Synthese- und Abbaurate, wobei die oft sehr schnellen Konzentrationsänderungen wichtiger regulatorischer Proteine nur durch ein spezifisches Signal für den selektiven Abbau und nicht durch unspezifische lysosomale Proteolyse gewährleistet werden können. In eukaryontischen Zellen kommt so dem Ubiquitin-System eine bedeutende Rolle innerhalb der posttranslationalen Modifikationssysteme zu. Neben der Hauptfunktion des Ubiquitin-Systems, dem selektiven Abbau falsch gefalteter Proteine und regulatorischer Komponenten wie z. B. Transkriptions- oder Zellzyklusfaktoren durch das Proteasom (Laney und Hochstrasser, 1999; Hershko und Ciechanover, 1998; Varshavsky, 1997), deuten sich eine Reihe weiterer Funktionen für die Modifikation von Proteinen mit Ubiquitin an, die nicht den proteasomalen Abbau des ubiquitinierten Substrates zur Folge haben (Pickart, 2001).

## 1.1. Das Ubiquitin/Proteasom-System

### 1.1.1. Komponenten des Ubiquitin/Proteasom-Systems

Während der "Ubiquitinierung" (Modifikation eines Proteins mit Ubiquitin) wird das hochkonservierte, aus 76 Aminosäuren bestehende Protein Ubiquitin kovalent mit dem Substratprotein verknüpft. Dabei erfolgt die Bildung einer Isopeptidbindung zwischen der Carboxylgruppe des carboxyterminalen Glycins des Ubiquitins und der primären  $\epsilon$ -Aminogruppe eines internen Lysinrestes des Zielproteins. Das bereits mit dem Substrat verknüpfte Ubiquitin kann selbst als Ziel für eine weitere Modifikation dienen, wobei durch wiederholte Ubiquitinierung sogenannte Ubiquitin-Ketten entstehen können. Die Ubiquitinierung ist analog zu anderen posttranslationalen Modifikationen eine reversible Reaktion, die durch Ubiquitin-Hydrolasen rückgängig gemacht werden kann (Wilkinson und Hochstrasser, 1998; Pickart, 2001; Yao und Cohen, 2002), wodurch das dekonjugierte Protein für andere Funktionen wieder zur Verfügung steht.



**Abb. 1. Schematische Darstellung des Ubiquitin/Proteasom-Systems.** Während der Konjugation werden Ubiquitin-Moleküle (rot) auf das Substrat übertragen. Die modifizierten Substrate gelangen über ihre Multiubiquitin-Kette an das 26S Proteasom, werden entfaltet, in das Innere des Proteasoms eingeschleust und zu Peptiden abgebaut. Die Ubiquitin-Kette wird entfernt und zu einzelnen Ubiquitin-Molekülen hydrolysiert.

Das Ubiquitin/Proteasom-System setzt sich aus zwei enzymatischen Reaktions-einheiten zusammen, dem Ubiquitin-Konjugationssystem und dem Proteasom (Abb. 1). Das Ubiquitin-Konjugationssystem ist für die Markierung des abzubauenen Proteins

mit Ubiquitin und damit für die Selektivität des Systems zuständig. Das 26S-Proteasom ist für den eigentlichen Abbau der Proteine in diesem System verantwortlich.

#### 1.1.1.1. Das Ubiquitin-Konjugationssystem

Ubiquitin wird in einer mehrstufigen enzymatischen Reaktion aktiviert und auf ein spezifisches Substrat übertragen (Abb. 2). Die einzelnen Enzyme dieser Kaskade werden als E1- (UBA), E2- (UBC), E3- (Ubiquitin-Ligasen) und E4-Enzyme (Multiubiquitinierungsfaktoren) bezeichnet.

##### *E1-Enzyme*

Im ersten Schritt erfolgt die Aktivierung von Ubiquitin über E1-Enzyme (Ubiquitin-Aktivierungsenzyme), d. h. hochkonservierte Proteine, die in den meisten Organismen von einem einzigen essentiellen Gen kodiert werden (McGrath et al., 1991; Scheffner et al., 1998). Dabei wird ATP-abhängig ein Ubiquitinadenylat gebildet, das unter AMP-Freisetzung auf die Thiolgruppe des konservierten Cysteinrestes im aktiven Zentrum des E1-Enzyms (unter Ausbildung einer energiereichen Thioesterbindung) übertragen wird.

##### *E2-Enzyme*

Das aktivierte Ubiquitin wird vom E1-Enzym auf Ubiquitin-Konjugationsenzyme (E2-Enzyme oder UBCs) in einer Transveresterungsreaktion übertragen, wobei ein Cystein der charakteristischen UBC-Domäne als Akzeptor dient. E2-Enzyme bilden eine große, hochkonservierte Proteinfamilie. Aufgrund ihrer unterschiedlichen N- und C-terminalen Verlängerungen der UBC-Domäne ist eine Einteilung in vier Klassen möglich (Matuschewski et al., 1996). Enzyme der Klasse I sind kleine Proteine, die wie die Mitglieder der UBC4/5-Familie im wesentlichen nur aus der UBC-Domäne bestehen. E2-Enzyme der Klasse II, wie die Proteine UBC6 und UBC3, enthalten variable C-terminale Verlängerungen, die für die Lokalisierung und die Substratspezifität notwendig sein können. Die Mitglieder der Klasse III besitzen N-terminale Verlängerungen. Diese Enzyme, sowie auch Enzyme der Klasse IV, die sowohl N- als auch C-terminale Verlängerungen besitzen, sind nur in höheren Eukaryonten bekannt (Matuschewski et

al., 1996; Scheffner et al., 1998). Die Funktionen dieser Enzyme sind vielseitig und betreffen z. B. den Abbau falsch gefalteter Proteine (UBC4/UBC5) (Seufert und Jentsch, 1990), die Zellzyklus-Kontrolle (CDC34) (Goebel et al., 1988; Krek, 1998) oder die DNA-Reparatur (RAD6/UBC13) (Jentsch et al., 1987; Hofmann und Pickart, 1999).

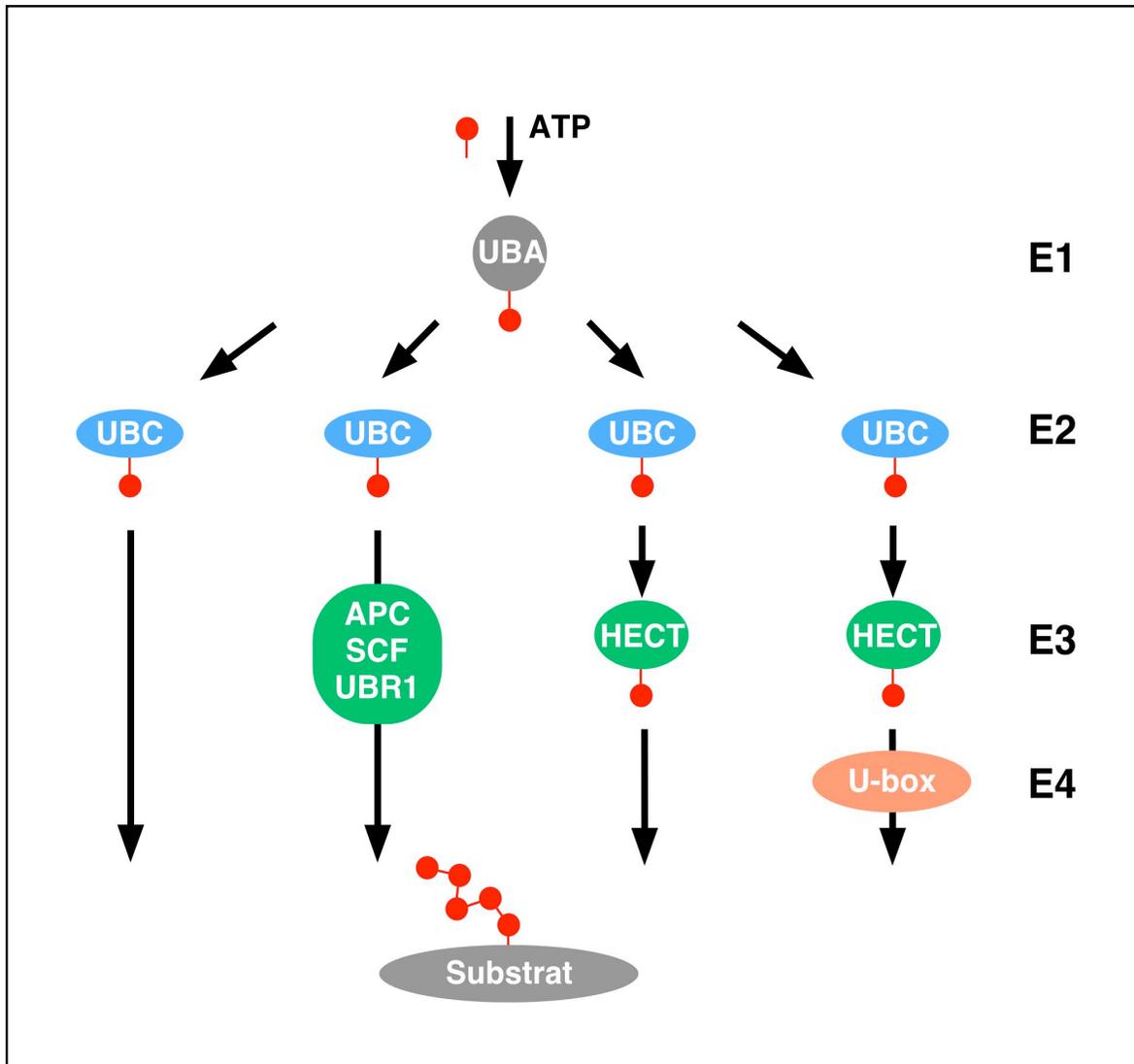
### *E3-Enzyme*

UBC-Proteine können Ubiquitin entweder direkt auf Substratproteine übertragen (Jentsch et al., 1987), oder sie benötigen für die Vermittlung spezifischer Ubiquitinierungsreaktionen zusätzliche Faktoren, die Ubiquitin-Ligasen. E3-Enzyme kommen in großer Vielzahl vor und sind aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede schwierig zu klassifizieren. Eine eindeutig abzugrenzende Klasse bilden jedoch die sogenannten HECT-Proteine. Sie besitzen eine C-terminale HECT-Domäne (*Homologous to E6-AP C-Terminus*), die ein aktives Cystein für die Thiolesterbindung mit Ubiquitin enthält (Scheffner et al., 1995). Für die Mehrheit der E3-Enzyme konnte jedoch keine Thiolesterreaktionen mit Ubiquitin nachgewiesen werden. Die Klasse umfaßt sowohl monomere Enzyme, wie z.B. UBR1 (Bartel et al., 1990), als auch Multiproteinkomplexe, wie den APC-Komplex (*anaphase promoting complex*) und den SCF-Komplex (*SKIP1/CDC53/F-box*). Kürzlich wurde gezeigt, dass die E3-Aktivität sowohl der APC- als auch der SCF-Komplexe von der Anwesenheit von Proteinen (APC11 bzw. RBX1/ROC1) mit RING (*really interesting new gene*)-Motiven abhängig ist (Tyers und Jorgensen, 2000). Auch die monomeren E3-Enzyme des UBR1-Typs besitzen ein konserviertes RING-Motiv, das für die Aktivität der Enzyme essentiell ist (Xie und Varshavsky, 2000). Zusätzlich wurde in den letzten Jahren eine Reihe von monomeren, untereinander nicht verwandten E3-Enzymen identifiziert, die ebenfalls über RING-Motive verfügen, welche für ihre E3-Aktivität essentiell sind (Freemont, 2000). Das RING-Motiv scheint somit ein charakteristisches Merkmal von E3-Enzymen zu sein, die nicht der HECT-E3-Klasse angehören.

### *E4-Proteine*

Für eine effiziente Erkennung und Degradation durch das 26S-Proteasom ist meistens die Multiubiquitinierung von Substraten eine wichtige Voraussetzung. In wenigen bisher beschriebenen Fällen wird zur Ausbildung langer Multiubiquitin-Ketten ein weiterer Faktor benötigt, ein sogenanntes E4-Enzym, das im Zusammenspiel mit den E1-, E2- und E3-Enzymen entscheidend zur Effizienz der Multiubiquitinierung beiträgt.

In *S. cerevisiae* z. B. schreibt man diese Funktion dem Protein UFD2 zu (Koegl et al., 1999), während in Säugetieren neben UFD2-Homologen auch das Protein CHIP als E4-Enzym identifiziert wurde (Imai et al., 2002). Diese Multiubiquitinierungsfaktoren besitzen am C-Terminus eine charakteristische sogenannte U-Box-Domäne (Koegl et al., 1999), die strukturell mit dem RING-Finger-Motiv verwandt (Aravind und Koonin, 2000) und für die Multiubiquitinierungs-Aktivität essentiell ist (Richly et al., 2005).



**Abb. 2. Schematische Darstellung des Ubiquitin-Konjugationssystems.** Ubiquitin wird über eine Thiolesterkaskade von Ubiquitin-Aktivierungsenzymen (E1) auf Ubiquitin-Konjugationsenzyme (E2) übertragen. Der Transfer des Ubiquitins auf eine Lysinreste des Substrats erfolgt meistens über Ubiquitin-Ligasen (E3), welche die Erkennung der Zielproteine vermitteln. Einige dieser E3s gehen selbst eine transiente Thiolesterbindung mit Ubiquitin ein (HECT-E3s). In einigen Fällen sind E4-Faktoren für die effiziente Multiubiquitinierung des Substrats notwendig.

### 1.1.1.2. Das 26S-Proteasom

Multiubiquitinierte Substrate können über das 26S-Proteasom erkannt und in einer ATP-verbrauchenden Reaktion durch diesen multikatalytischen Proteasekomplex zu kurzen Peptiden abgebaut werden (Lam et al., 2002; Pickart, 1997). Das Proteasom befindet sich sowohl im Cytosol als auch im Zellkern (Enekel et al., 1999; Russell et al., 1999) und setzt sich zusammen aus einem proteolytisch aktiven Komplex, dem 20S-Zylinder, sowie einem regulatorischen Komplex, dem 19S-Aufsatz, der sich auf einer oder auf beiden Seiten des Zylinders befinden kann. Unter den Komponenten des Aufsatzes befinden sich Rezeptoren für die Erkennung von Multiubiquitin-Ketten (van Nocker et al., 1996) sowie AAA-Typ ATPasen (Patel und Latterich, 1998) und Rpn (*regulatory particle non-ATPase*)-Untereinheiten (Yen et al., 2003; Pickart und Cohen, 2004), die vermutlich die Entfaltung nativer Proteine und deren Einschleusung in den 20S-Zylinder regulieren (Braun et al., 1999). Außerdem wurden Isopeptidasen identifiziert, die in Assoziation mit dem Aufsatz des 26S-Proteasoms die Abspaltung der Multiubiquitin-Ketten von den Substraten katalysieren (Wilkinson und Hochstrasser, 1998).

### 1.1.2. Funktionen des Ubiquitin/Proteasom-Systems

Eine zentrale Funktion des Ubiquitin/Proteasom-Systems ist der proteasomale Proteinabbau. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Eliminierung falsch gefalteter Proteine, die bereits unter normalen Wachstumsbedingungen in der Zelle entstehen, in Stress-Situationen, wie z. B. Hitze-, Ethanol oder Schwermetalleinwirkung, jedoch akkumulieren und ab einer bestimmten Konzentration das Überleben der Zelle gefährden können (Seufert und Jentsch, 1990; Jungmann et al., 1993). Interessanterweise ist das Ubiquitin/Proteasom-System ebenfalls am Abbau korrekter und falsch gefalteter Membranproteine, wie z. B. dem Ionenkanal CTFR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), sowie luminaler Proteine des Endoplasmatischen Retikulums (ER) beteiligt (Hiller et al., 1996; Travers et al., 2000). Neben dem Abbau falsch gefalteter Proteine kontrolliert das Ubiquitin/Proteasom-System die Halbwertszeit bestimmter regulatorischer Proteine wie z. B. die der Cycline und Cdk (*cyclin-dependent kinase*)-Inhibitoren. Somit ist es maßgeblich an der Regulation des eukaryontischen Zellzyklus beteiligt. Viele Transkriptionsfaktoren

werden ebenfalls in ihrer Aktivität durch Ubiquitin/Proteasom-vermittelte Proteolyse reguliert. Prominente Beispiele sind der Tumorsuppressor p53 (Fang et al., 2000) oder die Protoonkogen-Proteine c-Jun, E2F1, c-Myc und c-Fos.

Ein interessantes Phänomen ist die proteasomale Prozessierung von Proteinen. Erstmals wurde dieser Prozess für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, einem Transkriptionsfaktor mit zentraler Rolle in Entwicklungs- und Entzündungsvorgängen, beschrieben (Fan und Maniatis, 1991; Palombella et al., 1994). In diesem Fall führt die Ubiquitinierung des NF- $\kappa$ B-Vorläufers p105 nicht zur Degradation sondern zur Umwandlung des Vorläufers in seine p50-Form durch limitierte Proteolyse. Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors SPT23 in *S. cerevisiae* beobachtet (Rape et al., 2001).

Nicht immer bewirkt die Ubiquitinierung eines Proteins dessen Abbau über das 26S-Proteasom. Das bekannteste Beispiel für eine nichtproteasomale Funktion des Ubiquitin-Systems ist die Rezeptor-vermittelte Endocytose. So wird z. B. der membranständige  $\alpha$ -Faktor-bindende STE2-Rezeptor als Folge der Ligandenbindung ubiquitiniert. Diese Ubiquitinierung führt zur Endocytose des Rezeptors und schließlich zum lysosomalen Abbau in der Vakuole und nicht durch das 26S-Proteasom (Hicke und Riezmann, 1996; Hicke, 1999).

Eine essentielle Funktion kommt der speziellen Multiubiquitinierung von Proteinen während der DNA-Reparatur zu. Nach DNA-Schädigung wird der Polymerase-Kooperativitätsfaktor PCNA im Zellkern reguliert ubiquitiniert, was für die Rekrutierung spezieller Polymerasen verantwortlich sein könnte (Ulrich und Jentsch, 2000; Höge et al., 2002).

Das Ubiquitin/Proteasom-System hat durch seine zentrale Funktion in der intrazellulären Proteolyse eukaryontischer Zellen einen wichtigen Einfluss auf die verschiedensten zellulären Vorgänge. In den vergangenen Jahren wurden immer neue Substrate und Komponenten des Ubiquitin-Systems indentifiziert, darunter auch wichtige Regulatoren des programmierten Zelltods wie Proteine der Bcl-2-Familie (*B-cell lymphoma-2 family*), IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*) oder Regulatoren der IKK (*inhibitor of NF (nuclear factor)- $\kappa$ B kinase*).

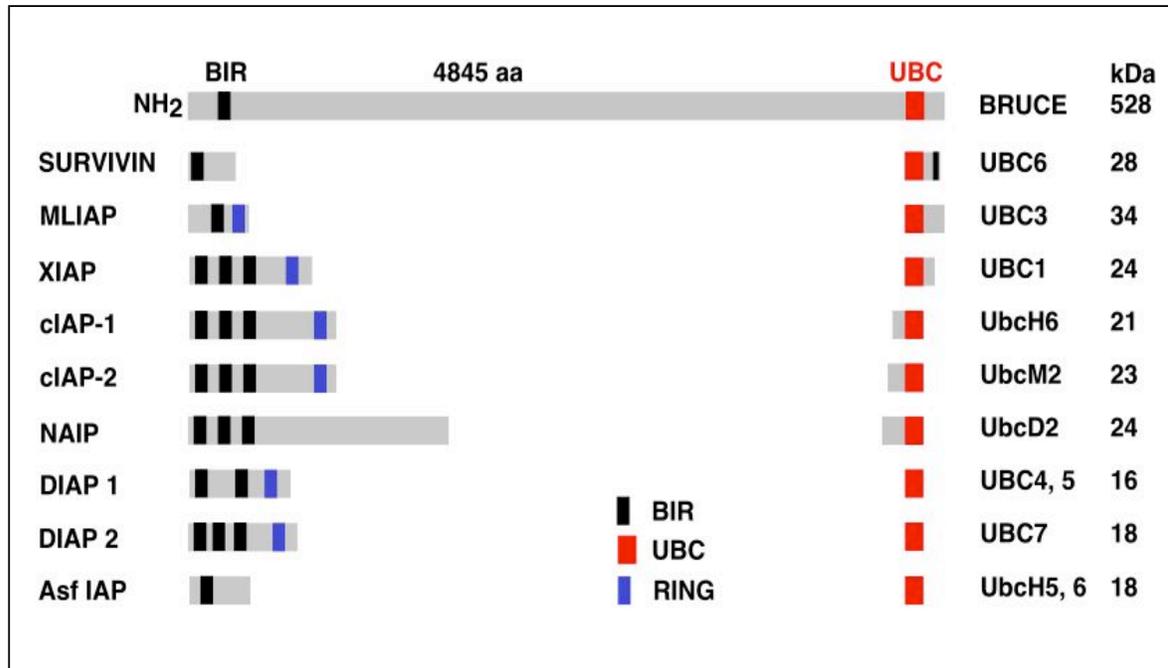
## 1.2. BRUCE – Ein neuartiges Ubiquitin-Konjugationsenzym

### 1.2.1. BRUCE – Gen und Protein

Die cDNA von *BRUCE* (*BIR-repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme*) wurde in einer auf der PCR-Methode basierenden Suche nach UBC-kodierenden Genen identifiziert und über cDNA-walking kloniert (Hauser et al., 1998). Das *BRUCE*-Gen der Maus befindet sich auf dem Chromosom 17 in Telomernähe, umfasst eine cDNA von ca. 176 kb und besteht aus insgesamt 73 Exons. Die 15,5 kb lange mRNA des Gens kodiert für ein 528 kDa großes Protein, das in vielen Organen und Geweben der adulten Maus in seiner vollen Länge exprimiert wird. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern und durch Zellfraktionierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass es sich bei BRUCE um ein peripheres Membranprotein handelt, das auf der cytosolischen Seite von Endomembransystemen wie dem *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) lokalisiert ist (Hauser et al., 1998). Es konnte ebenfalls in Verbindung mit vorwiegend leichten Vesikeln dieses Netzwerkes nachgewiesen werden. Eine besonders starke Expression ist in neuronalen Geweben zu beobachten. Dabei ist das Protein sowohl in den axonalen als auch in den dendritischen Ausläufern der Neurone zu finden.

### 1.2.2. Die E2-Komponente in BRUCE

BRUCE ist ein strukturell neuartiges Ubiquitin-Konjugationsenzym (UBC) der Maus (Hauser et al., 1998). Die für die E2-Enzyme des Ubiquitin/Proteasom-Systems charakteristische UBC-Domäne von BRUCE befindet sich nahe dem C-terminalen Ende des Proteins und umfasst die Aminosäurereste 4601 – 4671 (Abb. 3). Diese Domäne ist zu 37 % identisch mit der anderer UBC-Proteine und vollständig funktional. In Gegenwart von einem E1-Enzym wird Ubiquitin unter Ausbildung eines Thioesters auf das Cystein 4654 der UBC-Domäne von BRUCE übertragen. Ohne Zuhilfenahme weiterer E2- oder E3-Enzyme kann BRUCE die Ubiquitinierung spezifischer Substratproteine (siehe Abschnitt 1.5.) katalysieren. Dieses ungewöhnliche Enzym vereint somit sowohl E2- als auch E3-Aktivität in einem großen Molekül und fungiert als chimärische E2/E3-Ubiquitin-Ligase (Bartke et al., 2004; Hao et al., 2004).



**Abb. 3. Schematische Darstellung von BRUCE.** Gezeigt wird BRUCE, das aufgrund seiner beiden charakteristischen Domänen zwei unterschiedlichen Proteinfamilien zugeordnet werden kann. Maßstabgerechter Vergleich von BRUCE mit Ubiquitin-Konjugationsenzymen der Klasse I (UBC4,5, UBC7 und UbcH5,6), der Klasse II (UBC6, UBC3 und UBC1) und der Klasse III (UbcH6, UbcM2 und UbcD2). BRUCE im Vergleich zu Proteinen der IAP-Familie aus Säugern [Survivin, MLIAP (*LIVIN*), XIAP (*X-linked IAP*), cIAP-1 und cIAP-2 (*cellular IAP 1,2*), NAIP (*neuronal apoptosis inhibitor protein*)], aus *Drosophila* (DIAP 1 und DIAP 2) und aus Viren [Asf IAP (*african swine fever virus IAP*)].

### 1.2.3. Die IAP-Komponente in BRUCE

Zusätzlich zu der C-terminalen UBC-Domäne besitzt BRUCE eine BIR-Domäne (*baculoviral inhibitor of apoptosis repeat*) an seinem N-Terminus. Die BIR-Domäne wurde erstmals als Apoptose-inhibitorisches Element im Genom von Baculoviren identifiziert (Crook et al., 1993). Später fand man Proteine mit BIR-Domänen ebenfalls in Hefen, Fadenwürmern, Fliegen und in allen höheren Vertebraten. Die meisten dieser Proteine haben anti-apoptotische Eigenschaften und werden deshalb in der IAP-Familie (*inhibitor of apoptosis proteins*) zusammengefasst (Salvesen und Duckett, 2002; Deveraux und Reed, 1999). Die BIR-Domäne setzt sich aus ca. 80 Aminosäuren mit einer für Zink-bindende Bereiche charakteristischen Folge von konservierten Cystein- und Histidinresten zusammen (Hinds et al., 1999). Die derzeit bekannten IAPs weisen bis zu drei Kopien dieser Domäne auf (Deveraux und Reed, 1999) und können

zusätzlich C-terminale RING-Finger (Zink-bindende Domänen mit E3 Ubiquitin-Ligase-Aktivität) und/oder CARDs (*caspase recruitment domains*) enthalten, die wichtige Bestandteile für die Funktion der Proteine als Apoptoseinhibitoren darstellen (Abb. 3).

### **1.3. IAPs – Inhibitoren des programmierten Zelltods**

#### **1.3.1. Der programmierte Zelltod**

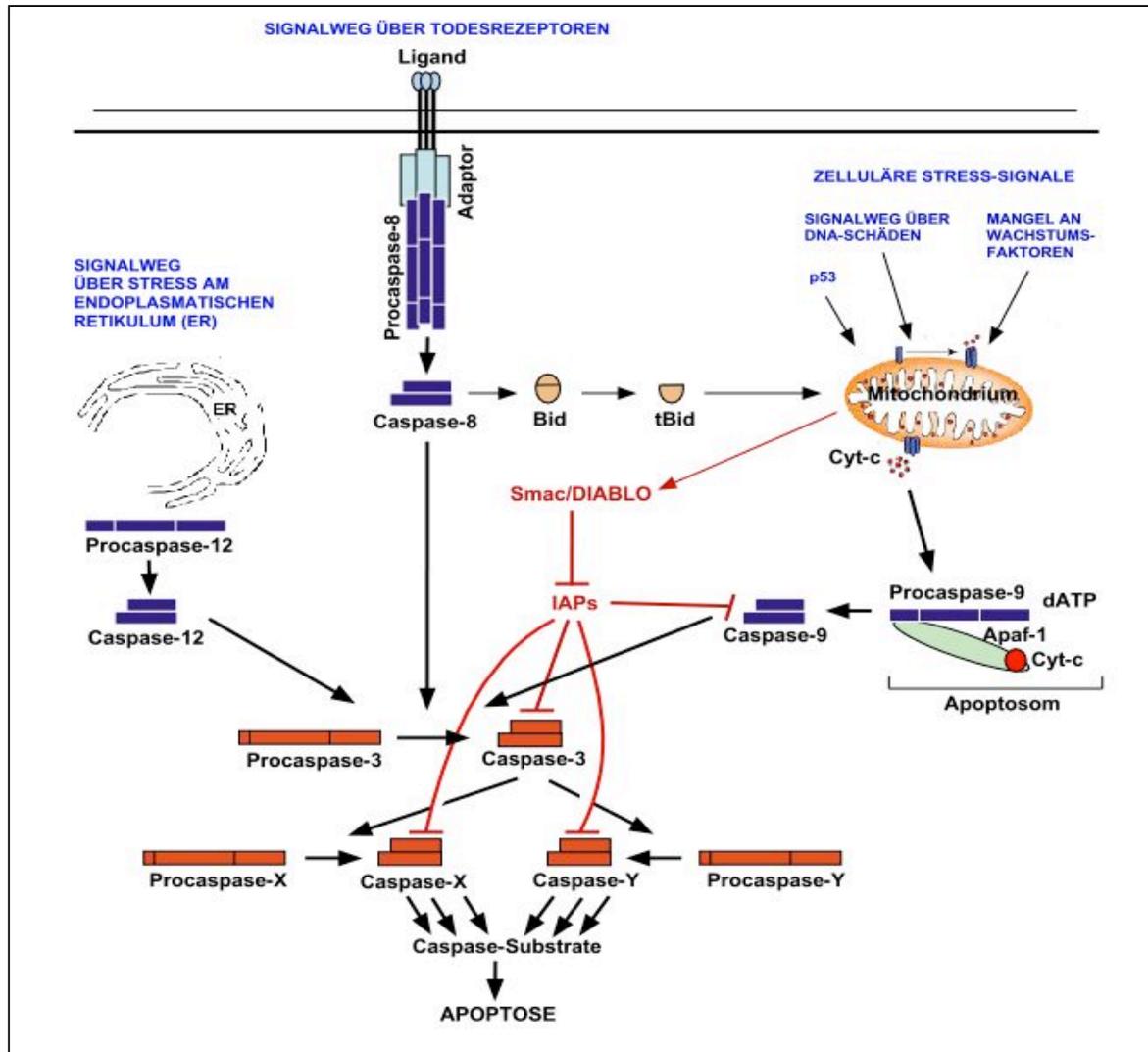
Der programmierte Zelltod ist ein physiologischer Vorgang, der von zentraler Bedeutung für die Entwicklung und die Aufrechterhaltung von multizellulären Organismen ist (Vaux und Korsmeyer, 1999). Er wird durch einen Prozess vermittelt, der als Apoptose bekannt ist. Im Verlauf der Entwicklung eines Organismus hat man das Absterben bestimmter Zellen zu einem definierten Zeitpunkt beobachtet. Durch wiederholte Zellteilung bildet sich während der Embryonalentwicklung vorübergehend ein Überschuss an Zellen, der durch programmierten Zelltod entfernt wird. So entstehen beispielsweise bei der Bildung des Nervensystems der Vertebraten zu viele Neuronen und Oligodendrozyten. Bis zur Hälfte der ursprünglich vorhandenen Neuronen sterben je nach Vernetzungsgrad und Anzahl der zu innervierenden Zielzellen (Barde, 1989; Oppenheim, 1991), und viele der Oligodendrozyten werden je nach Anzahl der zu myelinisierenden Axone entfernt (Barres et al., 1992). In diesem Zusammenhang wurde für sympathische Neuronen gezeigt, daß sie ohne die Freisetzung des Wachstumsfaktors NGF (*nerve growth factor*) durch ihre Zielzelle Apoptose einleiten. Zusätzlich spielt der programmierte Zelltod auch bei der Qualitätskontrolle während der Entwicklung eine Rolle, wobei von der Norm abweichende, falsch lokalisierte oder für den Organismus potentiell gefährliche Zellen zu entfernen sind. Um die gebildeten Gewebe im Organismus aufrechtzuerhalten (Homöostase), müssen außerdem gealterte bzw. geschädigte Zellen durch programmierten Zelltod entfernt und durch neu gebildete Zellen ersetzt werden.

Der Prozess der Apoptose ist durch spezifische morphologische Veränderungen der Zellen gekennzeichnet. Hierzu gehören die Kondensation und Aggregation von Chromatin, der Abbau der Kernlamina, die Clusterbildung von Kernporen, die Aggregation von Cytoskelettfilamenten, die Fusion des Endoplasmatischen Retikulums mit der Plasmamembran (*membrane blebbing*), die Abrundung der Zelle und das Lösen

von Zell-Zell-Kontakten, die Zellschrumpfung sowie die Abschnürung von apoptotischen Vesikeln, die von benachbarten Zellen oder Makrophagen erkannt und phagozytiert werden. Davon abzugrenzen ist die Nekrose, die zu einer Lyse der Zellen, der Freisetzung ihrer Inhaltsstoffe und damit sekundär zu entzündlichen Reaktionen im Gewebe führt. Der Vorgang der Apoptose kann durch eine Vielzahl unterschiedlicher Stimuli eingeleitet werden (Abb. 4). Einerseits können extrazelluläre Signale Oberflächenrezeptoren, sogenannte Todesrezeptoren wie den TNF-Rezeptor I oder den Fas/CD95-Rezeptor (Ashkenazi und Dixit, 1999), auf Zellen aktivieren und Apoptose auslösen. Andererseits ist es auch möglich, dass zelluläre Ereignisse (z. B. virale Infektionen, DNA-Schäden oder oxidativer Stress) Apoptose stimulieren, wobei dann meist zelluläre Kompartimente wie die Mitochondrien (Shi, 2001) oder das Endoplasmatische Retikulum (Oyadomari et al., 2002) eine übergeordnete regulatorische Rolle spielen (Abb. 4). Alle Wege münden schließlich in einen gemeinsamen Signaltransduktionsweg, dessen zentrale Komponente die Aktivierungskaskade der Caspasen darstellt.

### **1.3.2. Caspasen – Proteasen des programmierten Zelltods**

Caspasen bilden eine große Familie von evolutiv konservierten Cystein-Proteasen. Sie werden als inaktive Vorläufer hergestellt und erst nach Induktion der Apoptose durch proteolytische Spaltung in ihre aktive Form überführt. Die Caspasen lassen sich je nach Art ihrer Aktivierung in Initiator- und Effektor-Caspasen einteilen (Abb. 4). Sogenannte Initiator-Caspasen werden durch die Bindung von Apoptose-induzierenden Faktoren aktiviert [Caspase-8 und -10 über Todesrezeptoren (Sprick et al., 2002), Caspase-4 (Kamada et al., 1997) und Caspase-9 über den mitochondrialen Signalweg] und katalysieren ihre eigene Prozessierung zu den aktiven Caspasen. Die aktivierten Initiator-Caspasen sind in der Lage, die Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7) proteolytisch zu prozessieren und somit das Apoptosesignal weiterzuleiten. Diese aktivierten Effektor-Caspasen spalten weitere Caspasen im Rahmen einer proteolytischen Kaskade und amplifizieren somit das Apoptosesignal. Die Konsequenz der Caspase-Aktivierung ist die Spaltung einer Vielzahl von zellulären Proteinen sowie



**Abb. 4. Signalwege während der Apoptose.** Die apoptotische Signalkaskade kann in mehrere Routen unterteilt werden. Ein hier dargestellter Weg führt über zelluläre Stress-Signale wie DNA-Schädigung oder Mangel an Wachstumsfaktoren und die Wirkung pro-apoptischer Proteine der Bcl-2-Familie (*B-cell lymphoma-2 family*) wie Bid, Bik, Bim, Bad, Bax, Bad und Noxa zur Permeabilisierung des Mitochondriums durch Bax-Oligomerisierung und damit zur Freisetzung von Cytochrom c (Cyt-c) und kleinen regulatorischen Proteinen (z. B. Smac/DIABLO) aus dem Mitochondrium. Von den freigesetzten Faktoren assembliert Cytochrom c mit Caspase-9, Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) und dATP/ATP zum Apoptosom, was letztlich zur Aktivierung der Caspase führt. Smac (*second mitochondria-derived activator of caspase*)/DIABLO hat durch die Bindung und Inaktivierung von IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*), die ihrerseits in der Lage sind, eine Vielzahl von Caspasen zu inhibieren, eine pro-apoptische Wirkung. Vereinfacht dargestellt sind außerdem der Signalweg über die Aktivierung und Oligomerisierung von Todesrezeptoren wie z. B. Fas/CD95, die über Adaptermoleküle wie z. B. FADD (*Fas-associating death domain*) Procaspase-8 binden und aktivieren, sowie der Weg über Stress-Signale des Endoplasmatischen Retikulum (ER), der zu einer Aktivierung der Caspase-12 führt. Alle Signalwege haben die Aktivierung von Initiator-Caspasen (Caspase-9, -8 und -12) zur Folge, die wiederum Effektor-Caspasen wie die Caspasen 3 aktivieren, die ihrerseits ein proteolytisches Netzwerk aus amplifizierenden Rückkopplungen und Autoprozessierungen starten können. Obwohl die einzelnen Wege unter den meisten Bedingungen völlig unabhängig voneinander arbeiten, kann es doch zu Überschneidungen einzelner Schritte der Signalkaskaden kommen. So kann z. B. nach Aktivierung von Todesrezeptoren das zur Bcl-2-Familie gehörende Protein Bid durch Caspase-8 gespalten werden, wodurch Apoptose über den mitochondrialen Signalweg stimuliert wird.

die daraus resultierenden typischen morphologischen und funktionellen Veränderungen in der apoptotischen Zelle. Derzeit sind mehr als 130 Substratproteine für Caspasen bekannt. Unter ihnen befinden sich Adhäsionsmoleküle und Komponenten des Cytoskeletts, Proteine der Signaltransduktion, der DNA-Reparatur und Enzyme des basalen zellulären Stoffwechsels.

### 1.3.3. IAPs als Regulatoren der Caspase-Aktivität

Die Aktivität der Caspasen in der Zelle unterliegt erwartungsgemäß einer sehr strengen Kontrolle, bei der die Proteine der IAP-Familie eine zentrale Rolle spielen. Die anti-apoptotische Wirkung der IAPs wird in erster Linie durch eine direkte Bindung und Inhibition von Caspasen vermittelt. Für diesen Prozess sind die N-terminalen BIR-Domänen der Proteine essentiell. Die Bindung von IAPs an Caspasen ist scheinbar ein selektiver Vorgang. So binden und inhibieren z. B. die Proteine XIAP, cIAP-1 und cIAP-2 spezifisch die Caspasen -3, -7 und -9, nicht aber die Caspasen -1, -6, -8 und -10 (Deveraux und Reed, 1999).

Neben XIAP inhibieren auch Survivin und NAIP die Caspasen -3 und -7 direkt. Durch röntgenkristallographische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass IAPs sowohl mit großer Affinität an die aktiven Formen der Caspasen binden und somit zum sterischen Ausschluß der Interaktion mit Caspase-Substraten führen (Riedl et al., 2001; Huang et al., 2001; Chai et al., 2001), als auch mit inaktiven Vorläufern von Initiator-Caspasen interagieren, wodurch die autokatalytische Aktivierung des Enzyms verhindert wird. Damit gewährleisten die IAPs einen Schutz vor Apoptose. Neben der Inaktivierung der Caspasen durch die Bindung von IAPs scheint auch der proteasomale Abbau der Caspasen über den Mechanismus der Ubiquitinierung durch IAPs reguliert zu werden. So konnten *in vitro* die Monoubiquitinierung der Caspasen -3 und -7 durch cIAP-2 (Huang et al., 2000) sowie die Ubiquitinierung von Caspase-3 durch XIAP (Suzuki et al., 2001) nachgewiesen werden, beides in Abhängigkeit der Ubiquitin-Ligase-Aktivität der C-terminalen RING-Domäne der IAPs.

Die Aktivität der IAPs selbst unterliegt ebenfalls strengen Regulationsmechanismen. So haben IAPs mit RING-Domänen eine sehr kurze Halbwertszeit. Das ist auf eine aktive Autoubiquitinierung der Proteine zurückzuführen (Yang et al., 2000). Des Weiteren stellen die Proteine der IAP-Familie selbst Substrate für die Prozessierung durch

Caspasen dar. Die durch die Spaltung entstehenden Fragmente sind entweder weiterhin anti-apoptotisch wirksam, wie z. B. die prozessierten Fragmente von XIAP (Deveraux et al., 1999), funktionell inaktiv oder sogar pro-apoptotisch wirksam, wie das entstehende C-terminale Fragment von cIAP-1 (Clem et al., 2000). Eine weitere Regulationsmöglichkeit für IAPs wurde mit der Identifizierung von IAP-bindenden Proteinen entdeckt. In Säugern fand man bisher Smac (*second mitochondria-derived activator of caspase*)/DIABLO, XAF-1, HtrA2 und in *Drosophila* Hid, Reaper (Rpr), Grim, Sickle und Morgue als Regulatoren. Smac/DIABLO enthält, ähnlich wie HtrA2, eine mitochondriale Signalsequenz, die nach Import in das Mitochondrium durch die mitochondriale Signalpeptidase prozessiert wird. Nach Einleitung der Apoptose und der Permeabilisierung des Mitochondriums wird Smac/DIABLO aus dem Mitochondrium freigesetzt und ist dann als Aktivator von Caspasen wirksam. Diese Wirkung beruht auf der hochaffinen Bindung von Smac an IAPs. Die zuvor durch die IAPs gebundenen und inaktivierten Caspasen werden durch die Bindung von Smac verdrängt und erneut aktiviert (Salvesen und Duckett, 2002).

#### 1.3.4. Weitere Funktionen der IAPs

Wie sich in letzter Zeit herausstellte, gibt es innerhalb der Familie der IAPs eine Gruppe von Proteinen, die sich sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrer Funktion etwas von den klassischen IAPs unterscheiden. Sie werden nach dem zuerst entdeckten Vertreter dieser Gruppe Survivin-ähnliche BIRPs (*BIR-domain containing proteins*) genannt. Die Gruppe besteht aus sehr verschiedenen Proteinen, die nur die BIR-Domäne gemeinsam haben. BRUCE und seine Homologen enthalten zusätzlich zum BIR-Motiv noch eine UBC-Domäne. Die BIR-Domäne dieser Proteine kann etwas größer sein (bis zu über 100 Aminosäuren) als die der klassischen IAPs. Vertreter dieser Gruppe finden sich bei Säugetieren (BRUCE, Survivin), *C. elegans* (BIR-1, BIR-2), Hefen (Spbir1P) und *Drosophila* (dBRUCE, Deterin). Neben der Fähigkeit, Apoptose zu inhibieren, die auch den Survivin-ähnlichen BIRPs zum Teil zu eigen ist, liegt deren Hauptaufgabe in der Regulation des Zellzyklus. Einige dieser Proteine, so auch Survivin selbst, werden zellzyklusabhängig exprimiert und erfüllen wichtige Aufgaben während der Mitose, insbesondere bei der Organisation der Mikrotubuli, der Cytokinese und der

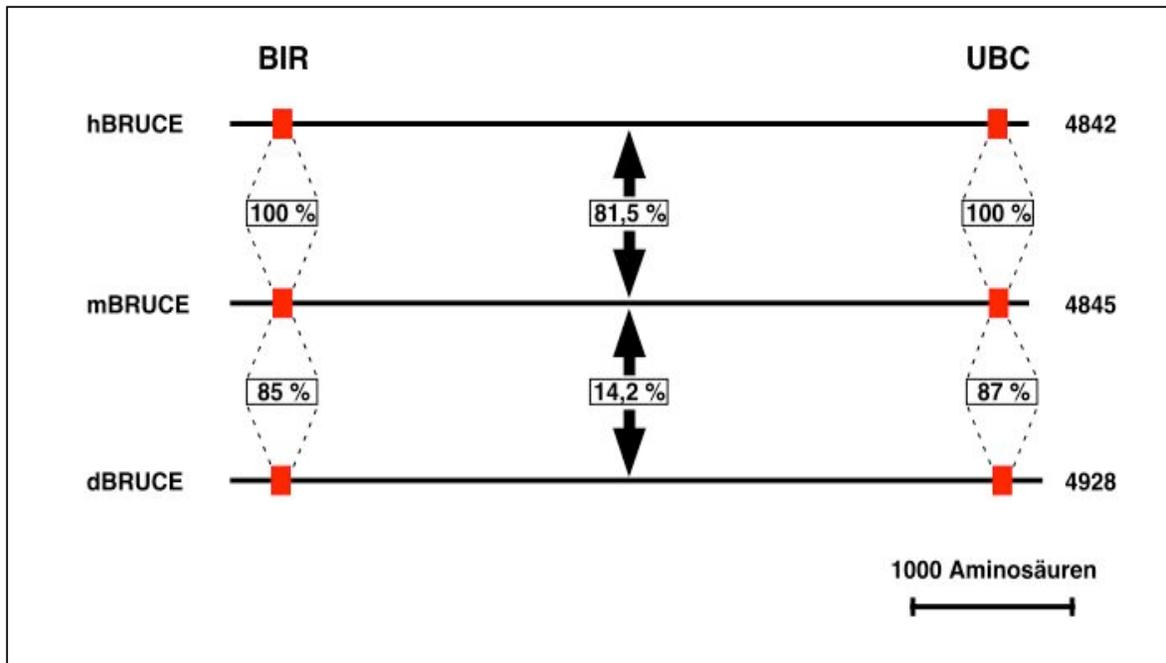
Lokalisierung von Kinasen der Aurora-Familie an den Centromeren und Spindelkörpern (Salvesen und Duckett, 2002).

#### 1.4. BRUCE und seine Homologen

Erste Hinweise für die Existenz des *BRUCE*-Gens in weiteren Genomen von Säugetieren wurden durch eine Vielzahl von Klonen mit *BRUCE*-ähnlichen Sequenzen aus öffentlichen Datenbanken gegeben. Eine Bestätigung für die Existenz eines humanen *BRUCE*-Gens erhielt man durch die Hybridisierungen von humanen genomischen  $\lambda$ -Bibliotheken mit Fragmenten aus der *BRUCE*-cDNA der Maus (Bardroff, 1997). In *Northern blots* konnte ein Transkript nachgewiesen werden, welches mit einer Größe von etwa 15 kb der *BRUCE*-mRNA der Maus entspricht. Durch *in situ*-Hybridisierung auf menschlichen Metaphase-Chromosomen wurde das Gen auf der Bande 22 des kurzen Arms des Chromosoms 2 (2p22) kartiert. Dort deckt das humane *BRUCE*-Gen einen genomischen Bereich von ca. 260 kb ab (Bardroff, 1997).

92 % der insgesamt 4830 Aminosäuren des Proteins sind identisch mit dem Maus-Protein. In der BIR- und der UBC-Domäne beträgt die Übereinstimmung sogar 100 % (Abb. 5). Ebenso wie *BRUCE* wird das humane Protein, auch Apollon genannt (Chen et al., 1999), in fast allen adulten Geweben exprimiert. Immunfluoreszenzanalysen zeigten eine dem *BRUCE* der Maus ähnliche Lokalisierung des Proteins am TGN und an Vesikeln.

Mit der Beendigung des *Drosophila melanogaster*-Sequenzierungsprojektes wurde auf dem Chromosom 3R der Fliege ein weiteres Gen identifiziert, das eine sehr starke Ähnlichkeit zum *BRUCE*-Gen der Maus aufweist (Adams et al., 2000). Das *Drosophila*-Protein d*BRUCE* ist mit 4928 Aminosäuren etwas größer als die Proteine der Säuger und besitzt ebenfalls die charakteristische BIR-Domäne am N-Terminus und eine UBC-Domäne am C-Terminus. Obwohl die Sequenzidentität der beiden Proteine nicht besonders hoch ist, zeigen die BIR- und die UBC-Domänen des *Drosophila*-Proteins über 85 % Sequenzübereinstimmung mit den entsprechenden Domänen der Säugerproteine.



**Abb. 5. Vergleich der BRUCE-Proteine.** Gezeigt ist hier der Homologievergleich der BRUCE-Proteine aus Mensch (hBRUCE), Maus (mBRUCE) und *Drosophila* (dBRUCE). Die Zahlen in den Kästchen geben die Sequenzidentitäten der entsprechenden Regionen an. Die Größe der Proteine ist als Anzahl der Aminosäuren angegeben. Mit Ausnahme der BIR- und der UBC-Domäne zeigt das *Drosophila*-Protein keine weiteren Bereiche mit auffällig hoher Ähnlichkeit zu BRUCE.

*In silico* wurden noch weitere BRUCE-Homologe vorhergesagt, so z. B. im Zebrafisch (*Danio rerio*) oder in der Ratte (*Rattus norvegicus*, auf Chromosom 6). In allen Fällen handelt es sich um Proteine mit einer Größe von 400 bis 500 kDa. Jedoch sind bei ihnen z. T. nur die BIR- oder die UBC-Domäne vorhanden (Hitz, 2003).

### 1.5. Die Funktion des BRUCE/Apollon-Proteins

Zwei IAPs/BIRPs, die wie BRUCE vor allem im Gehirn exprimiert werden und bei entwicklungsphysiologischen Vorgängen eine bedeutende Rolle zu spielen scheinen, sind NAIP und Survivin. NAIP bewirkt eine direkte Inhibition von Caspase-3 und -7 (Maier et al., 2002) und unterbindet bei Überexpression das Auswachsen der Neurone (Gotz et al., 2000). Mäuse, die keine intakte Kopie des *survivin*-Gens in ihrem Genom enthalten, zeigen eine frühe embryonale Letalität, wobei dieser Effekt scheinbar

hauptsächlich auf die Dysregulation der Spindelausbildung zurückzuführen ist (Uren et al., 2000). Wie Survivin wird auch BRUCE in einer Reihe von Tumoren und Krebszell-Linien übermäßig stark exprimiert (Altieri, 2003; Chen et al., 1999). BRUCE könnte insbesondere eine wichtige Rolle während der Kanzerogenese von unterschiedlichen Gliomen und Ovarialcarcinomen sowie bei der Entwicklung von Resistenzen gegen bestimmte Chemotherapeutika zukommen. So sind z. B. die Zellen der Linie SNB-78, die ein besonders hohes Expressionsniveau von BRUCE zeigen, gegen zahlreiche Chemotherapeutika resistent. In Experimenten mit *antisense*-Oligonukleotiden gegen BRUCE konnte in diesen Zellen die BRUCE-Expression signifikant reduziert werden. Dies führte zu einer erhöhten Sensibilität der Zellen gegenüber Cisplatin und Camptothecin (Chen et al., 1999). Desweiteren scheinen der Ubiquitin/Proteasom-vermittelte Abbau von BRUCE sowie die negative Regulation seiner Expression durch RNA-Interferenz apoptotische Vorgänge in der Zelle zu verstärken (Qiu et al., 2004).

Weitere Hinweise für eine anti-apoptotische Funktion von BRUCE ergaben sich aus einer Suche nach Suppressoren des Rpr/Hid/Grim-assoziierten Zelltods in *Drosophila* (Vernooy et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass dBRUCE die durch Rpr und Grim induzierte Caspase-abhängige Apoptose, nicht jedoch den über Hid induzierten Weg der Apoptose, inhibieren kann. Für diese Funktion scheint auch die UBC-Domäne von dBRUCE essentiell zu sein. Homozygote Mutanten der Fruchtfliege, welche die Funktion von dBRUCE komplett verloren haben, sind lebensfähig, die Männchen haben jedoch ihre Fähigkeit zur Fortpflanzung verloren. Die Spermatiden dieser Fliegen zeigen Defekte während ihrer terminalen Differenzierung. Die morphologische und strukturelle Reorganisation der Zellen während der Differenzierung setzt regulierte Apoptose-ähnliche Vorgänge voraus, die eine sequenzielle Aktivierung von Caspasen mit einschließen. In den Spermatiden der Mutanten scheint die Inhibition der aktivierten Caspasen nicht mehr möglich zu sein. Sie haben aufgrund erhöhter Caspase-Aktivität hyperkondensierte und degeneriert Zellkerne (Arama et al., 2003).

Neueste Studien belegen die vermutete Apoptose-inhibitorische Funktion von BRUCE *in vitro* und bieten interessante Einblicke in den Wirkmechanismus des Enzyms. Die BIR-Domäne des Proteins ist essentiell für seine anti-apoptotische Funktion. Durch sie wird die Bindung und Inhibition aktivierter Caspasen, insbesondere aktivierter Caspase-3 (Bartke et al., 2004) und Caspase-9 (Hao et al., 2004), vermittelt. Wird in Zellen Apoptose induziert, erfolgt neben dem Abbau von BRUCE/Apollon über das Proteasom (Qiu et al., 2004) eine Blockierung seiner IAP-Aktivität einerseits durch

Caspase- und HtrA2-vermittelte Spaltung sowie andererseits durch die Bindung von Smac an die BIR-Domäne des Proteins. Auch die UBC-Domäne von BRUCE/Apollon trägt entscheidend zu seiner anti-apoptischen Funktion bei. Als Substrate für die ungewöhnliche E2/E3-Aktivität dieses Enzyms wurden bislang Smac und Caspase-9 identifiziert (Bartke et al., 2004; Hao et al., 2004). Während für Smac noch nicht eindeutig geklärt ist, ob eine Monoubiquitinierung regulatorischer Natur vorliegt oder eine Multiubiquitinierung des pro-apoptischen Proteins seinen Abbau vermittelt, scheint die BRUCE/Apollon-abhängige Ubiquitinierung der Caspase ihren proteasomalen Abbau zur Folge zu haben.

Zusammengenommen weisen diese Daten eindeutig darauf hin, daß BRUCE in der lebenden Zelle unter bestimmten Bedingungen als Inhibitor apoptotischer Prozesse wirksam wird. Die Identität dieser Prozesse bleibt weiterhin spekulativ. Offen bleibt ebenfalls die Frage nach der funktionellen Bedeutung der spezifischen Lokalisierung von BRUCE am *trans*-Golgi-Netzwerk, dem *Sorting*-Kompartiment der Zelle.

## 1.6. Zielsetzung der Arbeit

Mit BRUCE wurde ein neuartiges Protein der Maus und anderer komplexer eukaryontischer Organismen identifiziert, das einerseits Homologie zu Ubiquitin-Konjugationsenzymen aufweist und andererseits strukturelle Komponenten der Apoptoseinhibitoren der IAP-Familie besitzt. Trotz eindeutiger Hinweise auf seine anti-apoptotische Funktion und erster Einblicke in den Wirkmechanismus dieses Proteins, sind die in Wachstum, Differenzierung und Zelltod einzelner Zellspezies involvierten spezifischen Prozesse, an deren Regulation BRUCE beteiligt ist, weitgehend unbekannt. Als experimentelles Modell für die funktionelle Charakterisierung des Proteins *in vivo* wurde die Maus gewählt und im Vorfeld dieser Arbeit eine für *BRUCE* heterozygote transgene Mauslinie etabliert (Pyrowolakis, 2000). Die Deletion im *BRUCE*-Gen hat einen vollständigen Verlust der *BRUCE*-Expression zur Folge. Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung des BRUCE-Proteins für die Entwicklung und die Funktion komplexer Organismen durch eine umfassende Analyse der homozygoten *Knockout*-Mäuse aufzuklären. Die für die phänotypische Charakterisierung notwendigen Methoden sollen im Labor etabliert und mit ihrer Hilfe die Auswirkungen des BRUCE-Verlustes auf einzelne Zellen, Gewebe, Organsysteme und den gesamten Organismus untersucht werden.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Das *in vivo*-Modell

Wurzeln über das Wissen, wie Gene die Entwicklung von Säugetieren kontrollieren, reichen zurück bis ins frühe 20. Jahrhundert, als die Erhaltung und Veränderung der Fellfarbe bei einer Vielzahl von domestizierten Tieren beobachtet und dokumentiert wurde. Seither etablierte sich vor allem die Maus (*Mus musculus*) als experimentelles Säugetiersystem der Wahl. Von ihr konnte bislang, nicht zuletzt durch die erfolgreichen Sequenzierungs-, Mutagenese- und *Gene Trap*-Projekte der letzten Jahre und Jahrzehnte, eine Vielzahl genetischer Informationen zusammengetragen werden. Heute existieren über 400 unterschiedliche Inzucht-Mauslinien (Festing, 1993), welche die experimentellen Möglichkeiten in z. B. Krebs- oder Transplantationsforschung, Immunologie oder Genetik revolutionierten. Inzuchtlinien nennt man Maus-Linien, für die nach mehr als 20 Generationen von Bruder×Schwester-Verpaarungen höchstmögliche Homozygotie für alle genetischen Loci erzielt (Altmann und Katz, 1979; Morse, 1981) und somit die Erfassung experimenteller Parameter in einem homogenen genetischen Hintergrund ermöglicht wurde. Jede Linie hat eine standardisierte Nomenklatur und spezielle Charakteristika. Für die in dieser Arbeit beschriebenen experimentellen Untersuchungen zur Funktion des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms BRUCE *in vivo* wurde die Inzuchtlinie C57BL/6 herangezogen. Genetische Charakteristika und Labormerkmale dieser Linie sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Um die Funktion eines Gens zu untersuchen, ist dessen Mutationsanalyse einer der aufschlussreichsten experimentellen Ansätze. Die Entwicklung von *Gene Targeting*-Techniken sowie von Methoden der Isolation, Kultivierung und genetischen Manipulation von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen), die reimplantiert weiterhin zur Entstehung von Geweben und Keimbahn beitragen können, schuf die Grundlagen für die Möglichkeit, einzelne Gene in einem Organismus gezielt zu modifizieren.

**Tabelle 1.** Genetische Charakteristika und Labormerkmale der Europäischen Hausmaus (*Mus musculus*), C57BL/6

Genom	
Anzahl der Chromosomen	40
DNA-Gehalt (diploid)	ca. 6 pg ( $3 \times 10^9$ bp)
Rekombinationseinheiten	1600 cM (2000 kb/cM)
Geschätzte Anzahl der Gene <sup>(a)</sup>	ca. $3 \times 10^4$
Repetitive DNA-Sequenzen (B1, B2, MIF-1, EC1) <sup>(c)</sup>	8 - 10 %
Reproduktionseigenschaften	
Dauer der Trächtigkeit	ca. 19 Tage
Alter bei Entwöhnung vom Muttertier	3 Wochen
Alter bei Geschlechtsreife	6 Wochen
Gewicht: Geburt	1,2 - 1,5 g
Entwöhnung	12 - 15 g
Geschlechtsreife	25 - 30 g
Lebensspanne im Labor	1,5 - 2 Jahre
Anzahl der Nachkommen <sup>(c)</sup>	6 - 10
Anzahl der Würfe verpaarungsfähiger Weibchen	4 - 6

(a) FANTOM Consortium und RIKEN Exploration Research Group, 2002

(b) Bennett et al., 1984

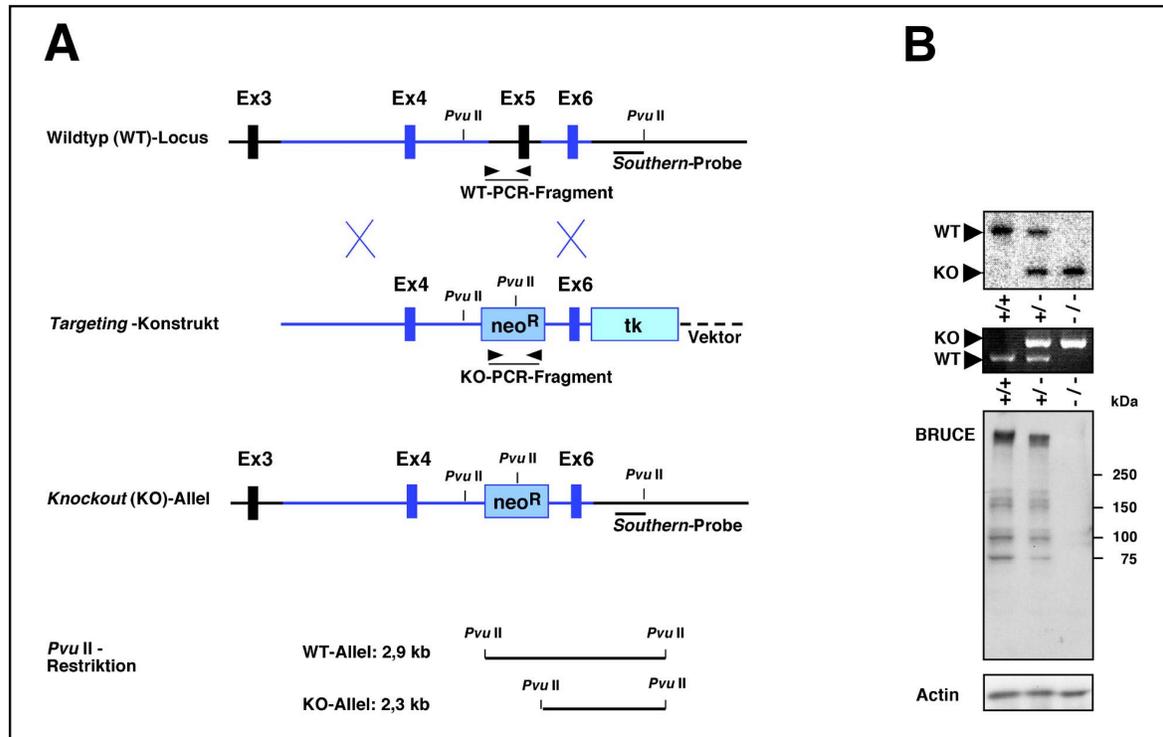
(c) Die Größe des Wurfes richtet sich nach der Anzahl der bei der Ovulation freigesetzten Eier und der pränatalen Mortalitätsrate, beides variiert mit Alter des Muttertieres, Parität und Haltungsbedingungen (Diät oder Stress).

## 2.2. Die Inaktivierung des *BRUCE*-Gens in der Maus

Für die funktionelle Charakterisierung des BRUCE-Proteins *in vivo* wurde im Vorfeld dieser Arbeit eine für *BRUCE* heterozygote transgene Mauslinie etabliert (Pyrowolakis, 2000). Zunächst soll für ein besseres Verständnis ein kurzer Überblick über *Knockout*-Strategie und -Technik gegeben werden.

Um den *Targeting*-Vektor für die homologe Rekombination in ES-Zellen herzustellen, wurde die 5'-terminale Region des *BRUCE*-Locus, welche die ersten 6 Exons des Gens enthält, kloniert und charakterisiert. Bei der Aufklärung der genomischen Organisation des N-terminalen Bereiches des BRUCE-Proteins stellte sich heraus, dass die kodierende Sequenz für die BIR-Domäne auf mehrere Exons verteilt ist. Der N-Terminus dieser Domäne wird ausschließlich von Exon 5 kodiert, während die Sequenz für den C-terminale Teil einschließlich des metallbindenden Motivs mit Exon 6 beginnt. Daraus ergab sich die im Folgenden beschriebene Konstruktion des *Targeting*-Vektors (Abb. 6A). Als Grundgerüst diente der Klonierungsvektor pBluescriptSK+. Exon 4 und 6 sowie benachbarte intronische Sequenzen wurden als 5'- und 3'-Homologiebereiche für

die homologe Rekombination gewählt und das von den Homologiebereichen eingeschlossene Exon 5 durch eine Neomycin-Resistenzkassette für die Positivselektion ersetzt. Hinter dem 3'-Homologiebereich wurde des Weiteren eine Thymidinkinase-Kassette für die Negativselektion gesetzt und in den offenen Leserahmen von Exon 4 zusätzlich ein Stop-Codon eingeführt.



**Abb. 6. Gezielte Inaktivierung von BRUCE durch homologe Rekombination in ES-Zellen.** (A) Die schematische Darstellung der *Targeting*-Strategie zeigt Exon (Ex) 3 bis 6 des *BRUCE*-Locus, das *Targeting*-Konstrukt und das mutierte Allel. Durch legitime Rekombination über die Homologiearme (blaue Regionen) wurden Exon 5 und benachbarte intronische Bereiche durch die Neomycin-Resistenzkassette (*neo*<sup>R</sup>) ersetzt. Durch den Austausch kommt es zur Integration einer zusätzlichen *Pvu*II-Schnittstelle in das mutierte Allel, wodurch das Ereignis über *Southern blot*-Analyse mit einer an den 3'-Homologiebereich angrenzenden DNA-Probe verfolgt werden kann. Dabei ist das detektierte *Pvu*II-Restriktionsfragment des mutierten Allels mit 2,3 kb kürzer als das 2,9 kb-Fragment des WT-Allels (B, oben). (B, Mitte) PCR-Analyse embryonaler DNA aus dem Dottersack. Die Positionen der Primerpaare für die Amplifikation der spezifischen Fragmente für das WT-Allel (556 bp) und das mutierte (KO) Allel (624 bp) sind in Ausschnitt (A) markiert. (B, unten) Immunoblot-Analyse der *BRUCE*-Expression in WT-, heterozygoten und *Knockout*-Embryonen (E10). Die geladenen Proteinmengen wurden mit einem Actin-Antikörper kontrolliert. Proteinfragmente mit weniger als 530 kDa sind Abbauprodukte des *BRUCE*-Proteins.

Mit dem linearisierten Vektor wurden mittels Elektroporation ES-Zellen transfiziert. Durch homologe Rekombination des *Targeting*-Vektors mit dem endogenen *BRUCE*-Locus wurde ein 0,8 kb-Fragment deletiert, welches das vollständige Exon 5 enthielt,

und durch die Neomycin-Kassette ersetzt. Die Integration führte zur Herstellung eines stark verkürzten offenen Leserahmens des *BRUCE*-Gens, der keine der beiden funktionellen Domänen kodierte. Nach Doppelselektion mit G418 und Ganciclovir sowie molekularbiologischen Analysen für die Bestätigung der korrekten Rekombination wurden die für den *BRUCE*-Locus heterozygoten ES-Zellen in Wirtsblastozysten injiziert und diese Blastozysten in scheinchwangere Mäuse implantiert. Die Wahl der Donor-Mauslinien der ES-Zellen und Blastozysten erfolgte so, dass in der Nachkommenschaft anhand der Fellfarbe der Grad des Chimärismus und somit die Keimbahngängigkeit der manipulierten ES-Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit bestimmt werden konnte. Die nach der Genotypisierung als heterozygot identifizierten chimären Männchen wurden mit Wildtyp (WT)-Weibchen der Donor-Linie der Blastozysten (C57BL/6) rückgekreuzt. Die Genotypen der F1-Generation traten in dem nach Mendel erwarteten Verhältnis auf. Die heterozygoten (*BRUCE*<sup>+/-</sup>)-Tiere zeigten keine Auffälligkeiten in Entwicklung oder Verhalten und konnten somit für die Etablierung einer homozygoten  $\Delta$ *BRUCE*-Linie herangezogen werden.

## 2.3. Die Bestimmung des Genotyps der transgenen Tiere

### 2.3.1. Southern blot-Analyse

Für die Bestimmung der Genotypen der Mäuse erfolgte anfangs die Analyse mittels *Southern blot*. Durch die homologe Rekombination wurden Exon 5 und angrenzende intronische Bereiche durch die Neomycin-Resistenzkassette ersetzt, die eine zusätzliche Schnittstelle für das Restriktionsenzym *PvuII* enthält. Der daraus resultierende Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) *PvuII*-verdauter genomischen DNA wurde mittels einer radioaktiv markierten, an den 3'-Homologiebereich angrenzenden, externen *BRUCE*-DNA-Probe detektiert (Abb. 6A und B, oben). Aufgrund der Neomycin-internen *PvuII*-Schnittstelle ist das Restriktionsfragment des mutierten Allels mit 2,3 kb kürzer als das 2,9 kb-Fragment des WT-Allels.

### 2.3.2. PCR-Analyse

Um den für die Genotypisierung der Mäuse erforderlichen Zeit- und Arbeitsaufwand zu minimieren, konnte eine wesentlich effizientere Methode etabliert werden. Wie auch für die *Southern blot*-Analyse, wurde genomische DNA aus Biopsiegewebe (Schwanzbiopsie der Maus 3 bis 6 Wochen nach der Geburt oder Dottersack des Embryos) isoliert. Die DNA ist als *Template* in einer PCR-Reaktion mit zwei Primerpaaren eingesetzt worden (Abb. 6A und B). Mit einem Primerpaar (wt-0/wt-3.as) wurde ein 556 kb-Fragment des WT-*BRUCE*-Allels amplifiziert. Die entsprechende Sequenz fehlt im mutierten Allel und stattdessen wird dieses Allel durch die Amplifikation eines 624 kb-Fragments des Neomycin-Resistenzgens mit dem zweiten Primerpaar (neo4/neo5) nachgewiesen.

### 2.4. Die Charakterisierung des Phänotyps der *BRUCE*-defizienten Mäuse

Heterozygote Tiere der Linie C57BL/6- $\Delta$ *BRUCE* unterschieden sich wie bereits erwähnt äußerlich nicht von ihren WT-Geschwistern und zeigten keine auffälligen Zuchtanomalien. Um homozygote Tiere für das mutierte *BRUCE*-Allel zu erhalten, wurden heterozygote Männchen mit heterozygoten Weibchen verpaart und die Nachkommen nach dem Absetzen vom Muttertier im Alter von 3 Wochen genotypisiert. Keines der Jungtiere besaß das mutierte *BRUCE*-Allel in Homozygotie, obwohl nach Mendel homozygote *BRUCE*-Mutanten mit einer Häufigkeit von 25 % erwartet werden konnten. Tiere ohne funktionelles *BRUCE*-Protein waren also nicht lebensfähig. Innerhalb der ersten Wochen nach der Geburt konnten keine Besonderheiten unter den Jungtieren beobachtet und keine verstorbenen Tiere gefunden werden. Diese Tatsache weist darauf hin, dass der *BRUCE*-Verlust möglicherweise eine embryonale Letalität zur Folge hat. Um den Zeitpunkt des Sterbens der *Knockout*-Tiere näher einzugrenzen, wurden verschiedene Stadien der Embryonalentwicklung bis hin zur Geburt untersucht.

### 2.4.1. Das Fehlen von BRUCE führt zu verzögertem embryonalen Wachstum und perinataler Letalität

Die unauffälligen heterozygoten Tiere der  $\Delta BRUCE$ -Linie wurden untereinander gekreuzt und eine erfolgreiche Verpaarung am nächsten Morgen durch Kontrolle des vaginalen Plugs festgestellt. Dieser Tag entspricht in allen folgenden Darstellungen dem embryonalen Entwicklungsstadium (E) 0,5. Die Trächtigkeitsperiode der heterozygoten Weibchen betrug durchschnittlich 19 Tage. Beginnend von E9,5 wurden im Abstand von 24 Stunden alle Embryonen der entsprechenden Würfe präpariert und mittels PCR-Analyse der DNA aus dem Dottersack genotypisiert. Zusätzlich wurden Embryo- und Gewebelysate hergestellt und im *Western blot* getestet (Abb. 6B). Mit Antikörpern gegen N- und C-terminale Proteinsequenzen konnten weder BRUCE selbst noch alternative Spleißvarianten des Proteins in *Knockout*-Lysaten detektiert werden. Es hat sich damit bestätigt, dass die *Targeting*-Strategie in der Tat zu einem vollständigen Verlust des funktionalen Proteins führt.

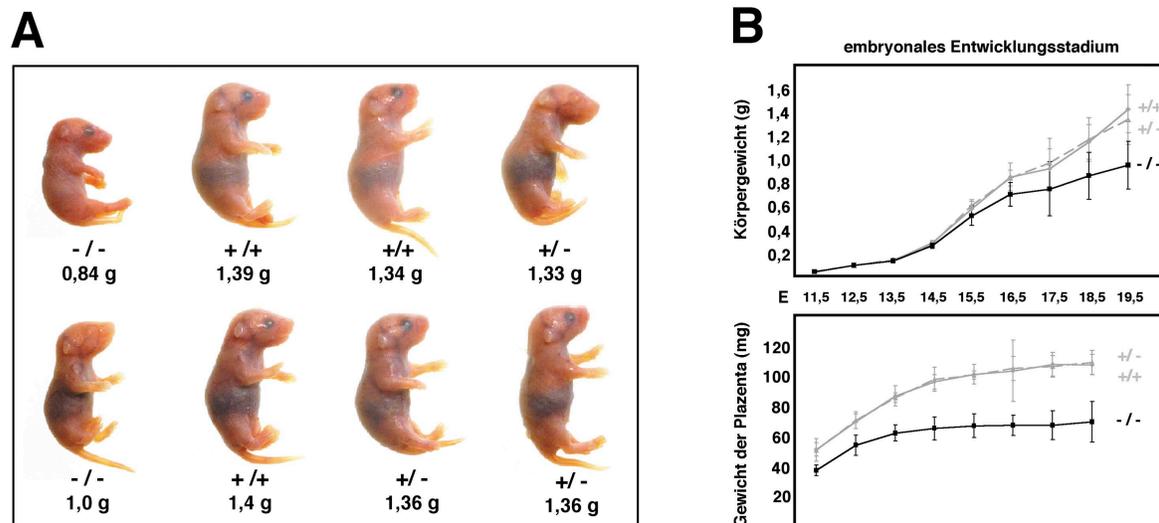
**Tabelle 2.** Genotypisierung der Nachkommen heterozygoter Verpaarungen ( $BRUCE^{+/-} \times BRUCE^{+/-}$ ) nach 10 Generationen der Rück-Kreuzung in C57BL/6

Entwicklungsstadium	Anzahl der Nachkommen des <i>BRUCE</i> -Genotyps:				
	+/+	+/-	-/-	ND	Resorbtion
E 9,5	2	4	1		1
E 10,5	3	8	3	4	2
E 11,5	11	28	9		7
E 12,5	25	48	26	3	5
E 13,5	29	70	27	3	20
E 14,5	28	49	23	8	18
E 15,5	8	16	9	2	3
E 16,5	2	11	5		4
E 17,5	12	25	16		
E 18,5	20	23	13		12
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>					
pränatal gesamt	140	282	132	20	72
erwartet	(21,7 %)	: (43,7 %)	: (20,4 %)		(11,1 %)
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>					
P 0 ( 1 h)	12	27	7		
P 0 ( 6 h)	5	15	2		
P 0 (12 h)	7	11	1		
P 0 (24 h)	8	15	0		
P 1	6	13	0		
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>					
postnatal gesamt	38	81	10		

E: Tag der embryonalen Entwicklung  
 P: Tag postnatal  
 ND: nicht determiniert

Bis hin zur Geburt gab es keine Abweichungen von der erwarteten Mendelschen Verteilung der Genotypen von 1 (WT) : 2 ( $BRUCE^{+/-}$ ) : 1 ( $BRUCE^{-/-}$ ). Während oder kurz nach der Geburt starben jedoch viele der  $BRUCE$ -Mutanten, und 12 bis 24 Stunden postnatal konnten keine *Knockout*-Embryonen mehr gefunden werden (Tabelle 2). Folglich verursacht der Verlust des  $BRUCE$ -Proteins eine perinatale Letalität.

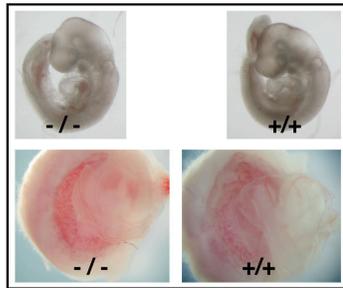
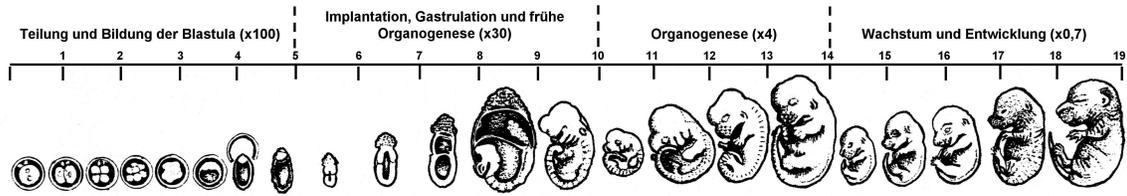
Daher wurde zunächst der Wurf eines heterozygoten Weibchens verfolgt und die Neugeborenen unmittelbar nach ihrer Geburt von der Mutter isoliert. Zwei der acht Jungtiere dieses Wurfs waren wesentlich kleiner und zeigten eine deutliche Gewichtsreduktion (Abb. 7A). Die Analyse der Genotypen bestätigte die Vermutung, dass die beiden auffälligen Tiere das mutierte  $BRUCE$ -Allel in Homozygotie trugen. Weitere Verpaarungen vervollständigten diese Beobachtung. Die in jedem Fall eindeutig zu identifizierenden neugeborenen  $BRUCE$ -Mutanten waren zwar in der Lage, Nahrung aufzunehmen, wurden jedoch häufig durch das Muttertier vom Rest des Wurfs separiert. Sie waren weniger agil als die WT- und heterozygoten Tiere, zeigten zum Teil starke Spasmen und starben innerhalb weniger Stunden nach der Geburt.



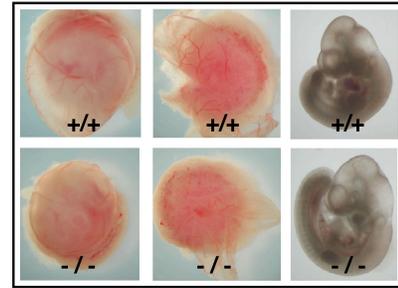
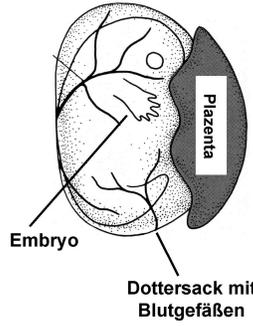
**Abb. 7.  $BRUCE$ -Verlust führt zu verzögertem embryonalem Wachstum und perinataler Letalität.** (A) Gewichts- und Wachstumsreduktion der neugeborenen  $BRUCE$ -Mutanten im Wurf eines Weibchens nach heterozygoter Verpaarung ( $BRUCE^{+/-} \times BRUCE^{+/-}$ ). (B) Gewichtsentwicklung der WT (+/+)-, heterozygoten (+/-) und mutierten (-/-)  $BRUCE$ -Embryonen und ihrer Plazentas von der mittleren bis zur späten Trageperiode. Gezeigt ist die Analyse der Mittelwerte des Körper- und Plazentagewichtes von mindestens 5, zumeist 10 Individuen (Männchen und Weibchen gemischt) zu den genannten Stadien der Embryonalentwicklung. Die Standardabweichung ist angegeben.

Die Ausprägung des *Knockout*-Phänotyps wurde über die unterschiedlichen Stadien der Embryonalentwicklung verfolgt (Abb. 8). Bis zum Tag E12 der Embryogenese waren die *BRUCE*-Mutanten äußerlich kaum von den Wildtypen und den heterozygoten Embryonen des Wurfs zu unterscheiden. Beginnend von E13,5 zeigten die Mutanten jedoch bis hin zur Geburt eine zunehmende Wachstumsretardierung, die sich in einer deutlich reduzierten Körpergröße und verzögerter Körpergewichtsentwicklung widerspiegelte (Abb. 7B). Die *BRUCE*<sup>-/-</sup>-Embryonen wogen nur etwa 70 % des durchschnittlichen Gewichtes eines WT-Embryos bei der Geburt. Die Mutanten wirkten zusätzlich blass und die Hauptgefäße des Blutgefäßsystems waren teilweise nicht deutlich sichtbar, was auf Defekte während der Vaskularisierung und/oder Störungen der Blutversorgung hindeuten könnte. In der Entwicklungsphase zwischen Tag E13 und E15 wurden in 34 % der *Knockout*-Embryonen temporäre Blutungen beobachtet, vor allem im Ventrikelsystem des Gehirns und im Kanal des Rückenmarks. In späteren Stadien der Entwicklung konnten jedoch auch im *Knockout*-Embryo außer der Wachstumsretardierung in der Regel keine weiteren morphologischen Veränderungen gefunden werden. Lediglich 4 % der Mutanten zeigten zusätzliche Defekte wie subcutane Blutungen oder generalisierte Ödeme.

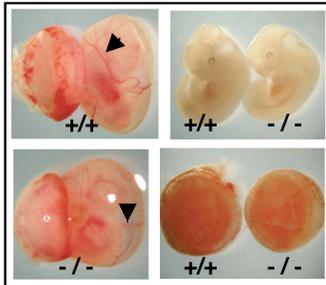
Neben den Abweichungen in der Embryonalentwicklung der *BRUCE*-Mutanten wurden vor allem morphologische Veränderungen im extra-embryonalen Gewebe beobachtet. Schon in frühen Stadien ihrer Entwicklung erschien die Plazenta der transgenen Embryonen kleiner und im Vergleich zum Wildtyp sehr blass (Abb. 8). Eine Analyse der Plazentagewichtsentwicklung zeigte bereits am Tag E11,5 eine Reduktion des mittleren Gewichtes der *Knockout*-Plazenta auf 73 % des Normalgewichtes. Während die WT-Plazenta im Verlaufe ihrer Reifung bis in die späte Trageperiode (E17) an Gewicht und Größe zunahm, wurde für die *BRUCE*<sup>-/-</sup>-Plazenta ab E15 eine deutliche Stagnation der Gewichtsentwicklung beobachtet. Sie erreichte nur etwa 65 % des durchschnittlichen Gewichtes einer voll entwickelten WT-Plazenta (Abb. 7B). Der Dottersack, der den Embryo vollständig umgibt, gehört ebenfalls dem extra-embryonalen Gewebe an. In frühen Stadien (E9) sind in ihm verteilt einzelne Blutinseln sichtbar, die sich später verbinden und die Zirkulation des Dottersacks bilden. Die normalerweise in allen untersuchten Stadien gut sichtbaren Verzweigungen der Blutgefäße waren in den Dottersäcken der *Knockout*-Embryonen wesentlich schlechter zu erkennen (Abb. 8).



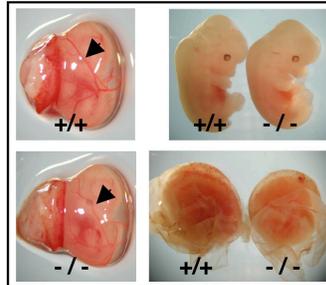
E 9,5



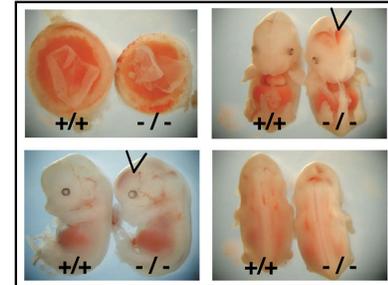
E 10,5



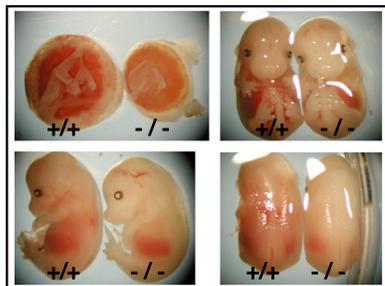
E11,5



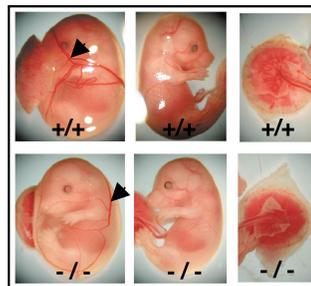
E12,5



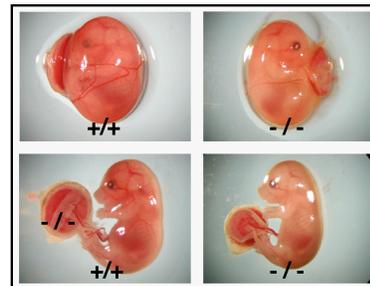
E13,5



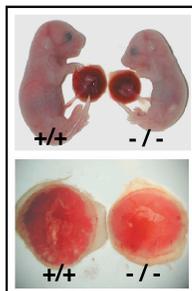
E 14,5



E15,5



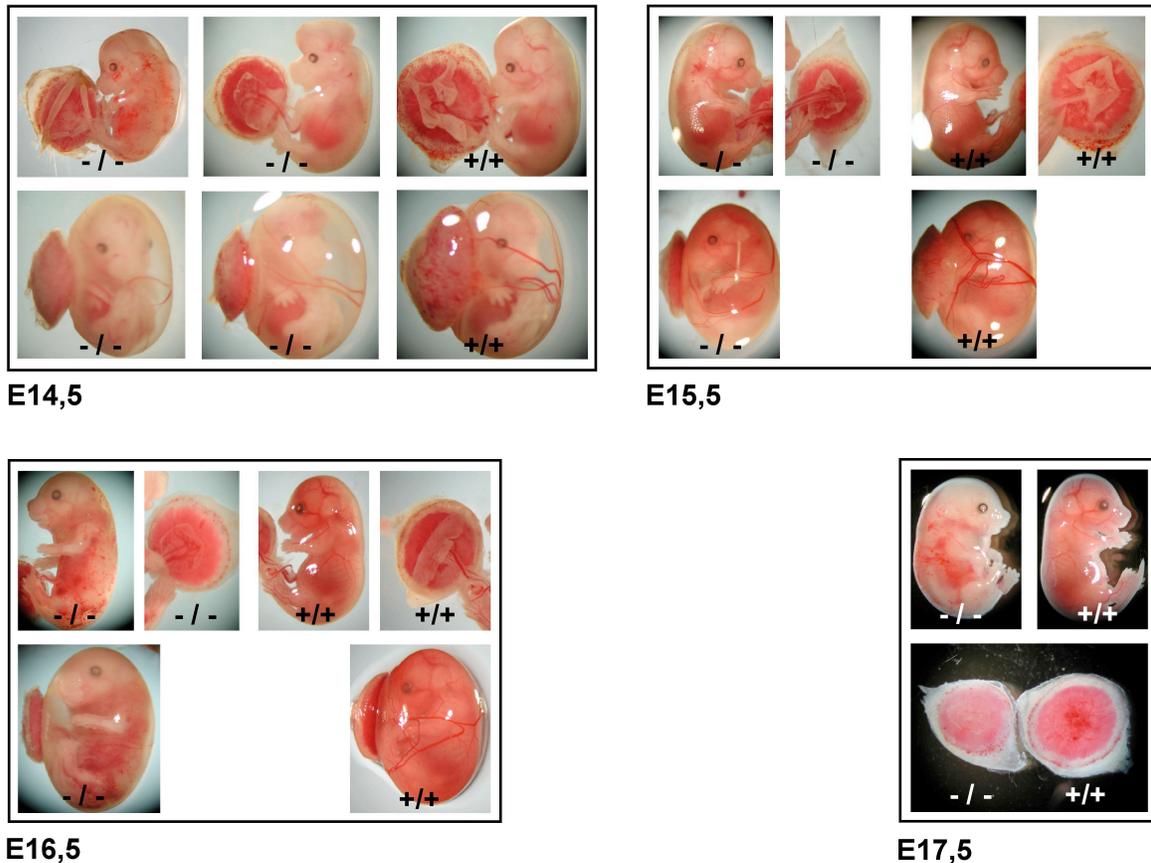
E16,5



E17,5

**Abb. 8. Embryonalentwicklung der WT (+/+)- und transgenen (-/-) BRUCE-Mäuse.** Knockout-Embryonen unterliegen einer nach E13,5 einsetzenden Wachstumsretardierung. Sie erscheinen kleiner und blass und Hauptgefäße des Blutgefäßsystems sind im Vergleich zum WT teilweise nicht deutlich zu erkennen. Zwischen E13 und E15 zeigen 34 % der Mutanten vor allem im Ventrikelsystem des Gehirns und im Kanal des Rückenmarks temporäre Blutungen (v). Defekte im extra-embryonalen Gewebe werden schon ab E9,5 deutlich. Die Plazenta der transgenen Tiere ist deutlich kleiner und sehr blass und die Blutgefäße im Dottersack sind nur schwer zu erkennen (▼). Schema der Embryonalentwicklung entnommen aus Hogan et al., 1994.

Interessant war die Beobachtung, dass sich sowohl der Phänotyp als auch der Zeitpunkt der Letalität veränderte, sobald die tragenden Weibchen Stress-Situationen ausgesetzt waren. In diesem Fall konnten nach Tag 17,5 der Embryonalentwicklung keine überlebenden *BRUCE*<sup>-/-</sup>-Embryonen mehr gefunden werden und der Anteil der Föten mit deutlich sichtbaren Defekten stieg von 4 % auf 42 %. Am häufigsten traten schwere subcutane Blutungen sowie generalisierte Ödeme auf. Nicht zu vernachlässigen war aber auch die Anzahl der Tiere mit schwerwiegenden Entwicklungsdefekten wie fehlender Schädeldecke, offenem Peritoneum oder fehlendem Unterkiefer (Abb. 9).



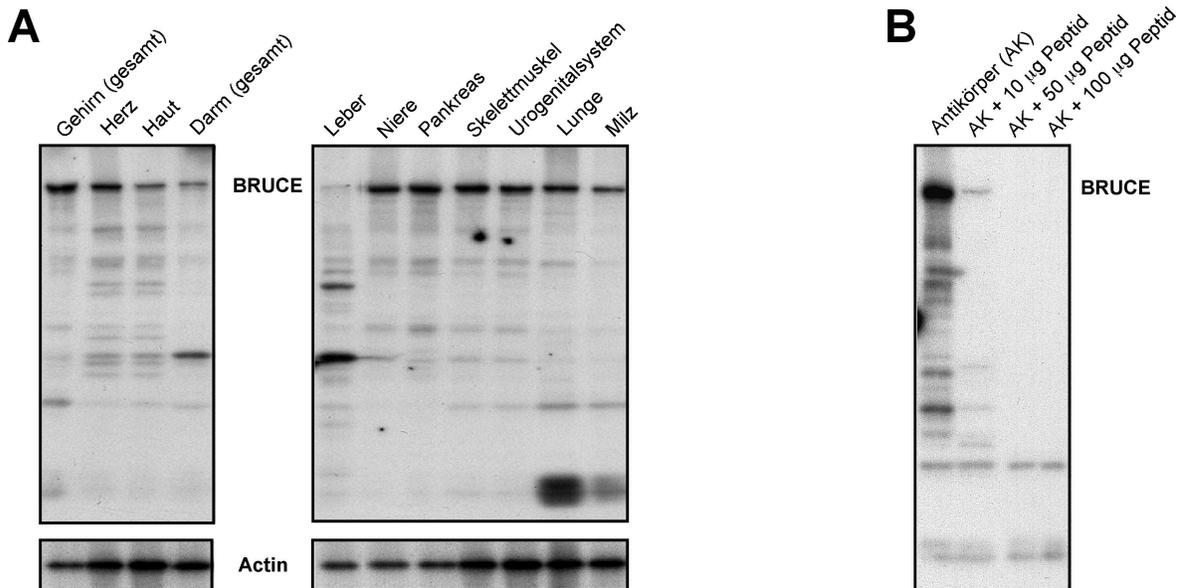
**Abb. 9. Stress-induzierter Phänotyp der WT-Embryonen (+/+) und *BRUCE*-Mutanten (-/-).** Durch Bauvorhaben waren die heterozygoten Weibchen während ihrer Trächtigkeit über längere Zeiträume äußeren Stressfaktoren wie Lärm und starken Vibrationen ausgesetzt. Dies führte zu einer Verstärkung des Phänotyps. Der Anteil der *Knockout*-Embryonen mit deutlich sichtbaren Defekten stieg ab E14 von 4 auf 42 % (davon 85 % mit schweren subcutanen Blutungen und generalisierten Ödemen, andere mit fehlender Schädeldecke, offenem Peritoneum oder fehlendem Unterkiefer) Nach Tag 17,5 der Embryonalentwicklung konnten keine überlebenden Mutanten mehr gefunden werden.

## 2.4.2. Die Ursachen der perinatalen Letalität - BRUCE wird für die normale Entwicklung der Plazenta benötigt

### 2.4.2.1. Phänotyp-Analyse des Embryos

#### *Die BRUCE-Expression während der Embryonalentwicklung*

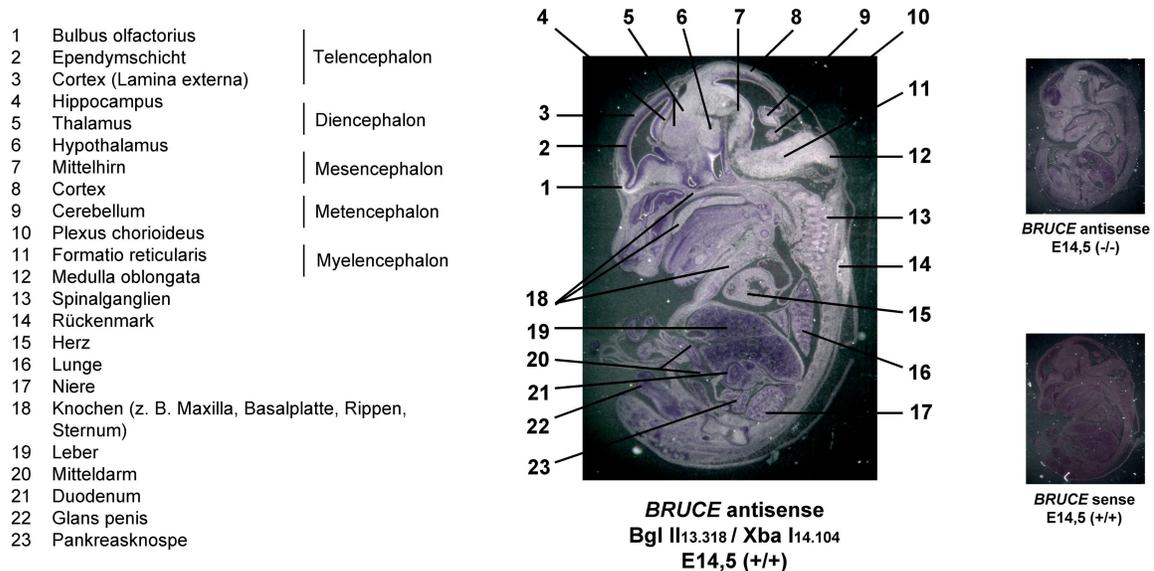
Um Hinweise auf spezifische, durch das Fehlen des BRUCE-Proteins verursachte Defekte zu erhalten, wurde zunächst die Expression des Gens im Embryo während seiner Entwicklung charakterisiert. Wie bereits mittels *Northern blot*-Analyse gezeigt (Bardroff, 1997), scheint *BRUCE*-mRNA in allen bislang getesteten embryonalen Organen und Geweben anwesend zu sein. Eine besonders hohe Expression wurde beispielsweise in Gehirn, Niere oder Leber gefunden. Diese Ergebnisse konnten auch im *Western blot* bestätigt werden (Abb. 10).



**Abb. 10. Western blot-Analyse der *BRUCE*-Expression in embryonalen Geweben der Maus E17,5.** (A) Es wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein der angegebenen Organe aufgetragen und BRUCE mittels eines gegen den N-Terminus des Proteins gerichteten monoklonalen Antikörpers detektiert. Die Kontrolle der geladenen Proteinmengen erfolgte mit einem Actin-Antikörper. (B) Die Spezifität des Antikörpers wurde zusätzlich durch seine Blockierung mit einem rekombinant hergestellten, N-terminalen Fragment des Proteins, welches das antigene Epitop enthielt, getestet. Es wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein eines Gehirnlisates aufgetragen. Der Primärantikörper wurde vor seiner Nutzung mit den angegebenen Mengen des Peptids präinkubiert.

In allen untersuchten Organen, die aus Embryonen kurz vor der Geburt isoliert wurden, konnte das Protein in seiner vollen Länge nachgewiesen werden. In Geweben mit sehr starker proteolytischer Aktivität wie Darm oder Leber wurden, bedingt durch die benötigte Zeit für Präparation und Herstellung der Lysate, hauptsächlich Abbauprodukte detektiert. Das Verhältnis zwischen Protein und Abbauprodukten schwankte je nach Qualität der Lysate. Der Abbau des Proteins konnte weniger durch Protease-Inhibitoren als vielmehr durch den unspezifischen Caspase-Inhibitor ZVAD blockiert werden.

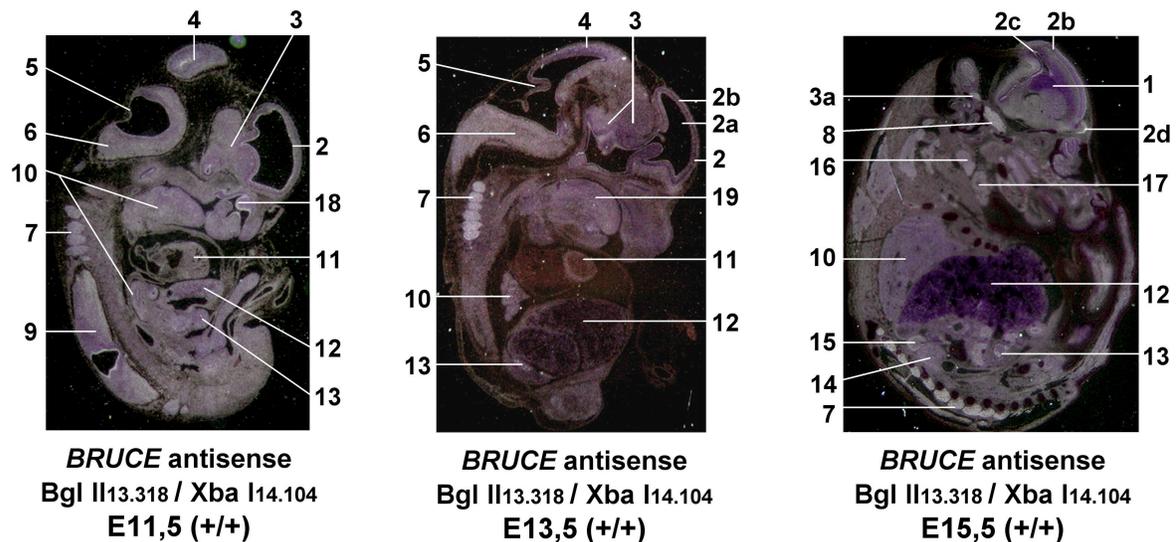
Um die spezifische Verteilung der *BRUCE*-mRNA und damit die *BRUCE*-Expression in den unterschiedlichen Geweben und Organen genauer zu beschreiben, erfolgte die Durchführung von *in situ*-Hybridisierungen auf saggitalen Gewebeschnitten der Embryonen. Mit radioaktiv-markierten Riboproben aus dem 5'- und 3'-Bereich der *BRUCE*-cDNA wurden unterschiedliche Entwicklungsstadien (E9,5 bis E17,5) analysiert.



**Abb. 11. *BRUCE*-Expression im WT-Embryo im Alter E14,5.** *In situ*-Hybridisierung mit radioaktiv-markierter *antisense BRUCE*-Riboprobe auf 8 µm dicken saggitalen Gewebeschnitten des Embryos. Die Spezifität der Probe wurde durch parallele Hybridisierung mit einer *sense*-Probe kontrolliert. *BRUCE*-mRNA ist in allen embryonalen Geweben nachweisbar. Eine besonders starke Expression zeigt sich in neuronalen Geweben mit einem sehr interessanten Verteilungsmuster der Transkripte im Gehirn.

Auch mit dieser Methode konnte die Expression des *BRUCE*-Gens in allen embryonalen Geweben nachgewiesen werden (Abb. 11 und 12). Während der frühen

Embryonalentwicklung einschließlich Tag E11,5 war, analog zu früheren *Northern blot*-Analysen der mRNA aus verschiedenen embryonalen Stadien (Hauser, 1998), eine sehr intensive *BRUCE*-Expression im gesamten Embryo zu beobachten. In den folgenden Stadien wurde eine starke Abnahme der *BRUCE*-mRNA verzeichnet. Eine geringe Menge der Transkripte konnte weiterhin in allen Geweben detektiert werden, jedoch zeigte sich ab E13,5 eine zunehmend stärkere *BRUCE*-Expression in den neuronalen Geweben des zentralen und peripheren Nervensystem.



**Abb. 12. *BRUCE*-Expression in Abhängigkeit vom embryonalen Entwicklungsstadium.** *In situ*-Hybridisierung mit radioaktiv-markierter *antisense BRUCE*-Riboprobe auf 8 µm dicken sagittalen Gewebeschnitten des Embryos. Intensive *BRUCE*-Expression in frühen Embryonalstadien einschließlich E11,5 im gesamten Embryo. In späteren Stadien generelle Abnahme der Menge der *BRUCE*-mRNA im Gewebe, nicht jedoch in neuronalen Geweben des zentralen und peripheren Nervensystems. Neben der starken neuronalen Grundexpression sind in den Spinal- und sympathischen Cervicalganglien sowie dem Trigemininalganglion, in der Hypophyse, dem Bulbus olfactorius, im Cortex und in der Ependymschicht der Ventrikel besonders hohe Mengen des Transkripts nachzuweisen. Erhöhte *BRUCE*-Expression auch in einigen nichtneuronalen Geweben wie Schilddrüse, Speicheldrüse oder Epithel des Darms.

1: rechte Hemisphäre mit lateralem Ventrikel, 2: Telencephalon, 2a: laterales Ventrikel, 2b: Cortex, 2c: Ependymschicht, 2d: Bulbus olfactorius, 3: Diencephalon, 3a: Hypophyse, 4: Mesencephalon, 5: Metencephalon, 6: Myelencephalon, 7: Spinalganglien, 8: Trigemininalganglion, 9: Neuralrohr, 10: Lunge, 11: Herz, 12: Leber, 13: Darm mit Epithel, 14: Niere, 15: Nebenniere, 16: Schilddrüse, 17: Speicheldrüse, 18: olfaktorisches Epithel, 19: Zungenmuskel.

In weiten Teilen des Gehirns und im Rückenmark war eine relativ gleichmäßige Verteilung der *BRUCE*-mRNA nachweisbar, wobei innerhalb des Zwischenhirns (Diencephalon) mit seinen Anhangsgebilden die Hypophyse eine besonders hohe Konzentration an Transkripten erkennen ließ. Auch im Endhirn (Telencephalon) konnten

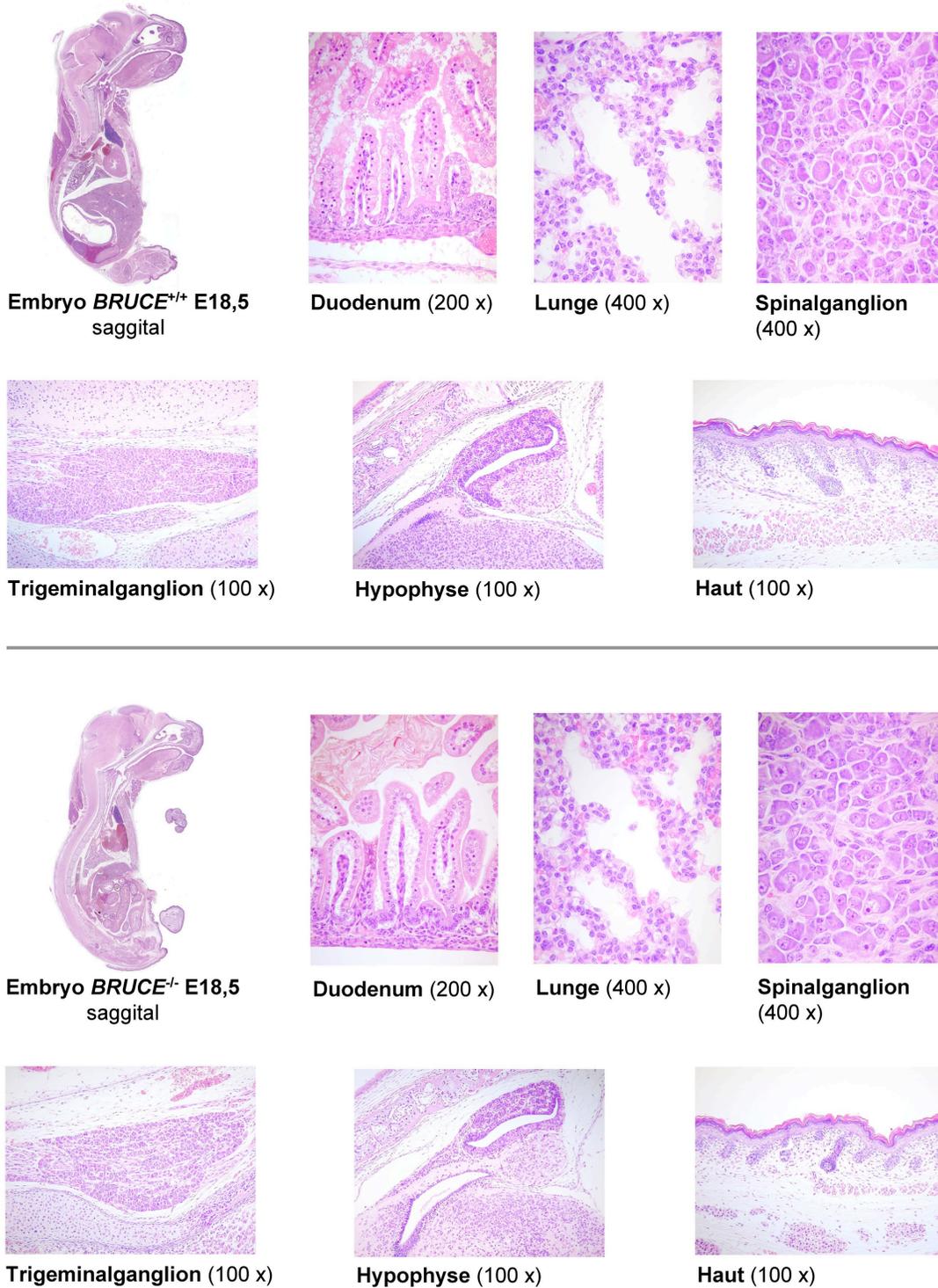
Regionen mit erhöhter *BRUCE*-Expression abgegrenzt werden. Hier sind insbesondere der Bulbus olfactorius und die Lamina externa des fetalen Cortex zu nennen. *BRUCE* wird außerdem von Ependymzellen, welche die Ventrikel des Gehirns auskleiden und an den paraventriculären Organen eine Verbindung zwischen dem Ventrikelraum und dem Gehirnparenchym herstellen, stark exprimiert. Im peripheren Nervensystem fallen durch einen extrem hohen mRNA-Gehalt vor allem Ganglien wie die Spinal- und sympathischen Cervicalganglien oder das Trigeminalganglion auf.

Eine im Vergleich zu den meisten nichtneuronalen Geweben deutlich erhöhte *BRUCE*-Expression wurde im Drüsenparenchym der Schilddrüse und der Speicheldrüse beobachtet. Außerdem konnte auch in den Epithelzellen des Darms ein starkes spezifisches Signal detektiert werden.

Basierend auf der Kenntnis der *BRUCE*-Expression in den unterschiedlichen Organen und Geweben des Embryos während seiner Entwicklung, wurden in der im Folgenden beschriebenen histologischen Analyse der *Knockout*-Embryonen vor allem jene Organe ausführlich auf Defekte hin untersucht, deren Zellen das Protein normalerweise besonders stark synthetisieren.

#### *Die histologische Analyse des Embryos*

Für histologische Untersuchungen wurden 4 µm dicke saggitale Paraffinschnitte von kompletten WT-, heterozygoten und homozygoten *Knockout*-Embryonen eines Wurfes angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt, um Gewebe und Zellen unter dem Mikroskop identifizieren zu können. Da sich die heterozygoten Tiere morphologisch nicht von den Wildtypen unterscheiden, wurden für die folgenden Betrachtungen ausschließlich WT-Embryonen für den Vergleich herangezogen. Die ausführliche histologische Analyse beschränkte sich zunächst auf die späten Entwicklungsstadien (E18 bis E18,5) kurz vor der Geburt. Es wurden alle Organsysteme und Gewebe auf ihren Entwicklungsstatus und mögliche Defekte hin untersucht, um eine Ursache für den perinatalen Tod der Mutanten zu finden. Alle lebenswichtigen Organe und Gewebe konnten im *Knockout*-Embryo identifiziert werden, und es zeigten sich im Vergleich zum Wildtyp keine offensichtlichen Abweichungen in ihrem Entwicklungsstadium und ihrer Architektur (Abb. 13).



**Abb. 13. Histologische Analyse der *BRUCE*-Mutanten.** 4 µm dicke saggitale Paraffinschnitte eines WT- und eines *Knockout*-Embryos E18,5 wurden mit Hämatoxylin/Eosin angefärbt und alle lebenswichtigen Organe auf sichtbare Defekte hin mikroskopisch untersucht (Analyse durchgeführt von der Firma FriMorfo, Fribourg, Schweiz). Ausgewählte Gewebe sind in den entsprechend optimalen Vergrößerungen gezeigt. Es konnten keine offensichtlichen Abweichungen in Entwicklung, Architektur und Feinstruktur der Organe und Gewebe festgestellt werden.

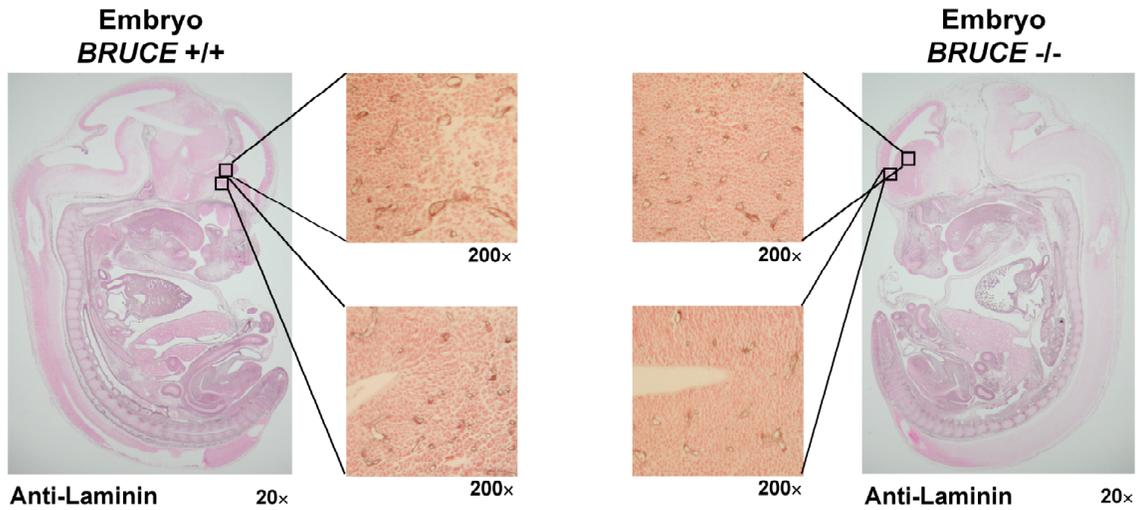
Obwohl für die perinatale Letalität der Embryonen keine Ursachen gefunden werden konnten, die auf sichtbaren Defekten in Organen basieren, sind funktionelle Störungen, z. B. des neuronalen Systems oder nichtneuronaler sekretorischer Gewebe, natürlich nicht auszuschließen.

Die teilweise auftretenden temporären Blutungen sowie die Beobachtung, dass die *Knockout*-Embryonen in der Regel sehr blass und die Blutgefäße im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen zumeist schlecht sichtbar waren, legten die Vermutung einer gestörten Vaskularisierung nahe. Die histologische Analyse der Organismen entsprechender Stadien der Embryogenese ließ jedoch keine offensichtlichen Abweichungen dieses Prozesses in den Nullmutanten erkennen. Auch mittels Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen Laminin zur Färbung der Basallamina konnten keine dilatierten oder kollabierten Blutgefäße und somit keine Hinweise auf die Ursache der Blutungen im Gehirn detektiert werden (Abb. 14A). Allerdings fiel im Rahmen dieser Untersuchungen eine scheinbar leichte Verzögerung der Erythrozytenreifung auf (Abb. 14B, siehe auch Abb. 19C).

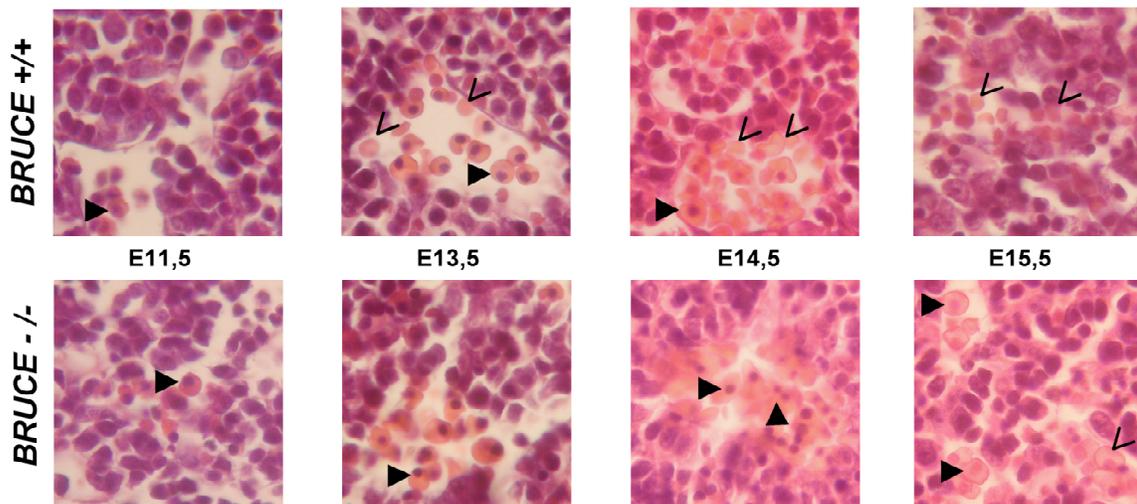
Bedingt durch das stark neuronal geprägte Expressionsmuster von *BRUCE* fand die Entwicklung des zentralen Nervensystems ebenfalls besondere Beachtung. Um die Ausprägung der unterschiedlichen Hirnregionen zu verfolgen, erfolgte die histopathologische Auswertung horizontaler Schnitte des Kopfbereiches in verschiedenen Entwicklungsstadien. Zum Zeitpunkt der teilweise auftretenden Blutungen wirkte das gesamte Gewebe des Gehirns weniger kompakt. Die scheinbar verringerte Dichte der gut sichtbaren Zellkerne weist möglicherweise auf eine reduzierte Zellzahl im neuronalen Gewebe hin. Dieser Effekt wurde in späteren Stadien der Embryonalentwicklung nicht mehr beobachtet. Bis auf die in Relation zur Wachstumsretardierung stehende Verkleinerung des Gehirns der *BRUCE*-Mutanten konnten im Vergleich zu den WT-Organismen keine deutlichen Entwicklungsdefizite einzelner Regionen des Gehirns festgestellt werden (Abb. 15).

Aufgrund der Wachstumsverzögerung der *Knockout*-Embryonen sowie der Abwesenheit sichtbarer Defekte im embryonalen Gewebe, die eine perinatale Letalität erklären könnten, wurde die histologische Analyse auf die extra-embryonalen Gewebe ausgeweitet.

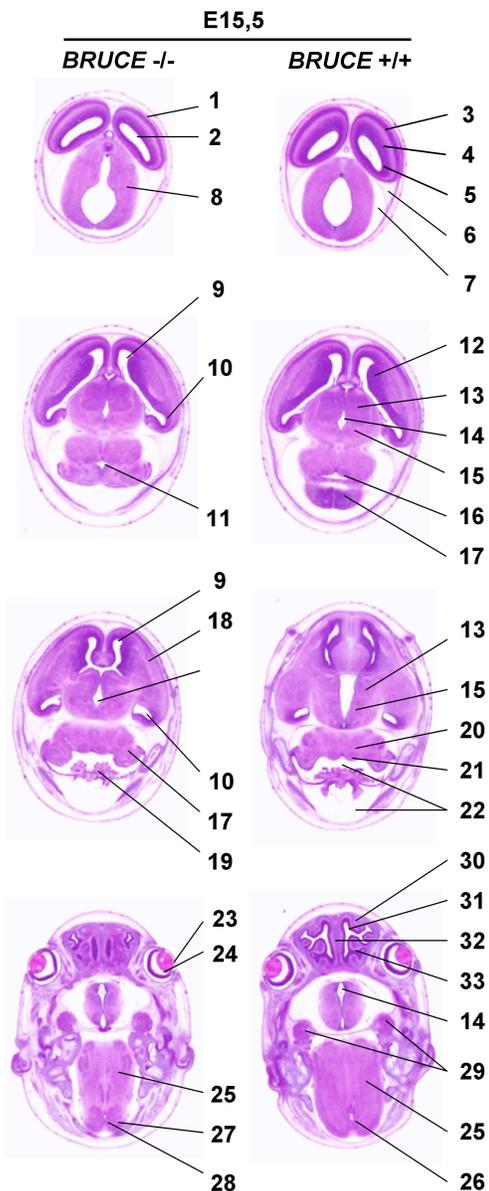
**A**



**B**



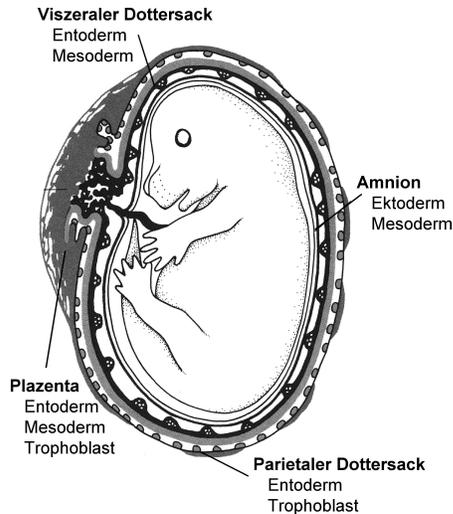
**Abb. 14. Erweiterte histologische Analyse der *BRUCE*<sup>-/-</sup> Embryonen.** (A) Vaskularisierung. Immunhistochemie mit Laminin-Antikörper zur Färbung der Basallamina auf 4 µm dicken sagittal Paraffinschnitten eines WT (*BRUCE*<sup>+/+</sup>)- und eines *Knockout* (*BRUCE*<sup>-/-</sup>)-Embryos im Stadium E13,5. Teile des Gehirns sind vergrößert dargestellt. Die Ausschnitte zeigen die dunkel gefärbte Basallamina der Blutgefäße im Striatum (oben) und in der Ventrikularzone (unten). (B) Erythrozytenreifung. H/E-Färbung 4 µm dicker sagittal Paraffinschnitte von WT (*BRUCE*<sup>+/+</sup>)- und *Knockout* (*BRUCE*<sup>-/-</sup>)-Embryonen in den angegebenen Entwicklungsstadien. Die in den Blutgefäßen des Lebergewebes enthaltenen roten Blutkörperchen sind mit Pfeilen gekennzeichnet (ausgefüllte Pfeile: kernhaltige embryonale Erythrozyten, offene Pfeile: ausgereifte Erythrozyten).



**Abb. 15. Entwicklung des zentralen Nervensystems in WT-Embryonen und *BRUCE*-Mutanten.** H/E-Färbung 4 µm dicker horizontaler Paraffinschnitte des Kopfbereiches. In frühen Stadien (E9,5 bis E11,5) verläuft die Organogenese des Gehirns scheinbar normal. Zum Zeitpunkt der teilweise auftretenden Blutungen (E13 bis E14,5) wirkt das Gewebe in Teilen des Gehirns, wie z. B. im Neopallium, im Striatum und in Teilen des Diencephalons (durch Pfeile gekennzeichnet), weniger kompakt. Die scheinbar verringerte Dichte der gut sichtbaren Zellkerne weist möglicherweise auf eine reduzierte Zellzahl im neuronalen Gewebe hin. Dieser Effekt ist in späteren Stadien der Embryonalentwicklung (E15,5 bis E18,5) nicht mehr zu beobachten. Bis auf die in Relation zur Wachstumsretardierung stehende geringere Größe des Gehirns der *BRUCE*-Mutanten können im Vergleich zu den WT-Organismen keine deutlichen Entwicklungsdefizite einzelner Regionen des Gehirns festgestellt werden. 1: Neocortex, 2: Ventriculus lateralis, 3: Intermediärzone, 4: Ventrikularzone, 5: Ependymalschicht, 6 und 7: Mesenchym (spätere Dura mater und Subarachnoidalraum), 8: Mesencephalon, 9: vorderes Horn des Ventriculus lateralis, 10: hinteres Horn des Ventriculus lateralis, 11: Aqueductus cerebri, 12: Corpus striatum (Kerngebiet über Nucleus caudatus und Putamen), 13: Thalamus (Diencephalon), 14: Ventriculus tertius, 15: Hypothalamus (Diencephalon), 16: Verbindung zwischen Brücke (Pons) und Mesencephalon, 17: Cerebellum, 18: Capsula interna, 19: Plexus chorioideus, 20: Brücke (Pons), 21: Tegmentum der Brücke, 22: Ventriculus quartus, 23: Linse des Auges, 24: Retina, 25: Medulla oblongata, 26: Übergang vom Ventriculus quartus in den Zentralkanal des Rückenmarks, 27: Rückenmark, 28: Zentralkanal, 29: Ganglion trigeminale (Gasser), 30: Capsula nasales, 31: Cavum nasi (Nasenhöhle), 32: Nasenseptum, 33: Riechepithel.

### 2.4.2.2. Phänotyp-Analyse der extra-embryonalen Gewebe

#### *Eine Einführung in Morphologie und Funktion der extra-embryonalen Gewebe*



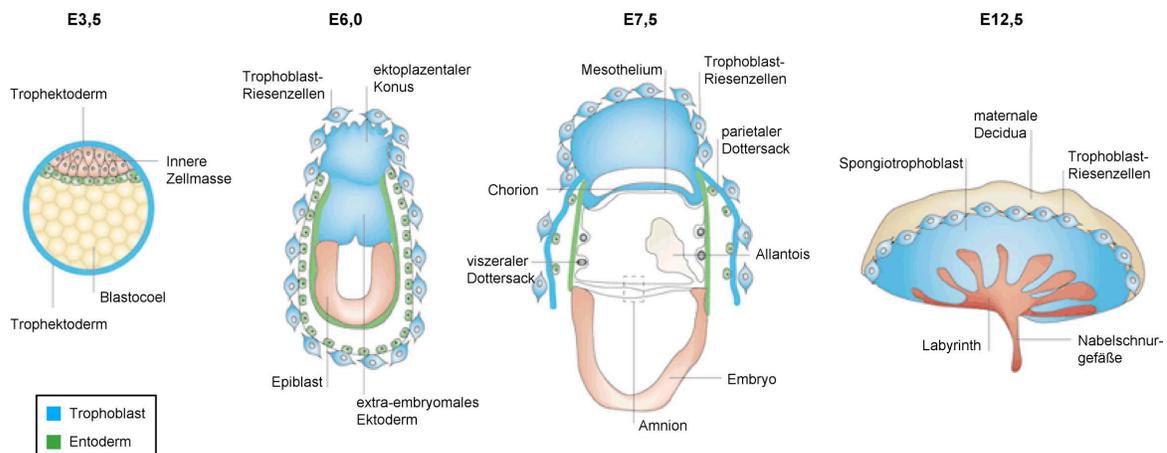
**Abb. 16. Plazenta und extra-embryonale Membranen eines Embryos E13,5** (nach Hogan et al., 1994).

Die extra-embryonalen Gewebe bilden einen integralen Bestandteil des embryonalen Lebenserhaltungssystems. Zu ihnen gehören die Plazenta sowie die Fruchthüllen des Embryos, d. h. der parietale und viszerale Dottersack und das Amnion (Abb. 16).

Die Trophoblastspezies der Plazenta haben ihren Ursprung im Trophektoderm der Blastocyste (Abb. 17). Ihre Differenzierung beginnt um den Zeitpunkt der Implantation. Die Zellen des Trophektoderms proliferieren und bilden das extra-embryonale Ektoderm und den ekto-plazentalen Konus. Ein Teil der Trophekto-

dermzellen unterliegt keinen weiteren Zellteilungen, fährt aber mit der Endoreduplikation seiner DNA fort. Diese sogenannten Riesenzellen formen die äußere Region des ekto-plazentalen Konus und umgeben schließlich den gesamten Conceptus. Das aus dem extra-embryonalen Ektoderm entstehende Chorion "fusioniert" zwischen den Tagen 8 und 9 der Embryonalentwicklung mit der vom embryonalen Mesoderm abstammenden Allantois. Der Kontakt initiiert das Einwachsen der feto-plazentalen Blutgefäße aus der Allantois in das Chorion. Mit den fetalen Blutgefäßen sind Trophoblastzellen assoziiert, die stark proliferieren und sich gemeinsam mit den Gefäßen verzweigen, ein Prozess, der als *Branching* bezeichnet wird. Zusammen bilden sie das Labyrinth der Plazenta, das zwischen E12 und E17 stark an Volumen und Komplexität zunimmt, nach E17 jedoch keinen morphologischen Veränderungen mehr unterliegt. Das sich entwickelnde Labyrinth wird strukturell durch die kompakte Schicht des Spongiotrophoblasten unterstützt, dessen Zellen aus den Trophoblastzellen des ekto-plazentalen Konus differenzieren (Rossant und Cross, 2001). Das mütterliche Blut, kommend aus dem zur Decidua umgebildeten Endometrium des Uterus, wird in einem zentralen arteriellen Blutsinus durch den Spongiotrophoblast geleitet und die mütterlichen Endothelzellen werden hier durch Trophoblastzellen ersetzt. Das

mütterliche Blut ergießt sich in Folge in die kleinen Sinusoide des Labyrithes, wo durch die aus 3 Zellschichten bestehende Plazentaschranke (2 Lagen Syncytiotrophoblastzellen, 1 Lage fetale Endothelzellen) der Austausch von Atemgasen und Stoffwechselprodukten mit dem fetalen Blut stattfindet. Das fetale Blutsystem ist durch die Nabelarterien und -venen mit dem in Entwicklung befindlichen Fetus verbunden.



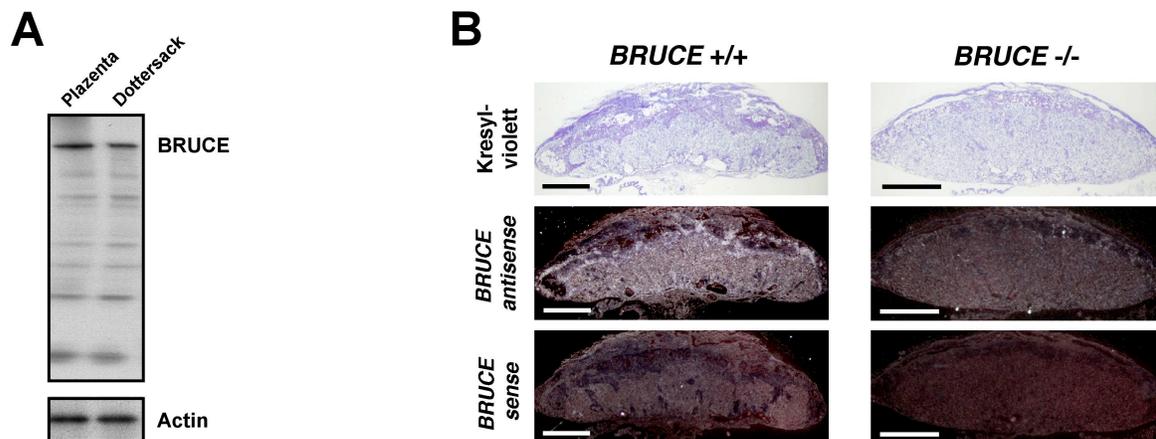
**Abb. 17. Die Entwicklung der Plazenta der Maus.** Schematische Darstellung der frühen Embryonalentwicklung der Maus von Tag (E) 3,5 bis 7,5 mit dem Ursprung der extra-embryonalen Zelltypen und der Plazentakomponenten. Morphologie der Plazenta am Tag E12,5 (nach Rossant und Cross, 2001).

Die voll entwickelte diskoidale, labyrinthäre, hämotrichoriale Chorioallantoisplazenta der Maus besteht also aus einem maternalen Anteil, der Decidua, und einem embryonalen Teil, der sich seinerseits aus der einzelligen Kontaktschicht aus Trophoblast-Riesenzellen, dem kompakten Spongiotrophoblast, dem Labyrinthsystem und der basalen Chorionplatte zusammensetzt (Abb. 17). Neben der metabolischen Funktion besitzt sie auch endokrine Aktivität und produziert z. B. Hormone wie plazentales Lactogen oder Angiogenesefaktoren wie Proliferin und VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Die Plazenta dient dem Embryo außerdem als immunologische Barriere. Solange sie noch nicht voll funktionsfähig ist, agiert der Dottersack als primitive Plazenta, indem Nährstoffe aus der Dottersackhöhle absorbiert und ins embryonale Kompartiment transportiert werden. Zudem fungiert der Dottersack in diesem frühen Stadium als wichtiges blutbildendes Organ mit einer eigenen Zirkulation, die später mit dem fetalen Blutsystem fusioniert (Kaufmann, 1992).

Angesichts dieses komplexen Aufbaus und der wichtigen Aufgabe des extra-embryonalen Gewebes ist es nicht verwunderlich, dass schon kleine Störungen dieses Systems, seien sie nun genetisch oder durch die Umwelt bedingt, schwerwiegende Konsequenzen für das Ungeborene haben können.

#### Die *BRUCE*-Expression in Plazenta und Dottersack

Wie in den meisten embryonalen Geweben wird *BRUCE* auch im extra-embryonalen Gewebe exprimiert. Im *Western blot* konnte das Protein sowohl in der Plazenta als auch im Dottersack nachgewiesen werden (Abb. 18A). Um die spezifische Verteilung der *BRUCE*-mRNA in den unterschiedlichen Gewebeschichten der Plazenta zu ermitteln, wurden *in situ*-Hybridisierungen auf plazentalen Gewebeschnitten durchgeführt. Mit radioaktiv-markierten Riboproben aus dem 5'- und 3'-Bereich der *BRUCE*-cDNA erfolgte die Analyse unterschiedlicher Entwicklungsstadien (E9,5 bis E17,5).

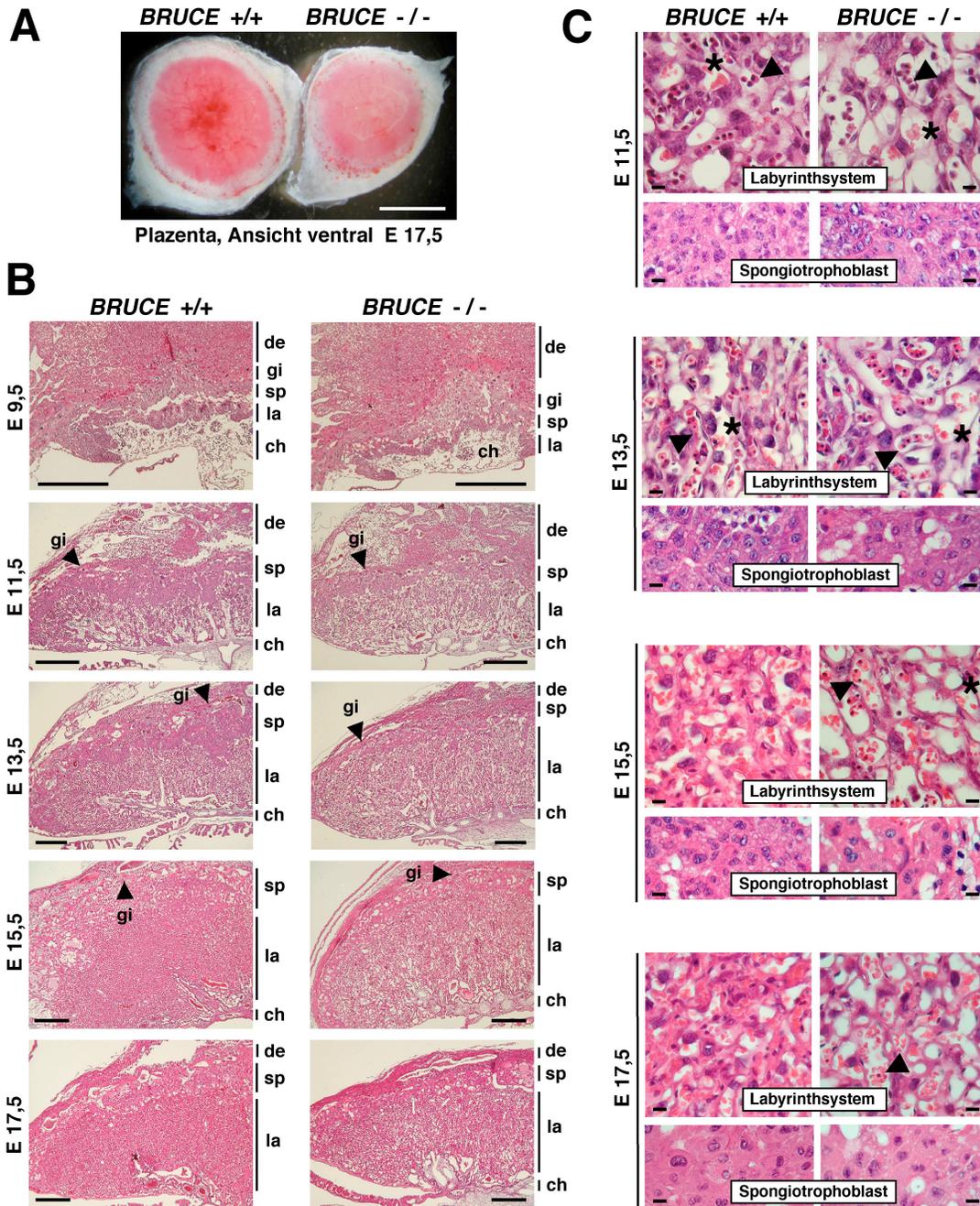


**Abb. 18. Analyse der *BRUCE*-Expression im extra-embryonalen Gewebe.** (A) Immunoblot-Analyse der *BRUCE*-Expression in Plazenta und Dottersack eines WT-Embryos E14,5. Die geladenen Proteinmengen wurden mit einem Actin-Antikörper kontrolliert. (B) *In situ*-Hybridisierung mit radioaktiv-markierter *antisense BRUCE*-Riboprobe auf 8 µm dicken Radialschnitten der Plazenta E14,5 eines WT (*BRUCE*<sup>+/+</sup>)- und eines *Knockout*-Embryos (*BRUCE*<sup>-/-</sup>). *BRUCE* wird hauptsächlich in den diploiden Trophoblastzellen des Labyrinthes und des Spongiotrophoblasten exprimiert. In geringerem Maße konnte *BRUCE*-mRNA auch in Riesenzellen, in fetalen Endothelzellen und im viszeralen Dottersack detektiert werden. Auf *Knockout*-Gewebe ist kein spezifisches Signal nachweisbar. Die Spezifität der Reaktion wurde zusätzlich durch Hybridisierung einer *sense* Probe kontrolliert. Maßstab: 1 mm.

*BRUCE*-Transkripte konnten in allen untersuchten Stadien mit vergleichbarem Verteilungsmuster nachgewiesen werden, wobei die Menge der mRNA mit zunehmender Reife der Plazenta leicht abzunehmen schien (Daten nicht gezeigt). *BRUCE* wird in allen Gewebeschichten der Plazenta sowie im viszeralen Dottersack exprimiert (Abb. 18B). Besonders hohe mRNA-Level traten in Zellverbänden des Spongiotrophoblasten auf, dagegen schien die *BRUCE*-Expression in den Trophoblast-Riesenzellen reduziert. Im Labyrinth und der Chorionplatte wurden die *BRUCE*-Transkripte hauptsächlich in den diploiden Trophoblastzellen, in geringerem Maße aber auch in den fetalen Endothelzellen detektiert. In plazentalen Gewebeschnitten von *Knockout*-Embryonen konnte spezifische Boten-RNA ausschließlich im heterozygoten maternalen Anteil der Plazenta nachgewiesen werden.

#### *Die histologische Analyse des extra-embryonalen Gewebes*

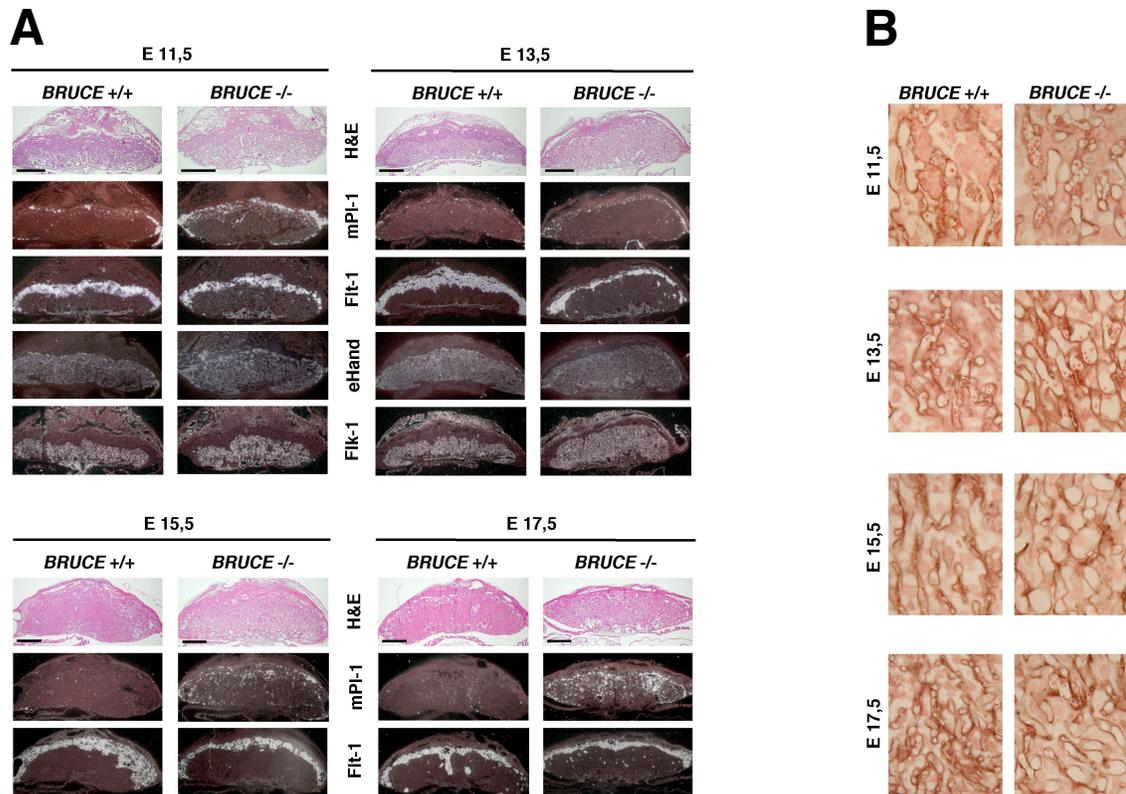
Wie bereits erwähnt, erschien die Plazenta der *BRUCE*-Mutanten generell kleiner als das Organ der Wildtyp-Embryonen, in Bezug auf die Färbung des Gewebes sehr blass (Abb. 19A) und zeigte sehr früh eine deutliche Verzögerung ihrer Gewichtsentwicklung. Die Verbindung zwischen Allantois und Chorion und damit der Beginn der Plazentamorphogenese wurde durch den Verlust des *BRUCE*-Proteins nicht beeinflusst. In frühen Stadien ihrer Entwicklung (E9,5 bis E11,5) wurden in der *Knockout*-Plazenta bis auf eine leichte Reduktion der Spongiotrophoblastschicht keine signifikanten Veränderungen beobachtet. Alle typischen Trophoblaststrukturen konnten in den histologischen Präparationen deutlich voneinander abgegrenzt werden. Sowohl die Chorionplatte als auch die Anzahl der Trophoblast-Riesenzellen erschienen ebenso wie die beginnende Infiltration des späteren Labyrinthsystems durch die embryonalen Blutgefäße unverändert (Abb. 19B und C). Während des weiteren Reifungsprozesses der Plazenta (E13,5 bis E17,5) wurde die Reduktion der Spongiotrophoblastzone in den *BRUCE*-Mutanten zunehmend deutlicher und die Trophoblast-Zellen dieser Schicht, die Glycogenzellen ausgenommen, erschienen sichtlich vergrößert. Diese Tendenz bestätigte sich auch in einer mittels *in situ*-Hybridisierung durchgeführten Markeranalyse der sich entwickelnden Plazenta zwischen E9,5 und E17,5 (Abb. 20A und 21). Durch die gezielte Mutagenese des Mausgenoms wurden bis zum heutigen Zeitpunkt mehr und mehr Faktoren bekannt, die während der Plazentaentwicklung



**Abb. 19. Morphologie und Histologie.** (A) Ventrale Ansicht einer WT (+/+)- und einer *Knockout* (-/-)-Plazenta, Stadium E17,5. Die blassere Farbe des Gewebes weist auf Störungen der Vaskularisierung hin. Maßstab: 0,5 cm. (B) H/E-gefärbte Radialschnitte der WT- und KO-Plazenta zu unterschiedlichen Stadien ihrer Entwicklung. Alle charakteristischen Strukturen sind deutlich voneinander abzugrenzen (de, Decidua; sp, Spongiotrophoblast; la, Labyrinth; ch, Chorionplatte; gi, Riesenzellen). Bildung der Chorioallantois sowie Gewebe der Decidua und Anzahl der Riesenzellen erscheinen normal. Der Spongiotrophoblast der KO-Plazenta ist deutlich reduziert und die Gewebestruktur des Labyrinthsystems scheinbar aufgelockert. Maßstab: 0,5 mm bei 50facher Vergrößerung. (C) 400fache Vergrößerung von Labyrinth und Spongiotrophoblast. Die fetalen Blutgefäße (Pfeilspitze) und maternalen Sinusoide (Stern) sind in frühen Stadien in normaler Anzahl vorhanden und haben engen Kontakt. Ab E13,5 setzt in der KO-Plazenta eine Verzögerung der Labyrinth-Morphogenese ein. Die Anzahl der Trophoblasten scheint in beiden Schichten stark reduziert und die Zellen wirken zunehmend vergrößert. Maßstab: 10 µm.

eine grundlegende Rolle spielen. So wurden z. B. spezielle Wachstums- oder Transkriptionsfaktoren sowie Oberflächenrezeptoren gefunden, die an Differenzierung und Proliferation der unterschiedlichen Zelltypen beteiligt sind (Rossant und Cross, 2001). Sie zeigen sehr spezifische Expressionsmuster und eignen sich daher gut, um einzelne Zellspezies *in situ* voneinander zu unterscheiden. In dieser Studie wurden die Rezeptor-Tyrosinkinase Flt-1 (*fms-like tyrosine kinase*, Hirashima et al., 2003) und der Spongiotrophoblast-spezifische Marker Tpbp/4311 (Lescisin et al., 1988) herangezogen, um die Differenzierung der Trophoblastzellen des ekto-plazentalen Konus in die Spongiotrophoblast-Zellen nachzuweisen. In der Plazenta der *BRUCE*-Mutanten war die durch Flt-1- und 4311-exprimierende Zellen gebildete Schicht des Spongiotrophoblasten in allen untersuchten Stadien deutlich reduziert. Interessante Veränderungen wurden auch bei der Analyse der für die Trophoblast-Riesenzellen spezifischen Expression der Polypeptidhormone Pl-1 (*placental lactogen 1*; Colosi et al., 1987) und Proliferin (Corbacho et al., 2002) beobachtet. Neben der dem Spongiotrophoblast aufliegenden einzelligen Schicht aus Riesenzellen wurden ab dem Stadium E11,5 weitere Pl-1-exprimierende Zellen in der *Knockout*-Plazenta gefunden. Anfangs waren diese Zellen ausschließlich im Spongiotrophoblast verteilt. Ab E15,5 wurden sie aber auch im Labyrinth sichtbar. Die Zellen erschienen im Vergleich zu den normalen Trophoblasten des gleichen Typs deutlich vergrößert, sie erreichten jedoch nicht die typische Morphologie der Riesenzellen.

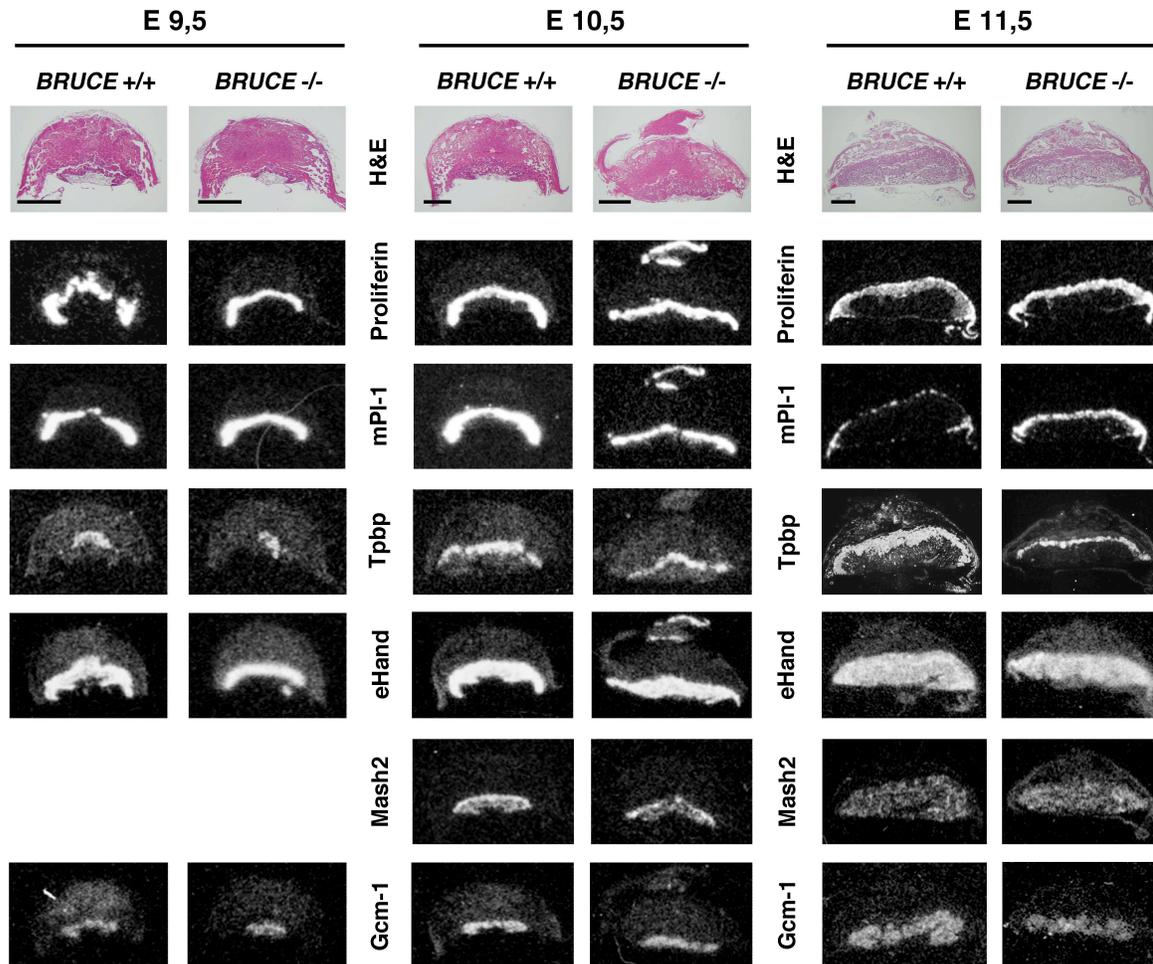
Zusätzliche Marker wie Mash2 (Guillemot et al., 1994), eHand (Scott et al., 2000), Gcm1 (Schreiber et al., 2000) und Flk-1 (Dumont et al., 1995) wurden hinsichtlich ihrer Expression untersucht, um die Differenzierung dieser und weiterer Trophoblastspezies sowie fetaler Endothelzellen im plazentalen Labyrinth nachzuweisen. Alle Zelltypen, sowohl Flk-1-exprimierende Endothelzellen als auch die Mash2- und eHand-exprimierenden Trophoblastzellen, wurden in vergleichbarer Distribution in WT- und *BRUCE*<sup>-/-</sup>-Plazenta vorgefunden. Die für die Bildung der labyrinthären Syncytiotrophoblasten notwendige Gcm1-Expression war ebenfalls nicht gestört. Des Weiteren konnte keine Fehlregulation der bHLH (*basic helix-loop-helix*)-Transkriptionsfaktoren Mash2 und eHand detektiert werden. Diese beiden Proteine sind u. a. Schlüsselregulatoren des Gleichgewichtes zwischen Spongiotrophoblast-Erhaltung und Riesenzell-Differenzierung (Cross, 2000).



**Abb. 20. Morphologie: Markeranalyse der sich entwickelnden Plazenta.** (A) *In situ*-Hybridisierung mit radioaktiv-markierten *antisense* Riboprobe auf seriellen Schnitten der WT (*BRUCE*<sup>+/+</sup>)- und *Knockout* (*BRUCE*<sup>-/-</sup>)-Plazenta zwischen E11,5 und E17,5. Die Expression spezifischer Gene wurde nachgewiesen, um die unterschiedlichen Trophoblast-Strukturen der Plazenta zu unterscheiden. Plazentales Lactogen (PI-1) wird in Trophoblast-Riesenzellen und die Rezeptor-Tyrosinkinase Flt-1 in Spongiotrophoblast-Zellen exprimiert. Flk-1 (*fetal liver kinase 1*) wird spezifisch in fetalen Endothelzellen exprimiert und wurde daher als Marker für die Labyrinthzone herangezogen. Die mRNA des Transkriptionsfaktors eHand kann in diploiden Trophoblastzellen des Labyrinthes, des Spongiotrophoblasten sowie in Trophoblast-Riesenzellen detektiert werden. Alle typischen Gewebestrukturen sind in der *BRUCE*<sup>-/-</sup>-Plazenta ausgebildet, der Spongiotrophoblast ist jedoch in allen Stadien stark reduziert und es wurde mit steigendem Alter der Plazenta eine zunehmende Zahl PI-1-exprimierender Zellen beobachtet. Maßstab: 1 mm. (B) Immunhistochemische Färbung der Basallamina fetaler Blutgefäße im Labyrinth der Plazenta mittels eines gegen Laminin gerichteten Antikörpers. Die stark erweiterten Gefäße weisen auf eine Verzögerung der Entwicklung des labyrinthären Blutgefäßsystems der *Knockout*-Plazenta hin.

Trotz der normalen Expression dieser für die Organogenese essentiellen Faktoren wurden weitere Störungen im Verlaufe der Plazentaentwicklung beobachtet. In Betrachtung der Entwicklung der Labyrinthzone, konnte festgestellt werden, dass in den frühen Stadien bis E11,5 (teilweise bis E13,5) sowohl die Anzahl als auch die Beschaffenheit der fetalen Blutgefäße und maternalen Sinusoide in WT- und *Knockout*-Plazenta vergleichbar waren. Das Labyrinth war von der Chorionplatte bis hin zum Spongiotrophoblast gleichmäßig infiltriert und beide Blutsysteme kamen über die

Plazentaschranke miteinander in engen Kontakt. Während das Labyrinth der WT-Plazenta durch intensive Zellproliferation und *Branching*-Morphogenese eine gleichmäßige und kompakte Gewebestruktur ausbildete, war dieser Entwicklungsprozess in der *Knockout*-Plazenta ab dem Embryonalstadium 13,5 deutlich verzögert. Fetale und mütterliche Kapillaren wirkten stark erweitert und das gesamte Gewebe dadurch sehr aufgelockert (Abb. 19).



**Abb. 21. Differenzierung: Markeranalyse der frühen Plazentaentwicklung (E9,5 bis E11,5).** *In situ*-Hybridisierung mit radioaktiv-markierten *antisense* Riboproben bzw. Oligonukleotid-Sonden auf seriellen Schnitten der WT (*BRUCE*<sup>+/+</sup>)- und *Knockout* (*BRUCE*<sup>-/-</sup>)-Plazenta. Die Expression spezifischer Gene wurde verfolgt, um die Differenzierung unterschiedlicher Trophoblastspezies nachzuweisen. Plazentales Lactogen (Pl-1) sowie Proliferin werden in Trophoblast-Riesenzellen exprimiert und *Tpbp* ist spezifisch für die Zellen des Spongiotrophoblasten. Die mRNA der Transkriptionsfaktoren *eHand* und *Mash2* kann in diploiden Trophoblastzellen des Labyrinthes sowie des Spongiotrophoblasten und *eHand* zusätzlich in Trophoblast-Riesenzellen detektiert werden. Die *Gcm1*-Expression beschränkt sich auf die Elongations- und Fusionsbereiche der Syncytiotrophoblasten. Alle typischen Trophoblastspezies sind auch in der *BRUCE*<sup>-/-</sup>-Plazenta nachzuweisen, man beachte die Reduktion der Anzahl *Tpbp*-exprimierender Zellen.

Diese Beobachtungen konnten mittels Immunhistochemie bestätigt werden. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen Laminin wurde die Basallamina der fetalen Blutgefäße in den Gewebeschnitten sichtbar gemacht. Die Gefäße im Labyrinth der *BRUCE*-defizienten Plazenten zeigten eine gestörte *Branching*-Morphogenese, was neben der deutlichen Erweiterung der Gefäße auch durch die Variabilität ihrer Größe und durch ihren ungleichmäßigen Querschnitt gut zu erkennen war (Abb. 20B).

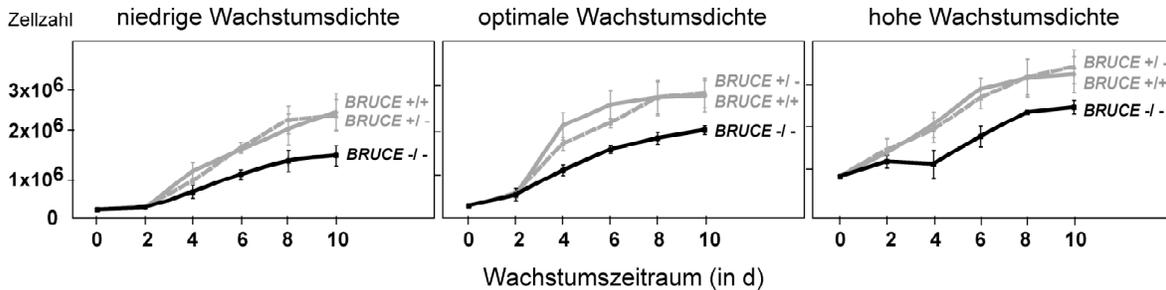
Wie bereits für den *BRUCE*<sup>-/-</sup>-Embryo beschrieben, so fiel auch im extra-embryonalen Gewebe des entsprechenden Genotyps eine Verzögerung der Erythrozytenreifung auf. In der extra-embryonalen Zirkulation eines WT-Embryos befinden sich bis zum Tag 11,5 der Embryonalentwicklung ausschließlich die kernhaltigen Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen. Zwischen E12 und E15 wird der Zellkern im Verlaufe der terminalen Differenzierung abgestoßen und nach E16 sind alle Erythrozyten voll ausgereift und damit kernlos (Kaufmann, 1992). In den *BRUCE*-Mutanten besaßen am Tag E15,5 noch ungefähr 50 % aller roten Blutkörperchen ihren Zellkern, wohingegen in den Kapillaren der WT-Plazenta keine kernhaltigen Zellen mehr sichtbar waren (Abb. 19C). Auch am Tag E17,5 wurden noch einzelne kernhaltige Erythrozyten in der fetalen Blutzirkulation des plazentalen Labyrinthes der transgenen Tiere gefunden.

### 2.4.3. Charakterisierung embryonaler Fibroblasten

Um Hinweise auf die Ursachen für die beschriebenen Veränderungen in den embryonalen und extra-embryonalen Geweben zu erhalten, wurden die diploiden Fibroblasten der *Knockout*-Embryonen als Modellsystem für Untersuchungen zu Apoptose- und Proliferationsverhalten *BRUCE*-defizienter Zellen herangezogen. Fibroblasten sind direkte Abkömmlinge des Mesenchyms und stellen *in vivo* Bindegewebszellen im eigentlichen Sinne dar. Lichtmikroskopisch ist der Fibroblast eine fusiforme, fortsatzreiche Zelle mit einer Größe von ca. 30 µm. Diploide Fibroblasten bzw. MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) können verhältnismäßig leicht aus Embryonen isoliert und als Primärkultur weitergeführt werden. Für die im folgenden beschriebenen Experimente wurden primäre MEF-Linien 13,5 Tage alter homozygoter WT-, heterozygoter und homozygoter *Knockout*-Embryonen etabliert. Mit Isolaten aus früheren oder späteren Embryonalstadien wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt.

### 2.4.3.1. Das Wachstum embryonaler Fibroblasten unter Kulturbedingungen

Zu Beginn der Kulturperiode waren die *Knockout*-MEFs von den entsprechenden WT- und heterozygoten Zellen hinsichtlich ihrer Morphologie und Größe nicht zu unterscheiden. Jedoch war die Anzahl der Zellen, die aus den transgenen Organismen isoliert werden konnte, deutlich geringer.



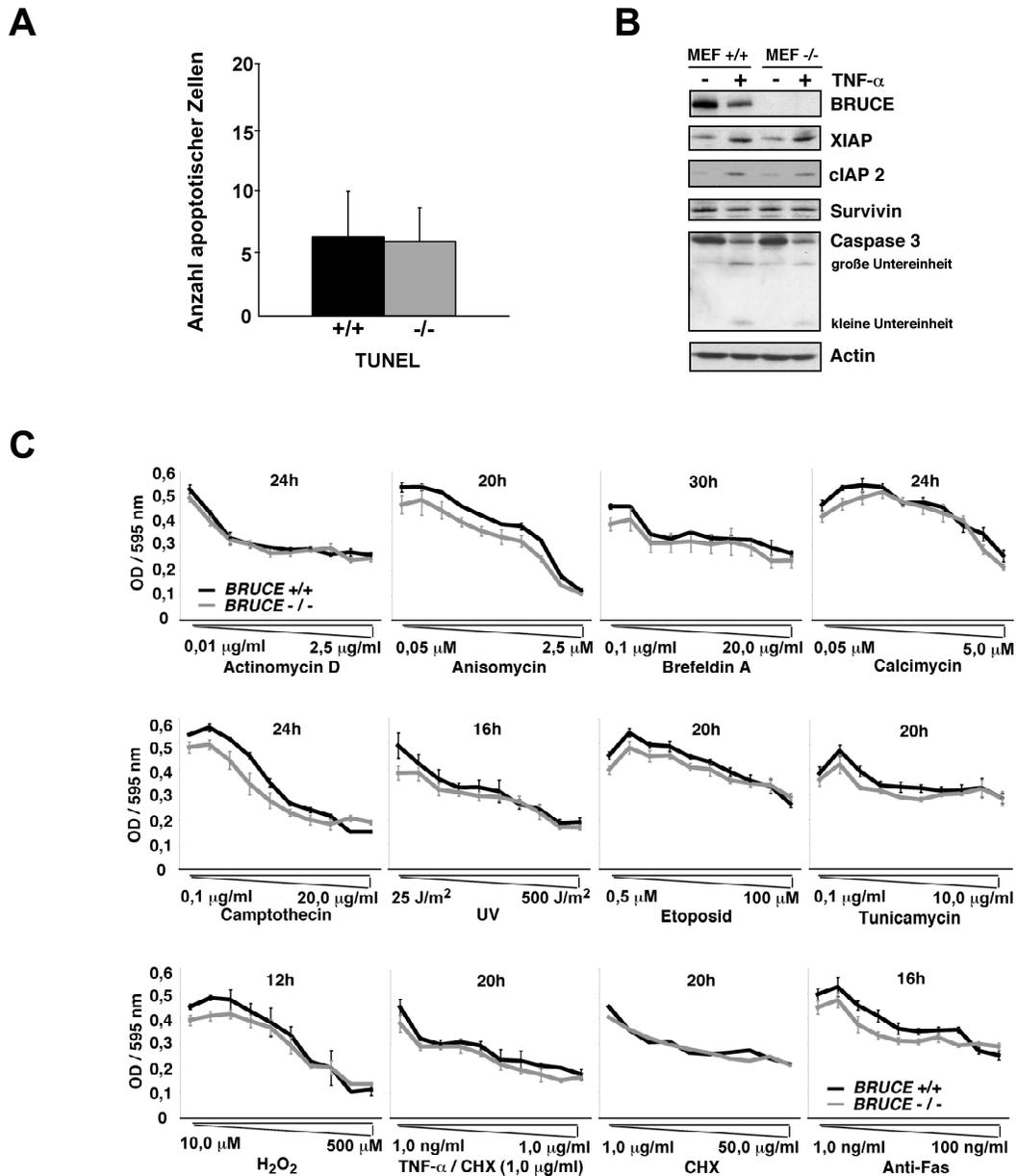
**Abb. 22. Wachstumsverhalten embryonaler Fibroblasten unter Kulturbedingungen.** Für die Erstellung der Wachstumskurven wurden primäre Fibroblasten aus WT (*BRUCE*<sup>+/+</sup>), heterozygoten (*BRUCE*<sup>+/-</sup>) und *BRUCE*-defizienten (*BRUCE*<sup>-/-</sup>) Embryonen im Stadium E13,5 isoliert. Die Zellen wurden in suboptimal niedriger ( $1 \times 10^5$  Zellen pro 6cm-Schale), optimaler ( $3 \times 10^5$  Zellen pro 6cm-Schale) und suboptimal hoher Wachstumsdichte ( $9 \times 10^5$  Zellen pro 6cm-Schale) ausgesät und die Zellzahl nach jeweils 2, 4, 6, 8 und 10 Tagen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils vier isolierten MEF-Linien eines jeden Genotyps.

*BRUCE*-defiziente Zellen zeigten im Vergleich zu den WT-Fibroblasten unter den gleichen definierten Kulturbedingungen ein verändertes Wachstumsverhalten (Abb. 22). Die deutlich flacher verlaufende Wachstumskurve der *Knockout*-Zellen implizierte eine drastische Verringerung der Zellzahl bzw. eine Verlangsamung des Wachstums. Die durchschnittliche Verdopplungszeit der WT-Fibroblasten betrug unter optimalen Bedingungen in ihrer exponentiellen Wachstumsphase ca. 24 h. Eine Verdopplung der Zellzahl der *BRUCE*-Mutanten konnte hingegen erst nach ungefähr 40 h verzeichnet werden. Zusätzlich wurde eine wesentlich geringere Zelldichte der *Knockout*-Kultur nach Einsetzen der Kontaktinhibition beobachtet. Sie betrug lediglich etwa 70 % der Kulturdichte der Kontrollzellen.

### 2.4.3.2. Apoptose und Proliferation

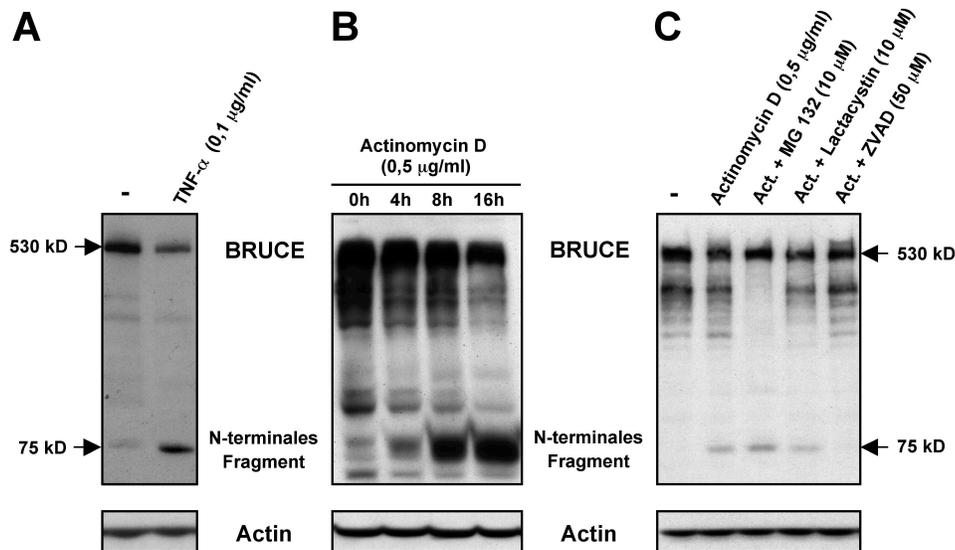
Da BRUCE der IAP-Familie Apoptose-inhibitorischer Proteine angehört, wurde zunächst untersucht, ob die Ursachen für die beobachteten Abweichungen in der *Knockout*-Kultur in einem veränderten Apoptoseverhalten der Fibroblasten liegen. Parallel zu den Zellzählungen für die Wachstumskurven wurden mittels Vitalfärbung mit dem Farbstoff Trypanblau tote und sterbende Zellen sichtbar gemacht und deren Anzahl dokumentiert. Die verringerte Zellzahl in der *Knockout*-Kultur konnte jedoch nicht auf einen höheren Anteil sterbender Zellen in der Kultur zurückgeführt werden. Auch mittels TUNEL-Assay wurden keine Unterschiede in der Apoptoserate der transgenen und der WT-Fibroblasten festgestellt. Mit fortschreitender Apoptose wird in den sterbenden Zellen die genomische DNA fragmentiert, es entstehen sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche. Diese Strangbrüche können mit Hilfe der TUNEL-Reaktion (*TdT-mediated dUTP nick end labeling*) detektiert werden. Die Anzahl TUNEL-positiver Zellen in den unterschiedlichen, nicht synchronisierten MEF-Kulturen war zu jedem Zeitpunkt vergleichbar (Abb. 23A).

Zusätzlich erfolgten Untersuchungen sowohl zur spezifischen Induktion als auch zum zeitlichen Verlauf der Apoptose in den primären Fibroblasten. In Zytotoxizitäts-Assays wurde die Sensitivität der Zellen gegenüber Substanzen getestet, die z. B. durch das Hervorrufen von DNA-Schäden, durch oxidativen Stress oder über eine Blockierung der Proteinsynthese, Behinderung der Protein-Translokation bzw. eine Aktivierung von Todesrezeptoren den programmierten Zelltod induzieren. Das Absterben der Zellen wurde sowohl in Abhängigkeit der Konzentration als auch der Wirkdauer der einzelnen Stimuli beobachtet (Abb. 23C). Das Fehlen des BRUCE-Proteins in den primären Fibroblasten der transgenen Organismen hatte keine veränderte Reaktion bzw. erhöhte Sensitivität der Zellen gegenüber den getesteten Apoptose-induzierenden Substanzen zur Folge. Aus diesen Resultaten ergab sich die Frage nach einer eventuellen Kompensation der anti-apoptotischen BRUCE-Funktion durch eine verstärkte Expression anderer Proteine der IAP-Familie. Dieses Phänomen wurde beispielsweise für Zellen beschrieben, die XIAP, das Protein mit der stärksten anti-apoptotischen Aktivität, nicht mehr synthetisieren (Harlin et al., 2001). Im *Western blot* wurde daher die Expression verschiedener IAP-Proteine wie XIAP, cIAP-2 oder Survivin in WT- und *BRUCE*-defizienten Fibroblasten überprüft (Abb. 23B).



**Abb. 23. Apoptose embryonaler Fibroblasten.** (A) Quantifizierung der Apoptoserate in nicht synchronisierter Kultur von WT (+/+)- und *Knockout* (-/-)-Fibroblasten mittels TUNEL-Assays. Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl TUNEL-positiver Zellen im mikroskopischen Gesichtsfeld bei 50facher Vergrößerung. (B) Bestimmung der Expressionslevel von IAP-Proteinen und Caspase-3 in WT (+/+)- und *BRUCE*-defizienten (-/-) Fibroblasten mittels *Western blot* von Zell-Lysaten (50  $\mu$ g Gesamtprotein). Die Induktion der Apoptose erfolgte mit 100 ng TNF- $\alpha$  pro ml Wachstumsmedium für 16 h. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen geerntet. Die geladenen Proteinmengen wurden mit Hilfe eines Antikörpers gegen Actin kontrolliert. (C) Sensitivität der WT (*BRUCE*+/-) und *Knockout* (*BRUCE*-/-)-Fibroblasten gegenüber unterschiedlichen apoptotischen Stimuli. Die Zellen wurden in der jeweils angegebenen Zeit den in den einzelnen Diagrammen angegebenen Apoptose-induzierenden Substanzen ausgesetzt. Das Überleben der Zellen ist in Abhängigkeit der Konzentration der einzelnen Substanzen dargestellt und wurde colorimetrisch durch Kristallviolett-Färbung der lebenden Fibroblasten ermittelt (arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung aus drei Werten). Als Maß für die Apoptoserate diente die optische Dichte (OD), ermittelt bei 595 nm.

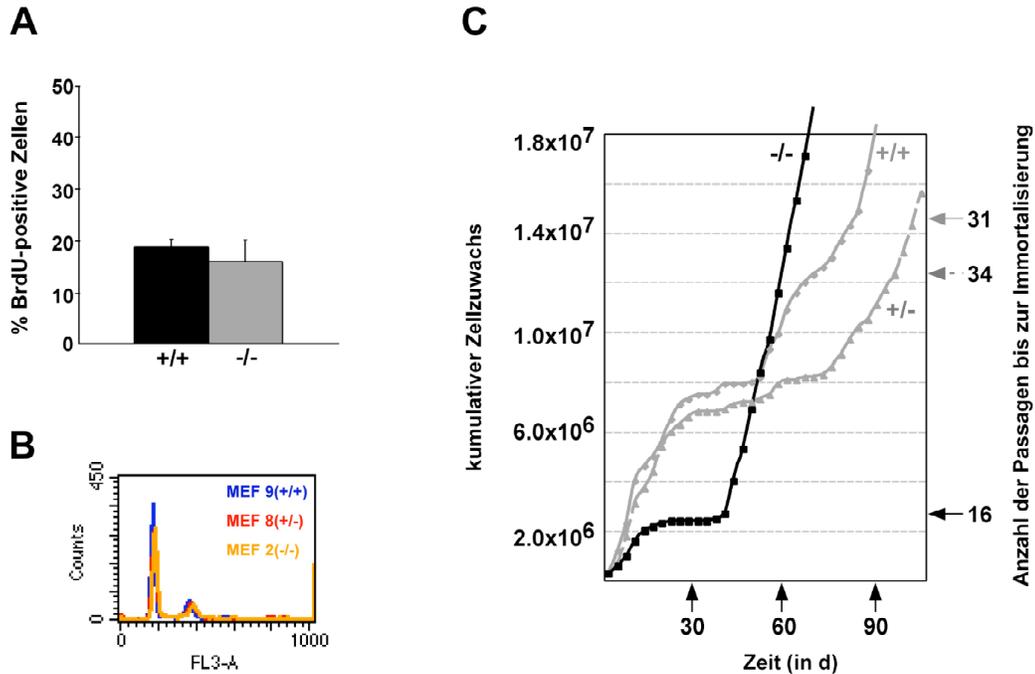
Sowohl in den WT- als auch in den *Knockout*-Zellen konnten nach Induktion der Apoptose durch TNF- $\alpha$  wie erwartet erhöhte Mengen von XIAP und cIAP-2 nachgewiesen werden. Es gab jedoch zwischen den einzelnen Zell-Linien keine Unterschiede bezüglich des Expressionsniveaus dieser IAPs. Auch die Aktivierung der Effektor-Caspase-3 erfolgte in gleichem Maße, und es konnte keine Akkumulation der aktivierten Caspase-3 detektiert werden.



**Abb. 24. Spezifische Spaltung von BRUCE durch aktivierte Caspasen.** BRUCE wird während der Apoptose proteolytisch prozessiert. Die Apoptosestimulation erfolgte in MEFs durch Inkubation der Zellen mit TNF- $\alpha$  für 16 h (A) bzw. Actinomycin D für 4, 8 und 16 h (B). Anschließend wurden die Zellen lysiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels *Western blot* mit den entsprechenden Antikörpern. (C) Die Fragmentierung von BRUCE kann durch die Blockierung aktivierter Caspasen aber nicht durch Inhibition des Proteasoms verhindert werden. Die MEFs wurden 1 h mit ZVAD, MG132 bzw. Lactacystin vorinkubiert, anschließend wurde durch Zugabe von Actinomycin D Apoptose induziert und nach 4 h Zell-Lysate hergestellt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels *Western blot*.

Interessanterweise scheint sich im Gegensatz zu anderen IAPs die nachweisbare BRUCE-Menge nach Apoptosestimulation zu verringern. Dies ist allerdings nicht auf eine Änderung des Expressionsniveaus zurückzuführen. Nach Induktion der Apoptose durch unterschiedliche Stimuli wird das funktionale BRUCE-Protein der vollen Länge gespalten und es kommt in der Zelle zur Akkumulation eines N-terminalen Fragments mit einer Größe von ca. 75 kDa (Abb. 24A und B). Dieser Abbau kann durch Inhibitoren des Proteasoms wie z. B. MG132 oder Lactacystin nicht verhindert werden. BRUCE scheint vielmehr ein Substrat aktivierter Caspasen zu sein, denn durch eine Blockierung

der Caspase-Aktivität in der Zelle durch den unspezifischen Caspase Inhibitor ZVAD kann die Spaltung von BRUCE und damit die Entstehung des N-terminalen Fragments unterbunden werden (Abb. 24C). Ein stabiles C-terminales BRUCE-Fragment konnte in den Fibroblasten bislang nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).



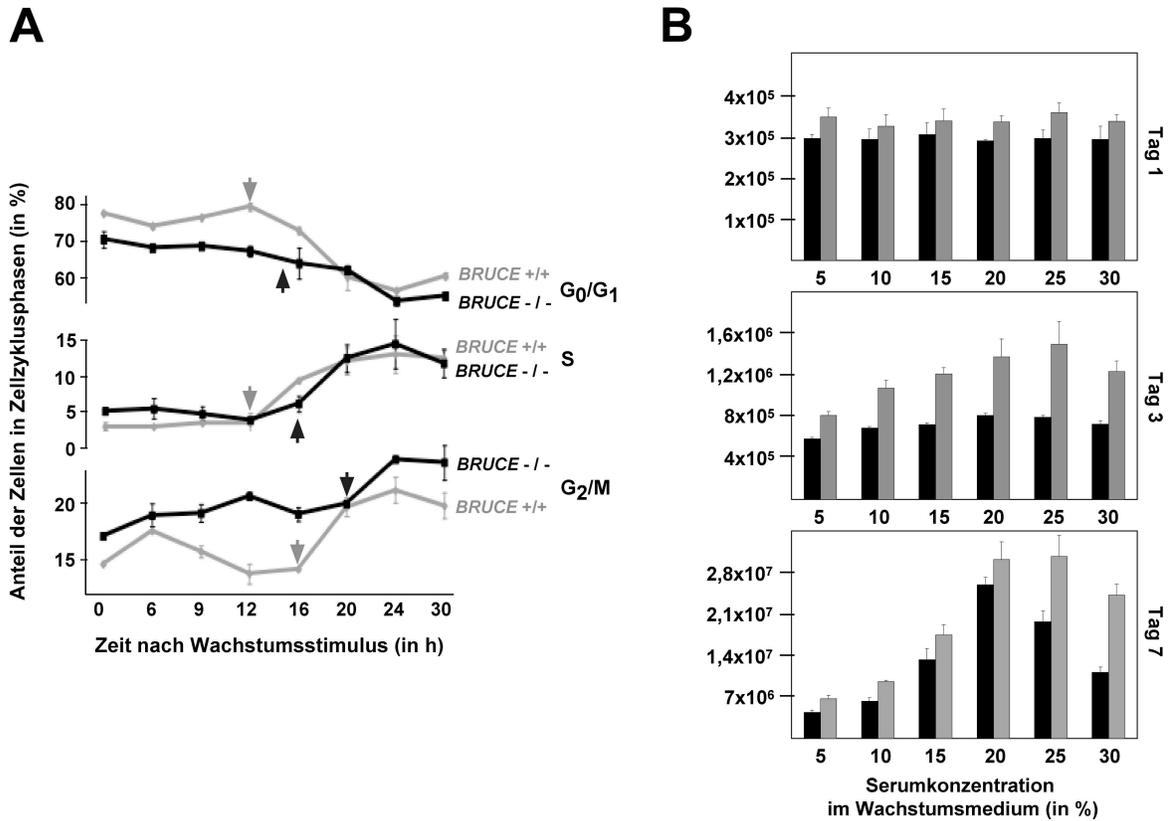
**Abb. 25. Proliferationsverhalten und Lebensspanne der primären Fibroblasten.** (A) Quantifizierung des Anteils der in S-Phase befindlichen WT (+/+)- und *Knockout* (-/-)-Fibroblasten an der Gesamtzellzahl in nicht synchronisierter Kultur durch BrdU-Inkorporation. Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl BrdU-positiver Zellen im mikroskopischen Gesichtsfeld bei 50facher Vergrößerung. (B) FACS (*fluorescence-activated cell sorting*)-Analyse des DNA-Gehalts der einzelnen Zellen einer WT (+/+)-, heterozygoten (+/-) und *Knockout* (-/-)-Kultur. Dargestellt ist die Verteilung der Zellen in G<sub>1</sub>- (Peak links, einfacher DNA-Gehalt, ca. 70 %), S- (Mitte, erhöhter DNA-Gehalt, ca. 10 %) bzw. G<sub>2</sub>/M-Phase (Peak rechts, doppelter DNA-Gehalt, ca. 20 %) des Zellzyklus. (C) Lebensspanne und Immortalisierung der MEFs (WT: +/+, heterozygot: +/-, *Knockout*: -/-) in kontinuierlicher 3T3-Kultur (alle 3 Tage Transfer von 3 × 10<sup>5</sup> in neue 6cm-Zellkulturschale). Mit steigender Anzahl der Passagen wurde der kumulative Zellzuwachs in Abhängigkeit der Zeit dokumentiert.

Neben der Fähigkeit, Apoptose zu inhibieren, wurde für einige IAPs, wie z. B. Survivin, auch eine Funktion in der Regulation des Zellzyklus beschrieben (Salvesen und Duckett, 2002). Daher sollte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass der BRUCE-Verlust ursächlich für Änderungen des Proliferationsverhaltens der Zellen verantwortlich sein könnte. In der Kultur nicht synchronisierter Fibroblasten wurden zunächst keine signifikanten Abweichungen in Bezug auf die Verteilung der sich in den einzelnen Zellzyklus-Phasen befindlichen Zellpopulationen beobachtet. Der durch BrdU-

Inkorporation ermittelte Anteil der Zellen in S-Phase lag sowohl in der WT- als auch in der *Knockout*-Kultur bei ungefähr 20 % der Gesamtzellzahl (Abb. 25A). Diese Beobachtung konnte durch eine FACS (*fluorescence-activated cell sorting*)-Analyse des DNA-Gehalts der einzelnen Zellen bestätigt werden. Es gab in den untersuchten Kulturen keine Unterschiede in der prozentualen Verteilung der Zellen in G<sub>1</sub>-, S- bzw. G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus (Abb. 25B). Eine deutliche Veränderung zeigte sich jedoch im Verlauf des Zellzyklus der genetisch manipulierten Fibroblasten. Für die Zellzyklus-Analyse wurden die MEFs durch Kontaktinhibition einerseits und den Entzug von Wachstumsfaktoren andererseits in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase arretiert. Nach erneuter Wachstumstimulation wurde das Durchlaufen des Zellzyklus der nun synchronisierten Zellen mittels FACS-Analyse verfolgt. Zellen mit gestörter *BRUCE*-Expression traten mit einer Verzögerung von ca. 4 h aus der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- in die S-Phase über. In gleichem Maße erfolgten auch der Eintritt in die folgende Mitose-Phase sowie die Beendigung des Teilungszyklus der *Knockout*-Fibroblasten zeitlich verzögert (Abb. 26A).

Eine Ursache für den verzögerten Übergang der *BRUCE*-defizienten Fibroblasten von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase und damit für die Verlängerung des gesamten Zellzyklus liegt möglicherweise in einer gestörten Reaktion der Zellen auf die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren. Um diese Vermutung zu testen, wurden WT- und *Knockout*-MEFs in Medium mit steigender Serumkonzentration (5 % bis 30 %) kultiviert. Während die Kontrollzellen von Beginn der Kulturperiode an proportional zur zunehmenden Konzentration der Wachstumsfaktoren im Medium mit deutlich verstärktem Wachstum und einer höheren Populationsdichte in der Kultur reagierten, benötigten die *Knockout*-Zellen wesentlich länger für die Adaptation an die veränderten Wachstumsbedingungen (Abb. 26B). Eine eindeutige Reaktion konnte erst nach ca. 96 h beobachtet werden.

Zusätzlich zur Analyse des Zellzyklus wurde die Vitalität der Fibroblasten anhand ihrer Lebensspanne bestimmt. Führt man isolierte Fibroblasten als kontinuierliche Primärkultur weiter, proliferieren die Zellen über einen begrenzten Zeitraum und treten dann in eine Phase der mitotischen Stagnation ein. Sie stellen in dieser Phase die Teilung ein und verharren in einem statischen Zustand. Einige Zellen der Kultur, deren Genom sich während der Phase intensiver Proliferation durch Mutation verändert, können diesen postmitotischen Status überwinden und spontan in eine immortalisierte, zu unbegrenztem Wachstum befähigte Form übergehen.



**Abb. 26. Analyse des Zellzyklus.** (A) FACS (*fluorescence-activated cell sorting*)-Analyse des DNA-Gehalts der einzelnen WT (*BRUCE+/+*)- und *Knockout* (*BRUCE-/-*)-Fibroblasten in synchronisierter Kultur. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus in Abhängigkeit der für einen gesamten Teilungszyklus benötigten Zeit. (B) Reaktion der primären WT- (grauer Balken) und *Knockout*-Fibroblasten (schwarzer Balken) auf die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren. Es wurden jeweils  $3 \times 10^5$  Zellen pro 6cm-Kulturschale ausgesät und in Kulturmedium mit unterschiedlicher Serumkonzentration (5 - 30 %) über einen Zeitraum von 7 Tagen kultiviert. Die Zellen wurden jeweils am Tag 1, 3 und 7 gezählt. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) von zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils zwei MEF-Linien eines jeden Genotyps.

Die Lebensspanne der *BRUCE*-defizienten Zellen wurde im Vergleich zu den WT-Zellen durch kontinuierliche 3T3-Kultur (alle 3 Tage Transfer von  $3 \times 10^5$  in neue 6cm-Zellkulturschale) bei gleichbleibenden Bedingungen von der ersten Passage bis zur mitotischen Stagnation und spontanen Immortalisierung ermittelt (Abb. 25C). Während die Fibroblasten der WT-Organismen durchschnittlich nach ungefähr 10 3T3-Passagen in das Stadium der Wachstumskrise eintraten, erreichten die aus den Nullmutanten isolierten Zellen mit nur 5 Transfers eine signifikant geringere Passagenzahl. Nach einer stark verkürzten postmitotischen Periode wurde nach nur 16 Passagen eine schnelle spontane Immortalisierung und ein neuerliches, sehr aggressives Wachstum der *Knockout*-Zellen beobachtet. Zusätzlich stieg der Anteil an Zellen mit mikroskopisch

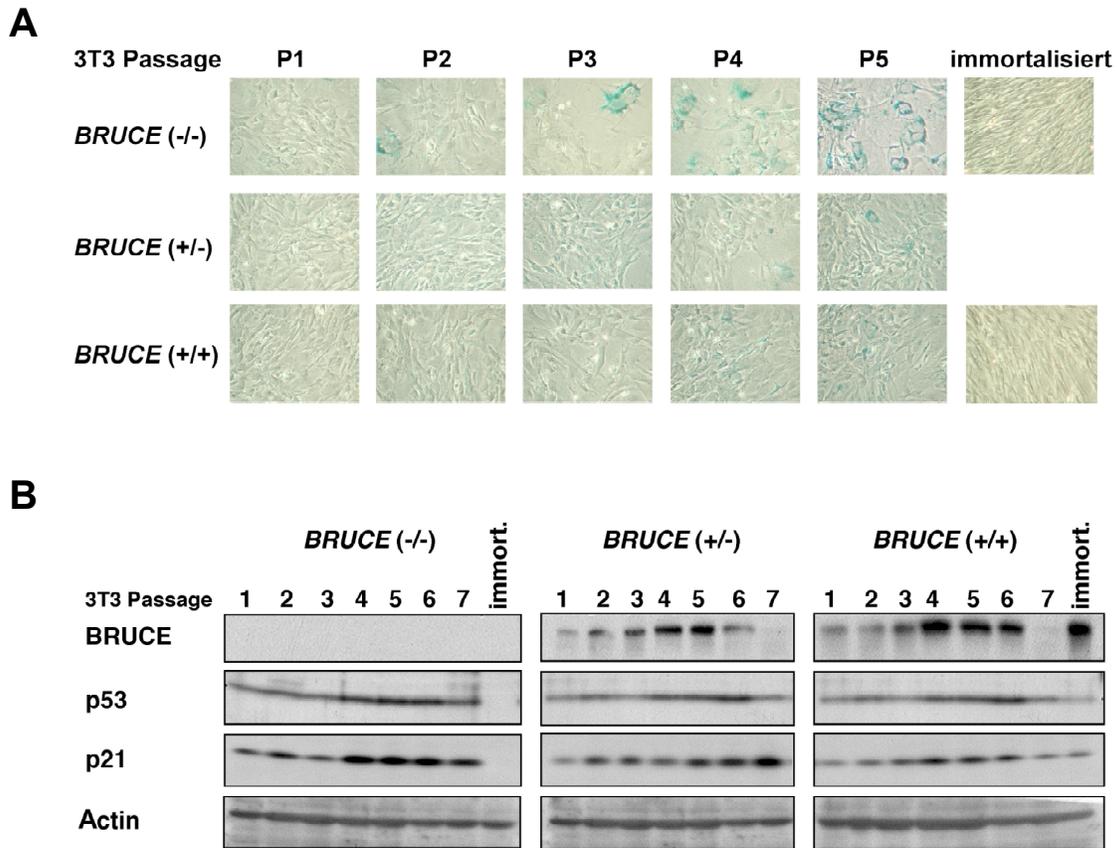
sichtbaren morphologischen Veränderungen, wie z. B. drastischen Vergrößerungen der Zellkörper und unterschiedlicher Größe der Zellkerne, in der Kultur bereits nach wenigen Passagen stark an. Diese morphologischen Alterationen sind typisch für gealterte Zellen im Stadium der Seneszenz. Im Alter nimmt die Größe der Zelle zu und auch die Nuclei und Nucleoli scheinen vergrößert. Cytoskelettale Bestandteile wie Actinfilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente fügen sich zu großen Bündeln und Platten zusammen, wodurch die Zellmotilität verringert wird. Seneszente Zellen zeigen vakuolisierendes Cytoplasma, vergrößerte Golgi-Apparate und Lysomen sowie eine veränderte Lipidzusammensetzung der Membranen. Der Proteingehalt der Zelle steigt mit dem Alter, obwohl die Proteinsynthese kontinuierlich abnimmt. Bestimmte Wachstumsfaktoren, Metalloproteinasen und Matrixproteine werden jedoch verstärkt exprimiert und auch sezerniert (Campisi et al., 2003).

Seneszente Zellen können *in vitro* leicht identifiziert werden. Sie exprimieren eine Isoform der  $\beta$ -Galaktosidase, die ihr Aktivitätsoptimum ausschließlich bei niedrigem pH-Wert erreicht. Nach jeder 3T3-Passage wurden WT-, heterozygote und homozygote *Knockout*-Fibroblasten mit Hilfe des Substrates X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indol- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) auf vorhandene  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität hin getestet. Bereits nach der 2. Passage erschienen in der *Knockout*-Kultur einzelne positive (blaue) Zellen. Nach der 4. Passage wurden mehr als 50 % und nach dem 5. Transfer sogar über 70 % der Zellen im Stadium der Seneszenz detektiert (Abb. 27A). In den Kulturen der WT- und heterozygoten Kontroll-Linien waren zu diesen Zeitpunkten lediglich einzelne gefärbte Zellen zu sehen.

Diese Beobachtungen bestätigten sich in einer Expressionsanalyse weiterer Seneszenzmarker mittels *Western blot*. In alternden Zellen wird beispielsweise der Tumorsuppressor p53 verstärkt synthetisiert. Dies induziert die Transkription verschiedener Gene, einschließlich des CDK (*cyclin-dependent protein kinase*)-Inhibitors p21, und bewirkt bzw. vereinfacht den Eintritt der Zelle in den Zellzyklus- bzw. Seneszenz-Arrest (Campisi, 2001). Parallel zum Erscheinen der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität während der 3. und 4. Passage der *Knockout*-Fibroblasten stieg auch das Expressionsniveau von p53 und p21 sprunghaft an. Im Gegensatz dazu stand der langsame kontinuierliche Anstieg der p53- und p21-Expression in den Kontrollzellen vom Beginn der Kulturperiode bis zum Eintritt in die postmitotische Phase (Abb. 27B). Interessant zeigte sich der Verlauf der *BRUCE*-Expression während der Kulturperiode

der primären Fibroblasten. In Phasen starker proliferativer Aktivität sowie im immortalisierten Stadium erfolgte eine Zunahme des Proteinlevels in der Zelle, wohingegen mit Eintritt der Zellen in die Phase der mitotischen Stagnation eine starke Abnahme der *BRUCE*-Expression zu verzeichnen war.

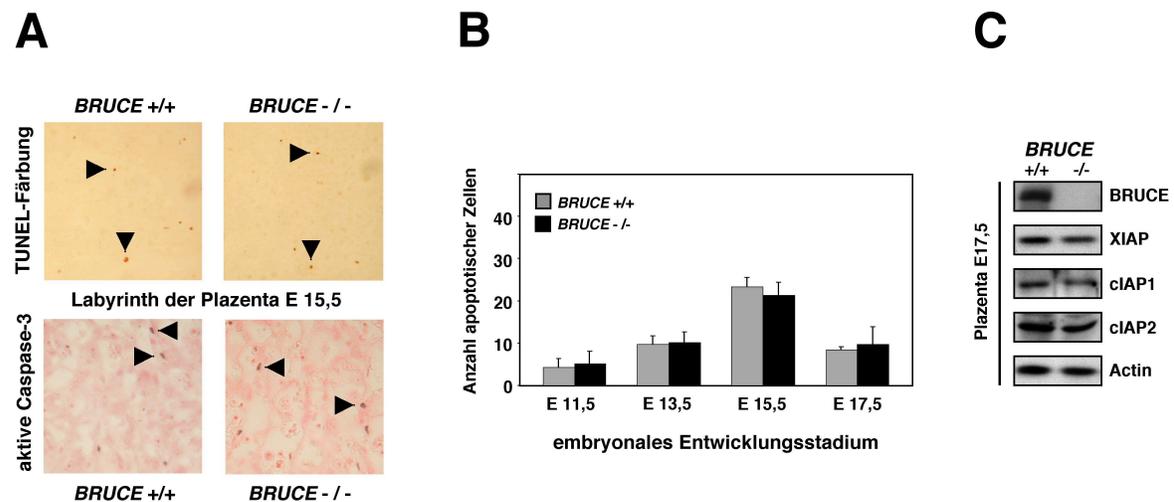
Zusätzlich ist anzumerken, daß die Immortalisierung der *Knockout*-Fibroblasten in jedem Fall mit einem Expressionsverlust von p53 und p21 einherging.



**Abb. 27. Vitalität und Lebensspanne der primären Fibroblasten.** (A) Übergang der teilungsaktiven WT (*BRUCE*<sup>+/+</sup>), heterozygoten (*BRUCE*<sup>+/-</sup>) und homozygoten *Knockout* (*BRUCE*<sup>-/-</sup>)-MEFs in das Stadium der Seneszenz. Mittels X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indol-β-D-Galaktopyranosid)-Färbung bei pH 6,0 wurde die pH-abhängige Aktivität der Seneszenz-aktivierten β-Galaktosidase in den Zellen nachgewiesen. Seneszente Zellen erscheinen unter dem Mikroskop blau. (B) Analyse der *BRUCE*-Expression sowie der Expression der Markergene p53 und p21 während der Kulturperiode der primären Zellen. Die Zellen wurden während der kontinuierlichen 3T3-Kultur (alle 3 Tage Transfer von 3×10<sup>5</sup> in neue 6cm-Zellkulturschale) nach jeder Passage geerntet und Lysate hergestellt. Der Nachweis der angegebenen Proteine erfolgte im *Western blot* mit den entsprechenden Antikörpern.

### 2.4.4. Apoptose und Proliferation im embryonalen und extra-embryonalen Gewebe

Parallel zu den zellbiologischen Untersuchungen der Kulturen primärer embryonaler Fibroblasten erfolgten *in situ*-Experimente zu Apoptose- und Proliferationsverhalten der Zellen in den embryonalen und extra-embryonalen Gewebeverbänden der WT- und *Knockout*-Organismen. Die Apoptoserate wurde *in situ* mittels TUNEL-Assay und immunhistochemischem Nachweis aktivierter Caspase-3 in der Zelle bestimmt. Neben der Plazenta fand u.a. das Gehirn besondere Beachtung in dieser Analyse, da *BRUCE* in verschiedenen Geweben dieses Organsystems sehr stark exprimiert wird. Außerdem spielen während der Entwicklung dieser Organe sowohl Apoptose, z. B. für die Entfernung nicht differenzierter Zellen aus dem neuronalen Gewebeverband, als auch Apoptose-ähnliche Vorgänge, wie z. B. während der Fusion der Syncytiotrophoblasten im Labyrinth der Plazenta, eine bedeutende Rolle (Huppertz und Kingdom, 2004).



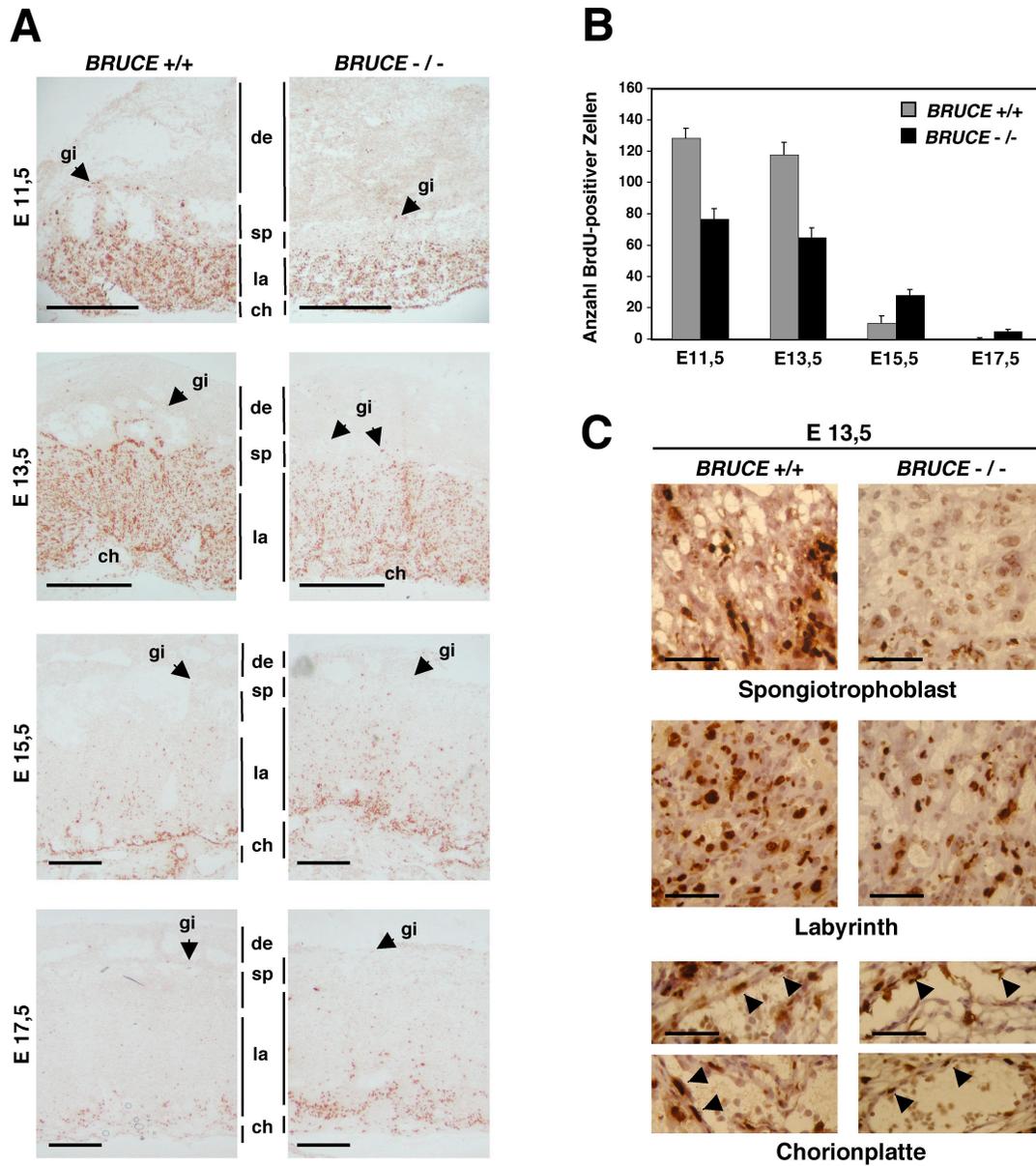
**Abb. 28. Apoptose im extra-embryonalen Gewebe.** (A) Apoptotische Zellen wurden im plazentalen Labyrinth zwischen E9,5 und E17,5 mittels TUNEL-Färbung und immunhistochemischer Detektion der aktivierten Caspase-3 sichtbar gemacht. Als Beispiel ist ein repräsentativer Gewebeausschnitt einer Plazenta am Tag 15,5 der Embryonalentwicklung abgebildet. (B) Quantifizierung der apoptotischen Zellen im Labyrinth. Die TUNEL-positiven Signale wurden bei 200facher Vergrößerung in 5 zufällig gewählten mikroskopischen Gesichtsfeldern dreier unterschiedlicher Organe des jeweiligen Genotyps zwischen E9,5 und E17,5 gezählt. Dargestellt ist ein Vergleich der mittleren Anzahl apoptotischer Zellen ( $\pm$  Standardabweichung) pro Gesichtsfeld in ausgewählten Stadien der Embryonalentwicklung. (C) Bestimmung der Expressionslevel von IAP-Proteinen in Gewebelysaten (50  $\mu$ g Gesamtprotein) von WT (+/+)- und *BRUCE*-defizienten (-/-) Plazentas (E15,5) mittels *Western blot*. Die geladenen Proteinmengen wurden mit Hilfe eines Actin-Antikörpers kontrolliert.

Es gab jedoch in den untersuchten Entwicklungsstadien (E11,5 bis 17,5 für den Embryo bzw. E9,5 bis 17,5 für die Plazenta) keine Hinweise auf eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen in den embryonalen (nicht gezeigt) und extra-embryonalen Geweben der Nullmutanten (Abb. 28A und B). Andere Mitglieder der IAP-Familie, die durch eine verstärkte Expression möglicherweise in der Lage wären, die gestörte anti-apoptotische BRUCE-Funktion zu kompensieren, wurden in den Geweben von WT- und *Knockout*-Embryonen in vergleichbarer Menge detektiert (Abb. 28C).

Abweichungen zwischen WT und *BRUCE*-Mutante konnten jedoch hinsichtlich des Proliferationsverhaltens bestimmter Zelltypen beobachtet werden. Eine detaillierte Quantifizierung der Proliferationsrate in den embryonalen Organen erfolgte nicht, da aufgrund des Plazentadefekts nicht nachweisbar ist, ob eventuelle Veränderungen der proliferativen Aktivität der Zellen primär durch den BRUCE-Verlust oder sekundär durch die funktionelle Störung der Plazenta ausgelöst werden.

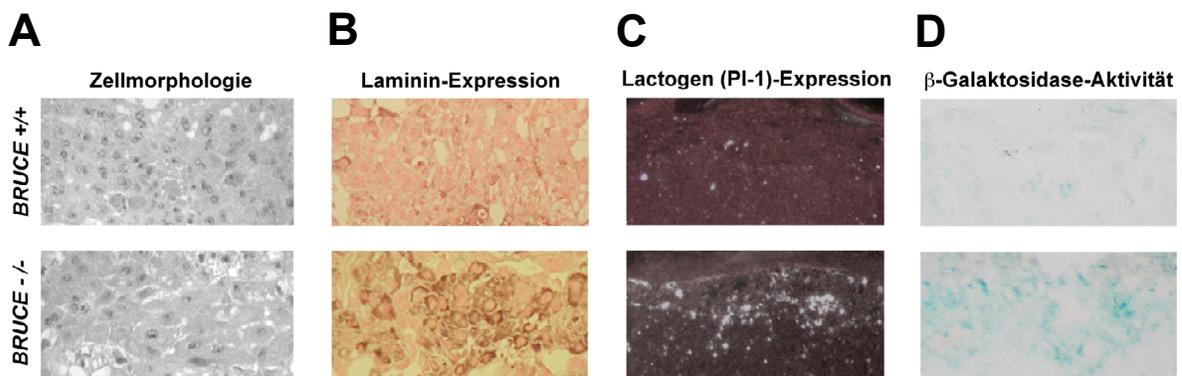
Die mittels BrdU-Inkorporation durchgeführte Analyse des Proliferationsmusters im extra-embryonalen Gewebe ließ eine drastische Verschiebung der Anzahl teilungsaktiver Zellen in der *Knockout*-Plazenta erkennen (Abb. 29A bis C). In allen untersuchten Stadien (E9,5 bis 17,5) konnten nahezu keine proliferierenden Zellen im Spongiotrophoblast detektiert werden. Das erklärt die Reduktion der Zellzahl und damit der Dicke dieser Struktur. Auch in der Labyrinthzone wurde während der Hauptphase der Organogenese zwischen E9,5 und E13,5 eine deutlich verminderte Anzahl BrdU-positiver Zellen bestimmt (55 - 60 % der WT-Kontrolle). Da die Endothelzellen der Blutgefäße in Nabelschnur und Chorionplatte eine annähernd normale Teilungsrate aufweisen, kann angenommen werden, dass sich dieser Effekt hauptsächlich auf die Trophoblast-Zellen der *Knockout*-Plazenta beschränkt. Die Trophoblasten bilden das Grundgerüst des Labyrinthsystems. Eine intensive Proliferation dieser Zellen ist Voraussetzung für den *Branching*-Prozess und die gleichmäßige Vaskularisierung des Gewebes, und somit erscheint die Anzahl teilungsaktiver Trophoblast- und Endothelzellen im Labyrinth in gleichem Maße reduziert (Abb. 29C).

Wie bereits in Kapitel 2.4.2.2. erwähnt, wurde eine Vergrößerung sowohl des Zellkörpers als auch der Zellkerne einzelner Trophoblasten im Spongiotrophoblast sowie im Labyrinth der *BRUCE*<sup>-/-</sup>-Plazenta beobachtet. Mittels *in situ*-Hybridisierung ließ sich in diesen Zellen außerdem die für Riesenzellen typische Expression des Wachstumshormons Lactogen (Pl-1) nachweisen.



**Abb. 29. Proliferation der Zellen in der Plazenta.** (A) Das Proliferationsmuster der Zellen wurde durch immunohistochemische Detektion der BrdU-Inkorporation bestimmt. Das Proliferationsverhalten der Trophoblasten ist in der Plazenta der Null-Mutanten verändert. In allen Stadien sind in der stark reduzierten Spongiotrophoblast-Schicht kaum teilungsaktive Zellen nachzuweisen. Die Anzahl proliferierender Zellen im Labyrinthsystem ist in den frühen Stadien der Organogenese (E11,5-E13,5) ebenfalls verringert, wohingegen in den späteren Stadien (E15,5-E17,5) im Gegensatz zur voll entwickelten WT-Plazenta weiterhin BrdU-Inkorporation beobachtet werden konnte. de, maternale Decidua; gi, Trophoblast-Riesenzellen; sp, Spongiotrophoblast; la, Labyrinth; ch, Chorionplatte. Maßstab, 1mm. (B) Quantifizierung der proliferativen Aktivität der labyrinthären Trophoblasten. Bei 400facher Vergrößerung wurde die Anzahl der BrdU-positiven Zellen in 5 zufällig gewählten mikroskopischen Gesichtsfeldern von 3 unterschiedlichen Organen des gleichen Genotyps ermittelt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ( $\pm$ Standardabweichung) der teilungsaktiven Zellen pro Feld. (C) Stärkere Vergrößerung (400 $\times$ ) der Spongiotrophoblast-, Labyrinth- und Chorion-Schichten von WT- und *Knockout*-Plazenta. Die proliferative Aktivität der Endothelzellen in den fötalen Blutgefäßen der Chorionplatte scheint unverändert. Maßstab, 50  $\mu$ m.

Zusätzlich wurde ein sehr hoher intrazellulärer Lamingehalt detektiert (Abb. 30A). Alternde Zellen unterliegen ähnlichen morphologischen und physiologischen Veränderungen. Die während der Entwicklung der Knockout-Plazenta vor allem im Spongiotrophoblast, teilweise aber auch im Labyrinth stark zunehmende Expression und Aktivität der Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidase weist auf das Vorhandensein seneszenten Zellen im Gewebe hin (Abb. 30B). Möglicherweise tragen also auch Differenzierungsfehler sowie vorzeitige Alterung diploider Trophoblast-Zellen zur Ausprägung des plazentalen Defekts bei.



**Abb. 30. Hinweise auf vorzeitige Zellalterung der Trophoblasten in der Knockout-Plazenta E15,5.** (A) Veränderte Morphologie der Zellen im Spongiotrophoblast der *Knockout* (*BRUCE*<sup>-/-</sup>)-Plazenta im Vergleich zur WT (*BRUCE*<sup>+/+</sup>)-Plazenta. H/E-Färbung 4  $\mu$ m dicker radialer plazentaler Paraffinschnitte. (B-D) Verändertes Expressionsmuster der Zellen im Spongiotrophoblast der *Knockout*-Plazenta. (B) Intrazellulärer Lamingehalt. Immunhistochemie mit Laminin-Antikörper auf 4  $\mu$ m dicken Radialschnitten der Plazentas. (C) Expression des für Trophoblast-Riesenzellen typischen Wachstumshormons PI-1 im Spongiotrophoblast der *Knockout*-Plazenta. *In situ*-Hybridisierung mit radioaktiv-markierter *antisense*-Oligonukleotidprobe auf 8  $\mu$ m dicken Paraffinschnitten. (D) Aktivität der Seneszenz-induzierten  $\beta$ -Galaktosidase im Spongiotrophoblast der *Knockout*-Plazenta. X-Gal-Färbung 15  $\mu$ m dicker Kryostat-schnitte bei pH 6,0.

Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass nicht veränderte Apoptoseeigenschaften der Trophoblasten, sondern vielmehr beeinträchtigte Proliferations- und/oder Differenzierungsereignisse der Zellen die beschriebenen Defekte im plazentalen Gewebe der *BRUCE*-Mutanten bewirken und damit die funktionelle Störung des Organs verursachen.

### 3. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des ungewöhnlichen Ubiquitin-Konjugationsenzym BRUCE während der Embryonalentwicklung der Maus beschrieben. Das Protein ist mit 528 kDa außergewöhnlich groß und lokalisiert an der cytosolischen Seite von Endomembranen des *trans*-Golgi-Apparates (TGN) sowie von Vesikeln. Nahe des C-Terminus des Proteins befindet sich die für die E2-Enzyme des Ubiquitin-Konjugationssystems charakteristische UBC-Domäne. N-terminal enthält BRUCE ein sogenanntes BIR-Motiv, das zentrale Strukturmotiv der Apoptose-inhibierenden Proteine der IAP-Familie. Bisherige Untersuchungen *in vitro* zeigten, dass BRUCE als aktives Ubiquitin-konjugierendes Enzym in das regulatorische Netzwerk apoptotischer Vorgänge in der Zelle eingebunden ist (Bartke et al., 2004; Hao et al., 2004.). Neben Apoptose-inhibitorischen Eigenschaften sind für BIR-enthaltende Proteine, wie z. B. Survivin, jedoch auch regulatorischen Funktionen während des Zellzyklus bekannt (Uren et al., 2000). Die in dieser Arbeit beschriebenen Auswirkungen der Deletion des *BRUCE*-Gens in der Maus weisen darauf hin, dass BRUCE *in vivo* für die Vitalität der Zellen eines Organismus eine entscheidende Rolle spielt. Dabei scheint das Protein neben der vermuteten Funktion als Regulator apoptotischer Vorgänge auch eine komplexe Funktion in Zellteilungs- und Differenzierungsprozessen während der Embryonalentwicklung der Maus innezuhaben.

#### 3.1. Der vollständige BRUCE-Verlust führt zu perinataler Letalität

Analog zu früheren *Northern blot*-Analysen (Hauser, 1998) wurde mittels *Western blot* und *in situ*-Hybridisierung eine intensive Expression des *BRUCE*-Gens in allen embryonalen Geweben und Organen während der frühen Embryonalentwicklung nachgewiesen. Eine Regulation der *BRUCE*-Expression erfolgt scheinbar sowohl gewebespezifisch als auch in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums. Insbesondere nach abgeschlossener Organogenese wurde eine starke Abnahme der Transkripte in den meisten Organen verzeichnet. Ausnahmen bilden neuronale Gewebe des zentralen und peripheren Nervensystem, wie z. B. Bulbus olfactorius, Ependymschicht des Ventrikelsystems oder Spinal- und Trigemininalganglien, sowie einige nichtneuronale

Gewebe, wie das Drüsenparenchym der Schild- und Speicheldrüsen oder die Epithelzellen des Darms. Damit scheint BRUCE insbesondere in Geweben mit hoher Transport- bzw. sekretorischer Aktivität von Bedeutung zu sein.

Für die funktionelle Charakterisierung des BRUCE-Proteins *in vivo* wurde eine transgene Mauslinie herangezogen, in der mittels homologer Rekombinationstechniken der Wildtyp-Locus des *BRUCE*-Gens zerstört wurde. Molekularbiologische und proteinbiochemische Analysen bestätigten eine komplette Inaktivierung des Gens und damit den vollständigen Verlust des Proteins in den Zellen des Organismus. Mäuse, welche die Mutation in Heterozygotie trugen, zeigten keine Auffälligkeiten in Entwicklung, Vitalität und Verhalten. Damit kann ein Dosis-abhängiger Effekt der verminderten *BRUCE*-Expression ausgeschlossen werden. Der komplette Funktionsverlust war so schwerwiegend, dass homozygote Mäuse die perinatale Periode nicht überlebten. Während die frühe Embryonalentwicklung bis zum Stadium E13 in den *BRUCE*-Mutanten scheinbar normal verlief, wurde in den folgenden Tagen bis hin zur Geburt eine zunehmende Wachstumsverzögerung der Embryonen beobachtet.

### **3.2. BRUCE ist essentiell für die Entwicklung und den funktionellen Erhalt der extra-embryonalen Gewebe**

In umfangreichen histologischen Analysen zeigten sich in den embryonalen Geweben und Organsystemen keine drastischen morphologischen Veränderungen, die Rückschlüsse auf die Ursachen der perinatalen Letalität der transgenen Embryonen zuließen. BRUCE wird jedoch nicht nur im Embryo selbst, sondern auch in den extra-embryonalen Geweben in starkem Maße synthetisiert. Dazu gehören die Fruchthüllen und die Plazenta des Embryos, die ebenfalls zu den Geweben mit hoher Transportleistung und sekretorischer Aktivität gezählt werden können.

Die Plazenta ist ein bedeutendes lebenserhaltendes Organ, das als fetomaternale Kontaktfläche während der Embryogenese für den Austausch von Sauerstoff, Nährstoffen und Abfallprodukten zwischen mütterlichem und embryonalem Blutssystem verantwortlich ist. Heute kennt man eine Vielzahl von Genen, die für Entwicklung und Funktion der Plazenta und ihrer Gewebestrukturen von Bedeutung sind (Tab. 3; Rossant und Cross, 2001). Mutationsanalysen in Tiermodellen zeigten, dass viele

dieser Gene direkt in die Ausbildung des Labyrinthsystems involviert sind. Eine Störung ihrer Funktion führt zu embryonaler Sterblichkeit während der mittleren Trächtigkeitsperiode (Schorpp-Kistner et al., 1999; Schreiber et al., 2000; Moser et al., 2004). Einige Mutationen bewirken weniger drastische Defekte im Labyrinth und/oder anderen Strukturen der Plazenta, haben aber dennoch, ähnlich wie für die *BRUCE*-Deletion beschrieben, eine späte embryonale oder perinatale Letalität zur Folge (Monkley et al., 1996; Li et al., 1998; Rodriguez et al., 2004).

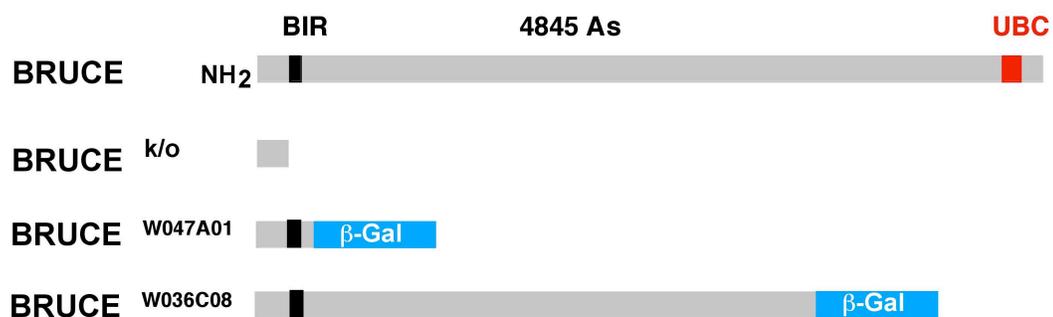
**Tabelle 3. Mausmutanten mit gestörter Trophoblast- und Plazentaentwicklung**

Gen	Genprodukt	Trophoblast-Defekt
<b>Entwicklung der Trophoblast-Linien</b>		
<i>Cdx2</i>	Homöobox-Transkriptionsfaktor	ja
<i>Eomes</i>	Homöobox-Transkriptionsfaktor	ia
<b>Differenzierung der Trophoblast-Riesenzellen</b>		
<i>Hand1</i>	bHLH-Transkriptionsfaktor	ja
<i>Mdfi (I-mfa)</i>	Inhibitor von bHLH-Faktoren	ia
<b>Spongiotrophoblast-Erhaltung</b>		
<i>Mash2</i>	bHLH-Transkriptionsfaktor	ja
<i>Egfr</i>	EGFR ( <i>epidermal growth factor receptor</i> )	ja
<b>Chorioallantoische Fusion</b>		
<i>Bmp5 / Bmp7</i>	Proteine der Knochen-Morphogenese	?
<i>Dnmt</i>	DNA-Methyltransferase	?
<i>Itga4</i>	Intergrin $\alpha 4$ , Bindungspartner Vcam1	nein
<i>Vcam1</i>	Zelladhäsionsmolekül, Bindungspartner Itga4	nein
<i>brachyury</i>	T-Box-Transkriptionsfaktor	nein
<b>Branching und Labyrinth-Entwicklung</b>		
<i>Gcm1</i>	Transkriptionsfaktor	ja
<i>Junb</i>	Ap1-Transkriptionsfaktor	ja
<i>Hgf</i>	Hepatozyten-Wachstumsfaktor	ja
<i>Met</i>	Rezeptor für Hepatozyten-Wachstumsfaktor	ja
<i>Vhlh</i>	Tumor-Suppressor	?
<i>Sos1</i>	GDP/GTP Austauschfaktor	ja
<i>Gab1</i>	<i>Signalling</i> -Adaptermolekül	ja
<b>Vaskularisierung des Labyrinthes</b>		
<i>Esx1</i>	Homöobox-Transkriptionsfaktor	ja
<i>Arnt</i>	bHLH/PAS-Transkriptionsfaktor	ia
<b>Nährstofftransport durch das Labyrinth</b>		
<i>Gjb2 (Cx26)</i>	Connexin, <i>Gap Junction</i> -Protein	ja

(modifiziert nach Rossant und Cross, 2001); ?: nicht bekannt; bHLH: *basic helix-loop-helix*

Der Beginn der Plazentagenese erfolgt in den *BRUCE*-Mutanten mit Herstellung des chorioallantoischen Kontaktes sowohl zeitlich als auch funktionell ohne Störung. Die Ausbildung der unterschiedlichen Gewebestrukturen wird ebenfalls korrekt initiiert. Mit zunehmender Reifung ist jedoch die normale Gewichtsentwicklung der *Knockout*-Plazenta gestört. Der Spongiotrophoblast wirkt im Vergleich zum WT stark reduziert und die Entwicklung des Labyrinthsystems verzögert. Die Gefäßdichte im Labyrinth ist folglich deutlich verringert und bietet durch eine kleinere Oberfläche eine verminderte Effizienz der Nähr- und Sauerstoffbereitstellung für den Embryo während seiner Entwicklung. Dieses Entwicklungsdefizit der Plazenta kann mit großer Wahrscheinlichkeit als Ursache für Wachstumsretardierung und perinatale Letalität angenommen werden. Funktionsstörungen oder Missbildungen der Plazenta sind auch beim Menschen häufig Ursachen für eine Wachstumsretardierung des Embryos, auch als IUGR (*intra-uterine growth restriction*)-Syndrom bezeichnet, mit nachfolgendem Spontanabort oder Frühgeburt (Cetin et al., 2004).

Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Wurst vom Max-Planck-Institut für Psychiatrie und der Gesellschaft für Umwelt und Gesundheit (GSF) in München wurden zwei weitere Mauslinien mit veränderten *BRUCE*-Allelen charakterisiert. Es handelt sich in beiden Fällen um Allele, die für die Fusion einer C-terminal verkürzten Variante des *BRUCE*-Proteins mit dem Enzym  $\beta$ -Galaktosidase kodieren (Abb. 31).



**Abb. 31. Die *BRUCE*-Fusionsproteine der Genfallen-Linien.** Die erwarteten Fusionsproteine nach Integration des Genfallen-Vektors in den WT-Locus im maßstabgerechten Vergleich zum WT-Protein.

Diesen Fusionsproteinen fehlt die UBC-Domäne, während das N-terminale BIR-Motiv noch vorhanden ist. Der Funktionsverlust war auch in diesen Genfallen-Linien so

schwerwiegend, dass mit keiner der beiden Mutationen homozygote Mäuse geboren wurden. Während für die Linie W047A01 eine frühe embryonale Letalität vor E10 beschrieben wurde, setzte die Embryonensterblichkeit bei der Linie W036C08 zwischen E11 und E14 ein. Die embryonale Letalität dieser Linie konnte ebenfalls auf Defekte der Plazentaentwicklung zurückgeführt werden (Hitz, 2003). Die Unterschiede in der Ausprägung des Phänotyps können einerseits mit dem variablen genetischen Hintergrund der Genfallen-Linien erklärt werden. Andererseits ist durch die Expression der verkürzten Fusionsvarianten auch ein dominant-negativer Effekt denkbar. Erste Untersuchungen ergaben, dass eine Di- bzw. Oligomerisierung des BRUCE-Proteins für seine Funktionalität möglicherweise von Bedeutung ist (Bartke, persönliche Mitteilung). Nicht zuletzt wurde mit Hilfe dieser Linien das gewebs- und entwicklungsabhängige Expressionsprofil des *BRUCE*-Gens bestätigt.

### **3.3. Vom Phänotyp des *Knockout*-Modells zur Aktivität des BRUCE-Proteins – Einblicke in die komplexe Funktion des Proteins innerhalb der Zelle**

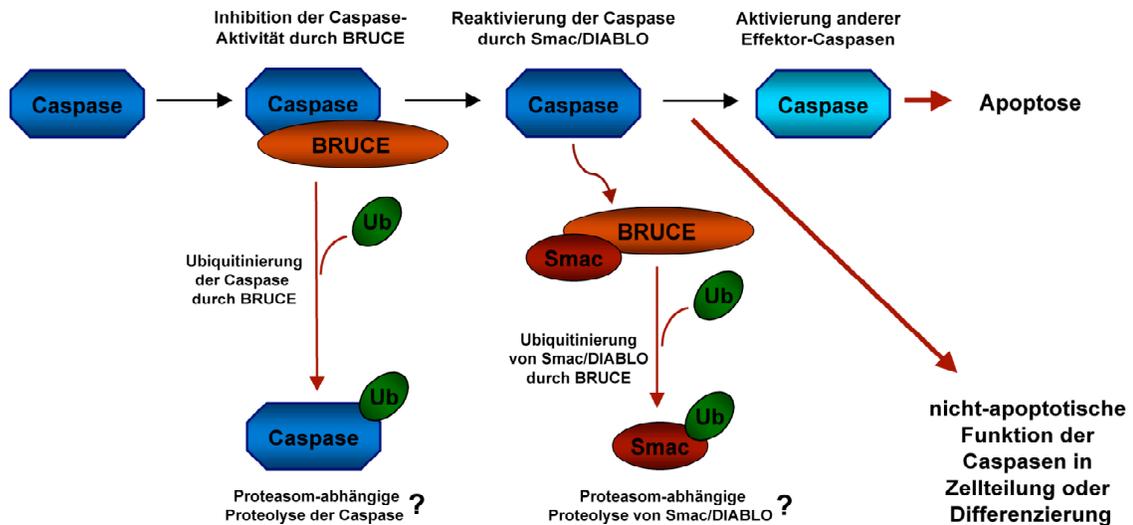
BRUCE ist aufgrund seiner Größe und Struktur ein außergewöhnliches Protein der BIRP (*BIR-domain containing proteins*)-Familie. Neuere Untersuchungen zeigen, dass BRUCE *in vitro* funktionelle Charakteristika der IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*) besitzt, die durch ihre charakteristischen BIR-Domänen ebenfalls den BIRPs zugerechnet werden. Allen IAPs gemeinsam ist ihre Fähigkeit, Apoptose zu inhibieren, indem sie direkt an Caspasen binden und deren Aktivität blockieren. Auch BRUCE ist wie die klassischen IAPs in der Lage, Caspasen zu inhibieren. Nach Apoptose-Induktion wird BRUCE durch proteolytische Spaltung durch Caspasen und die Serinprotease HtrA2 sowie durch die Bindung des kleinen mitochondrialen Proteins Smac inaktiviert. Damit scheint es funktionell in das regulatorische Netzwerk der Apoptose eingebunden zu sein (Abb. 32). Ähnliche Beobachtungen wurden auch in *Drosophila* gemacht. Der in diesem Organismus durch Reaper und Grim aktivierte, Caspase-abhängige Zelltod kann durch dBruce verhindert werden (Vernooy et al., 2002). In jeder Hinsicht scheint die UBC-Domäne für die uneingeschränkte anti-apoptotische Funktion des Proteins von Bedeutung zu sein. Als Substrate für eine

direkte Ubiquitinierung durch die kombinierte E2/E3-Aktivität von BRUCE sind bislang Caspase-9 und Smac identifiziert worden (Bartke et al., 2004; Hao et al., 2004).

Das vor allem stark neuronal geprägte Expressionsmuster von *BRUCE* lässt eine spezifische Funktion des Proteins während der Entwicklung des Nervensystems vermuten. Bei der Histogenese des Nervensystems kommt der Apoptose der Nervenzellen besondere Bedeutung zu, da durch den zeitlich und räumlich koordinierten programmierten Zelltod eine Abstimmung der einzelnen neuronalen Systeme auf ihr Zielorgan erfolgt. Aber sowohl in diesem als auch in anderen embryonalen Geweben wurden in den untersuchten Entwicklungsstadien keine schwerwiegenden Defekte gefunden, die mit verstärkter Apoptose einhergehen. Auch für die morphologischen Veränderungen im extra-embryonalen Gewebe der Plazenta konnte die Ursache nicht in unkontrolliertem Zelltod gefunden werden. Eine Erklärung für das unerwartete Ausbleiben von Apoptosedefekten *in vivo* bietet die Möglichkeit einer funktionellen Überlappung der IAP-Proteine. So zeigen z. B. das humane XIAP sowie dessen Mausomolog MIAP-3 ein ähnliches Expressionsmuster wie BRUCE. Auch XIAP ist im Embryo ubiquitär exprimiert. In der Plazenta zeigt sich beim Menschen zu Beginn der Plazentaentwicklung eine starke Expression vor allem im Syncytiotrophoblast, dem analogen Gewebe zum Labyrinth der Maus. Trotz der starken anti-apoptotischen Aktivität von XIAP kam in den *Knockout*-Mäusen die Mutation in der Ausprägung des Phänotyps nicht zur Geltung. Der Verlust der Apoptose-inhibitorischen XIAP-Funktion wurde durch eine erhöhte Konzentration der beiden Apoptoseinhibitoren cIAP-1 und cIAP-2 ausgeglichen (Harlin et al., 2001). Obwohl eine verstärkte Expression anderer IAPs in den *BRUCE*-Mutanten nicht nachweisbar war, ist eine Kompensationseffekt der vergleichsweise schwachen anti-apoptotischen Aktivität von BRUCE denkbar. Jedoch gibt es keine absolute funktionelle Redundanz, da der BRUCE-Verlust nicht wie im Falle von XIAP vollständig kompensiert werden kann und eine perinatale Letalität verursacht.

Die Aktivität von Caspase, die durch die Proteine der IAP-Familie selektiv blockiert werden kann, führt nicht zwangsläufig zum Tod der Zelle. In der letzten Zeit wurden zunehmend auch nicht-apoptotische Funktionen für Caspasen beschrieben, denen in streng regulierten Apoptose-ähnlichen Prozessen während des Zellzyklus oder der terminalen Differenzierung von Zellen eine bedeutende Rolle zukommt (Abraham und Shaham, 2004). Daher muss für einen funktionellen Inhibitor von Caspasen wie BRUCE auch eine regulative Beteiligung an Zellteilungs- oder Differenzierungsvorgängen in

Betracht gezogen werden. Außerdem besitzt BRUCE aufgrund der Struktur seines BIR-Motivs eine sehr enge Verwandtschaft mit den Survivin-ähnlichen BIRPs. Obwohl ursprünglich als Caspase-Inhibitor beschrieben, ist Survivin, ähnlich wie auch andere Vertreter dieser Gruppe, in erster Linie in die Regulation der Zellteilung involviert (Verhagen et al., 2001; Salvesen und Duckett, 2002).



**Abb. 32. Ein Modell für die Regulation der Caspase-Aktivität während Apoptose oder Apoptose-ähnlichen Prozessen durch BRUCE.** BRUCE ist in der Lage, die Aktivität von Caspasen durch direkte Bindung über das BIR-Motiv zu blockieren. Eine mögliche Konsequenz der Bindung ist die Ubiquitinierung der Caspase durch die E2/E3-Aktivität von BRUCE. Damit könnte der nachfolgende proteasomale Abbau der Protease verbunden sein. BRUCE selbst kann nach Apoptose-Induktion sowohl durch Caspase- und/oder HtrA2-vermittelte Spaltung als auch durch direkte Bindung des mitochondrialen pro-apoptotischen Faktors Smac/DIABLO inaktiviert werden. Smac ist wiederum Substrat für eine BRUCE-abhängige Ubiquitinierung.

Experimente mit den im Rahmen dieser Arbeit als Modellsystem etablierten embryonalen Fibroblasten der *BRUCE*-Mutanten lieferten weitere Hinweise darauf, dass auch BRUCE sich funktionell von den klassischen IAPs unterscheidet. Eine wie von Hao und Kollegen geschilderte gesteigerte Apoptoserate in der Kultur primärer *BRUCE*-defizienter Fibroblasten sowie die Hypersensitivität der Zellen gegenüber Apoptose-induzierenden Faktoren wie  $\text{TNF-}\alpha$  (*tumor necrosis factor*  $\alpha$ ) oder Etoposid konnte nicht bestätigt werden. Stattdessen wurden Veränderungen im Proliferationsverhalten der Zellen beobachtet. Die Kulturen der *Knockout*-Fibroblasten waren gekennzeichnet durch ein sehr langsames Wachstum der Zellen. Der verlängerte

Teilungszyklus wurde hauptsächlich durch den verzögerten Übergang der Zellen aus der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase in die Synthesephase des Zellzyklus verursacht.

Ähnliche Effekte wurden auch *in situ* im extra-embryonalen Gewebe der Plazenta beobachtet. Die drastisch reduzierte Anzahl teilungsaktiver Trophoblasten im plazentalen Gewebe ist eine mögliche Erklärung sowohl für die Reduktion der Spongiotrophoblast-Schicht als auch für den Reifungsdefekt des Labyrinthsystems. Die intensive Proliferation der labyrinthären Trophoblasten ist Voraussetzung für den *Branching*-Prozess und die komplexe Vaskularisierung dieser Struktur. Zusätzlich zu der beeinträchtigten proliferativen Aktivität der Trophoblastspezies in der Plazenta zeigten sich in der histologischen Analyse des Organs Auffälligkeiten im Differenzierungsmuster der Zellen. Mit zunehmendem Alter der Plazenta fielen nicht nur morphologische Veränderungen der Trophoblasten sondern auch Abweichungen im spezifischen Expressionsprofil dieser Zellen auf.

Erste Hinweise auf eine eventuelle Beteiligung von BRUCE in speziellen Differenzierungsvorgängen lieferten homozygote Mutanten der Fruchtfliege mit gestörter dBruce-Funktion. Die Organismen sind lebensfähig, die Männchen jedoch infertil. Die Spermatiden zeigen Defekte während ihrer terminalen Differenzierung. Die morphologische und strukturelle Reorganisation der Zellen während der Differenzierung setzt regulierte Apoptose-ähnliche Vorgänge voraus, die eine sequenzielle Aktivierung von Caspasen mit einschließen. In den Spermatiden der Mutanten scheint die Inhibition der aktivierten Caspasen nicht mehr möglich zu sein. Sie haben aufgrund erhöhter Caspase-Aktivität hyperkondensierte und degeneriert Zellkerne (Arama et al., 2003). Wie in Spermatiden können auch in anderen Zelltypen Apoptose-ähnliche Vorgänge nachgewiesen werden, die nicht zum Tod sondern zur terminalen Differenzierung der Zellen beitragen. Für die Caspasen -3 und -14 wurde beispielsweise eine spezifische Funktion während der Differenzierung von Skelettmuskelzellen bzw. Keratinozyten beschrieben (Abraham und Shaham, 2004). Im Hinblick auf den Plazentadefekt der *BRUCE*-Mutanten ist auch die streng regulierte Aktivität von Initiator- und Effektor-Caspasen während der Fusion und Erneuerung (*Turnover*) von Syncytiotrophoblast-Strukturen sehr interessant, die im Labyrinthsystem die Schranke zwischen mütterlichem und fötalem Blutssystem bilden. In mononukleären Cytotrophoblasten erfolgt nach spezifischer Aktivierung der Caspase-8 die Spaltung von Fodrin und anderen mit dem Cytoskelett der Zelle assoziierten Proteinen. Die dadurch verminderte Stabilität der Plasmamembran sowie der für die frühe Apoptose typische Phosphatidylserin-*Flip* in

der Membran sind Voraussetzungen für die Fusion der Zelle mit einer benachbarten Trophoblast-Zelle bzw. dem angrenzenden Syncytium. Als Resultat der fein abgestimmten zeitlichen und räumlichen Aktivität pro- und anti-apoptotischer Proteine wird die Zelle jedoch vor einem weiteren Verlauf der Apoptose geschützt. Eine Aktivierung von Effektor-Caspasen ist während dieses Vorgangs daher kaum nachzuweisen. Effektor-Caspasen wie Caspase-3 und -6 treten erst in Aktion wenn gealterte und damit potentiell gefährlich Bestandteile, wie z. B. geschädigte Zellkerne, aus dem syncytialen Verband durch Abschnürung apoptotischer Vesikel ausgeschleust werden müssen, um den Erhalt des Syncytiotrophoblasten zu gewährleisten. Auch dieser Prozess unterliegt einer strengen räumlichen und zeitlichen Regulation und ist nur in genau definierten Bereichen innerhalb des Syncytiotrophoblasten zu beobachten (Huppertz und Kingdom, 2004). Möglicherweise ist die Funktion von BRUCE in eben solchen speziellen Vorgängen zu suchen, in denen zelluläre Kompartimente, wie z. B. der Golgi-Apparat, vor der durch Apoptose-ähnliche Vorgänge induzierten Caspase-Aktivität geschützt werden müssen. Erst die Inaktivierung von BRUCE würde nachfolgende apoptotische Ereignisse wie den geordneten Abbau des TGN und seine Verpackung in apoptotische Vesikel erleichtern. Aufgrund der zentralen Aufgabe des TGN im Vesikeltransport und -*Sorting* innerhalb der Zelle ist durch eine gestörte BRUCE-Funktion auch die negative Beeinflussung dieser und damit in Verbindung stehender grundlegender Prozesse denkbar, die für die Vitalität der einzelnen Zelle sowie die Interaktion der Zellen im Gewebeverband von Bedeutung sind.

In der Kultur primärer Fibroblasten hat das Fehlen von BRUCE nicht nur Einfluss auf die Wachstumsrate und den Teilungszyklus der Zellen sondern auch auf deren Lebensspanne. Charakteristische morphologische Veränderungen, Abweichungen in Genexpression und Metabolismus sowie eine abnehmende proliferative Aktivität markieren bereits nach wenigen Passagen den Eintritt der Zellen in das Stadium der Seneszenz. In der Fachliteratur wird die Seneszenz als Defensivmechanismus gegen alterungsbedingte Immortalisierung der Körperzellen diskutiert, um der Entstehung von malignen Tumoren entgegenzuwirken (Campisi, 2001). Ausgelöst durch die mit steigender Anzahl an Zellteilungen auftretende Telomerverkürzung oder beispielsweise durch massive DNA-Schädigung kommt es zur Aktivierung eines Kontrollmechanismus, der die Zellen durch Überexpression von Tumorsuppressoren wie p53 und/oder pRb irreversibel in den Seneszenzarrest führt. Tatsächlich wurde für *BRUCE*-defiziente Fibroblasten eine hohe spontane Immortalisierungsrate mit anschließendem

aggressiven Wachstum der Zellen beobachtet. Die Immortalisierung ging in jedem Fall mit einem Verlust sowohl der p53-Expression als auch der durch p53 regulierten p21-Expression einher. Durch welche Störung oder welches Signal der Seneszenzarrrest in den *Knockout*-Zellen verursacht wird, ist unklar.

Durch die für senescente Zellen typische Überexpression und Sekretion von Wachstumshormonen, Metalloproteasen, Proteinen der extrazellulären Matrix sowie inflammatorischen Cytokinen tragen diese im alternden Organismus gehäuft auftretenden Zellen zu Störungen der lokalen Gewebestruktur und -funktion bei. Möglicherweise sind in den *BRUCE*-Mutanten neben Proliferations- und Differenzierungsfehlern auch vorzeitige Zellalterung und Seneszenz an der Ausprägung des Phänotyps beteiligt. Während der gesamten Plazentagenese, vor allem aber in der alternden *Knockout*-Plazenta der späten Embryonalentwicklung, fallen besonders im Spongiotrophoblast morphologisch veränderte und teilungsinaktive Trophoblasten auf, die zusätzlich das für Riesenzellen typische Wachstumshormon Proliferin sowie Laminin, eine Komponente der Basalmembran, exprimieren und Aktivität der Seneszenz-induzierten  $\beta$ -Galaktosidase besitzen.

Für eine detaillierte Aufklärung der Ursachen für die beschriebenen Defekte im Gewebe der *BRUCE*-defizienten Plazenta auf zellulärer Ebene, könnten Experimente mit Explantat-Kulturen durchgeführt werden. Sowohl apoptotische Vorgänge als auch Differenzierung und Seneszenz ließen sich *ex vivo* besser voneinander abgrenzen und definieren. Ein weiteres geeignetes System für die Untersuchung von Zellzyklus, Cytokinese und Differenzierung von Trophoblasten könnte durch die Isolation und Kultur von Trophoblast-Stammzellen etabliert werden.

*BRUCE* wird zwar in fast allen embryonalen und adulten Geweben exprimiert, Effekte seiner Deletion konnten bis jetzt aber nur in der Plazenta beschrieben werden. Allen Effekten, die im Embryo zu beobachten sind, wie temporäre Blutungen, verzögerte Erythrozytenreifung oder Anämie, kann nicht zugeordnet werden, ob sie direkt durch den Verlust der *BRUCE*-Funktion oder als Sekundäreffekt in Folge der Defekte im extra-embryonalen Gewebe auftreten. Im Falle der Erythrozytenreifung wäre ein direkter Effekt durchaus denkbar. Während ihrer terminalen Differenzierung verlieren die roten Blutkörperchen unter Beibehaltung ihrer metabolischen Aktivität sowohl den Zellkern als auch andere subzelluläre Organellen, ein Prozess, für den die nicht-apoptotische Funktion von Caspasen benötigt wird (Ishizaki et al., 1998; Carlile et al., 2004). Allerdings wurden auch für *Rb* und *SOCS3*-defiziente Mäuse Erythropoese-

Defekte beschrieben, die sich später aufgrund funktioneller Störungen der Plazenta als sekundär herausstellten (Roberts et al., 2001; de Bruin et al., 2003). Sauerstoff- und Nährstoffmangel sowie eine eingeschränkte Sekretion von plazentalen Erythropoiese-Faktoren können eine Akkumulation der Vorläuferzellen vor allem in der peripheren Zirkulation verursachen.

Durch die perinatale Letalität der *BRUCE-Knockout*-Mäuse ist es leider nicht möglich, Aussagen über die Rolle von BRUCE für Entwicklung und Wachstum juveniler Mäuse bzw. die Funktion von BRUCE in speziellen Zelltypen, Geweben oder Organen adulter Mäuse zu treffen. Die sehr aufwendige Methode der tetraploiden Fusion ist in solchen Fällen das Mittel der Wahl, um die Plazenta zu retten und ihre normale Entwicklung und Funktion zu gewährleisten (McLaughlin, 1993; de Bruin et al., 2003). Hierbei werden die beiden Zellen eines isolierten WT-Embryos im Zweizellstadium mit Hilfe eines elektrischen Impulses zu einer tetraploiden Zelle fusioniert, mit einem *Knockout*-Embryo im Stadium der Morula *in vitro* aggregiert und zur Blastocyste gereift. Die so erhaltenen chimärischen Blastocysten werden in scheinchwangere Mäuse reimplantiert. Im Verlauf der Embryonalentwicklung tragen die tetraploiden WT-Zellen ausschließlich zur Bildung des extra-embryonalen Gewebes der *Knockout*-Embryonen bei. Dadurch wäre einerseits die Charakterisierung des Phänotyps ohne maskierende Defekte im extra-embryonalen Gewebe, andererseits vielleicht sogar eine Entwicklung des Embryos über die perinatale Phase hinaus möglich. Die Charakterisierung der phänotypischen Manifestation der *BRUCE*-Defizienz im adulten Organismus, wie beispielsweise das Auftreten einer gestörten Spermatogenese oder die Beeinträchtigung neuronaler Funktionen, könnte am besten durch die Etablierung eines induzierbaren *Knockout*-Modells erfolgen. Die vorliegende Phänotypisierung des klassischen *Knockouts* verdeutlicht jedoch bereits die Komplexität der BRUCE-Funktion (für Proliferation, Differenzierung, Vitalität und/oder Überleben spezieller Zelltypen) und die Bedeutung des funktionellen Verlustes dieses ungewöhnlichen Enzyms für Entwicklung und Funktion der Plazenta und damit für die gesamte Embryonalentwicklung der Maus.

## **4. Material und Methoden**

### **4.1. Material**

#### **4.1.1. Chemikalien und Reagenzien**

Soweit nicht anders vermerkt, fanden analysenreine Chemikalien und Reagenzien der Firmen Aldrich, Applied Biosystems, Biomol, Biorad, Difco, Fluka, Invitrogen, Kodak, Merck, Roth, Riedel de Haen, Serva oder Sigma Verwendung. Molekularbiologische Reagenzien, Restriktionsendonukleasen und die Mehrzahl anderer Enzyme wurden (wenn nicht anders angegeben) von den Firmen Roche, MBI, Fermentas, New England Biolabs, Pharmacia und Promega bezogen. Radiochemikalien stammten von den Firmen Amersham und Hartmann Analytic. In fast allen der unten beschriebenen Methoden sind sterile Lösungen und sterile Gefäße eingesetzt worden. Unter besonderer Vorsicht wurde mit RNA gearbeitet. Wasser und autoklavierbare Lösungen wurden über Nacht in 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) inkubiert und anschließend zweimal autoklaviert. Für nicht autoklavierbare Lösungen wurden RNase-freie Substanzen und DEPC-Wasser verwendet oder zu den Lösungen wurde RNase-Block (InnoGenex) dazugegeben. Instrumente, Glas-, und Plastikware wurden vor Gebrauch mit RNase AWAY (Molecular BioProducts) behandelt oder wenn möglich mehrere Stunden bei 220° C gebacken.

#### **4.1.2. Hard- und Software**

Datenbankrecherchen (Sequenzsuche und Sequenzvergleiche sowie Literaturrecherchen) erfolgten mit Hilfe des "National Center for Biotechnology Information" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Für Sequenzanalysen (Erstellen von Restriktionskarten, Auswertung von DNA-Sequenzierungen, Vergleiche von Proteinsequenzen und Primerdesign) wurde das Programmpaket DNA-Star (DNA Star Inc.) verwendet. Röntgenfilme und Gelphotographien sind mit einem AGFA-Scanner (Arcus II) und mit dem Programm Adobe Photoshop 5.0 (Adobe Systems Inc.) digitalisiert worden. Alle Graphiken und Abbildungen wurden mit den Programmen Canvas 6.0 (Daneba Software Inc.) und Microsoft Powerpoint 98 (Microsoft Corp.) zu ihren endgültigen

Formaten verarbeitet. Die Arbeit wurde auf einem Apple Macintosh G4 mit der Software Microsoft Word 98 (Microsoft Corp.) geschrieben.

Die nachfolgenden mikrobiologischen, molekularbiologischen und protein-biochemischen Methoden richten sich im wesentlichen nach Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1987 und nach Angaben der Hersteller.

## 4.2. Mikrobiologische und Molekularbiologische Techniken

### 4.2.1 *E. coli* -Stämme

XL1-Blue: sup E44, hsd R17, rec A1, gyr A46, thi, rel A1, lac<sup>-</sup>, F<sup>+</sup>[pro AB<sup>+</sup>, lac I q, Lac Z M15, Tn10(tet<sup>r</sup>)] (Stratagene)

BL21-Gold (DE3): B F<sup>-</sup>, ompT, hsdS(<sub>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)dcm<sup>+</sup>, Tet<sup>r</sup>, gal, endA, The</sub>

TG1: D(lac, pro), supE44, thi, hsd D5, F<sup>+</sup>[Tra D36, pro<sup>+</sup>, lac I q, lac Z DM15]

### 4.2.2. *E. coli* -Vektoren

pUC19	(NEB)
pBluescriptSK(+)	(Stratagene)
pSuper	(OligoEngine)
pQE9	(Qiagen)

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

LB-Medium: 1 % Trypton (Difco)  
0,5 % Hefeextrakt (Difco)  
1 % NaCl  
sterilisiert durch Autoklavieren

LB-Agar: LB-Medium mit 1,5 % Agar

Flüssigkulturen in LB-Medium wurden bei 37° C und 200 U/min geschüttelt und Agarplatten über Kopf bei 37° C inkubiert. Für die Selektion von transformierten Bakterien sind Antibiotika in einer Konzentration von 50 µg/ml (Ampicillin) bzw. 30 µg/ml (Kanamycin) dem Medium zugefügt worden. Die Zelldichte von *E. coli*-Kulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) bestimmt. Bakterien in Flüssigkultur können für ca. 2 Wochen und Ausstriche auf Agarplatten mehrere Wochen bei 4° C gelagert werden. Für eine langfristige Lagerung wurden stationäre Flüssigkulturen mit Glycerol versetzt (Endkonzentration 18 %) und bei -80° C eingefroren.

#### 4.2.4. Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Es wurden sowohl chemisch kompetente als auch elektrokompetente Zellen verwendet. In beiden Fällen wurde aus einer Einzelkolonie des entsprechenden *E. coli*-Stammes eine Übernachtskultur in Flüssigmedium hergestellt. Mit 10 ml dieser Kultur wurde 1 l LB-Medium angeimpft und bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,6 – 0,8 bei 37° C inkubiert. Nach 20 min Inkubation der Kultur in Eiswasser wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 6000 x g, 4° C) geerntet. Alle weiteren Schritte sind im Kühlraum unter Verwendung von vorgekühlten Materialien und Lösungen durchgeführt worden. Für die Herstellung von elektrokompetenten Zellen wurde das Zellsediment in 1 l sterilem H<sub>2</sub>O vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und der letzte Schritt mit 0,5 l H<sub>2</sub>O wiederholt. Die Zellen wurden in 20 ml 10 % Glycerin resuspendiert und erneut durch Zentrifugation geerntet. Schließlich wurden die Zellen in 3 ml 10 % Glycerin resuspendiert, in 100 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70° C gelagert. Für die Herstellung der chemisch kompetenten Zellen wurde das Zellsediment in 200 ml kalter 100 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, in 400 ml einer 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, für 20 min in Eiswasser inkubiert und erneut abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde schließlich in 20 ml 15 % Glycerin und 100 mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen und in 100 µl-Aliquots bei -70° C gelagert.

#### 4.2.5. Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Vor der Transformation wurden die kompetenten Zellen langsam aufgetaut. Für eine Elektroporation erfolgte die Mischung von ca. 0,1 pmol Plasmid bzw. 1 µl des Ligationsansatzes mit 30 µl der elektrokompenten Zellen. Die Suspension wurde in eine Elektroporations-Küvette (0,1 cm Dicke) überführt und die Zellen bei einem Puls von 1,8 kV und 25 µF bei einem Widerstand von 200 Ω elektroporiert. Die Zellen wurden schnell in 0,5 ml LB-Medium aufgenommen, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und nach 60 min Inkubation bei 37° C auf Selektionsplatten ausgestrichen.

Für eine chemische Transformation wurden 50 µl der aufgetauten Zellsuspension mit wenigen Nanogramm Plasmid bzw. bis zu 10 µl eines Ligationsansatzes gemischt, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock bei 42° C für 45 sec. ausgesetzt. Der Ansatz wurde für 2 min auf Eis gekühlt, mit 1 ml LB-Medium versetzt und 40 min bei 37° C geschüttelt. Danach sind die Zellsuspension auf Selektionsplatten ausgestrichen und in der Regel über Nacht bei 37° C inkubiert worden.

#### 4.2.6. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem System der Firma Qiagen über Anionenaustauscher-Säulen nach alkalischer Lyse. Für den kleinen Maßstab, z. B. Restriktionsanalysen, wurde das "QIAprep Spin Miniprep Kit" eingesetzt. In diesem Fall erfolgte die Isolierung nach Herstellerangaben aus 3 ml Übernachtskultur. Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mit Hilfe des "Plasmid Maxi Kits" aus 500 ml Übernachtskultur isoliert. Dabei wurde ebenfalls nach Herstellerangaben verfahren. Alle Plasmidpräparationen sind im letzten Schritt in 10 mM Tris-HCl (pH 8,5) aufgenommen worden.

Die Konzentrationsbestimmung der DNA in wässriger Lösung erfolgte photometrisch bei den Wellenlängen 260 und 280 nm. Eine optische Dichte von 1, gemessen bei 260 nm, entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA, 40 µg/ml für einzelsträngige DNA bzw. RNA oder 20 µg/ml für Oligonukleotide. Das Verhältnis der optischen Dichten  $OD_{260} / OD_{280}$  einer angemessen reinen Plasmidlösung sollte bei 1,8 - 2,0 liegen.

#### 4.2.7. Präparation genomischer DNA aus Zellen und Geweben

##### *Puffer und Lösungen:*

Proteinase K-Puffer:	100 mM Tris/HCl pH 8,5
	200 mM NaCl
	5 mM EDTA
	0,2 % SDS
	20 µl Proteinase K (frisch aus Stocklösung 10 mg/ml)

Die Zellen einer konfluent bewachsenen 10 cm-Schale wurden geerntet und bei 200 x g für 5 min zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet bzw. eine definierte Menge Biopsiegewebe adulter Mäuse (z. B. 0,5 – 1 cm Schwanzbiopsie) oder geeignetes embryonales Gewebe (Amnion, Schwanz oder Kopf) wurde in 500 µl Proteinase K-Puffer über Nacht bei 55° C geschüttelt. Es wurden anschließend 200 µl einer gesättigten NaCl-Lösung zu den Ansätzen pipettiert, vorsichtig gemischt und die ausfallenden Proteine bei 16.000 x g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, die DNA durch Zugabe von 330 µl Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (2 min bei 16.000 x g) pelletiert. Das Pellet wurde mit 350 µl 70 % Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert und in einem entsprechenden Volumen Aqua dest. aufgenommen (25 – 150 µl).

#### 4.2.8. Präzipitation von Nukleinsäuren

Für die Ethanol-Fällung von DNA wurden 1/10 Volumen (Vol.) 3 M Na-Acetat (pH 5,4) und 2,5 Vol. Ethanol mit der DNA-Lösung vermischt, dieser Ansatz 1 h bei 4° bzw. -20° C inkubiert und die DNA anschließend durch eine Zentrifugation bei 16.000 x g und 4° C für 20 min pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, die DNA durch Zugabe von 70 % Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das DNA-Sediment wurde getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer [50 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA] oder in destilliertem Wasser aufgenommen. Bei der Fällung mit Isopropanol wurde die DNA mit 1 Vol. Isopropanol bei RT präzipitiert.

RNA ist in Gegenwart von 10 µg tRNA präzipitiert worden. Der Ansatz wurde mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 1 Vol. 4 M NH<sub>4</sub>Oac und 2,5 Vol. Ethanol für eine Stunde bei -80° C gelagert. Die RNA wurde wie für die

Präzipitation von DNA beschrieben pelletiert, gewaschen und in einem geeigneten Volumen DEPC-Wasser aufgenommen.

#### 4.2.9. Restriktionsverdau von DNA

Die sequenzspezifische Hydrolyse von DNA mit Restriktionsenzymen wurde nach den allgemein üblichen Vorschriften durchgeführt (vgl. Sambrook et al., 1989). Die Restriktionsbedingungen wurden entsprechend den Empfehlungen der Hersteller gewählt und die Restriktionsenzyme in den mitgelieferten Puffern eingesetzt. Für analytische Restriktionen wurden 1 - 2 µg DNA mit 2 - 4 Einheiten des jeweiligen Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 10 µl verdaut. Die Inkubation erfolgte bei 37° C für 1 h. Bei präparativen Restriktionen für Klonierungen, die Verwendung der DNA in *Southern Blot*-Analysen oder für *In vitro*-Transkriptionen wurden mindestens 5 µg DNA in einem Volumen von 20 – 30 µl verdaut. Dabei ist die Enzymmenge auf mindestens 10 Einheiten pro µg DNA erhöht worden. Die Inkubation erfolgte hier in der Regel für mehrere Stunden bei 37° C.

#### 4.2.10. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

*Puffer und Lösungen:*

1 x TBE:	45 mM Tris-Borat 1 mM EDTA pH 8,0
5 x Probenpuffer:	0,5 % SDS 25 mM EDTA, pH 8,0 25 % Glycerin 0,01 % (w/v) Orange G

Für Analysen und präparative Isolierungen von DNA-Fragmenten ist 0,7 - 2%ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) versetzt und in Flachkammern mit Kämmen für die Geltaschen gegossen. Als Laufpuffer fand 1 x TBE Verwendung. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag mit 0,2 Vol. 5 x DNA-Probepuffer versetzt. Abhängig von der Gelgröße betrug die angelegte Spannung 100 – 200 V. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid konnte die aufgetrennte DNA auf einem UV-Illuminator sichtbar

gemacht und fotografiert werden. Durch die parallele Auftrennung eines Größenmarkers ("1 kb DNA-Ladder", Gibco BRL) war es möglich, die Länge der DNA-Fragmente zu ermitteln.

#### **4.2.11. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Gelextraktion von DNA-Fragmenten nach vorhergehender Agarose-Gelelektrophorese diente der Aufreinigung von präparativen Restriktions- und PCR-Ansätzen. Die zu isolierende Bande ist unter langwelligem UV-Licht (324 nm) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt worden. Für die Extraktion wurde ausschließlich das "Qiaex II Gel Extraction Kit" der Firma Qiagen verwendet. Dabei wird die aus dem Gel herausgelöste DNA an eine Silikamatrix gebunden, gewaschen und schließlich in 20 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 eluiert. Die Vorgehensweise richtete sich exakt nach dem Herstellerprotokoll.

#### **4.2.12. Ligation von DNA**

Um bei Klonierungen die Religation des Vektors zu vermeiden, wurden die 5'-Enden der DNA dephosphoryliert. Die Reaktion erfolgte in einem speziellen Phosphatasepuffer mit ca. 0,1 Einheit (*calf intestine*-) Phosphatase (Roche) pro 20 pmol 5'-DNA-Enden bei 37° C für 30 min.

Die Verknüpfung von DNA-Enden bei Klonierungen erfolgte mit T4 DNA-Ligase (NEB) in einem Volumen von 20 µl. Dabei wurden standardmäßig 0,5 - 1 µl geschnittene Vektor-DNA aus der Gelextraktion (ca. 100 ng) mit 5 - 10 µl geschnittener und geextrahierter Insertions-DNA entweder bei 20° C für 3 h oder bei 16° C über Nacht ligiert. Das molare Verhältnis Vektor-/Insertions-DNA ist anhand der Bandenintensität im ethidiumbromid-gefärbten Gel abgeschätzt worden und lag jeweils bei 1:5 bis 1:10.

#### 4.2.13. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

<i>Primer:</i>	jp101	GAG CCT GTG ATT TAT AGT GTA C
	jp136	CTT CAG CTG GAT AGT GAG TTC C
	wt-0	GTG TCT CCA CCT AAC CTA TGC
	wt-3.as	GGT GAT AAA ATC CAG CTT GAG C
	neo4	GGC TAT TCG GCT ATG ACT GGG C
	neo5	GGG TAG CCA ACG CTA TGT CCT G

Die Standard-PCR-Reaktionen fanden in einem Volumen von 50 µl mit ca. 50 ng Plasmid-DNA oder 0,5 µg genomischer DNA in einfach konzentriertem PCR-Puffer (Gibco Taq PCR Polymerase Puffer bzw. NEB ThermoPol Puffer) mit jeweils 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 0,5 µM der entsprechenden Oligonukleotide (Primer) und 1 - 5 Einheiten Polymerase (Taq oder vent-Polymerase) statt. Wenn nicht im 10fach konzentrierten PCR-Puffer enthalten, wurde MgCl<sub>2</sub> in einer Endkonzentration von 1 - 3 mM zu den Reaktionsansätzen gegeben. Die Amplifizierung ist in einem "DNA-Thermo-Cycler" der Firma Perkin-Elmer Cetus durchgeführt worden. Das Profil der Reaktion richtete sich nach der Quantität und Qualität der Matrizen-DNA, der Länge und dem G/C-Gehalt der Oligonukleotide und der Länge des erwarteten PCR-Fragments.

##### *Standard-PCR-Programm:*

1	Initiale Denaturierung	5 min, 94° C
2	Amplifizierung	30 Zyklen: 1 min, 94° C 30 sec. <i>Annealing</i> 1 min / 1000 bp, 72° C Kettenverlängerung
3	Auffüllen der Enden	5 min, 72° C
4	Kühlung	∞ 4° C

Zum Abschätzen der *Annealing* -Temperatur wurde die Schmelztemperatur der Primer nach der Faustregel 4° C pro G/C und 2° C pro A/T-Nukleotid berechnet. Die gewählte *Annealing*-Temperatur lag dann einige Grade unter der berechneten Primer-Schmelztemperatur, in der Regel zwischen 50 und 55° C.

#### 4.2.14. Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

*Template:* - 0,4 kb *Bam*HI-Fragment der mit den Primern jp101 und jp136 PCR-amplifizierten Sequenz des *BRUCE* cDNA-Klons  $\lambda$ 7-Sal I

Für die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten (200 - 2000 bp Länge) wurde der "High-Prime Kit" (Roche) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Es sind 50-100 ng des zu markierenden Fragments und 50  $\mu$ Ci  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-dCTP eingesetzt worden. In einigen Fällen wurden die nicht eingebauten Nukleotide mit Hilfe einer Gelfiltration ("G25-Spin column", Pharmacia) abgetrennt.

#### 4.2.15. Southern blot -Hybridisierung

*Puffer und Lösungen:*

Natriumphosphat-Puffer:	1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 4 ml H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> auf 1 l Puffer pH 7,2
Hybridisierungspuffer:	0,5 M Natriumphosphat-Puffer 7 % SDS pH 7,2
20 x SSC:	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0
Waschpuffer:	40 mM Natriumphosphat-Puffer 1 % SDS pH 7,2

Genomische DNA (3 - 10  $\mu$ g) wurde bei der geeigneten Temperatur 3 - 16 h verdaut und in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Für eine spätere Orientierung ist ein angelegtes Lineal zusammen mit dem Ethidiumbromid-gefärbten Gel fotografiert worden. Das Gel wurde 3 x 15 min in 500 ml 0,25 M HCl auf einem Schüttler inkubiert. Dieser Schritt führt zur Bildung von Doppelstrangbrüchen innerhalb der DNA-Fragmente, wodurch einen quantitativer Transfer der DNA ermöglicht wird. Anschließend wurde das Gel kurz mit Aqua dest. gewaschen und 3 x 15 min in 0,4 N NaOH (Denaturierung der DNA) auf einem Schüttler inkubiert. Der Transfer erfolgte über Nacht durch Kapillartransfer auf eine positiv geladene Nylonmembran ("GeneScreen PLUS", NEN<sup>TM</sup> Life Science Products) mit 0,4 N NaOH als Transferpuffer. Alternativ

wurde die DNA mit Hilfe eines Vakuum-Blotters auf die Nylonmembran überführt (2 h bei 50 mBar). Nach dem vollständigen Transfer wurde die Membran kurz in 2 x SSC geschüttelt (Entfernung von Agaroseresten), anschließend getrocknet und 30 min bei 65° C fixiert. In diesem Zustand kann die Membran bei RT oder längerfristig bei 4° C bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt werden.

Die getrockneten und fixierten Nylonmembranen wurden kurz in 2 x SSC-Puffer geschwenkt und in 10 - 30 ml Hybridisierungspuffer mit 100 µg/ml denaturierter Heringssperma-DNA für 2 - 3 h bei 65° C prähybridisiert. Anschließend erfolgte die spezifische Hybridisierung der radioaktiv markierten und denaturierten DNA-Sonden in Hybridisierungspuffer über Nacht bei 65° C. Die Membran ist bei der gleichen Temperatur mindestens dreimal mit vorgewärmtem *Southern*-Waschpuffer unter kräftigem Schütteln gewaschen worden. Die nasse Membran wurde in einer Plastikhülle eingeschweißt und zunächst 2 - 24 h (je nach Signalintensität) gegen eine Phosphoimager-Platte exponiert. Hybridisierungssignale wurden mit einem Phosphoimager (FUJIFILM BAS-2500) detektiert und mit den Programmen Image Reader BAS-2500 V1.4E und Image Gauge V3.01 verarbeitet. Die Exposition gegen Röntgenfilm (BIOMAX, Kodak) erfolgte mit Verstärkerfolie (Quanta III) bei -80° C für einen Tag oder bis zu mehreren Tagen.

#### 4.2.16. Präparation von RNA-Sonden mittels *in vitro*-Transkription

<i>Template:</i>	pBS II SK+ pl-1		Dr. M. Moser (MPI für Biochemie, Abt. Mole- kulare Medizin)
	pBS II SK+ gcm-1		
pBS II SK+ mash2			
pBS II SK+ ehand			
	pBS II SK+ flt-1		Dr. T. Floss (GSF, Neuherberg)
	pBS II SK+ flk-1		
	pSuper <sub>13.318</sub> BRUCE <sub>14.101</sub>		

Als Template für die *in vitro*-Transkription wurden 800 - 1200 b lange cDNA-Fragmente der Gene, deren Expression nachgewiesen werden soll, in ein Plasmid mit den Promotorelementen für die T3-, T7- und/oder SP6-Polymerase (z. B. pBSII, Stratagene) kloniert. Die Transkription ist in einem Gesamtvolumen von 30 µl durchgeführt worden.

Reagenz	Volumen (in $\mu\text{l}$ )	Konzentration
DEPC-H <sub>2</sub> O	16,5	
10 x Transkriptionspuffer (Roche)	3,0	1 x
NTP-Mix (ATP, CTP, GTP, je 10 mM)	3,0	1 mM
0,3 M DTT	1,0	10 mM
RNasin (40 U/ $\mu\text{l}$ RNase-Inhibitor, Promega)	1,0	40 U
linearisierte Plasmid-DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	1,5	1,0 $\mu\text{g}$
$\alpha$ -[ <sup>35</sup> S]-UTP (12,5 mCi/ml; 1250 Ci/mmol, Amersham)	3,0	100 $\mu\text{Ci}$
T7, T3 oder SP6 RNA-Polymerase (Roche)	1,0	20 U

Die einzelnen Komponenten wurden bei RT gemischt und insgesamt 3 h bei 37° C inkubiert, wobei nach 1 h nochmals 0,5  $\mu\text{l}$  der RNA-Polymerase zum Ansatz gegeben wurden. Die Plasmid-DNA ist nach der cRNA-Synthese durch Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  RNase-freier DNase I (10 U/ $\mu\text{l}$ , Roche) enzymatisch entfernt worden. Die RNA-Sonden wurden anschließend entweder mit Hilfe der "RNeasy Mini Spin Columns" aus dem "RNeasy Kit" (Qiagen) gereinigt und in insgesamt 50  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser eluiert oder die überschüssigen Nukleotide mittels Gelfiltration entfernt und die RNA gefällt. Die Aktivität der Proben wurde anschließend über Szintillationszählung ermittelt.

#### 4.2.17. *antisense* Oligonukleotid-Sonden

<i>Oligonukleotide:</i>	Proliferin (1)	(NM031191)	b 1 - 63
	Proliferin (2)		b 453 - 514
	Tpbp (4311)	(6678404)	b 1 - 62

Die Sequenzen der benutzten Oligonukleotide waren in jedem Fall publiziert oder aus der veröffentlichten Gensequenz leicht ablesbar (entsprechende Quellen sind angegeben). Für alle verwendeten, komplementär zu den verschiedenen Target-mRNAs synthetisierten, *antisense* Oligonukleotide wurden die vom Hersteller (MWG) gelieferten Lyophilisate gelöst, auf eine Konzentration von 10 pmol/ $\mu\text{l}$  verdünnt und bei -20° C zwischengelagert. In einer Standardreaktion wurden 90 pmol Oligonukleotid mit Deoxyadenosin-5'-[ $\alpha$ -thio]triphosphat [<sup>35</sup>S] wie folgt zur Reaktion gebracht und 30 min bei 37° C inkubiert:

Reagenz	Volumen (in $\mu\text{l}$ )
Oligonukleotid (10 pmol)	9,0
5 x TdT-Reaktionspuffer	4,0
25 mM $\text{CoCl}_2$ (Roche)	4,0
$\alpha$ -[ $^{35}\text{S}$ ]-dATP (12,5 mCi/ml; 1250 Ci/mmol, Amersham)	2,0
Terminale Deoxynukleotidyltransferase (TdT, rekombinant, Roche)	1,0

Bei dieser kobaltabhängigen Enzymreaktion erfolgte die Anknüpfung von 10 - 30 Adenosinmonophosphatresten an das 3'-Ende der Oligonukleotide. Sie wurde mittels EDTA (0,2 M; pH 8,0; 2  $\mu\text{l}$ ) als Komplexbildner gestoppt und die Ansätze einer Gelfiltration mittels "G25-Spin Columns" (Pharmacia) unterzogen. Bei der Zentrifugation der Säulen für 2 min bei 3000 U/min (Eppendorf 5415 C) wurden die radioaktiv markierten Oligonukleotide eluiert und 1 oder 2  $\mu\text{l}$  der erhaltenen Eluate zur Aktivitätsbestimmung im Flüssigkeitsszintillator gemessen, wobei die Zerfallsraten bei 50.000 bis 200.000 cpm/ $\mu\text{l}$  liegen sollten. Den  $^{35}\text{S}$ -markierten Proben wurde nach der Markierung jeweils 1  $\mu\text{l}$  1 M DTT (Dithiothreitol) als Oxidationsschutz zugefügt und die Proben konnten, aufgrund der relativ langen Halbwertszeit des Isotopes von ca. 87 Tagen, bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zu einem Monat bis zu ihrer Verwendung zwischengelagert werden.

### 4.3. Proteinbiochemische Techniken

#### 4.3.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinen erfolgte nach der von Bradford entwickelten Methode mit dem "Protein Assay Kit" (Biorad). Es wurden 1 - 10  $\mu\text{l}$  der zu bestimmenden Proteinlösung mit 1 ml Protein-Assay-Lösung für exakt 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die optische Dichte bei 595 nm mit einem Spektrophotometer (Pharmacia) bestimmt. Als Standard wurden Lösungen mit bekannter Konzentration von Immunglobulinen (IgG) verwendet und eine Eichkurve erstellt.

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

#### *Puffer und Lösungen:*

Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris-Base 190 mM Glycin 0,1 % SDS
Probenpuffer (4x):	8 % w/v SDS 40 % v/v Glycerol 240 mM Tris/HCl pH 6,8 0,02 % Bromphenolblau 100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
Sammelgelpuffer:	1 M Tris/HCl pH 6,8
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl pH 8,8

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte nach ihren Molekulargewichten durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) mit dem "Mighty Small"-Gelsystem (Hofer). Die jeweiligen Trenngele sind nach der Herstellung mit Isopropanol überschichtet worden. Nach der Polymerisation wurde der Alkohol entfernt, die Geloberfläche mit Wasser gespült, das Sammelgel gegossen und die Geltaschen mit einem geeigneten Kamm gesteckt.

Bestandteile	Sammelgel 3,75 % (20 ml)	Sammelgel 5 % (20 ml)	Trenngel 10 % (20 ml)
30 % (w/v) Acrylamid / 0,8 % (w/v) Bisacrylamid	2,5 ml	3,4 ml	6,7 ml
Stammlösung Tris	5,0 ml	2,5 ml	5,0 ml
Aqua dest.	12,1 ml	13,6 ml	7,9 ml
SDS (10 %)	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
APS (0,1 mg/ml)	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
TEMED	75 $\mu$ l	35 $\mu$ l	10 $\mu$ l

Bestandteile	Gradientengel 4 %ige Lösung (25 ml)	Gradientengel 20 %ige Lösung (25 ml)
30 % (w/v) Acrylamid / 0,8 % (w/v) Bisacrylamid	3,3 ml	16,7 ml
Stammlösung Tris	6,25 ml	6,25 ml
Aqua dest.	15,0 ml	-
Succrose	-	3,9 g
	<u>je 10,5 ml</u>	
SDS (10 %)	105 µl	
APS (0,1 mg/ml)	105 µl	
TEMED	2,5 µl	

Die Proteinproben wurden in Probenpuffer aufgenommen, durch Erhitzen (5 - 15 min bei 95° C) denaturiert, auf das Gel aufgetragen und bei einer Stromstärke von 20 - 40 mA pro Gel aufgetrennt (Molekulargewichtsstandard: "Bench Mark Prestained Protein Ladder", Invitrogen). Gradientengele sind mit Hilfe eines Gradientenmischers (Hoefer SG50) gegossen worden.

#### 4.3.3. Western blot

##### *Puffer und Lösungen:*

Transferpuffer:	25 mM Tris/HCl (pH 7,6) 144 mM Glycin 20 % v/v Methanol 0,01 % w/v SDS
TBST-Puffer:	25 mM Tris/HCl (pH 7,6) 137 mM NaCl 0,05 % Tween 20
Ponceau S-Lösung	(Sigma)
Blockierungslösung:	4 % Magermilch in TBST

*Primäre Antikörper:*

- Anti-BRUCE N-term. (Transduction Laboratories; monoklonaler Maus-Antikörper, 1:1000)
- Anti-BRUCE C-term. [HP9, Hauser, AG Jentsch; polyklonaler Kaninchen-Antikörper (affinitätsgereinigt), 1:100]
- Anti-Actin [I-19, Santa Cruz; polyklonaler Ziege-Antikörper (affinitätsgereinigt), 1:1000]
- Anti-p21 (F-9, Santa Cruz; monoklonaler Maus-Antikörper, 1:500)
- Anti-p53 [FL-393, Santa Cruz; polyklonaler Kaninchen-Antikörper (affinitätsgereinigt), 1:250]
- Anti-Survivin (A-19, Santa Cruz; polyklonaler Ziege-Antikörper, 1:500)
- Anti-XIAP (Transduction Laboratories; monoklonaler Maus-Antikörper, 1:250)
- Anti-clAP1 (Pharmingen; polyklonaler Kaninchen Antikörper, 1:200)
- Anti-clAP2 (R&D Systems; polyklonaler Kaninchen-Antikörper, 1:650)
- Anti-Caspase 3 (K-19, Santa Cruz; polyklonaler Ziege-Antikörper, 1:250)
- Anti-Smac (Bartke, AG Jentsch; polyklonaler Kaninchen-Antikörper, 1:5000)

*Sekundäre Antikörper:*

- Ziege, Anti-Kaninchen (Dianova)
- Ziege, Anti-Maus (Dianova)
- Esel, Anti-Ziege (Sigma)

Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membranen (Immobilon, Pharmacia) erfolgte in einer Tankblotapparatur der Firma Hoefer. Membran, Gel, Whatman-Papier und Schwämme wurden gemäß Herstelleranleitung geschichtet und in die Apparatur eingesetzt. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 70 V für mindestens 1 h.

Für den immunochemischen Nachweis von Proteinbanden wurde die Membran für 30 - 60 min in Blockierungspuffer geschwenkt und anschließend mit dem in Blockierungspuffer verdünnten primären Antikörper für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4° C auf dem Schüttler inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit TBST für jeweils 5 min ist die Membran mit einer 1:10.000-Verdünnung des entsprechenden Meerrettichperoxidase-gekoppelten sekundären Antikörpers wie zuvor inkubiert worden. Die Detektion der Immunomarkierung erfolgte nach erneutem fünfmaligen Waschen in TBST mit Hilfe des ECL-Systems (*enhanced chemoluminescence*, Amersham

Pharmacia) gemäß Herstellerangaben. Die bei der enzymatischen Reaktion entstehenden Lichtsignale wurde durch Auflegen eines ECL-Röntgenfilms (Amersham Pharmacia) detektiert.

#### 4.3.4. Herstellung von Proteinextrakten aus kultivierten Zellen

*Puffer und Lösungen:*

PBS:	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
	1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
	pH 7,4

Die ca. 80 % konfluenten Zellen einer 10cm-Zellkulturschale wurden in PBS gewaschen und in einem kleinen Volumen einer 0,25%igen Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco BRL) bei RT abgelöst, in 2 ml Medium resuspendiert und in einer Neubauer-Zählkammer (Roth) gezählt.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und die sedimentierten Zellen nach einer Zentrifugation für 5 min bei 200 x g und RT in Laemmlipuffer resuspendiert, für 10 min bei 95° C lysiert und die Proteine denaturiert. So hergestellte Lysate konnten mehrere Monate bei -20° C aufbewahrt werden.

#### 4.3.5. Herstellung von Proteinextrakten aus embryonalen Geweben

*Puffer und Lösungen:*

Lysepuffer:	50 mM Tris/HCl (pH 7,4)
	150 mM NaCl
	2 mM EDTA, 1 % Triton X-100
	[je nach Bedarf Zugabe von Proteaseinhibitoren (Complete Inhibitor-Cocktail, Roche) und Caspase-Inhibitoren (20 µM ZVAD, Bachem)]

Adulte oder embryonale Gewebe oder Organe wurden nach ihrer Isolation in kalter PBS gewaschen und in einem entsprechenden Volumen Lysepuffer (500 µl pro 100 mg Gewebe) in einem Homogenisator (Roth) von geeigneter Größe gründlich homogenisiert. Das Homogenat wurde weitere 15 min auf Eis inkubiert, anschließend die noch vorhandenen Zelltrümmer abzentrifugiert (20 min bei 4° C und 20.000 x g) und das Lysat in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Sofort erfolgte die Bestimmung der

Gesamtproteinkonzentration nach Bradford und mit Lysepuffer wurde eine geeignete Proteinkonzentration (10 mg/ml) eingestellt. Die Proteine wurden in Laemmlipuffer für 10 min bei 95° C denaturiert und die so hergestellten Lysate bei -80° C gelagert.

#### 4.4. Methoden im Umgang mit eukaryontischen Zellen

##### 4.4.1. Isolierung primärer Fibroblasten aus Mausembryonen

*Puffer und Lösungen:*

Zellkultur-Medium:	Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) 4500 mg/l Glucose (Gibco BRL) 10 % Fetales Kälberserum (FCS, Sigma) 100 u/ml Penicillin / 100 u/ml Streptomycin (Gibco BRL)
--------------------	---

Embryonale Fibroblasten (MEFs) können relativ einfach aus Mausembryonen zwischen den embryonalen Entwicklungsstadien E11,5 und E14,5 isoliert werden. Nach der Verpaarung von heterozygoten C57Bl/6- $\Delta$ BRUCE-Mäusen wurde am folgenden Morgen durch "Plug-Kontrolle" die Befruchtung der Weibchen festgestellt. Dieser Tag entspricht dem embryonalen Entwicklungsstadium E0,5. Elf bis vierzehn Tage später wurden die tragenden Weibchen durch zerebrale Dislokation euthanasiert, der Bauchraum geöffnet und die im Uterus befindlichen Embryonen entnommen und in PBS gespült. Uterusgewebe, Plazenta und Amnion wurden verworfen oder für andere Anwendungen präpariert. Der Kopf ist unter der Sterilbank von den Embryonen abgetrennt und für die Genotypisierung aufbewahrt worden. Nach der Entfernung der inneren Organe wurden die Embryonen mittels einer Spritze mit einer 18G- oder 19G-Kanüle separat in 5 ml Zellkulturmedium in einer 6cm-Schale zerkleinert und die Gewebestücke über Nacht bei 37° C, 7,5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Aus den embryonalen Zellklumpen wuchsen innerhalb von ein bis zwei Tagen Fibroblasten aus. Nachdem die Zellen eine 50 - 80%ige Konfluenz erreichten, wurden sie in PBS gewaschen, durch Zugabe von einem geringen Volumen 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und in 5 ml Medium leicht resuspendiert. Nach dem Absinken der Zellklumpen wurde der fibroblastenhaltige Überstand in eine 10cm-Zellkulturschale mit vorgewärmtem Medium überführt und unter den bereits genannten Bedingungen weiter inkubiert. Nach der

Genotypisierung der Klone mittels PCR wurden für weitere Analysen jeweils 4 Wildtyp-Linien, 4 heterozygote Linien und 4 *Knockout*-Linien parallel kultiviert.

#### 4.4.2. Kultivierung und Konservierung eukaryontischer Zellen

*Puffer und Lösungen:*

Einfriermedium: 10 % DMSO in FCS

Die primären MEFs wurden in Monolayerkultur bei 37° C, 7,5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit in DMEM (Gibco BRL) mit 10% FCS und Penicillin/Streptomycin kultiviert. Für den Zellumsatz wurde bei einer Konfluenz von 80 - 100 % das Kulturmedium entfernt und der Zellrasen mit steriler PBS gewaschen. Die Zellen wurden in einem kleinen Volumen einer 0,25%igen Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco BRL) abgelöst, in etwas Medium resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 ml vorgewärmtem Medium überführt. Nach einer kurzen Zentrifugation (4 min, 200 x g, RT) wurden die sedimentierten Zellen in einem geeigneten Volumen Kulturmedium gut vereinzelt und im Verhältnis 1:3 in neue Kulturschalen umgesetzt. Das Wachstumsmedium ist täglich gewechselt worden.

Für die Konservierung wurden die sedimentierten Zellen in 2 ml vorgekühltem Einfriermedium vorsichtig resuspendiert und in vorgekühlte Kryoröhrchen (Nalgene) überführt. Die Absenkung der Temperatur auf -80° C erfolgte sehr langsam (ca. 1° C pro Minute) in Einfrierboxen (Nalgene). Nach Erreichen dieser Temperatur wurden die Zellen für die Dauerlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen in einem Wasserbad schnell auf 37° C erwärmt, zentrifugiert und in 10 ml vorgewärmtes Medium gegeben.

#### 4.4.3. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde als die Anzahl suspendierter Zellen in einem bestimmten Volumen mit einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt.

Ein Tropfen (10 µl) Zellsuspension wurde auf die Zählplatte gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen in den Quadraten durch Auszählen ermittelt. Die durchschnittliche Anzahl der Zellen in einem großen

Quadrat, bestehend aus 16 kleinen Quadraten, multipliziert mit 10.000 ergab die Zellzahl pro Milliliter.

#### 4.4.4. Erstellung von Wachstumskurven

Um Abweichungen im Wachstumsverhalten zwischen Wildtyp- und *Knockout*-Linien nachzuweisen sind Wachstumskurven erstellt worden. Hierzu wurden die Zellen gezählt und in drei verschiedenen Dichten in 6cm-Schalen ausgesät [ $1 \times 10^5$  Zellen pro Schale (suboptimal niedrige Wachstumsdichte),  $3 \times 10^5$  Zellen pro Schale (optimale Wachstumsdichte),  $9 \times 10^5$  Zellen pro Schale (suboptimal hohe Wachstumsdichte)]. Während einer Wachstumsphase von insgesamt 10 Tagen wurden alle zwei Tage die Zellen gezählt und das Medium gewechselt.

#### 4.4.5. Immortalisierung primärer Fibroblasten

Da primäre embryonale Fibroblasten in Kultur eine sehr hohe spontane Immortalisierungsrate aufweisen, ist es nach dem 3T3-Protokoll (Todaro G. J. und Green H., 1963) möglich, immortalisierte Zell-Linien herzustellen, ohne die Zellen mit viralen Onkogenen transfizieren zu müssen. Hierzu ist es notwendig, die Zellen stets in der Wachstumsphase zu halten. Alle 3 Tage wurde eine neue 6cm-Schale mit  $3 \times 10^5$  Fibroblasten inokuliert. Nach einigen dieser 3T3-Passagen sanken die Wachstumsraten der Zellen und die Fibroblasten gingen in eine "Wachstumskrise" über, in der kaum noch teilungsfähige Zellen nachzuweisen waren. In dieser Zeit wurde lediglich das Medium regelmäßig gewechselt. Innerhalb weniger Wochen war ein erneuter Wachstumsschub der nun spontan immortalisierten Zellen zu beobachten und die Wachstumsrate stieg langsam wieder auf das Niveau der primären Zellen an. Um aus diesem Zellgemisch eine homogene Linie zu erhalten, wurden die Zellen über eine Verdünnungsreihe vereinzelt, einzelne Klone herausgepickt und kultiviert.

#### 4.4.6. Seneszenz-Assay (SA- $\beta$ -Gal-Färbung)

Primäre Zellen zeigen eine begrenzte Replikationskapazität, die bei den meisten "normalen" Zellen in die Seneszenz führt. Dieses Stadium ist u. a. durch die Expression der SA- $\beta$ -Gal (*senescence-associated  $\beta$ -galactosidase*) und ihre pH-abhängige Aktivität gekennzeichnet, wodurch sich seneszente Zellen in Kultur oder im Gewebe einfach nachweisen lassen. Der Seneszenz-Assay wurde *in vitro* mit Hilfe des "Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit" (Cell Signaling) durchgeführt. Hierfür sind frisch isolierte embryonale Fibroblasten über mehrere 3T3-Passagen kultiviert worden. Nach jeder Passage wurde eine zu etwa 80 % konfluent bewachsene 6cm-Zellkulturschale für den Test herangezogen, die Zellen in PBS gewaschen und mit einer Glutaraldehyd-haltigen Fixierlösung fixiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen und anschließend in einer Färbelösung mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indol- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (X-Gal) über Nacht bei 37° C inkubiert. Nach Entfernung der Färbelösung und Waschen der Zellen wurden diese mit 70 % Glycerol überschichtet, mikroskopisch ausgewertet, dokumentiert und bei 4° C gelagert.

#### 4.4.7. Proliferationsstudien (PI-Färbung und FACS-Analyse)

*Puffer und Lösungen:*

PI-Färbelösung:	100 ml 0,1 % Triton X-100 in PBS
	20 mg RNase A
	2 mg Propidiumjodid

Zellen weisen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus einen unterschiedlichen DNA-Gehalt auf (1n in der G<sub>1</sub>-Phase, zwischen n und 2n in der Synthese-Phase, 2n in der G<sub>2</sub>- oder der Mitose-Phase). Mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffe, die in die DNA interkalieren (z.B. Propidiumjodid) und einer anschließenden Messung des DNA-Gehaltes in einem FACS-Gerät (Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer), kann man Aussagen über das Proliferationsverhalten bestimmter Zellen treffen und Zellen in bestimmten Zellzyklusphasen nachweisen. Für die FACS-Analyse wurden die zu untersuchenden Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten geerntet, wobei Medium und Waschüberstand ebenfalls gesammelt und mitverwendet wurden, um auch sich teilende und apoptotische Zellen mitzuerfassen. Die Zellen wurden in einem 50ml-Falcon gesammelt, 6 min bei 200 x g zentrifugiert und in einem entsprechenden

Volumen PBS resuspendiert (1 - 2 ml). Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt,  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen für die Analyse abgenommen und in einem 15ml-Falcon erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde in 500  $\mu$ l PBS gut resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 4,5 ml eiskaltem 70%igem Ethanol für mindestens 2 h fixiert. Die fixierten Zellen wurden in 5 ml PBS gewaschen, erneut abzentrifugiert, anschließend in 900  $\mu$ l PI-Färbelösung resuspendiert und 30 min bei RT in Dunkelheit inkubiert. Es folgte die Messung des DNA-Gehaltes im FACS-Gerät (FACSCalibur, Becton Dickinson). Die Auswertung der Daten ist mit Hilfe der Software CELLQuest (Becton Dickinson) vorgenommen worden. Um synchronisierte Zellen für die Analyse des gesamten Zellzyklus zu erhalten, wurden die primären Fibroblasten zunächst durch Kontaktinhibition in  $G_0$  arretiert und anschließend für 36 h in Medium mit minimaler Serumkonzentration (0,3 % FCS) kultiviert. Die Zellen wurden danach in optimaler Wachstumsdichte erneut ausgesät und mit einer erhöhten Serumkonzentration (20 % FCS) im Medium stimuliert. Über einen Zeitraum von insgesamt 36 h wurden fortlaufend Proben genommen, wie beschrieben gefärbt und im FACS-Gerät ausgewertet.

#### 4.4.8. Apoptose-Assays

##### 1) TUNEL-Assay und Vitalfärbung

Mit Fortschreiten des programmierten Zelltods wird die genomische DNA in der Zelle fragmentiert. Es entstehen sowohl Doppel- als auch Einzelstrangbrüche, die mit Hilfe der TUNEL-Reaktion (*terminal TdT-mediated dUTP nick end-labeling*) detektiert werden können. Dabei katalysiert die terminale Deoxynucleotid-Transferase (TdT) die Polymerisation von markiertem dUTP an freie 3'-OH Enden der DNA. Um zu beobachten, ob in den isolierten embryonalen *Knockout*-Fibroblasten im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen während der normalen Kulturphase vermehrt Zelltod auftrat, wurden die Zellen auf Kammer-Objektträgern ("Chamber Slide Lab-Tek", NalgeNunc) kultiviert. Die TUNEL-Assays sind mit Hilfe des "ApoTag *In Situ* Apoptosis Detection Kit" (Oncor) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt worden.

Zusätzlich wurden die embryonalen Fibroblasten nach jeder Passage vor dem Umsetzen in neue Kulturgefäße in Anwesenheit von Trypanblau gezählt. Dafür wurden 50  $\mu$ l der suspendierten Zellen entnommen, 1:1 mit 0,5%iger Trypanblaulösung (Sigma)

gemischt, kurz inkubiert und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Der Farbstoff verbleibt nur bei toten und sterbenden Zellen in der Zelle, die vitalen Zellen hingegen erscheinen hell unter dem Mikroskop. Die jeweilige Anzahl der blau gefärbten Zellen wurde dokumentiert.

## 2) Zytotoxizitäts-Studien

Um die Sensitivität der Zellen gegenüber unterschiedlichen Apoptose-induzierenden Substanzen zu testen, wurden die MEFs mit einer Dichte von 18.000 Zellen pro Well in 96-Well-Platten ausgesät, wobei die äußeren Wells ausgespart und nur mit Medium bestückt wurden. Am folgenden Tag wurde das Kulturmedium abgenommen und durch 100  $\mu$ l frisches Medium mit den zu testenden Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen ersetzt [Actinomycin D (Sigma): 0,01 bis 2,5  $\mu$ g/ml, Anisomycin (Sigma): 0,05 bis 2,5  $\mu$ M, Brefeldin A (Sigma): 0,1 bis 20  $\mu$ g/ml, Calcimycin (Calbiochem): 0,05 bis 5,0  $\mu$ M, Camptothecin (Calbiochem): 0,1 bis 20  $\mu$ g/ml, UV-Strahlung: 10 bis 500 J/m<sup>2</sup>, Etoposid (Sigma): 0,5 bis 100  $\mu$ M, Tunicamycin (Sigma): 0,1 bis 10  $\mu$ g/ml, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck): 10 bis 500  $\mu$ M, TNF- $\alpha$  (R&D Systems): 1,0 ng/ml bis 1,0  $\mu$ g/ml allein oder in Kombination mit 1,0  $\mu$ g/ml Cycloheximid (CHX), CHX (Sigma): 1,0 bis 50  $\mu$ g/ml, Hamster Anti-Maus Fas (Pharmingen): 1,0 bis 100 ng/ml]. Als Kontrolle wurden Zellen nur mit Medium bzw. mit Medium, welches das jeweilige Lösungsmittel der Substanz in den entsprechenden Konzentrationen enthielt, überschichtet. Die Platten wurden maximal 32 h bei 37° C inkubiert. Über diesen Zeitraum verteilt sind Proben genommen worden. Dafür wurde das Medium aus den Platten entfernt und durch 70  $\mu$ l Färbelösung (0,5 % Kristallviolett (w/v) in 40 % Methanol in PBS) ersetzt. Nach 20minütiger Inkubation bei RT wurden die Platten mehrfach in PBS gewaschen und luftgetrocknet. Nur die lebenden Zellen werden in der Färbelösung in den Wells fixiert und durch den Farbstoff angefärbt. Die Intensität der Färbung gibt also Aufschluss über die Sensitivität der Zellen gegenüber der Apoptose-stimulierenden Substanz. Neben der visuellen erfolgte eine detaillierte Auswertung im ELISA-Spektrophotometer (Labsystems Multiskan RC). Hierfür wurde der Farbstoff in den Wells durch Zugabe von 70  $\mu$ l Methanol pro Well gelöst und die optische Dichte der Lösungen bei einer Wellenlänge von 590 nm bestimmt. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen wurde ermittelt, indem die einzelnen OD-Werte mit den Werten der Kontrollen verglichen und die Differenz bestimmt wurde.

## 4.5. Tierhaltung

<i>Mausstämme:</i>	C57BL/6 (Wildtyp)
	C57BL/6- $\Delta$ BRUCE (heterozygot)
	C57BL/6-BRUCE Gene Trap W036C08 (heterozygot)
	129/SvJ (Wildtyp)
	129/SvJ- $\Delta$ BRUCE (heterozygot)

Die Zucht der Mausstämme erfolgte unter Einhaltung der allgemeinen ethischen Richtlinien für die Tierhaltung in der tierexperimentellen Einrichtung des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried unter der Leitung von Dr. Brandstetter. Die Tiere der Genfallen-Linie W036C08 stammen aus den Beständen der GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit)-Tierhaltung in Neuherberg. Die Mäuse wurden gruppenweise in Käfigen bei unbegrenztem Angebot an Futter und Wasser spezifiziert pathogenfrei (SPF) in einem Raum mit Standardtemperatur und Standardfeuchtigkeit ( $21 \pm 0,5^\circ \text{C}$ , 55 – 75 %) in einem 12h-Tag/Nacht-Zyklus gehalten. In einem Alter von 3 bis 4 Wochen wurden sie von der Mutter abgesetzt und eine Schwanzbiopsie für die Genotypisierung genommen. Die Tiere konnten über ein Lochsystem bzw. eine Nummernmarke im Ohr identifiziert werden.

## 4.6. Histologische Techniken

### 4.6.1. Präparation und Aufarbeitung der Gewebe für die Histologie

#### *Puffer und Lösungen:*

Bouin's Fixativ:	75 ml gesättigte Pikrinsäurelösung 25 ml 37 % Formaldehyd 5 ml Eisessig
4 % Formalin:	12 ml 37 % Formaldehyd 88 ml PBS
4 % PFA:	40 g Paraformaldehyd in 500 ml DEPC-Wasser bei $60^\circ \text{C}$ unter tropfenweiser Zugabe von 1 M NaOH lösen 500 ml 2 x PBS dazugeben
Zinkformalin; pH 6,25	(Polysciences Inc.)

Um histologische Untersuchungen an Wildtyp-, sowie heterozygoten und homozygoten *Knockout*-Embryonen eines Wurfes in unterschiedlichen Entwicklungsstadien vornehmen zu können, wurden heterozygote Mäuse verpaart. Die Befruchtung der Weibchen ist am folgenden Morgen durch "Plug-Kontrolle" festgestellt worden. Dieser Tag entspricht in diesen Ausführungen dem embryonalen Entwicklungsstadium E0,5. Zum Zeitpunkt des gewünschten Embryonalstadiums, die Weibchen dieses Stamms tragen ihren Nachwuchs in einem Zeitraum von 18 - 19 Tagen aus, wurden die tragenden Weibchen durch zerebrale Dislokation euthanasiert, der Bauchraum geöffnet, die im Uterus befindlichen Embryonen entnommen und in PBS gespült. Uterusgewebe wurde verworfen, Plazenta und Amnion jedoch mit den Embryonen für die Analyse präpariert. Amnion- oder Schwanzgewebe sind für die Genotypisierung aufbewahrt worden.

Lebendes Gewebe unterliegt nach der Entnahme aus dem Organismus drastischen Veränderungen. Um diesen postmortalen Zersetzungsvorgang zu unterbrechen und die Struktur der Embryonen und Gewebe möglichst im Originalzustand festzuhalten, erfolgte eine Fixierung mit einem für die spätere Anwendung geeigneten Fixativ. Fixiert wurde je nach Fixativ meist über Nacht bei RT (Formalin, Bouin's) oder 4° C (PFA). Anschließend wurden die Proben in 50 % Ethanol gewaschen (bei Fixierung mit Bouin's Fixativ mehrfach) und gegebenenfalls bei 4° C gelagert. Bei Verwendung von Zinkformalin wurde das Material nach erfolgter Fixierung zunächst in 4 % Formalin gespült, damit während der folgenden Entwässerung keine Schädigung des Gewebes durch Ausfällungen erfolgte.

#### **4.6.2. Einbettung**

Über eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 2 x 96 % und 3 x 100 % Ethanol) wurde das zuvor fixierte Gewebe entwässert. Zur vollständigen Entfernung des Alkohols wurde das Gewebe vor der Durchtränkung mit flüssigem Paraffin mit dem Zwischenmedium Xylol durchtränkt, das sich sowohl mit Alkohol als auch mit Paraffin mischt. Die Einbettung der Gewebestücke erfolgte in einem Einbettautomaten der Firma Shandon. Nach dem Einlegen der Gewebestücke in beschriftete Kassetten (Roth) wurden diese, mit einem Deckel verschlossen, in einen speziellen Gewebekorb

geschichtet und in den Automaten eingebracht. Die Einbettung erfolgte nach folgendem Protokoll:

Reagenz	Temperatur (in °C)	Zeit (in min)	
70 % EtOH	37	30	bewegt
80% EtOH	37	30	bewegt
96 % EtOH	37	30	bewegt
96 % EtOH	37	45	tidal & bewegt
100 % EtOH	37	30	tidal & bewegt
100 % EtOH	37	30	tidal & bewegt
100 % EtOH	37	45	tidal & bewegt
Xylol	37	30	tidal & bewegt
Xylol	37	45	bewegt
Paraffin	60	30	bewegt
Paraffin	60	30	bewegt

Anschließend wurde der Gewebekorb aus dem Automaten entnommen, die Kassetten in die dafür vorgesehene Wanne (Temperatur 60° C) der Paraffinausgießstation (Leica) gegeben und das eingebettete Gewebe ausgeblockt.

#### 4.6.3. Ausblocken

Zum Zwecke des Ausblockens wurde das eingebettete Gewebe in die vorgewärmten Metallausgießrahmen (24 x 24 mm, 5 mm tief bzw. 24 x 30 mm, 9 mm tief) gelegt. Die Formen wurden mit flüssigem Paraffin (65°C) aus dem Paraffinspender gefüllt, das Gewebe im Paraffin richtig positioniert und ausgerichtet und der Metallrahmen anschließend mit der dazugehörigen Kassette abgedeckt. Zum Erkalten des so erhaltenen Blockes ist die Form samt Inhalt auf eine Kühlplatte gestellt worden. Nach völligem Erkalten wurde der Block aus dem Rahmen entfernt, bis zum Schneiden auf der Kühlplatte belassen oder bei RT gelagert.

#### 4.6.4. Anfertigung von Paraffinschnitten

Die Paraffinblöcke wurden in die Halterung des halbautomatischen Mikrotoms (RM 2145, Leica) eingespannt, zu der gewünschten Schnittfläche des Gewebes getrimmt und je nach Anwendung 4 - 10  $\mu\text{m}$  dünne Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in einem Wasserbad (Leica) bei 37° C geglättet, auf SuperFrost Plus-Objektträger (Roth) gezogen und auf einem Strecktisch (Leica) bei 40° C mehrere Stunden adheriert und getrocknet. Anschließend sind die Paraffinschnitte bis zur weiteren Verwendung staubfrei bei RT gelagert worden. Um Schnitte für *in situ*-Hybridisierungen herzustellen, wurde unter RNase-freien Bedingungen gearbeitet.

#### 4.6.5. Anfertigung von Gefrierschnitten

Die zu schneidenden Embryonen bzw. Organe wurden nach der Präparation auf Trockeneis durchgefroren und bis zum Schneiden bei -80° C gelagert. Vor dem Schneiden wurden SuperFrost Plus-Objektträger (Roth) im Kryostaten vorgekühlt, die gefrorenen Gewebe in "Tissue-Tek O.C.T Compound" (Sakura Finetek Europe) eingebettet und auf die richtige Schnitt-Temperatur gebracht. Nach dem jeweiligen Schnittplan sind 10 bis 16  $\mu\text{m}$  dünne Schnitte angefertigt und auf die Objektträger gezogen worden. An dieser Stelle wurden die Schnitte bis zur weiteren Verwendung bei -80° C zwischengelagert.

#### 4.6.6. Färbetechniken

##### 1) *Hämatoxylin-Eosin-Färbung*

Um Gewebe und einzelne Zellen unter dem Mikroskop besser identifizieren zu können, wurden sie angefärbt. Die gängigste Methode um Übersichtsfärbungen in Geweben durchzuführen ist die Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer (HE-Färbung). Hämatoxylin dient dabei vor allem zur Anfärbung von Zellkernen, wohingegen das Eosin bevorzugt Plasmaanteile anfärbt. Häufig tritt jedoch auch eine Färbung verschiedener basischer oder saurer Gewebe auf. Die 4 - 8  $\mu\text{m}$  dünnen Paraffinschnitte wurden über Xylol (zum Entfernen des Paraffins) und eine abfallende Ethanolreihe rehydriert. Die Objektträger wurden 15 min in Mayer's Hämatoxylin (Sigma) inkubiert

und anschließend mehrere Minuten in Leitungswasser gefolgt von 10 sec. 1 % HCl in 70 % Ethanol differenziert. Daraufhin sind die Schnitte unter fließendem Wasser 15 min gespült worden. Die Präparate wurden nun etwa 2 min in der Eosin Y-Lösung (0,5 % Eosin Y in Aqua dest., 10 Tropfen Eisessig pro Liter) inkubiert, anschließend mehrere Minuten in Wasser gespült, kurz in 80 % Ethanol differenziert und über eine aufsteigende Alkoholreihe, beginnend bei 90 % Ethanol, dehydriert. Danach wurden die Schnitte zweimal je 5 min in Xylol inkubiert und anschließend in "VectaMount" (Vector Laboratories) eingedeckelt.

### *2) Nisslfärbung mit Kresylviolett*

Diese vor allem in der Neurohistologie angewandte Methode wurde für die Gegenfärbung von Gewebe nach radioaktiven *In situ*-Hybridisierungen herangezogen, da sie gut mit Silberfärbungen kombiniert werden kann. Sie beruht auf einer Überfärbung des Schnittes mit Kresylviolett, einem Farbstoff der Tiazinfamilie, und dem nachfolgendem Auswaschen des Farbstoffüberschusses, wobei sich die Fasern schneller als die Zellbestandteile entfärben, wodurch erreicht wird, dass das Zellmaterial intensiv gegenüber dem farblosen Hintergrund gefärbt wird. Die Schnitte wurden wie bereits beschrieben rehydriert, kurz in Aqua dest. gewässert und 30 bis 60 min in gepufferter Kresylviolettlösung [0,5 % Kresylviolett in Natriumacetatpuffer (16,4 g/l Natriumacetat, pH 3,8 - 4,0 mit 99%iger Essigsäure)] gefärbt. Danach wurden die Präparate in Acetatpuffer (16,4 g/l Natriumacetat, pH 6,0 mit 99%iger Essigsäure) gespült, in einer aufsteigenden Ethanolreihe, beginnend mit 70 % Ethanol, entwässert und über Xylol als Zwischenmedium eingedeckelt.

### *3) Methoden der Gegenfärbung*

Um nach histologischen Anwendungen wie der Immunohistochemie Gewebe und einzelne Zellen in der Auswertung unter dem Mikroskop besser identifizieren zu können, wurden die Schnitte einer geeigneten Gegenfärbung unterzogen. Anwendung fanden dabei "Vector Nuclear Fast Red", "Vector Methyl Green" und "Vector Hematoxylin QS" (Vector Laboratories) nach den Vorschriften des Herstellers.

#### 4.6.7. Immunhistochemie

Die folgenden primären Antikörper fanden in dieser Methode Verwendung. In Klammern finden sich unter anderem Angaben zur Verdünnung für die Immundetektion.

- Anti-Laminin (Sigma; polyklonaler Kaninchen-Antikörper, 1:25)
- Anti-*active* Caspase 3 (Promega; polyklonaler Kaninchen-Antikörper, 1:150)
- Anti-p21 (Ab-5, NeoMarkers; monoklonaler Maus-Antikörper, 2 µg/ml)
- Anti-p53 (CM5, NOVO Castra; polyklonaler Kaninchen-Antikörper, 1:500)

Für die Immunhistochemie wurden 6 - 8 µm dünne Mikrotomschnitte des in Paraffin eingebetteten Materials angefertigt und auf Objektträger gezogen. Das Paraffin wurde mittels Xylol aus dem Gewebe herausgelöst und die Schnitte anschließend über eine fallende Ethanolreihe rehydriert. Die Detektion der Antigene durch die spezifischen Antikörper erfolgte mit Hilfe der Vectastain ABC (*Avidin:Biotinylated enzyme Complex*)-Methode nach Su-Ming Hsu et al. 1981 (Vector Laboratories). Da die Protokolle der folgenden Vectastain-Produkte ohne Modifikationen miteinander kombiniert und nach den Angaben des Herstellers angewandt wurden, soll an dieser Stelle nur ein kurzer Überblick über die Methode gegeben werden.

- "R.T.U. Vectastain Universal Quick Kit"
- "Avidin/Biotin Blocking Kit"
- "M.O.M. Basic Kit"
- "Peroxidase Substrate Kit DAB"
- "Nuclear Fast Red", "Methyl Green", "Hematoxylin QS"
- "VectaMount Permanent Mounting Medium"

Nach einer Inaktivierung der gewebeeigenen Peroxidase erfolgte in mehreren Schritten die Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen, endogenem Biotin und gewebeinternen Immunglobulinen, um die Intensität des Hintergrundsignals zu minimieren. Für einige Antikörper war zusätzlich die Demaskierung des Antigens notwendig (entweder enzymatisch oder durch Erhitzen der Schnitte in Citratpuffer in der Mikrowelle). Die Schnitte wurden zuerst 1 h bei RT in einer feuchten Kammer mit dem primären, gegen das gewünschte Antigen gerichteten Antikörper und anschließend für

30 min mit einem pan-spezifischen biotinylierten sekundären Antikörper inkubiert. In einem weiteren Inkubationsschritt bindet die mit Streptavidin komplexierte Peroxidase an die Biotingruppen des sekundären Antikörpers und die gesamte immunhistochemische Reaktion kann mit dem Peroxidase-Substrat DAB (3,3'-Diaminobenzidin) colorimetrisch detektiert werden. Die braunen bis grau-schwarzen Präzipitate sind unlöslich und so können die Schnitte nach einer geeigneten Gegenfärbung dehydriert und in *Mounting Medium* dauerhaft eingedeckelt werden.

#### 4.6.8. *In situ*-Hybridisierung mit radioaktiv markierten RNA-Sonden

##### *Puffer und Lösungen:*

DEPC-H <sub>2</sub> O:	1 ml DEPC pro 1 l Wasser ÜN bei 37° C schütteln, 2 × autoklavieren
Proteinase K – Puffer:	50 mM Tris/HCl (pH 7,6) 5 mM EDTA (pH 8,0) mit DEPC behandeln und autoklavieren
20 x SSC:	175,32 g NaCl 88,23 g tri-NaCl x 2H <sub>2</sub> O mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen pH 7,0; mit DEPC behandeln und autoklavieren
1M Triethanolamin (10x):	42 ml TEA (Merck) 100 ml Aqua dest. pH 8,0 mit 32 % HCl einstellen mit DEPC-H <sub>2</sub> O auf 250 ml auffüllen
2 M Natriumacetat:	8,203 g NaAc in 40 ml Aqua dest. lösen pH mit HAc einstellen und auf 50 ml auffüllen (pH 5,2)
1 M DTT:	3,09 g DTT in 20 ml 0,01 M NaAc (pH 5,2) lösen, steril filtrieren, aliquotiert bei -20° C lagern
EDTA (0,25 M):	9,305 g Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O in 30 ml Aqua dest. lösen mit 2 M NaOH (ca. 20 ml) auf pH 8,0 einstellen, auf 100 ml auffüllen

Carrier-(ss)DNA (4mg/ml): (aus Heringssperma)	60 mg DNA in 12 ml DEPC-Wasser suspendieren + 1 ml 4 N NaOH, bei 45° C lösen + 2 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,4)
Poly(A)-RNA (Sigma):	5 mg/ml in DEPC-H <sub>2</sub> O
tRNA (10 mg/ml):	tRNA in DEPC-H <sub>2</sub> O lösen (2,5 mg/ml) Phenol/Chloroform-Extraktion Ethanol-Fällung Bestimmung der Konzentration (OD <sub>260</sub> ) Konzentration mit DEPC-H <sub>2</sub> O auf 10 mg/ml einstellen und Aliquots bei -80° C lagern
Hybridisierungspuffer	(InnoGenex)
5 x NTE:	2,5 M NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 25 mM EDTA (pH 8,0) autoklavieren
4 M Ammoniumacetat:	77,1 g NH <sub>4</sub> OAc auf 250 ml mit DEPC- H <sub>2</sub> O auffüllen autoklavieren

Im Unterschied zu den bereits beschriebenen Methoden der DNA- und RNA-Hybridisierung, die von aus Geweben isolierter DNA bzw. RNA ausgehen, basiert die *in situ*-Hybridisierung (ISH) auf der Identifizierung und Lokalisierung von spezifischen Nukleotidsequenzen innerhalb des Gewebes und erlaubt somit eine eindeutige Zuordnung der nachzuweisenden Targetgene zu bestimmten Organregionen.

Alle zur ISH verwendeten sagittalen Embryo- bzw. Plazentaschnitte wurden entweder in einem Kryostaten in einer Schichtdicke von 14 µm geschnitten oder sie wurden in Paraffin eingebettet und in einem Mikrotom Schnitte mit einer Dicke von 8 µm angefertigt.

Die Paraffinschnitte wurden zunächst zweimal 15 min mit Xylol behandelt und anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert (2 × 5 min 100% EtOH, 1 × 5 min 70 % EtOH und 1 × 3 min DEPC-H<sub>2</sub>O). Diese Schritte entfallen bei der Bearbeitung von Kryostatschnitten, welche lediglich der Aufbewahrungsbox entnommen und für 30 min an der Luft getrocknet worden sind. Alle Proben wurden für 3 min in DEPC-PBS gewaschen und dann für 20 min auf Eis in 4 % Paraformaldehydlösung (PFA) fixiert. Anschließend wurden die Schnitte 2 × 5 min mit PBS gewaschen und für

die Targetdemaskierung 7 min mit 20 µg/ml Proteinase K in PK-Puffer inkubiert. Die Präparate wurden erneut mit PBS gewaschen, 20 min in 4 % PFA nachfixiert und wiederum in PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte zu der Erzielung negativer Ladungen auf der Schnittoberfläche und damit der Reduzierung unspezifischer Bindungen einer Acetanhydrid-Behandlung unterzogen und unter Rühren 10 min in 0,1M Triethanolamin-Lösung mit frisch zugesetztem Essigsäureanhydrid (600 µl auf 200ml TEA-Lösung) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in 2 × SSC und Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (je 1 min 60 % EtOH, 70 % EtOH, 95 % EtOH, 100 % EtOH) wurden die Schnitte schließlich an der Luft getrocknet. Kryoschnitte sind zur Lipidentfernung vor der Trocknung zusätzlich je 1 min in Chloroform, 100 % EtOH und 95 % EtOH gespült worden.

Für die Hybridisierung wurden 35.000 - 70.000 cpm/µl der entsprechenden radioaktiv markierten RNA-Sonde mit Hybridisierungspuffer zu einem Endvolumen von 90 µl gemischt, für 2 min bei 90° C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Das Hybridisierungsgemisch wurde auf die Objektträger gegeben und die Präparate blasenfrei eingedeckelt. Die Hybridisierung erfolgte 16 - 20 h bei einer Temperatur von 57,5° C in einer gut verschlossenen feuchten Kammer mit ausreichend Flüssigkeit (50 % Formamid / 4 × SSC).

Reagenz	Temperatur (in °C)	Zeit (in min)
2 × SSC, 1 mM DTT	RT	2 × 5 min
1 × SSC, 1 mM DTT	RT	10
0,5 × SSC, 1 mM DTT	RT	10
0,1 × SSC, 1 mM DTT	64	2 × 30
0,1 × SSC	RT	2 × 10
30 % EtOH in 300 mM NH <sub>4</sub> OH	RT	1
50 % EtOH in 300 mM NH <sub>4</sub> OH	RT	1
70 % EtOH in 300 mM NH <sub>4</sub> OH	RT	1
95 % EtOH	RT	1
100 % EtOH	RT	2 × 1

Nach der Hybridisierung wurden die Deckgläser von den Objektträgern entfernt und die Präparate  $4 \times 5$  min bei RT mit  $4 \times$  SSC gewaschen. Um einzelsträngige, nicht hybridisierte RNA von den Schnitten zu entfernen, wurden diese für 20 min bei  $37^\circ\text{C}$  mit  $20 \mu\text{g/ml}$  RNase A in NTE-Puffer inkubiert und anschließend nach dem in der Tabelle zusammengefassten Protokoll gewaschen.

Die entwässerten und getrockneten Schnitte wurden mit Autoradiographiefilmen (Hyperfilm- $\beta$ max, Amersham) für 1 bis 3 Tage licht- und erschütterungsgeschützt exponiert. Nach der Entwicklung der Filme, die für erste Auswertungen in Bezug auf Stärke und Spezifität des Signals Verwendung fanden, wurden die Objektträger mit Fotoemulsion (LM-1, Amersham Biosciences) beschichtet. Die Fotoemulsion sowie die Kammer zum Eintauchen der Objektträger sind im Wasserbad auf  $43^\circ\text{C}$  vorgewärmt worden. Die für die Entwicklung vorgesehenen Objektträger wurden dann mit mäßiger Geschwindigkeit in die temperierte Emulsion getaucht und ebenso herausgezogen, am unteren Ende leicht abgetupft und aufrecht zum Trocknen gestellt. Bei völliger Dunkelheit wurden die Objektträger  $\geq 1$  h getrocknet und in Expositions Kästen mit Silikagel überführt, welche für 2 bis 6 Wochen bei  $4^\circ\text{C}$  bis zur fotografischen Entwicklung gelagert wurden. Am Tag der Entwicklung der Schnitte wurden die Boxen auf Raumtemperatur gebracht und die Objektträger in Glasgestelle sortiert. Diese wurden für 2 min in den auf  $17^\circ\text{C}$  temperierten Kodakentwickler (D19) gestellt und anschließend für 30 sec unter ständigem Schütteln in Aqua dest. gebracht. Die Fixierung erfolgte mit Kodak-Fixierer für 2 min, gefolgt von einer Wässerung in Aqua dest. für eine halbe Stunde und der Trocknung der Objektträger an der Luft. Nach der fotografischen Entwicklung folgte eine ausreichende, nicht zu starke Gegenfärbung (modifiziert nach Nissl) mittels Kresylviolett, wodurch eine Auswertung mit der Durchlichtmikroskopie und filterverstärktem Phasenkontrast auch auf zellulärer Ebene möglich war. Der Nachweis der Markierung erfolgte mittels Dunkelfeldmikroskopie (Stereomikroskop MZ6, Leica). Die Ergebnisse wurden mit einem digitalen Kamerasystem (Coolpix 990, Nikon) dokumentiert.

#### 4.6.9. *In situ*-Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden

Diese Methode benötigt weit weniger Zeit als die bereits beschriebene Technik, da auf solche althergebrachten Vorbehandlungen wie

- Proteinase K-Behandlung (auf Kryo-Schnitten), um eine höhere mRNA-Zugänglichkeit für die Probe zu erzielen
- Acetanhydrid-Behandlung zur Erzielung negativer Ladungen auf der Schnittoberfläche und damit der Reduzierung unspezifischer Bindungsstellen
- Chloroform-Behandlung zur Lipidentfernung

verzichtet werden kann und somit die Zeiteinsparung der sowieso schon sehr aufwendigen Technik enorm zunimmt.

Kryostat-Schnitte wurden den Aufbewahrungsboxen entnommen, langsam auf Raumtemperatur gebracht und 30 min luftgetrocknet. Nach einer 5minütigen Fixierung mit kaltem 4%igen PFA und anschließender Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe sind die Objektträger in 96%igem Alkohol bis zur Nutzung bei 4° C zwischengelagert worden. Bei Verwendung von Paraffinschnitten für diese Methode wurden diese rehydriert, mit 10 µg/ml Proteinase K in PBT bei 37° C 15 min demaskiert, in 4 % PFA für 20 min bei 4° C nachfixiert, gewaschen und ebenfalls über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und zwischengelagert. In Vorbereitung auf die Hybridisierung wurden die entsprechend ausgewählten Objektträger für ca. eine halbe Stunde an der Luft getrocknet und nach dem Auftragen des Hybridisierungsgemisches mit einem der Größe des Objektträgers angepassten Parafilmstreifen bedeckt. Die Schnitte wurden in feucht gehaltenen Hybridisierungskammern für ca. 18 h bei der entsprechenden Temperatur (zumeist 42° C) hybridisiert. Der Hybridisierungsmix bestand dabei aus 100 µl Hybridisierungspuffer (InnoGenex), 100 µg/ml Poly(A)-Säure (nicht für Oligo d(T)<sub>45</sub>-Kontrollsonde), 200 µg/ml ssDNA, 2 µl radioaktiv markiertem Oligonukleotid (ca. 0,15 pmol mit 200.000 - 700.000 cpm) und 1 µl 1 M DTT je Objektträger. Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Parafilmstreifen von den Objektträgern entfernt, die Schnitte kurz in 1 x SSC bei RT gespült und unter leichtem Schütteln für 30 min bei 55° C ebenfalls in 1 x SSC gewaschen. Nach kurzem Waschen in 1 x SSC und 0,1 x SSC bei RT wurden die Schnitte über eine ansteigende

Alkoholreihe entwässert, getrocknet, und wie bereits beschrieben exponiert, entwickelt und gegengefärbt.

#### **4.6.10. Nachweis apoptotischer Zellen *in situ***

Der Nachweis apoptotischer Zellen erfolgte *in situ* mit Hilfe der TUNEL-Reaktion (siehe Abschnitt 4.4.8.) oder immunhistochemisch mittels eines Antikörpers gegen die in apoptotischen Zellen nachweisbare aktive Form der Caspase 3 (Promega). Paraffinschnitte (8  $\mu\text{m}$ ) der zu testenden Gewebe/Organe/Embryonen wurden wie im Abschnitt 4.4.6. beschrieben vorbereitet, die Objektträger nach Angaben des Herstellers mit dem entsprechend konzentrierten Antikörper inkubiert und das Signal wie beschrieben detektiert. Parallel wurden auf benachbarten Schnitten der gleichen Gewebe TUNEL-Assays mit Hilfe des "ApopTag *In Situ* Apoptosis Detection Kit" (Oncor) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### **4.6.11. Nachweis proliferierender Zellen *in situ***

Der Nachweis proliferierender Zellen in embryonalen Geweben erfolgte mittels des "BrdU *In-Situ* detection Kit" (BD PharMingen). Diese Methode basiert auf der Inkorporation des Thymidinanalogon Bromdesoxyuridin (BrdU) in die DNA einer sich in der Synthesephase des Zellzyklus befindenden Zellpopulation. BrdU kann nach dem Einbau in die DNA in Gewebeschnitten mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Für diesen Nachweis wurden zunächst tragende Weibchen in der entsprechenden embryonalen Entwicklungsphase intraperitoneal mit 1 mg BrdU (gelöst in 300  $\mu\text{l}$  steriler PBS) injiziert. Nach einem Zeitraum von 4 - 6 h (Resorption und Inkorporation des BrdU) sind die Embryonen mit Plazenta und Amnion präpariert worden. Von Embryo und Plazenta wurden 10  $\mu\text{m}$  dünne Gefrierschnitte angefertigt, mit denen nach den Angaben des Herstellers für die immunhistochemische Detektion des inkorporierten BrdU verfahren wurde. Aus dem Amnion wurde DNA gewonnen und für die Genotypisierung der Embryonen eingesetzt.

#### 4.6.12. Nachweis seneszenten Zellen *in situ*

Primäre Zellen zeigen eine begrenzte Replikationskapazität, die bei den meisten "normalen" Zellen in die Seneszenz führt. Dieses Stadium ist u. a. durch eine pH-abhängige  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gekennzeichnet, wodurch sich seneszente Zellen in Kultur oder im Gewebe einfach nachweisen lassen. Der Seneszenz-Assay wurde *in situ* mit Hilfe des "Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit" (Cell Signaling) durchgeführt. Hierfür sind von den zu untersuchenden Geweben bzw. Embryonen 10  $\mu$ m dünne Gefrierschnitte angefertigt worden. Die bei  $-80^{\circ}$  C zwischengelagerten Objektträger wurden bei  $30^{\circ}$  C luftgetrocknet und anschließend mit einer entsprechenden Menge der im *Staining Kit* enthaltenen Lösungen in feuchten Kammern unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen inkubiert. Zuerst erfolgte die Fixierung der Schnitte mit einer glutaraldehydhaltigen Fixierlösung. Die Präparate wurden gewaschen und anschließend in einer Färbelösung mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indol- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (X-Gal) 24 - 72 h bei  $37^{\circ}$  C inkubiert. Nach Entfernung der Färbelösung und Waschen der Objektträger in PBS wurden die Schnitte mit 70 % Glycerol überschichtet und eingedeckelt sowie mikroskopisch ausgewertet und dokumentiert.

## Literaturverzeichnis

- Abraham M. C. and S. Shaham (2004). Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biol.* **14**(2). 184-193.
- Adams M. D. et al., (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, **247** [5461], 2185-85.
- Altieri D. C. (2003). Survivin and apoptosis control. *Adv Cancer Res*, **88**, 31-52.
- Altieri D. C. (2003). Blocking survivin to kill cancer cells. *Methods Mol Biol*, **223**, 533-42.
- Altmann P. L. and D. D. Katz (1979). Inbred and genetically defined strains of laboratory animals, Part I: Mouse and rat. Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda, Maryland.
- Arama E., J. Agapite and H. Steller (2003). Caspase activity and a specific cytochrome c are required for sperm differentiation in *drosophila*. *Dev Cell*, **4**, 687-697.
- Aravind L. and E. V. Koonin (2000). The U box is a modified RING finger – a common domain in ubiquitination [letter]. *Curr Biol*, **10**, 132-34.
- Ashkenazi A. and V. M. Dixit (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol*, **11**(2), 255-60.
- Ausubel F. M., R. Bent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidmna, J. A. Smith and K. Struhl (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*. Green and Wiley, New York.
- Barde Y. A. (1989). Trophic factors and neuronal survival. *Neuron*. **2**. 1525-34.
- Barres B. A., I. K. Hart, H. S. Coles, J. F. Burne, J. T. Voyvodic, W. D. Richardson and M. C. Raff (1992). Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*. **70**. 31-46.
- Bardroff M. (1997). Charakterisierung eines neuartigen Proteins der Maus mit Homologie zu Ubiquitin-Konjugationsenzymen und Apoptose-Inhibitoren. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Bartel B., I. Wunning and A. Varshavsky (1990). The recognition component of the N-end rule pathway. *Embo J*, **9**, 3179-89.
- Bartke T., C. Pohl, G. Pyrowolakis and S. Jentsch (2004). Dual role of BRUCE as an antiapoptotic IAP and chimeric E2/E3 ubiquitin ligase. *Mol Cell*. **14**. 801-11.
- Braun B. C., M. Glickmann, R. Kraft, B. Dahlmann, P. M. Kloetzel, D. Finley and M. Schmidt (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-Like activity. *Nat Cell Biol*, **1**, 221-26.

- Campisi J. (2001). Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.* **11**(11). S27-S31.
- Campisi J. (2003). Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Experimental Gerontology.* **38**. 5-11.
- Carlile G. W., D. H. Smith and M. Wiedmann (2004). Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood.* **103**(11). 4310-6.
- Cetin I., J.-M. Foidart, M. Miozzo, T. Raun, T. Jansson, V. Tsatsaris, W. Reik, J. Cross, S. Hauguel-de-Mouzon, N. Illsley, J. Kingdom and B. Huppertz (2004). Fetal growth restriction: a workshop report. *Placenta.* **25**. 753-757.
- Chai J., Shiozaki E., Srinivasula S. M., Wu Q., Dataa P., Alnemri E. S. and Y. Shi (2001). Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell*, **104**, 769-780.
- Chen Z., Naito M., Hori S., Mashima T., Yamori T. and T. Tsuruo (1999). A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **264**, 847-854.
- Clem R. J., Sheu T.-T., Richter B. W. M. , He W.-W., Thornberry N. A., Duckett C. S. and J. M. Hardwick (2000). c-IAP1 is cleaved by caspases to produce a proapoptotic C-terminal fragment. *J Biol Chem*, **276**(10), 7602-7608.
- Colosi P., F. Talamantes and D. I. Linzer (1987). Molecular cloning and expression of mouse placental lactogen I complementary deoxyribonucleic acid. *Mol Endocrinol.* **1**. 767-776.
- Corbacho A. M., G. Martinez de la Escalera and C. Clapp (2002). Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J Endocrinol.* **173**. 219-238.
- Crook N. E., Clem R. J. and L. K. Miller (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*, **67**, 2168-2174.
- Cross J. C. (2000). Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Sem in Cell Dev Biol.* **11**(2). 105-13.
- de Bruin A., L. Wu, H. I. Saavedra, P. Wilsom, Y. Yang, T. J. Rosol, M. Weinstein, M. L. Robinson and G. Leone (2003). Rb function in extraembryonic lineages suppresses apoptosis in CNS of Rb-deficient mice. *PNAS.* **100**(11). 6546-6551.
- Deveraux Q. L., Leo E., Stennicke H. R., Welsh K., Salvesen G. S. and J. C. Reed (1999). Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J*, **18**(19), 5242-5251.
- Deveraux Q. L. and J. C. Reed (1999). IAP family proteins – suppressors of apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 239-252.

- Dumont D. J., G. H. Fong, M. C. Puri, G. Gradwohl, K. Alitalo and M. L. Breitmann (1995). Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn.* **203**, 80-92.
- Enekel C., A. Lehmann and P. M. Kloetzel (1999). GFP-labelling of 26S proteasomes in living yeast: insights into proteasomal functions at the nuclear envelope/rough ER. *Mol Biol Rep*, **26**, 131-5.
- Fan C. M. and T. Maniatis (1991). Generation of p50 subunit of NF- $\kappa$ B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature*, **354**, 395-398.
- Fang S., J. P. Jensen, R. L. Ludwig, K. H. Vousden and A. M. Weissman (2000). Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem*, **275**, 8945-51.
- Festing M. F. W. (1993). Origins and characteristics of inbred strains of mice. *Mouse Genome*. **91**. 393-509.
- Freemont P. S. (2000). RING for destruction? *Curr Biol*, **10**, R84-7.
- Goebel M. G., J. Yochem, S. Jentsch, J. P. McGrath, A. Varshavsky and B. Byers (1988). The yeast cell cycle gene CDC34 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Science*, **241**, 1331-5.
- Gotz R., Karch C., Digby M. R., Troppmaier J., Rapp U. R. and M. Sendtner (2000). The neuronal apoptosis inhibitory protein suppresses neuronal differentiation and apoptosis in PC12 cells. *Hum Mol Genet*, **9**(17), 2479-2489.
- Guillemot F., A. Nagy, A. Auerbach, J. Rossant and A. L. Joyner (1994). Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. *Nature*. **371**. 333-336.
- Hao Y., K. Sekine, A. Kawabata, H. Nakamura, T. Ishioka, H. Ohata, R. Katayama, C. Hashimoto, X. Zhang, T. Noda, T. Tsuoro and M. Naito (2004). Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function. *Nat Cell Biol*. **6**(9). 849-60.
- Harlin H., S. B. Reffey, C. S. Duckett, T. Lindstein and C. B. Thompson (2001). Characterization of XIAP-deficient mice. *Mol Cell Biol*. **21**(10). 3604-3608.
- Hauser H. P., M. Bardroff, G. Pyrowolakis, and S. Jentsch (1998). A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J Cell Bio*, **270**, 9407-12.
- Hershko A. and A. Ciechanover (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. **67**, 425-79.
- Hicke L. (1999). Getting down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol*, **9**, 107-12.
- Hicke L. and H. Riezmann (1996). Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell*, **84**, 277-87.

- Hiller M. M., A. Finger, M. Schweiger and D. H. Wolf (1996). ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science*, **273**, 1725-8.
- Hinds M. G., Norton R. S., Vaux D. L. and C. L. Day (1999). Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis repeat. *Nat Struct Biol*, **6**(7), 648-651.
- Hirashima M., Y. Lu, L. Byers and J. Rossant (2003). Trophoblast expression of fms-Linke tyrosine kinase 1 is not required for the establishment of the maternal-fetal interface in the mouse placenta. *Proc Natl Acad Sci*. **100**. 15637-15642.
- Hitz C. (2003). Analyse des *bruce*-Gens anhand zweier durch Genfallen-Technologie generierten Mausmutanten. Diplomarbeit GSF Neuherberg, TU München.
- Hogan B. R. Beddington, F. Costantini and E. Lacy (1994). Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. *CSH Laboratory Press*. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Höge C., B. Pfander, G. L. Moldovan, G. Pyrovolakis and S. Jentsch (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, **419**, 135-41.
- Hofmann R. M. and C. M. Pickart (1999). Noncanonical MMS2 encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell*, **96**, 645-53.
- Huang H. K., Joazeiro C. A. P., Bonfoco E., Kamada S., Levenson J. D. and T. Hunter (2000). The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J Biol Chem*, **275**(35), 26661-26664.
- Huang Y., Park Y. C., Rich R. L., Segal D., Myszka D. G. and H. Wu (2001). Structural basis of caspase inhibition by XIAP: Differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell*, **104**, 781-790.
- Huppertz B. and J. Kingdom (2004). Apoptosis in the trophoblast-Role of Apoptosis in placental morphogenesis. *J Soc Gynecol Investig*. **11**. 353-62.
- Imai Y., M. Soda, S. Hatakeyama, T. Akagi, T. Hashikawa, K.-I. Nakayama and R. Takahashi (2002). CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's Disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell*, **10**, 55-67.
- Ishizaki Y, M. D. Jacobson and M. C. Raff (1998). A role for caspases in lense fiber differentiation. *J Cell Biol*. **140**. 153-158.
- Jentsch S., J. P. McGrath, and A. Varshavsky (1987). The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature*, **329**, 131-4.
- Jungmann J., H. A. Reins, C. Schobert and S. Jentsch (1993). Resistance to cadmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis. *Nature*, **361**, 369-71.

- Kamada S., Washida M., Hasegawa J., Kusano H., Funahashi Y. and Y. Tsujimoto (1997). Involvement of caspase-4(-like) protease in Fas-mediated apoptotic pathway. *Oncogene*, **15**(3), 285-290.
- Kaufmann M. H. (1992). The Atlas of Mouse Development. *Academic Press Ltd.*, London, UK.
- Koegl M., T. Hoppe, S. Schlenker, H. D. Ulrich, T. U. Mayer and S. Jentsch (1999). A novel ubiquitin factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, **96**, 635-44.
- Krek W. (1998). Proteolysis and the G1-S transition: the SCF connection. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 36-42.
- Lam Y. A., T. G. Lawson, M. Velayutham, J. L. Zweier and C. M. Pickart (2002). A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature*, **416**, 763-7.
- Laney J. D. and M. Hochstrasser (1999). Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell*, **97**, 427-30.
- Lescisin K. R., S. Varmuza and J. Rossant (1988). Isolation and characterization of a novel trophoblast-specific cDNA in the mouse. *Genes Dev.* **2**. 1639-1646.
- Li Y. and R. R. Behringer (1998). *Esx1* an X-chromosome-imprinted regulator of placental development and fetal growth. *Nat Genet.* **20**(3). 309-11.
- Maier J. K., Lahoua Z., Gendron N. H., Fenti R., Johnston A., Davoodi J., Rasper D., Roy S., Slack R. S., Nicholson D. W. and A. E. MacKenzie (2002). The neuronal apoptosis inhibitory protein is a direct inhibitor of caspases 3 and 7. *J Neurosci*, **22**(6), 2035-2043.
- Matuschewski K., H. P. Hauser, M. Treier and S. Jentsch (1996). Identification of a novel family of ubiquitin-conjugating enzymes with distinct amino-terminal extensions. *J Biol Chem*, **271**, 2789-94.
- McGrath J. P., S. Jentsch and A. Varshavsky (1991). UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *Embo J*, **10**, 227-36.
- McLaughlin K. J. (1993). Production of tetraploid embryos by electrofusion. *Methods Enzymol.* **225**. 919-30.
- Monkley S. J., S. J. Delaney, D. J. Pennisi, J. H. Christiansen and B. J. Wainwright (1996). Targeted disruption of the *Wnt2* gene results in placentation defects. *Development.* **122**(11). 3343-53.
- Morse H. C. (1981). The laboratory mouse – A historical perspective. *The mouse in biomedical research. History, genetics and wild mice* (ed. H. L. Foster et al.), vol. 1, pp. 1-16. Academic Press, N. Y.

- Moser M., Y. Li, K. Vaupel, D. Kretschmar, R. Kluge, P. Glynn and R. Buettner (2004). Placental failure and impaired vasculogenesis result in embryonic lethality for neuropathy target esterase-deficient mice. *Mol Cell Biol.* **24**(4). 1667-1679.
- Oppenheim R. W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* **14.** 453-501.
- Oyadomari S., Araki E. and M. Mori (2002). Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic  $\beta$ -cells. *Apoptosis*, **7**, 335-345.
- Palombella V. J., O. J. Rando, A. L. Goldberg and T. Maniatis (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing of NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell*, **78**, 773-85.
- Patel S. and M. Latterich (1998). The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol*, **8**, 65-71.
- Pickart C. M. (1997). Targeting of substrates to the 26S proteasome. *Faseb J*, **11**, 1055-66.
- Pickart C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, **70**, 503-533.
- Pickart C. M. and R. E. Cohen (2004). Proteasomes and their kin: Proteases in the machine age. *Nat Rev.* **5.** 177-187.
- Pohl C. (2003). Charakterisierung der proteolytischen Prozessierung des IAP-verwandten Proteins BRUCE durch Caspasen. Diplomarbeit Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Pyrowolakis G. (2000). Funktion des BRUCE-Ubiquitin-Konjugationsenzym *in vitro* und *in vivo*. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Qiu X. B., S. L. Markant, J. Yuan and L. Goldberg (2004). Nrdp1-mediated degradation of the gigantic IAP, BRUCE, is a novel pathway for triggering apoptosis. *EMBO J.* **23.** 800-810.
- Rape M., T. Hoppe, I. Gorr, M. Kalocay, H. Richly and S. Jentsch (2001). Mobilization of processed, membrane tethered SPT23 transcription factor by CDC48 (UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone. *Cell.* **107**(5). 667-77.
- Richly H., M. Rape, S. Braun, S. Rumpf, C. Hoegge and S. Jentsch (2005). A series of ubiquitin-binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell.*
- Riedl S. J., Renatus M., Schwarzenbacher R., Zhou Q., Sun C., Fesik S. W., Liddington R. C. and G. S. Salvesen (2001). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell*, **104**, 791-800.

Roberts A. W., L. Robb, S. Rakar, L. Hartley, L. Cluse, N. A. Nicola, D. Metcalf, D. J. Hilton and W. S. Alexander (2001). Placental defect and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3. *Proc Natl Acad Sci*. **98**. 9324-9329.

Rodriguez T. A., D. B. Sparrow, A. N. Scott, S. L. Withington, J. I. Preis, J. Michalick, M. Clements, T. E. Tsang, T. Shioda, R. S. P. Beddington and S. L. Dunwoodie (2004). *Cited1* is required in trophoblast for placental development and for embryo growth and survival. *Mol Cell Biol*. **24**(1). 228-244.

Rossant J. and J. C. Cross (2001). Placental development: Lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet*. **2**(7). 538-48.

Russell S. J., S. H. Reed, W. Huang, E. C. Friedberg and S. A. Johnston (1999). The 19 S regulatory complex of the proteasome functions independently of proteolysis in nucleotide excision repair. *Mol Cell*, **3**, 687-95.

Salvesen G. S. and C. S. Duckett (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**(6), 401-10.

Sambrook J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. *CSH Laboratory Press*. Cold Spring Harbor, N. Y.

Scheffner M., U. Nuber and J. M. Huibregtse (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature*, **373**, 81-3.

Scheffner M. (1999). Moving protein heads for breakdown [news; comment]. *Nature*, **398**, 103-4.

Schreiber J., E. Riethmacher-Sonnenberg, D. Riethmacher, E. E. Tuerk, J. Enderich, M. R. Bösel and M. Wegner (2000). Placental failure in mice lacking the mammalian homolog of glial cells missing, GCMa. *Mol Cell Biol*. **20**. 2466-2474.

Schorpp-Kistner M., Z.-Q. Wang, P. Angel and E. F. Wagner (1999). JunB is essential for mammalian placentation. *EMBO J*. **18**(4). 934-948.

Scott I. C., L. Anson-Cartwright, P. Riley, D. Reda and J. Cross (2000). The HAND1 basic helix-loop-helix transcription factor regulates trophoblast differentiation via multiple mechanisms. *Mol Cell Biol*. **20**. 530-541.

Seufert W. and S. Jentsch (1990). Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *Embo J*, **9**, 543-50.

Shi Y. (2001). A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nat Struct Biol*, **8**(5), 394-401.

Sprick M. R., Rieser E., Stahl H., Grosse-Wilde A., Weigand M. A. and H. Walczak (2002). Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J*, **21**(17), 4520-4530.

- Suzuki Y., Imai Y., Nakayama H., Takahashi K., Takio K. and R. Takahashi (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell*, **8**(3):613-621.
- Suzuki Y., Nakabayashi Y. and R. Takahashi (2001). 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*, **98**(15), 8662-7.
- Todaro G. J. and H. Green (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol*, **17**, 299-313.
- Travers K. J., C. K. Patil, L. Wodicka, D. J. Lockhart, J. S. Weissmann and P. Walter (2000). Functional and genomic analysis reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*, **101**, 249.
- Tyers M. and P. Jorgensen (2000). Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 54-64.
- Ulrich H. D. and S. Jentsch (2000). Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *Embo J*, **19**, 3388-97.
- Uren A. G., Wong L., Pakusch M., Fowler K. J., Burrows F. J., Vaux D. L. and K. H. Choo (2000). Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr Biol*, **10**, 1319-1328.
- van Nocker S., S. Sadis, D. M. Rubin, M. Glickmann, H. Fu, O. Coux, I. Wefes, D. Finley and R. D. Vierstra (1996). The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol Cell Biol*, **16**, 159-62.
- Varshavsky A. (1997). The Ubiquitin-system. *Trends Biochem Sci*, **22**, 383-7
- Vaux D. L. and S. J. Korsmayer (1999). Cell death in development. *Cell*, **96**, 245-54.
- Verhagen A. M., E. J. Coulson and D. L. Vaux (2001). Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biology*. **2**(7). reviews3009.1-3009.10
- Vernooy S. Y., Chow V., Verbrugghe K., Yang J., Cole S., Olson M. R. and B. A. Hay (2002). *Drosophila* Bruce can potently suppress Rpr- and Grim-dependent but not Hid-dependent cell death. *Curr Biol*, **12**, 1164-1168.
- Wilkinson K. D. and M. Hochstrasser (1998). The deubiquitinating enzymes. In: Ubiquitin and the biology of the cell. *Plenum Press New York and London*, 99-120.
- Xie Y. and A. Vashavsky (2000). Physical association of ubiquitin ligases and the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci*, **97**, 2497-502.

Yang Y., Fang S., Jensen J. P., Weissman A. M. 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.

Yao T. and R. E. Cohen (2002). A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature*, **419**, 403-7.

Yen H.-C., C. Espirito and E. C. Chang (2003). Rpn5 is a conserved proteasome subunit and required for proper proteasome localization and assembly. *J Biol Chem*. **278**(33). 30669-76.

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten:

Name: Kristina Lotz  
Wohnort: Wangener Str. 40  
82319 Starnberg  
Telefon: 08151/555299  
Geburtsdatum: 25.04.1974  
Geburtsort: Greifswald

### Schulbildung:

1980 - 1988 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule „Martin Andersen Nexö“ in Greifswald  
1988 - 1992 Erweiterte Oberschule „Friedrich Ludwig Jahn“ in Greifswald, Spezialklasse mit verstärktem neusprachlichen Unterricht  
30.06.1992 Abschluß: Abitur

### Studium:

01.10.1992 Studium Biologie-Diplom an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald (Hauptfach: Molekularbiologie, Nebenfächer: Genetik, Virologie)  
22.10.1999 Abschluß: Diplom

### Beruf:

19.07.1999 - 18.02.2000 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Max von Pettenkofer-Institut München  
seit 19.02.2000 Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Dissertation am Max-Planck-Institut für Biochemie Martinsried in der Abteilung Molekulare Zellbiologie

Starnberg, 20.12.2004