Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

DISSERTATION

Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung von RAIP, einem neuen ER-lokalisierten proapoptotischen Protein

Eingereicht von

Erik Braziulis

Erstgutachter: PD Dr. Stefan Grimm

Zweitgutachter: Prof. Dr. Charles David

mündliche Prüfung am 08. April 2004

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Promotionsarbeit das Ergebnis meiner eigenständigen Arbeit ist, und daß ich dieses Manuskript persönlich verfasst habe. Zudem habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München, in der „Selbständigen Nachwuchsgruppe“ von Herrn PD Dr. Stefan Grimm angefertigt.

Als erstes möchte ich mich bei PD Dr. Stefan Grimm bedanken, der mir ermöglichte, in seinem Labor diese Arbeit durchzuführen, und mir durch Anleitung und Diskussionsbereitschaft tatkräftig zur Seite stand.

Mein Dank gilt ebenso Dr. Manuel Bauer für seine intensive Betreuung zu Beginn dieser Arbeit.

Herzlichen Dank an den Zweitgutachter dieser Arbeit, Prof. Charles David an der Ludwig-Maximillians Universität München (LMU), für seine Unterstützung.

Ein besonderes „Dankeschön“ gilt allen aus der Arbeitsgruppe (Timur Albayrak, Manuel Bauer, Ulla Cramer, Andreas Gewies, Jasmina Putnik, Volker Scherhammer, Nicole Schönfeld, Alexis Schubert und Frank Voß), deren Hilfsbereitschaft und Diskussionsbereitschaft entscheidend zur freunschaftlichen Atmosphäre im Labor und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Danke Volker und Andreas, ihr habt mit Eurer aufmunternden, positiven und netten Art meinen Laboralltag oft leichter gemacht!

Ganz besonders möchte ich mich bei Andrea und unserem kleinen Sonnenschein Andreas bedanken, die mich immer unterstützten und mir die Kraft gaben, auch schlechte Tage zu überstehen.

DANKE

1 Einleitung 1

1.1 Die Entstehung des Begriffes Apoptose 1

1.2 Die Bedeutung der Apoptose 1

1.2.1 Apoptose im gesunden Organismus 1

1.2.2 Apoptose und Krankheit 3

1.3 Morphologische Veränderungen bei der Apoptose 4

1.3.1 Konservierung apoptotischer Mechanismen 5

1.4 Caspasen 6

1.4.1 Caspaseaktivierung 7

1.4.2 Rezeptorvermittelte Caspaseaktivierung 8

1.4.3 Mitochondriale Caspaseaktivierung 10

1.4.4 Caspasensubstrate 11

1.4.5 Caspase-unabhängige Apoptose durch AIF und Endonuklease G 12

1.5 Die Regulation der Apoptose 13

1.5.1 Die Familie der IAPs 13

1.5.2 Die Bcl-2-Familie 13

1.6 Rolle des Endoplasmatischen Retikulum (ER) bei der Apoptose 16

1.7 Ziele der Arbeit 19

2 Materialien 20

2.1 Chemikalien 20

2.2 Verbrauchsmaterial 22

2.2.1 Biochemische Reagenzien 22

2.2.2 Verbrauchsmaterial 23

2.3 Reaktionssets 23

2.3.1 Enzyme 24

2.3.2 Längen- und Molekulargewichtsstandards 24

2.4 Oligonukleotide 24

2.5 Puffer und Lösungen 26

2.6 Plasmide 28

2.7 Zellinien und Bakterienstämme 29

2.7.1 Eukaryontische Zellinien 29

2.7.2 Bakterienstämme 29

2.8 Zellkulturmedien 30

2.9 Medien für die Bakterienkultur 30

2.10 Antikörper 30

2.11 Verwendete Geräte 31

3 Methoden 33

3.1 Molekularbiologische Methoden 33

3.1.1 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolisierung 33

3.1.2 Nukleinsäure-Fällung 33

3.1.3 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration 34

3.1.4 Präparation von Plasmid-DNA 34

3.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA im 96-well Format 34

3.1.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen 35

3.1.7 Dephosphorylierung von DNA-Enden mit CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase) 36

3.1.8 Auffüllen überhängender DNA-Enden 36

3.1.9 Agarose-Gelelektrophorese 36

3.1.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen 37

3.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten 37

3.1.12 Klonierung in pSUPER Vektor 37

3.1.13 Gesamt-RNA-Isolation aus Säugerzellen 38

3.1.14 RNA-Isolation aus HeLa-Zellen für LightCycler PCR 38

3.1.15 Reverse Transkription, cDNA-Synthese 38

3.1.16 cDNA-Synthese für LightCycler PCR 39

3.1.17 Polymerase Kettenreaktion (PCR) 39

3.1.18 LightCycler PCR 40

3.1.19 Gerichtete in vitro Mutagenese 40

3.1.20 Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode 41

3.1.21 Herstellung von [32P]-markierten cDNA-Fragmenten für Northern-Blot-Analysen 42

3.1.22 Nachweis membrangebundener RNA mit [32P]-markierten cDNA-Proben 42

3.1.23 Herstellung kompetenter E. coli 43
3.1.24 Transformation kompetenter Bakterien 43

3.2 Methoden der eukaryontischen Zellkultur 44
3.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellinien 44
3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Gewebekulturzellen 45
3.2.3 Transiente Transfektion von Gewebekulturzellen 45

3.3 Proteinchemische Standardmethoden 48
3.3.1 Herstellung von Gesamtzell-Lysaten 48
3.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen 49
3.3.3 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 49
3.3.4 Coomassie-Färbung von Proteingelen 49
3.3.5 Autoradiografie von Gelen 49

3.4 Immunologische und immunbiochemische Methoden 50
3.4.1 Immunoblot-Analyse 50
3.4.2 Co-Immunpräzipitation von Proteinen 51
3.4.3 Indirekte Immunfluoreszenz 51
3.4.4 DAPI-Färbung 52
3.4.5 ConcanavalinA-Färbung 52
3.4.6 Mitotracker-Färbung 53

3.5 Methoden zum Nachweis der Apoptose 53
3.5.1 DNA-Leiter 53
3.5.2 Nachweis hypodiploider DNA mittels Durchflußzytofluorimetrie 54
3.5.3 Caspase-3-Aktivitätstest 54

3.6 Datenbanken: 55

4 Ergebnisse 56

4.1 Reihenuntersuchung nach dominant Apoptose induzierenden Genen: Screen . 56

4.2 Charakterisierung von PSAP als Apoptose induzierendes Gen 59
4.2.1 PSAP induziert Apoptose in 293T und HeLa-Zellen 60
4.2.2 PSAP-vermittelte Apoptose kann durch Bcl-X_L und Hemmung der PT-Pore inhibiert werden 61
4.2.3 Die Cotransfektion von Presenilin-1 beeinflusst die Apoptoseinduktion durch PSAP nicht signifikant 62

4.3 Charakterisierung von RAIP, einem bisher unbekannten Apoptose induzierenden Protein 63
4.3.1 Sequenzinformationen über RAIP 63
4.3.1.1 RAIP-Homologe in verschiedenen Organismen 63
4.3.1.2 Untersuchung der RAIP-Proteinsequenz 67
4.3.2 RAIP induziert Apoptose in 293T und HeLa-Zellen 67
4.3.2.1 RAIP induzierte Apoptose ist caspasenabhängig 69
4.3.2.2 Antiapoptotische Bcl-2 Proteine inhibieren RAIP-vermittelte Apoptose 70
4.3.2.3 Spike ΔN19 wirkt nicht dominant negativ auf RAIP-vermittelte Apoptose 71
4.3.3 Untersuchung einer Caspase-3 Schnittstelle in RAIP 72
4.3.4 Herstellung von RAIP- spezifischem Antiserum 74
4.3.5 Die zelluläre Lokalisation von RAIP 75
4.3.5.1 Lokalisation von RAIP-YFP in HeLa-Zellen 75
4.3.5.2 Immunfluoreszenz gegen RAIP –HA 77
4.3.5.3 Lokalisation von endogenem RAIP 78
4.3.6 Apoptoseinduktion und Lokalisation von RAIP-Deletionsmutanten 80
4.3.6.1 Lokalisation und Apoptoseinduktion von RAIP-Deletionen in HeLa-Zellen 80
4.3.6.2 Lokalisation und Apoptoseinduktion von RAIP-Deletionen in 293T-Zellen 84
4.3.7 RAIP-Interaktionspartner 87
4.3.7.1 SRp-40, Ferritin und Sirtuin interagieren mit RAIP in Co-Immunpräzipitationen 88
4.3.8 Quantifizierung der endogenen RAIP-mRNA in Northern Blots 90
4.3.8.1 Vergleich der RAIP-mRNA in Tumor- und Normalgewebe 90
4.3.9 Verminderung der RAIP-Expression durch RNAi 93
4.3.9.1 RAIP-RNAi vermindert die Überexpression von transfiziertem RAIP 93
4.3.9.2 RAIP-RNAi vermindert die endogene RAIP-mRNA Menge 94
4.3.9.3 Wirkung von RAIP-RNAi auf die Apoptoseinduktion durch Zytostatika 96

5 Diskussion 99

5.1 Expressionsscreen nach dominant Apoptose-induzierenden Genen 99

5.2 PSAP induziert caspaseabhängig Apoptose 102

5.3 RAIP, ein neues proapoptotisches Protein, induziert Apoptose über allgemeine Signalwege 103

5.4 Expressionslevel von RAIP 105

5.5 Die Proteinsequenz von RAIP 106

5.6 RAIP ist am ER lokalisiert..... 107

5.7 RAIP–Interaktionspartner 109

6 Zusammenfassung..... 115

7 Abkürzungsverzeichnis 117

8 Literatur 121

9 Lebenslauf..... 132

1 Einleitung

1.1 Die Entstehung des Begriffes Apoptose

Schon seit mehr als 150 Jahren ist das Auftreten von Zelltod bei mehrzelligen Organismen unter bestimmten physiologischen und pathologischen Bedingungen beobachtet und dokumentiert worden. Virchow prägte bereits 1871 die Begriffe „Necrosis“ und „Necrobiosis“ (*necrosis*, griechisch für Tod, Absterben) (Virchow, 1871) und lange Zeit wurde jede Art von Zelltod als „Nekrose“ bezeichnet. Der Begriff „programmierter Zelltod“ wurde 1964 eingeführt, um zu verdeutlichen, dass Zelltod während der Entwicklung nicht zufällig geschieht sondern eine Abfolge von kontrollierten Schritten ist, die schließlich zu einem lokal und zeitlich begrenzten Absterben von Zellen führt (Lockshin und Williams 1964). Als “Nekrose” wird seither nur noch der passive Zelltod infolge irreparabler Beschädigungen der Zelle bezeichnet. Der Begriff „Apoptose“ wurde erstmals in einer Publikation von Kerr, Wyllie and Currie verwendet um die morphologischen Abläufe zu beschreiben, die zu kontrolliertem Zelltod führen (Kerr et al. 1972). „Apoptose“ ist aus dem Griechischen abgeleitet und bedeutet „abfallen“ oder „abwerfen“ in Analogie zu abfallenden Blättern im Herbst.

Apoptose ist im Gegensatz zu Nekrose ein physiologischer, Energie verbrauchender, genau definierter und strikt regulierter Prozess, der für mehrzellige Organismen unabdingbar ist.

1.2 Die Bedeutung der Apoptose

1.2.1 Apoptose im gesunden Organismus

Ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zelltod ist entscheidend für die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines mehrzelligen Systems. Das “selbstlose” Absterben einzelner Zellen ist deshalb genauso Voraussetzung für das Wohlergehen des Gesamtorganismus wie das Wachstum von Zellen. Während der Entwicklung eines mehrzelligen Organismus werden zunächst viele Zellen im

Überschuss gebildet, die anschließend durch programmierten Zelltod wieder sterben und dadurch dazu beitragen, Organe und Gewebe zu formen (siehe Abb. 1.1).

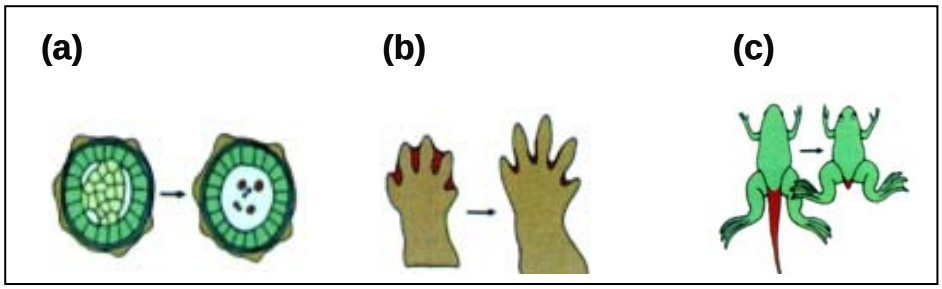


Abb. 1.1 Beispiele der Apoptose in der Entwicklung: *(a) Gastrulation durch Absterben von Zellen im Inneren der Blastula; (b) Apoptotische Eleminierung von Zellen zwischen den Fingern; (c) Rückbildung des Schwanzes während der Metamorphose des Frosches.*

So ist die Gastrulation des frühen Embyos eine Folge des gezieltes Absterbens von Zellen im Inneren der Blastula (Joza et al. 2001). Auch bei anderen Entwicklungsschritten, wie zum Beispiel bei der Ablösung des Neuralrohrs vom umliegenden Gewebe, ist Apoptose essentiell an der Strukturbildung beteiligt. Besonders anschauliche Beispiele für die Beteiligung von programmiertem Zelltod in der Embryogenese von Wirbeltieren ist die Bildung von freistehenden/ frei beweglichen Fingern durch programmierten Zelltod im mesenchymalen Gewebe zwischen den Fingern und die Metamorphose der Kaulquappe, bei der der Schwanz durch apoptotische Prozesse zurückgebildet wird (Zuzarte-Luis und Hurle 2002). Bei der Entwicklung des Gehirnes spielt Apoptose ebenso eine wichtige Rolle. Etwa die Hälfte der Neuronen, die ursprünglich gebildet werden, sterben wieder ab bis das adulte Gehirn gebildet ist (Hutchins und Barger 1998).

Apoptotischer Zelltod ermöglicht ebenso die Funktion des Immunsystems: die Negativselektion von autoreaktiven oder zu schwach reaktiven B- und T-Lymphozyten sorgt dafür, dass ein “Pool” von sehr effektiven, aber nicht autoreaktiven Immunzellen kontrolliert wird. Außerdem wird nach jeder Immunantwort, bei der durch klonale Expansion die Anzahl antigenspezifischer Lymphozyten stark erhöht wurde, durch Apoptose die Zahl der Lymphozyten wieder reduziert (Bouillet et al. 1999; Braun et al. 1996; Kagi et al. 1994a; Kagi et al. 1994b; Krammer 2000; Rathmell und Thompson 2002).

Diese Beispiele zeigen, dass genau regulierte apoptotische Vorgänge in vielen biologischen Bereichen eine sehr wichtige Bedeutung haben, daher ist eine Fehlregulation der Apoptose mit der Entstehung vieler Krankheiten verknüpft.

1.2.2 Apoptose und Krankheit

Eine wichtige Funktion der Apoptose ist die Entfernung von überschüssigen, kranken, defekten oder entarteten Zellen aus dem Gewebe, um eine Schädigung des Gewebes bzw. des Organismus zu verhindern. Eine Fehlregulation der Apoptose kann schwerwiegende Krankheiten zur Folge haben. Funktionelle Defekte, die zu einer Erhöhung der Zelltodrate führen sind u.a. beteiligt an der Entstehung von neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer oder Parkinson (Kroemer et al. 1997; Thompson 1995). Im Verlauf einer HIV-Infektion wird das Immunsystem durch übermässige Apoptose der T-Zellen geschwächt und die Patienten werden anfälliger für Infektionen, z.B. mit Herpes- oder Adenoviren (McLaughlin et al. 2001; Thompson 1995).

Bei einer verminderten Apoptoserate werden Zellen nicht beseitigt, die dem Körper schädlich werden können. Wenn zum Beispiel autoreaktive Lymphozyten nicht ausreichend durch Apoptose sterben, können Autoimmunkrankheiten wie z.B. SLE (Systemischer Lupus erithematosus) entstehen (Bouillet et al. 1999; Watanabe-Fukunaga et al. 1992).

Bei der Entstehung von Tumoren und Metastasen ist die Fehlregulierung der Apoptose stets ein entscheidender Schritt (Zörnig et al. 2001) Nicht nur die Fähigkeit, sich unkontrolliert zu teilen, sondern auch der Verlust einer funktionierenden Apoptosekontrolle bewirkt, dass ein transformierter Zellklon überleben kann. Die meisten Tumore weisen daher eine Resistenz gegen Apoptose auf (Hanahan und Weinberg 2000; Jaattela 1999; Strasser et al. 1997).

Eine Zelle mit intakter Apoptosemaschinerie stirbt, wenn sie nicht ständig mit spezifischen Wachstumsfaktoren und anderen Überlebenssignalen aus ihrer Umgebung versorgt wird. So wird verhindert, dass Zellen, die Kontakt zu ihren Nachbarzellen verloren haben oder in ein anderes Gewebe gelangt sind, überleben oder sogar proliferieren. Tumorwachstum und Metastasierung können nur erfolgen, wenn dieses apoptotische Schutzprogramm nicht funktioniert (Fadeel et al. 1999; Zörnig et al. 2001)

1.3 Morphologische Veränderungen bei der Apoptose

Apoptotische Zellen zeigen eine Abfolge typischer morphologischer Veränderungen: Die Zelle schrumpft, ihre Oberfläche verformt sich und sie verliert den Kontakt zur extrazellulären Matrix und zu ihren Nachbarzellen. Gleichzeitig zerfällt der Zellkern und das Chromatin kondensiert. Später bilden sich an der Plasmamembran membranumschlossene Vesikel, sogenannte „apoptotische Körperchen“, die sich abschnüren. So löst sich die Zelle in kleine, kompakte, membranumschlossene Strukturen auf, die alle Zellbestandteile wie Zytosol, Chromatin und Organellen enthalten (siehe Abb. 1.2). Vom Zellinhalt wird so nichts in das umliegende Gewebe freigesetzt. Die apoptotischen Körperchen werden anschließend von Makrophagen endozytiert und können so aus dem Gewebe entfernt werden, ohne eine inflammatorische Reaktion auszulösen. Diese vollständige, schnelle und unspektakuläre Entfernung der apoptotischen Zellen aus dem Gewebe ist auch ein Grund, warum Apoptose lange Zeit unbeachtet blieb (Arends und Wyllie 1991; Kerr et al. 1994; Peitsch et al. 1994; Raff 1992; Thornberry und Lazebnik 1998).

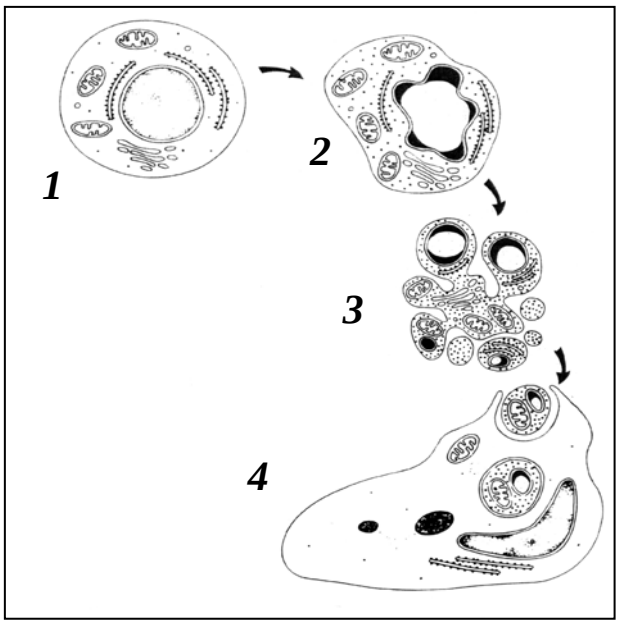


Abb. 1.2 Morphologische Veränderungen einer Zelle während der Apoptose: *Die Zelle schrumpft und löst sich vom umgebenden Gewebe ab (1), das Cytoplasma und das Chromatin kondensieren (2). Einschnürungen in der Plasma- und Kernmembran führen zur Bildung von apoptotischen Körperchen (3), die von Nachbarzellen oder Makrophagen phagozytiert und verdaut werden (4)* (Kerr et al. 1994).

Alle beschriebenen morphlogischen Veränderungen sind eine Folge von regulierten biochemischen Prozessen in der apoptotischen Zelle. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Aktivierung proteolytischer Enzyme, die die Spaltung einer Vielzahl spezifischer Substrate zur Folge hat, z.B. von Strukturproteinen, die normalerweise die Zell- und Organellenstruktur aufrechterhalten. Proteaseaktivierung ist ebenfalls der erste Schritt zur Aktivierung von Endonukleasen, die schließlich zur Spaltung der DNA in oligonukleosomale Fragmente führt (Saraste und Pulkki 2000).

1.3.1 Konservierung apoptotischer Mechanismen

Apoptotischer Zelltod ist für alle mehrzelligen Organismen überaus wichtig, so dass er bei allen Metazoen vorkommt (Tittel und Steller 2000): bei Säugetieren, Insekten (Richardson und Kumar 2002), Nematoden (Liu und Hengartner 1999) und Cnidarier (Cikala et al. 1999). Sogar bei Pflanzen könnten apoptotische Prozesse eine Rolle spielen (Solomon et al. 1999) und selbst bei Hefen gibt es apoptoseähnliche

Zelltodprogramme (Frohlich und Madeo 2000; Skulachev 2002). Ebenso sind viele Mechanismen der Regulation der Apoptose evolutiv konserviert. Erste Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen der Apoptose (-regulation) wurden durch genetische Untersuchungen an dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* gewonnen. Im Laufe der Entwicklung eines Hermaphroditen werden normalerweise 1090 somatische Zellen gebildet, von denen 131 durch Apoptose sterben. 1986 konnte gezeigt werden, dass die Deletion oder Mutation eines einzelnen Gens, ced-3, ausreicht um diesen Zelltod zu verhindern (Ellis und Horvitz 1986). Es stellte sich heraus, dass Ced-3 ein Homolog des humanen Cysteinprotease *Interleukin-1β converting enzyme* (*ICE*) ist und das ließ vermuten, dass Cysteinproteasen auch beim programmierten Zelltod bei Säugetieren eine wichtige Rolle spielen (Yuan et al. 1993).

1.4 Caspasen

Inzwischen sind bei Säugetieren 14 verschiedene Cysteinproteasen bekannt, die Homologien zu *Ced-3* und *ICE* aufweisen. Sie werden „Caspasen“ genannt: **C**ysteinproteasen, die ihre Substrate spezifisch c-terminal von einem **Asp**artat spalten (Alnemri et al. 1996). Die Caspasen wurden nach dem Zeitpunkt ihrer Entdeckung nummeriert, so wird *ICE* auch Caspase-1 genannt.

Nach Ihrer Funktion und Sequenzhomologien können die Caspasen in 3 Gruppen eingeteilt werden: 1) Initiatorcaspasen, 2) Effektorcaspasen und 3) Caspasen, die hauptsächlich bei der Vermittlung von Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen (Earnshaw et al. 1999; Strasser et al. 2000; Thornberry und Lazebnik 1998). Die Initiatorcaspasen 2, 8, 9 und 10 stehen am Anfang der Aktivierungskaskade die schließlich zur Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 führt (Kaufmann und Hengartner 2001).

Die Caspasen 1, 4, 5, 11, 12, 13 und 14 sind (soweit bekannt) hauptsächlich an der proteolytischen Zytokinprozessierung bei Entzündungsreaktionen beteiligt, ihre Rolle bei der Vermittlung von Apoptose ist fraglich (Denault und Salvesen 2002; Earnshaw et al. 1999; Strasser et al. 2000).

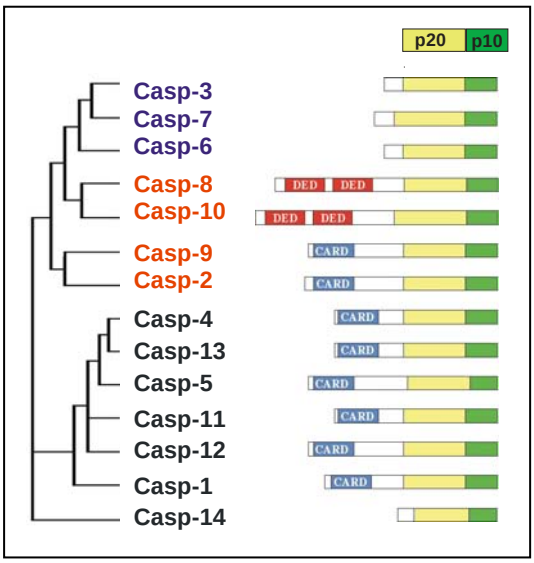


Abb. 1.3 Die phylogenetische Verwandtschaft und die Funktion der Caspasen (nach Shi, 2002): *Alle Caspasen besitzen typische c-terminale Untereinheiten (p10/20). Im Gegensatz zu den Initiatorcaspasen (rot) und übrigen Caspasen (schwarz) besitzen die Effektorcaspasen (blau) weder Death Effector Domänen (DED) noch Caspase Recruitment Domänen (CARD).*

1.4.1 Caspaseaktivierung

Caspasen werden in der Zelle als katalytisch inaktive Procaspasen synthetisiert, die 3 typische Domänen aufweisen: eine N-terminale Prodomäne, und zwei C-terminale Untereinheiten: eine große (p20, 17-22 kD)) und eine kleine (p10, 10-12 kD) Untereinheit. Proteolytische Spaltungen zwischen diesen Domänen, entweder durch Autoproteolyse oder durch andere aktive Caspasen, setzen diese Domänen frei. Die aktiven Caspasen entstehen anschliessend durch Tetramerisierung von je zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten (Abb. 1.4) .

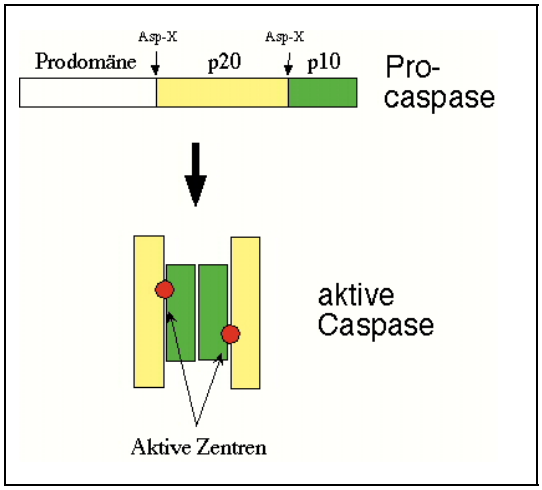


Abb. 1.4 Aktivierung der Caspasen durch proteolytische Spaltung und Tetramerisierung: *An zwei Stellen wird die Procaspase nach spezifischen Aspartat-Resten (Asp-X) geschnitten (oben), je eine kleine (p10) und eine grosse Untereinheit (p20) dimerisieren und bilden schließlich einen Heterotetramer mit zwei aktiven Zentren (unten) (Thornberry und Lazebnik 1998).*

Während die Prodomänen der Effektorcaspasen (3, 6, 7) relativ klein sind, besitzen die größeren Prodomänen der Initiatorcaspasen (2, 8, 9, 10) typische Interaktionsdomänen wie die *Death Effector Domäne* (DED) oder die *Caspase Recruting Domäne* (CARD) (siehe Abb. 1.3). Über diese Domänen werden die Procaspasen von apoptose-induzierenden Komplexen gebunden und aktiviert (siehe Abschnitt 1.4.2 und 1.4.3). Unterschieden wird zwischen extrinsischer Aktivierung über (liganden-aktivierte) Rezeptoren und intrinsischer Aktivierung durch Signale, die in der Zelle selbst generiert werden.

1.4.2 Rezeptorvermittelte Caspaseaktivierung

Spezifische Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie (Fas, TNFa-R, TRAIL-R, etc.) in der Plasmamembran vermitteln nach Bindung ihrer spezifischer Liganden die Caspase-aktivierung beim extrinsischen Aktivierungsweg (Ellis und Horvitz 1986; Scaffidi et al. 1999). Die Ligandenbindung bewirkt eine Trimerisierung und Aktivierung der Rezeptoren, die dann über Adaptermoleküle inaktive Procaspase-8 binden können. In einem solchen Komplex, „*Death Inducing Signalling Complex*“ (DISC) genannt, werden zwei Procaspase-8-Moleküle in räumliche Nähe zueinander gebracht und können so autokatalytisch (Abb. 1.5).

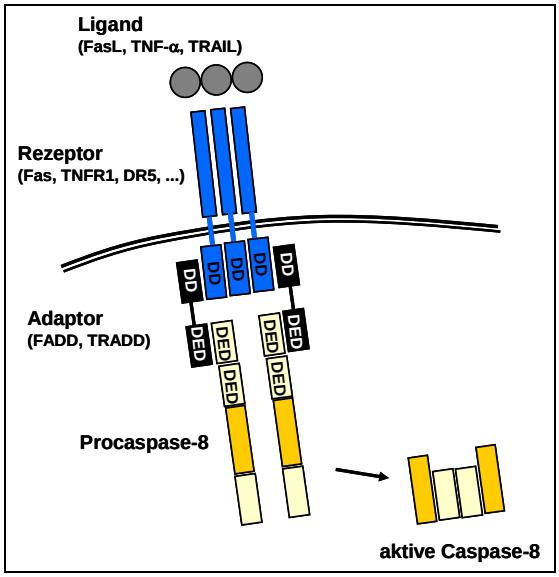


Abb. 1.5 extrinsische, Rezeptorvermittelte Caspase-8 Aktivierung: *Nach Ligandenbindung rekrutiert der Rezeptor Adaptormoleküle über seine zytoplasmatischen Death Domains (DD). An diese bindet über Death Effector Domänen (DED) Procaspase-8, der entstehende Komplex wird „Death Inducing Signalling Complex" (DISC) genannt. Die Procaspase wird aktiviert und bildet nach autokatalytischer Spaltung den aktiven Caspase-8 Heterotetramer der dann Effektorcaspasen aktivieren kann.*

In sogenannten Typ I Zellen ist die Aktivierung der Initiatorcaspasen-8 allein ausreichend, um genügend Caspase-3 zu aktivieren und schließlich Zelltod auszulösen (Scaffidi et al. 1998). In Typ II Zellen reicht die Aktivierung der Initiatorcaspase-8 allein nicht aus um Zelltod auszulösen, zusätzlich muss ein proapototisches Signal aus den Mitochondrien generiert werden. Caspase-8 spaltet das (zytosolische) proapoptotische Bcl-2 Familien Protein Bid, das C-terminale Spaltprodukt, tBid, kann an die Mitochondrien translozieren und dort die mitochondiralen Apoptosesignalwege aktivieren. Experimente mit $Bid^{-/-}$ doppel-*knock-out* Mäusen verdeutlichen die Bedeutung der Verknüpfung zwischen mitochondrialer und rezeptorvermittelten Caspaseaktivierung in Typ II Zellen: $Bid^{-/-}$ *knock-out* Mäuse sind resistent für Fas- und TNF-induzierte Apotose, aber nicht resistent gegen andere Apoptosestimuli (Wang et al. 2001).

Die Regulation der Rezeptorvermittelten Caspaseaktivierung setzt bereits direkt am Rezeptorkomplex an: Zelluläre Inhibitoren, sog. c-FLIPs (Fas assoziierte *Death*-domänen-ähnliche *ICE*-Inhibitorproteine) besitzen *Death Effector Domänen* (DED) und können wie Procaspase-8 den Rezeptorkomplex binden (siehe auch Abb. 1.5). Die

Bindestellen für Procaspase-8 werden so blockiert und die Caspaseaktivierung verhindert (Zörnig et al. 2001). Auch einige Viren codieren für FLIPs (sog. v-FLIP), um Apoptoseinduktion in infizierten Zellen zu verhindern (Thome et al. 1997; Zörnig et al. 2001).

1.4.3 Mitochondriale Caspaseaktivierung

Neben der Funktion, extrinsische Apoptosesignale zu verstärken, spielen Mitochondrien bei der Vermittlung von intrinsischen Apoptosesignalen, wie DNA-Schädigung, oxidativem Stress und Nährstoffmangel eine entscheidende Rolle (Kaufmann und Earnshaw 2000; Wang 2001). In den meisten Fällen führt die Mitochondrienaktivierung zum Zusammenbruch des Membranpotentials und zur Freisetzung von mitochondrialen proapoptotischen Proteinen ins Zytoplasma, wie z.B. Cytochrom c (ein Bestandteil der Atmungskette) und AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) (Bernardi et al. 1999; Loeffler und Kroemer 2000). Ursache dafür ist die Öffnung einer Pore, die beide mitochondrialen Membranen durchspannt, die sog. *permeability transition pore* (PTP), die aus mehreren Proteinen zusammengesetzt ist. Nach einem Modell bildet der *Adenine Nucleotide Translocator* (ANT) eine Pore in der inneren Membran, der *Voltage Dependent Anion Channel* (VDAC) eine Pore der äusseren Membran (Belzacq et al. 2002). Weitere Bestandteile der PTP sind ATP-verbrauchende Enzyme (wie z.B. die Hexokinase) auf der zytoplasmatischen Seite, die mitochondriale Kreatinkinase (mtCK) im Intermembranraum sowie in der mitochondrialen Matrix das mitochondriale Chaperon Cyclophilin D.

Aus den Mitochondrien freigesetztes Cytochrom c kann das zytosolische Protein Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor-1*) binden, das daraufhin die Affinität zu ATP bzw. dATP erhöht. Nach Bindung der Nukleotide oligomerisiert der Komplex und bindet Procaspase-9. In diesem Komplex, „Apoptosom“ genannt, wird Caspase-9 aktiviert (siehe Abb. 1.6) (Adams und Cory 2002; Zou et al. 1999).

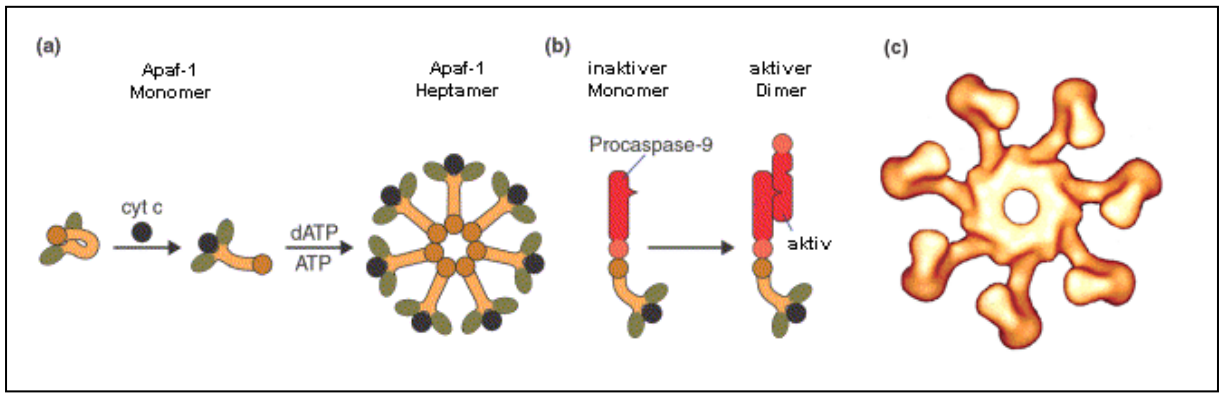


Abb. 1.6 Bildung des aktiven Apoptosoms: *Die Bindung von Cytochrom c (Adams und Cory 2001) an Apaf-1 führt zu einer Konformationsänderung, dATP/ATP kann binden und Apaf-1 oligomerisieren (a). Procaspase-9 wird so in räumliche Nähe zu weiteren Procaspase-9 Molekülen gebracht und dadurch aktiviert (b) (nach (Adams und Cory 2002). (c) Struktur des1000 kD Apoptosoms (aus (Shi 2002).*

Die Bedeutung des mitochondiralen Apoptosesignalweges wird durch *knock-out* Experimente verdeutlicht: Bei Mäusen mit Apaf-1, Caspase-9 oder Caspase-3 *knock-out* wurde fast komplett der neuronale Zelltod während der Entwicklung unterbunden (Cecconi et al. 1998; Honarpour et al. 2000; Honarpour et al. 2001; Kuida et al. 1998; Kuida et al. 1996; Yoshida et al. 1998). Die meisten anderen Organe entwickelten sich hingegen völlig normal (Wang 2001). Auch nicht-neuronale Apaf-$1^{-/-}$ *knock-out* Zelllinien zeigen Apoptose, wenn auch verzögert, die in diesen Zellen also Caspase-9-unabhängig sein muss (Haraguchi et al. 2000; Honarpour et al. 2000).

1.4.4 Caspasensubstrate

Aktive Effektorcaspasen sind an den meisten Veränderungen der apoptotischen Zelle direkt beteiligt: Bisher sind mehr als 100 verschiedene Caspasesubstrate bekannt (Kaufmann und Hengartner 2001). Die Kondensation des Zytoplasma ist eine Folge der proteolytischen Modifizierung von Zytoskelettproteinen wie Aktin und Gelsolin durch aktive Caspasen, ebenso die Ablösung von Zellen aus dem Gewebeverband nach einer Prozessierung der Zelladhäsionsmoleküle β-Cathenin und Plakoglobin (Stroh und Schulze-Osthoff 1998). Die morphologischen und biochemischen Veränderungen im Zellkern und die Chromatinkondesation sind ebenfalls zurückzuführen auf die Spaltung spezifischer Caspasesubstrate: Lamin B (Intermediärfilamentprotein im Kern) , NuMA (*Nuclear Mitotic Aparatus protein*), PARP-1 (Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1) und

ICAD (*Inhibitor of Caspase Activated DNase*). Laminspaltung führt zu Veränderungen der Kernmembran und trägt zusammen mit der Prozessierung von NuMA zur Chromatinkondensation bei (Hirata et al. 1998; Taimen und Kallajoki 2003; Thornberry und Lazebnik 1998). Die Spaltung des Inhibitorproteins ICAD aktiviert die Endonuklease CAD (Caspase Activated DNase), die genomische DNA internukleosomal schneidet und apoptosetypische DNA-Fragmente bildet (Enari et al. 1998; Liu et al. 1997).

Aktivierte Caspasen beeinflussen ausserdem die Regulation von Enzymen, die an DNA-Reparatur (z.B. DNA-PK_{CS}, PARP), mRNA-Spleissen (U1-70K) oder DNA-Replikation (Replikationsfaktor C) beteiligt sind (Cryns und Yuan 1998; Lazebnik et al. 1994; Rheaume et al. 1997; Song et al. 1996). Auch apoptoseinhibierende Bcl-2 Proteine werden durch Caspasen prozessiert und verlieren so ihre inhibitorische Funktion oder werden sogar proapoptotisch (Adams und Cory 1998; Cheng et al. 1997; Xue und Horvitz 1997).

1.4.5 Caspase-unabhängige Apoptose durch AIF und Endonuklease G

Zelltod, der typisch apoptotische Merkmale wie DNA-Fragmentierung und Ausbleiben einer inflammatorischen Antwort zeigt, kann auch ohne Beteiligung von Caspasen ausgelöst werden. Die mitochondrialen proapoptotischen Proteine AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) und Endonuklease G werden nach Apoptoseinduktion aus dem mitochondrialen Intermembranraum freigesetzt und können in den Zellkern translozieren. Dort induzieren sie internukleosomale DNA-Fragmentierung und DNA-Kondensation ohne Beteiligung von aktivierten Caspasen (Li et al. 2001; Miramar et al. 2001; Susin et al. 1999).

Zwei weitere proapoptotische Proteine werden ebenfalls bei Aktivierung der Mitochondrien freigesetzt: Smac/Diablo (Du et al. 2000; Verhagen et al. 2000) und HtrA2/Omi (Suzuki et al. 2001). Diese Proteine wirken proapoptotisch indem sie Apoptoseinhibitoren der IAP-Familie (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*) binden und deren Wirkung neutralisieren (siehe 1.5.1) (Shi 2002).

1.5 Die Regulation der Apoptose

In jeder Zelle werden inaktive Procaspasen exprimiert, deren Aktivierung unwiderruflich die selbstverstärkende Caspasekaskade (Aktivierung von Procaspasen durch aktive Caspasen) auslöst, die schließlich den Tod der Zelle zur Folge hat. Die Aktivierung der Caspasen muss deshalb durch einen hochwirksamen und komplexen Regulationsmechanismus kontrolliert werden (Thornberry und Lazebnik 1998).

1.5.1 Die Familie der IAPs

IAPs (*inhibitor of apoptosis protein*) sind eine Familie von antiapoptotischen Proteinen, die ursprünglich bei Bacculoviren beschrieben wurden und in allen Spezies vorhanden sind. Bei Säugetieren sind bisher acht verschiedene IAPs beschrieben (u.a. XIAP, c-IAP-1+2, SURVIVIN und NAIP), die alle über konservierte Domänen (BIR-Domänen) mit den aktiven Caspasen-3, 7, oder 9 interagieren und deren enzymatische Aktivität inhibieren können (Deveraux et al. 1997; Kaufmann und Hengartner 2001; Shi 2002). Eine weitere Funktion der IAPs liegt darin, gebundene Caspasen zur Degradierung ans Proteasom zu dirigieren (Suzuki et al. 2001; Yang et al. 2000).
Hohe Konzentrationen von IAPs können so z.B. die Caspase-9 Aktivierung durch das Apoptosom bzw. Cytochrom c neutralisieren (Bratton et al. 2001; Srinivasula et al. 2001). Ist das Signal aus den Mitochondrien allerdings stark, kann die Freisetzung von Smac/Diablo oder HtrA2/Omi IAPs binden, deren inhibitorische Wirkung neutralisieren und den Zelltod vermitteln (Chai et al. 2000; Srinivasula et al. 2001; Wang 2001). Entscheidend für die proapoptotische Reaktion der Zelle ist also die Stärke des Apoptosesignals aus den Mitochondrien und die Konzentration der Inhibitoren.

1.5.2 Die Bcl-2-Familie

Bcl-2 ist ein Onkogen, das in B-Zell Lymphoma häufig in den Immunglobulin-Lokus transloziert ist (Translokation t(14:18)) (Tsujimoto et al. 1984; Zörnig et al. 2001). B-Zellen, die mit Bcl-2 transfiziert wurden, waren resistent gegen Apoptose nach IL-3 Entzug. Zum ersten Mal konnte so gezeigt werden, dass nicht nur der Verlust der

Wachstumskontrolle sondern auch Verhinderung der Apoptose zur Tumorgenese entscheidend beiträgt (Vaux et al. 1988).

Bei Säugetieren wurden bisher mehr als 30 Bcl-2 Familienmitglieder identifiziert, die alle über eine oder mehrere Bcl-2 Homologiedomänen verfügen (BH1-BH4). Es gibt sowohl proapoptotische als auch antiapoptotische Bcl-2-Proteine Eine Gemeinsamkeit aller antiapoptotischen Bcl-2 Proteine, zu denen neben Bcl-2 z.B. auch Bcl-XL, Bcl-w, A1 und Mcl-1 gehören, ist das Vorhandensein aller vier BH-Domänen (BH1-BH4). Die proapoptotischen Bcl-2 Proteine lassen sich wiederum in zwei Gruppen gliedern: Die „Bax Familie“ mit den Domänen BH1, BH2 und BH3 (Bax, Bak, Bok) und die „BH3-only“ Proteine, die nur die BH-3 Domäne besitzen (Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, Puma, Blk, BNIP und SPIKE) (Martinou und Green 2001}. Viele Bcl-2 Proteine besitzen zusätzlich eine c-terminale Transmembrandomäne mit der sie in Membranen der Mitochondrien, des Endoplasmatischen Retikulum (ER; Strasser et al. 2000) oder des Zellkerns inserieren können (Bouillet und Strasser 2002).

Die Aufgabe der Bcl-2 Proteine liegt in der Kontrolle der Freisetzung von Proteinen aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Bcl-2 Proteine interagieren miteinander und bilden Homo- oder Heterodimere, die noch weiter oligomerisieren können. Die Zusammensetzung der Oligomere entscheidet über die Wirkung des Komplexes: beispielsweise wirken Bcl-2 Homodimere oder Bcl-2/Bax Heterodimere anti-apoptotisch, dagegen Bax Homodimere proapoptotisch. Ihre strukturelle Ähnlichkeit mit bakteriellen kanalbildenden Proteinen wie Diphterietoxin oder Colicin (A und E1) weist darauf hin, dass Bcl-2 Proteine als Oligomere Kanäle in der Mitochondrien-membran bilden können, bei Bax und Bak scheint dies auch in vivo eine Rolle zu spielen (Antonsson et al. 2001). Rekombinant in Bakterien exprimiertes Bax führt in Zellen zu Cytochrom c Freisetzung aus den Mitochondrien, rekombinantes Bcl-2 und Bcl-XL können die Freisetzung reprimieren (Yang et al. 1997). Auch in liposomale Membranen integrierte Bax Homotetramere ermöglichen Cytochrom c Ausfluss (Saito et al. 2000). In nicht apoptotischen Zellen ist das Bax-Monomer im Zytoplasma lokalisiert, das sich bei Apoptoseinduktion in die äußere Mitochondrienmembran einlagert, oligomerisiert, und so zu einer Freisetzung von Cytochrom c führt (Antonsson et al. 2001; Nechushtan et al. 2001; Wolter et al. 1997).

Die Bedeutung von Bax und Bak in der Apoptose während der Entwicklung wird in *knock-out* Experimenten deutlich: $Bax^{-/-}$ und $Bak^{-/-}$ Doppel-*knock-out* Mäuse zeigen schwere Entwicklungsdefizite, besonders Ansammlungen von überschüssigen Zellen im Gehirn und im hämatopoetischen System. Kulturzellen, denen Bax und Bak fehlt sind zudem resistent gegen Apoptoseinduktion z.B. durch UV-Strahlung, ebenso können BH3-only-Proteine in solchen Zellen keine Apoptose auslösen (Lindsten et al. 2000; Wei et al. 2001).

Nach einem Modell (Wang 2001) wird die proapoptotische Wirkung von Bax und Bak durch antiapoptotische Bcl-2 Proteine und proapoptotische BH3-only Proteine reguliert: antiapoptotische Bcl-2 Proteine bilden mit Bax/Bak Heterodimere und verhindern so die Bildung von Bax/Bak Oligomeren. Proapoptotische BH3-only Proteine translozieren auf ein apoptotisches Signal hin aus anderen Zellkompartimenten an die Mitochondrien und können ebenfalls mit antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen dimerisieren und diese aus den BH3-only/Bcl-2 Heterodimeren herauslösen. Freie BH3-Proteine können in der Folge oligomerisieren und Kanäle bilden. Entscheidend für die Wirkung auf die Mitochondrien ist demnach das stöchometrische Verhältnis der Bcl-2 Proteine und die Zusammensetzung der Heterodimere (siehe Abb. 1.7) (Gross et al. 1998; Oltvai et al. 1993; Puthalakath et al. 1999; Sedlak et al. 1995).

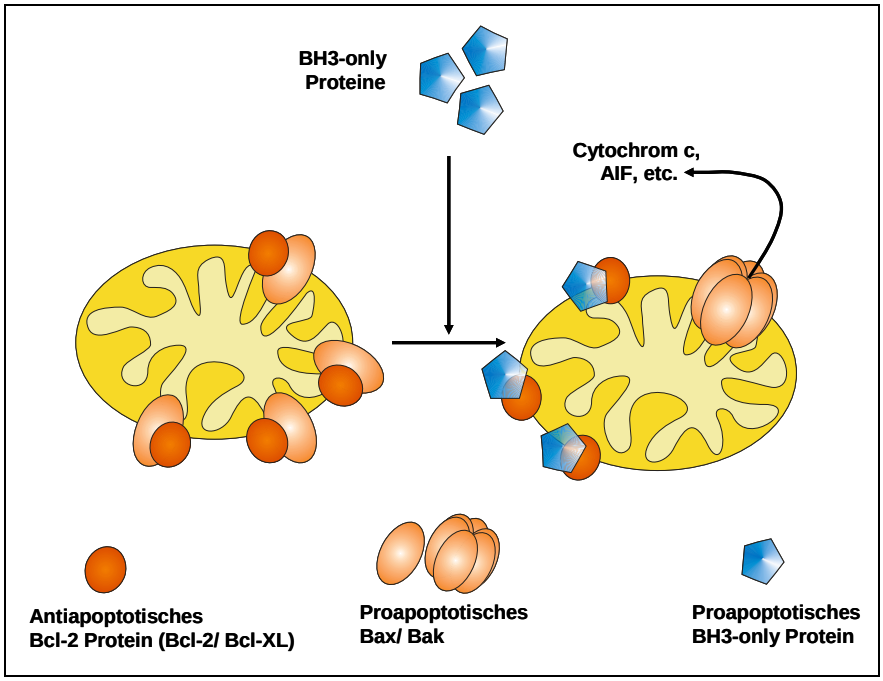


Abb. 1.7 Modell der Regulation der Mitochondrienaktivierung durch Bcl-2 Proteine: *Antiapoptotische Bcl-2 Proteine binden proapoptotische Bcl-2 Proteine der Bax-Gruppe und verhindern so deren Oligomerisierung. BH-3 only Proteine translozieren auf einen apoptotischen Stimulus hin in die Mitochondrien und dimerisieren mit den antiapoptotischen Proteinen; Bax/Bak kann oligomerisieren und eine Pore bilden, durch die proapoptotische Faktoren aus dem Intermembranraum ins Zytosol gelangen können.*

1.6 Rolle des Endoplasmatischen Retikulum (ER) bei der Apoptose

Neben den Mitochondrien gewinnt das Endoplasmatische Retikulum (ER) immer mehr Beachtung als zweites Kompartiment der Zelle, das bei der Apoptoseinduktion eine Rolle spielt. Im ER verhindern Kontrollmechanismen, dass falsch gefaltete Proteine in den sekretorischen Weg entlassen werden. Falsch gefaltete Proteine, Fehler bei der Glycosilierung, gestörter Calcium-Haushalt oder Glucosemangel lösen die sogenannte „*unfolded protein response*“ (UPR) aus, die entweder zu einer Unterbrechung der Proteinsynthese und Hochregulation von ER-ständigen Chaperonen führt oder, wenn sie länger andauert, Apoptose oder Nekrose zur Folge hat (Kaufmann und Hengartner 2001; Lindsten et al. 2000). Auch verschiedene chemische Reagenzien können eine UPR auslösen: Brefeldin A (BFA) inhibiert den Transport von Proteinen zwischen Endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat, Tunicamycin verhindert die N-

Glycolysierung von Proteinen, Thapsigargin inhibiert die sarkoplasmatisch/ endoplasmatische Ca2+ -ATPase (SERCA) (Breckenridge et al. 2003a; Ferri und Kroemer 2001).

Das ER ist der größte Ca^{2+} Speicher der Zelle, und Ca^{2+} Efflux aus dem ER ist häufig mit einer Ca^{2+} Aufnahme in die Mitochondrien gekoppelt. Ca^{2+} Ionen scheinen also zwischen ER und Mitochondrien zu vermitteln, ob und wie das zur Aktivierung von Caspasen führt, ist jedoch bisher ungeklärt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Ca^{2+} an Annexin-V für Apoptoseinduktion durch einige Inducer nötig ist (Hawkins et al. 2002). Zellen ohne Annexin-V konnten kein Cytochrom c aus den Mitochondrien freisetzen, ebenso Wildtypzellen nach Behandlung mit Ca^{2+} Chelatbildnern. Annexin-V vermittelt also wahrscheinlich das Ca^{2+} Signal vom ER zu den Mitochondrien.

Es gibt immer mehr Hinweise, dass Bcl-2 im ER ebenso wie in den Mitochondrien eine apoptoseregulierende Funktion ausübt. Ein Bcl-2-Konstrukt das spezifisch im ER lokalisiert (Bcl-2cb5) kann die Kommunikation zwischen ER und Mitochondrien nach ER-Stress und anderen Stimuli unterbrechen und sogar die Aktivierung von Bax in den Mitochondrien verhindern (Annis et al. 2001; Häcki et al. 2000; Wang 2001).

Bax oder Bak sind essentiell für die Apoptoseinduktion nach ER-Stress, so konnte gezeigt werden, dass $bax^{-/-}$ und $bak^{-/-}$-Doppel-*knock-out*-Zellen resistent gegen Brefeldin-A- und Tunicamycin-induzierte Apoptose sind (Wei et al. 2001; Zong et al. 2001). Bax und Bak sind nicht nur in den Mitochondrien sondern auch in der ER-Membran lokalisiert und können dort durch ER Stress oligomerisieren und aktiviert werden (Zong et al. 2003). Sie sind beteiligt an der Mobilsierung von Ca^{2+} aus dem ER und die Aufnahme in die Mitochondrien (Nutt et al. 2002; Scorrano et al. 2003) und sind essentiell für die Aktivierung von Caspase-12 am ER (Zong et al. 2003). Diese Caspase 12, die bisher nur bei der Maus gefunden wurde, ist am ER lokalisiert und wird nur bei ER-Stress aktiviert (Nakagawa et al. 2000). Zellen von Caspase-12 defizienten Mäusen sind teilweise resistent gegen ER-Stress-induzierte Apoptose (BFA, Tunicamycin, Thapsigargin) aber nicht gegen andere Apoptosestimuli (Nakagawa et al. 2000). Es gibt auch Hinweise, dass Caspase-12 unabhängig von Apaf-1, also ohne Mitochondrienaktivierung, Caspase-9 aktivieren kann (Rao et al. 2002).

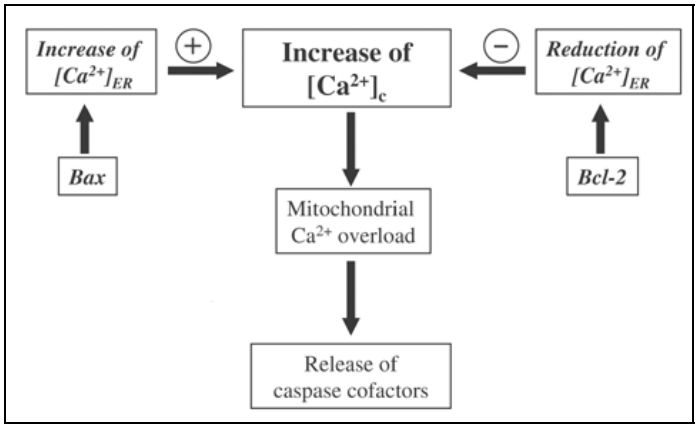


Abb. 1.8 Wirkung von Ca^{2+} aus dem ER auf die Apoptoseinduktion: *Proapoptotisches Bax führt zur Erhöhung der Ca^{2+} Konzentration im ER ($[Ca^{2+}]ER$) und Freisetzung ins Zytoplasma, antiapoptotisches Bcl-2 hat die entgegengesetzte Wirkung. Eine erhöhte Ca^{2+} Konzentration im Zytoplasma ($[Ca^{2+}]c$) führt zu einer Erhöhung der Ca^{2+} Konzentration in den Mitochondrien, was die Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus den Motochondrien zur Folge hat (Rizzuto et al. 2003)*

Interessanterweise ist das ER auch bei der Rezeptor-vermittelten Apoptose beteiligt. In den meisten Zellen (Typ II Zellen) reicht die Aktivierung von Caspase-8 durch den DISC nicht aus um Apoptose zu induzieren, weitere proapoptotische Signale aus den Mitochondrien werden benötigt (siehe auch Abschnitt 1.4.2). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Spaltung von Bap31, eines integralen ER-Membranproteins, durch Caspase-8 für die Mitochondrienaktivierung nach Fas-Induktion benötigt wird (Breckenridge et al. 2003b; Nguyen et al. 2000). Eine Caspase-resistente Bap31-Mutante verhinderte die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und typische apoptotische morphologische Veränderungen (Nguyen et al. 2000). Die Überexpression des N-terminalen Bap31-Fragmentes p20 führte zu Ca^{2+}-Freisetzung aus dem ER und anschliessendem Cytochrom c Austritt aus den Mitochondrien (Breckenridge et al. 2003b).

Obwohl viele Studien eine regulierende Rolle des ER in der Apoptose zeigen, bleiben die Signal-Mechanismen die aus dieser Organelle hervorgebracht werden größtenteils unbekannt. Im Fall von ER-Stess, wo das apoptotische Signal aus dem ER selbst kommt, wurde deutlich, dass das ER sein eigenes unabhängiges Apoptoseprogramm besitzt, das Caspasen aktivieren und eine Mitochondrienreaktion auslösen kann. Noch muss herausgefunden werden, ob ER-Signalwege an anderen Apoptoseprogrammen beteiligt sind (Breckenridge et al. 2003b).

1.7 Ziele der Arbeit

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

Von den mit Hilfe dieses Verfahrens erhaltenen Klonen, die bei Überexpression proapoptotisch wirken, wurden zwei ausgewählt, die bisher noch nicht mit Funktionen in der Apoptose beschrieben waren: PSAP und RAIP. In dieser Arbeit sollten die Apoptose-induzierenden und weitere funktionelle Eigenschaften dieser Proteine charakterisiert werden.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid-Lösung (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biomol, Hamburg
Ammoniumperoxiddisulfat	Sigma, München
Bacto Agar	Difco, Detroit, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	Roth, Karlsruhe
Chloroquin	Sigma, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München
Dithiothreitol (DTT)	BioTech, St. Leon-Rot
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, München
Ethylendioxy-bis-(ethylennitril)-tetraacetat (EGTA)	Biomol, Hamburg
Ethanol	Riedel-de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma, München
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
D(+)-Glucose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
HEPES	Biomol, Hamburg

Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Riedel-de Haen, Seelze
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Milupa, Friedrichsdorf
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma, München
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Gibco BRL, Eggenstein
Nonidet P-40	Sigma, München
Phenol	Sigma, München
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; pH 8)	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma, München
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma, München
Saccharose (Sucrose)	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Sigma, München
TEMED	Sigma, München
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma, München
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Sigma, München
Tween 20 (Polyoxyethylen-sorbitanmonolaurat)	Sigma, München
Magnesiumchlorid	Sigma, München
Natriumazid	Sigma, München

Uridin	Sigma, München
Wasserstoffperoxid (33%)	Sigma, München

2.2 Verbrauchsmaterial

2.2.1 Biochemische Reagenzien

Aktinomycin D	Sigma, München
Ampicillin	Sigma, München
Aprotinin	Sigma, München
Arsentrioxid	Sigma, München
ATP	Sigma, München
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, München
Cis-Platin	Sigma, München
Cycloheximid	Sigma, München
EGTA	Calbiochem, La Jolla, USA
Etoposid	Sigma, München
Interferon-γ (human, rekombinant)	Biomol, Hamburg
Kanamycin	Sigma, München
Leupeptin	Sigma, München
Menadion	Sigma, München
Paclitaxel (Taxol)	Sigma, München
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, München
Streptomycin	Sigma, München
Tetracyclin	Sigma, München
TTFA	Sigma, München
Tumor-Nekrose-Faktor α (human, rekombinant)	Biomol, Hamburg
Z-VAD-fmk (Z-Val-Ala-Asp (oMe)-Fluormethylketon)	Enzyme Systems Products, Livermore, USA

2.2.2 Verbrauchsmaterial

Einmalkunststoffwaren	Firmen B. Braun (Melsungen), Becton Dickinson (Heidelberg), Biozym Diagnostik (Hess. Oldendorf), Brand (Wertheim), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickenhausen), Josef Peske (Aindling-Pichl), Sarstedt (Nümbrecht), und Zinsser Analytic (Frankfurt)
Kulturgefäße	Becton Dickinson (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen) und Nunc (Wiesbaden)
Einmalhandschuhe	Semperit (Wien)
Sterilfilter	Firmen Millipore (Eschborn), Pall (Dreieich) und Renner (Dannstadt)
Transfermembran (PDVF)	Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Röntgenfilme	Firma Kodak (Stuttgart)

2.3 Reaktionssets

BioRad Protein Microassay	BioRad, München
Caspase-3 Aktivitätsassay	Roche, Mannheim
Long Template PCR Kit	Roche, Mannheim
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce, Rockford, USA
Oligofectamine Transfektionsreagenz	QIAGEN, Hilden
Complete without EDTA, Proteaseinhibitor -Mischung	Roche, Mannheim
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
BioRad *Protein Microassay*	BioRad, München
Effectene Transfektionsreagenz	QIAGEN, Hilden
Fugene6 Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
QIAGEN Plasmid Kit (Mini, Midi, Maxi)	QIAGEN, Hilden

QIAex II DNA-Extraktion aus Agarosegelen	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gelextraktionskit	QIAGEN, Hilden
RNeasy Mini Kit (RNA-Isolation)	QIAGEN, Hilden
HighPure RNA Isolation Kit	Roche, Mannheim
First-Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche, Mannheim
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green	Roche, Mannheim

2.3.1 Enzyme

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

2.3.2 Längen- und Molekulargewichtsstandards

Full-range rainbow recombinant protein molecular weight marker	Amersham Pharmacia (Freiburg)
100 bp SmartLadder SF, DNA Größenstandard	Eurogentec, Seraing (Belgien)
1 kb SmartLadder, DNA Größenstandard	Eurogentec, Seraing (Belgien)

2.4 Oligonukleotide

Name	**Sequenz (5´→ 3´)**
RAIP-wt	Forward: CCCAAGCTTGGGTGCAGCATGTCTAGACTGGGA Reverse: GAATGCGGCCGCTTAGTCTCGTAAAATGACTTCCAG
RAIP ΔTM	Forward: CCCAAGCTTGCCACCATGCAGCGATGGAAACGGACCCAG Reverse: wie RAIP-wt
RAIP -ATG	Forward: CCCAAGCTTGGGTCTAGACTGGGAGCCCTGGGT Reverse: wie RAIP-wt
RAIP N	Forward: wie RAIP-wt Reverse: TAGTGCATGCGGCCGCCGTCAAGAGAATCCTTTCTCCC
RAIP C	Forward: GCGGATCCTGCATG Reverse: wie RAIP-wt

RAIP 1a	Forward: wie RAIPΔTM Reverse: ACGATGCGGCCGCTTACAGGCGGTCCAGCACCTTCTC
RAIP 1b	Forward: CCCAAGCTTGGGATGGACTTTGTGCTGACCAGCCTT Reverse: wie RAIP N
RAIP 2a	Forward: wie RAIPΔTM Reverse: TAGTGCATG CGG CCGCTTAGTCAAGAGAATCCTTTCTCCC
RAIP 2b	Forward: CCCAAGCTTGGGATGCTGCGGCGGGAGGTGGAGGAG Reverse: wie RAIP N
RAIP 3	Forward: wie RAIPΔTM Reverse: wie RAIP N
RAIP mut	Forward: AAGGATTCTCTTGAGTTGGAG Reverse: CTCCAACTCAAGAGAATCCTT
RAIP pSUPER A	Forward: GATCTCCGTCATATGCGCTAGATGGATTCAAGAGATCCATCTAGGGCATATG ACTTTTTGGAAA Reverse: AGCTTTTCCAAAAAGTCATATGCCCTAGATGGATCTCTTGAATCCATCTAGGG CATATGACGGA
RAIP pSUPER B	Forward: GATCTCCCTCCCTGGACTATAGCGAGTTCAAGAGACTGCGTATAGTCCAGGG AGTTTTTGGAAA Reverse: AGCTTTTCCAAAAACTCCCTGGACTATACGCAGTCTCTTGAACTGCGTATAGT CCAGGGAGGA
RAIP LIGHTCYCLER	Forward: ATGCCACATGGAAGAGAACC Reverse: TTCTTTGTCGAGAGTCCCGCT
Sirtuin-7	Forward: CGGAATTCCATGGCAGCCGGGGGTCTGAGC Reverse: TGTAGACGACCAAGTATTTGGCGTTCCGGA
SRp40	Forward: CCCAAGCTTGCCACCATGAGTGGCTGTCGGGTATTG Reverse: TAGTGCATGCGGCCGCCATTGCCACTGTCAACTGATCT
Ferritin	Forward: CCCAAGCTTGCCACCATGACGACCGCGTCCACCTC Reverse: TAGTGCATGCGGCCGCCGCTTTCATTATCACTGTCTCC
ICAD	Forward: CCCAAGCTTGCCACCATGGAGGTGACCGGGGACGCCGGG Reverse: TAGTGCATGCGGCCGCCCTATGTGGGATCCTGTCTGGCTCG
PSAP wt	Forward: CCCAAGCTTGCCACCATGGCGGGAGCCGGAGCTGGA Reverse: GAATGCGGCTTACTCCAGGGCAAAGCATGA
SAIP-ORF	Forward: CGCGGATCCCCACCATGGAGGCCGTGCTG Reverse: CGCTCTAGATCAGGATTTGGACTTGG
ΔN-19 (HA,myc)	Forward: CCCAAGCTTGGGGGCGACATGTGCATTGGGACGGTGGATAGC Reverse:TAGTGCATGCGGCCGCCCGAAGCGGGAATCTGCGGCAG

Bcl2 (HA,myc)	Forward: CGGAATTCGGAAATATGGCGCACGCTGGGAGAACA Reverse: TAGTGCATGCGGCCGCCCTTGTGGCCCAGATAGGCACC
Bcl-XL (HA,myc)	Forward: CGGAATTCGGAAATATGTCTCAGAGCAACCGGGAG Reverse: TAGTGCATGCGGCCGCCTTTCCGACTGAAGAGTGAGCC
Bap31 (HA, myc)	Forward: CGGAATTCAACAGGATGAGTCTGCAGTGG Reverse: TAGTGCATGCGGCCGCCCTCTTCCTTCTTGTCCATG
CycD	Forward: CCGCTCGAGATGCTGGCGCTGCGCTG Reverse: CCGGGATTC CTAACATCCCTAGCAGCC

2.5 Puffer und Lösungen

Blocklösung für Western-Blots	5% (w/v) Milchpulver in TBS/T
Blocklösung für Immunfluoreszenz	2% (w/v) BSA in PBS
Complete ohne EDTA, 50x	1 Tablette „complete ohne EDTA"-Proteaseinhibitor-Mischung (Roche) in 25 ml ddH_2O
Coomassie-Färbelösung SERVA Blue R (SERVA)	50% (v/v) Methanol, 10% Essigsäure, 0,1% (w/v)
DNA-Auftragspuffer, 6x	10 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, 1% SDS (w/v), 30% (w/v) Glyzerin, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, pH 8,0
IP-Puffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,4, 0,2% (v/v), Igepal, 1 mM EDTA und 1,5 mM $MgCl_2$
Lysepuffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,4, 0,2% (v/v), Igepal, 1 mM EDTA und 1,5 mM $MgCl_2$
P1	50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0
P2	200 mM NaOH, 1% SDS
P3	3 M K-Azetat, pH 5,5

Paraformaldehyd-Lösung	37% (w/v) Paraformaldehyd dunkel bei 4°C gelagert, Arbeitslösung: 3,7% in PBS
PBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1,8 mM KH_2PO_4, pH 7,4 eingestellt mit NaOH
PBS-T	0,05% Tween-20 in PBS
Hypotoner-Lysepuffer	20 µg/ml Propidium iodid, 0,1% (w/v) Na_3Citrat, 0,1% Triton X-100 in PBS
Ponceau-Färbelösung	0,1% Ponceau S, 1% (v/v) Essigsäure
SDS-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer, 10x	209 mM Tris/HCl, 41% (w/v) Glyzerin, 7,7% (w/v) SDS, 0,003% (w/v) Bromphenolblau, 1% (v/v) β-Mercaptoethanol, pH 6,8
SDS-Probenpuffer, 2x	125 mM Tris/HCl, 17% (w/v) Glyzerin, 4,1% SDS, 0,001% (w/v) Bromphenolblau, 2% (v/v) β–Mercaptoethanol, pH 6,8
SDS-Sammelgelpuffer, 4x	0,5 M Tris/HCl, 0,4% (w/v) SDS, pH 6,8
SDS-Trenngelpuffer, 4x	1,5 M Tris/HCl, 0,4% (w/v) SDS, pH 8,8
SSC, 20 x	0,3 M Trinatriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7,0 eingestellt mit HCl
TAE-Puffer, 5x	450 mM Tris, 450 mM Borsäure, 10 mM EDTA
TBS	20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5
TBS/T-Puffer	150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 0,05% Tween 20
TE	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
Triton-X-100-Lösung	0,2% (w/v) Triton-X-100 in PBS
Transferpuffer	47,9 mM Tris, 38,6 mM Glycin, 0,037% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol

TSS	10% (w/v) Polyethylenglykol 6000, 5% (v/v) DMSO, 50 mM $MgCl_2$ in LB-Medium
Vorhybridisierungslösung	1 M NaCl, 10% (w/v) Dextransulfat, 1% (w/v) SDS, 0,01% (w/v) Heringssperma-DNA

2.6 Plasmide

pcDNA3	3,5 kbp großes Plasmid, mit CMV-Promoter zur Expression rekombinanter DNA in eukaryontischen Zellen; enthält eine Neomycin-Resistenzkassette (Invitrogen,Heidelberg)pcDNA3HA Eukaryontischer Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für einen C-terminalen HA-Tag
pcDNA3myc	Eukaryontischer Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für einen C-terminalen myc-Tag
pcDNA3-YFP	Eukaryontischer Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für einen C-terminalen YFP-Tag (Alexis Schubert, Clontech)
pcDNA3Δ	Derivat von pcDNA3 mit deletierter Neomycin-Resistenzkassette (Grimm et al. 1998)
GFP-pLantern	Eukaryontischer Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für GFP (GibcoBRL)
Bcl2-HA	Eukaryontischer pcDNA3-Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für humanes Bcl-2 (Thomas Mund, Doktorarbeit)
Bap31-HA/myc	Eukaryontischer pcDNA3-Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für humanes Bap31 (Thomas Mund, Doktorarbeit)pBluescript II KS (-) Stratagene
pLucCMV	cDNA von Leuchtkäfer-Luciferase unter Kontrolle des CMV-Promotors; basiert auf pRcCMV (Invitrogen, Heidelberg)

pNedd2	cDNA von Caspase-2 (erhalten von S. Kumar, Adelaide, Australien) unter Kontrolle des CMV-Promotors; basiert auf pRcCMV (5,5kb, Invitrogen, Heidelberg)

2.7 Zellinien und Bakterienstämme

2.7.1 Eukaryontische Zellinien

293T	Human Embryonic Kidney
BHK	Baby Hamster Kidney
CHO	Chinese Hamster Ovary
HeLa	Cervix Carcinoma
Jurkat	Human T cell Leukemia
L929	Maus Fibroblasten
MCF7	Human Breast Adenocarcinoma
NIH3T3	Maus Fibroblasten
NRK	Normal Rat Kidney
PC3	Prostate Carcinoma
Raji	Burkitt's Lymphoma
Rat1	Rat Fibroblasts

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

2.7.2 Bakterienstämme

E. coli DH5α	F^- Φ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F)U169 *deo*R *rec*A1 *end*A1
	*hsd*R17 (r_K^- m_K^+) *sup*E44 λ^- *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1
E. coli SURE	BF^- dcm *omp*T *hsd*S (rB-mB-) gal

2.8 Zellkulturmedien

Medien für die Zellkultur	
Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium (DMEM)	Sigma, München
MEM nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco BRL, Eggenstein
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma, München
L-Glutamin (100 x)	Life Technologies, Karlsruhe
Natriumpyruvat (100 x)	Life Technologies, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (100 x)	Life Technologies, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (10 x)	Life Technologies, Karlsruhe

2.9 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium	1% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1%(w/v) NaCl
Superbroth-Medium	3,5% (w/v) Bactotrypton, 2% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl
SOC-Medium	2% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM Glucose

2.10 Antikörper

Name	Antigen	Herkunft	Referenz/Hersteller
Anti-Bcl2	Humanes Bcl2	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
Anti-Cytochrome c	Humanes-Cytochrome c	Maus, monoklonal	PharminGen Europe
Anti-Fas (CH-11)	Human Fas	Maus, monoklonal	Kamiya Biomedical, USA
Anti-mouse IgG		Ziege, polyklonal	Amersham Pharmacia,

Peroxidase-conjugate			Freiburg
Anti-rabbit IgG Peroxidase-conjugate		Ziege, polyklonal	Amersham Pharmacia, Freiburg
Anti-rat IgG Peroxidase-conjugate		Esel, Ziege polyklonal	Roche, Mannheim
Anti-myc IgG Peroxidase-conjugate		Maus, monoklonal	Roche, Mannheim
Anti-mouse IgG Rhodamine-conjugate		Ziege, polyklonal	Roche, Mannheim
Anti-rabbit IgG AlexaGreen-conjugate		Ziege, polyklonal	Amersham Pharmacia, Freiburg
Anti-RAIP	humanes RAIP	Hase, polyklonal	EUROGENTECH

2.11 Verwendete Geräte

Geräte	**Hersteller**
Durchflusscytometer: FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
E.coli-Pulser (Elektroporationsgerät)	BioRad, München
Brutschränke & Inkubatoren,	Heraeus, Hanau
Inkubationsschüttler: Elektrophoresekammern	(Eigenbau) MPI-Werkstatt
Power-Supply für die Gelelektrophorese:	
Electrophoresis Power Supply EPS 600	Pharmacia Biotech
Mikroskope: Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop: Axiophot IM-35	Zeiss, Oberkochen
Kühlzentrifugen: 5417 R, 4K15, RC 5B Plus	Eppendorf, Sigma, Sorval

Pipetten	Eppendorf
	Gilson, Middleton, USA
Tischzentrifugen	Eppendorf
UV-Tisch: UVT-14L, Eagle Eye	Herlolab, Stratagene
Vakuumzentrifuge: Concentrator 5301	Eppendorf
Spektrophotometer: DU 530	Beckman
PCR: Mastercycler Gradient,	Eppendorf
Mastercycler Personal	Eppendorf
LightCycler PCR	Roche, Mannheim
Ultraschallgerät: Cell Disruptor B15	Branson
Glasdouncer: Glas Col 009CS38	Cole-Parmer Instrument Co
Inkubatoren:Forma Scientific 3121 (21% O_2)	Forma Scientific, Marietta, USA

3 Methoden

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

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolisierung

Um DNA-Lösungen von Proteinverunreinigungen zu befreien wurde die Phenol-Chloroformextraktion (modifiziert nach Kirby (Kirby 1957)) verwendet.
Die DNA-Lösung wurde mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; pH 8) versetzt und gut durchmischt. Dadurch wurden Proteine denaturiert und in der Interphase zwischen wässriger und organischer Phase angereichert. Zur Phasentrennung wurden die Proben 5 min bei 20.800xg zentrifugiert. Die DNA-haltige wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Entfernung von Phenolresten wurde 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt, durchmischt und nochmals 5 min bei 20800xg zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und die darin enthaltene DNA wurde durch Ethanol-Natriumacetat gefällt

3.1.2 Nukleinsäure-Fällung

DNA aus wässriger Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumazetat-Lösung (pH 5,2) oder 5 M Ammoniumacertat gemischt und mit dem 2,5fachen Volumen Ethanol oder dem 0,7fachen Volumen Isopropanol versetzt. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte für mindestens 30 min bei -20°C. Die gefällte DNA wurde durch 20 Minuten Zentrifugation bei 14000 g bei 4°C pelletiert und anschliessend mit 70% Ethanol gewaschen. Die durch erneute Zentrifugation pelletierte Nukleinsäure wurde an der Luft oder im Vakuum getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH2O oder EB-Puffer aufgenommen.

3.1.3 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

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

3.1.4 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Präparation kleinerer Plasmid-DNA Mengen aus E.coli wurden einzelne Bakterienkolonien in 2ml LB-Medium überimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt.
Die Übernachtkultur wurde 5 min bei 6000 rpm abzentrifugiert und das Bakterien-Pellet in 150 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl alkalischer Lösung P2 wurde das Gemisch vorsichtig gemischt und die Bakterien 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Durch anschliessendes Mischen mit 150 µl eisgekühltem saurem Puffer 3 und Inkubation für 10 min auf Eis wurde die Lyse gestoppt. Die ausgefallenen Proteine und die Bakteriendebris wurden abzentrifugiert (10 min, 13000 g, 4°C) und die Plasmid-DNA mit 400 µl Isopropanol aus dem Überstand ausgefällt. Die Plasmid-DNA wurde durch 10minütige Zentrifugation bei 13000 g und RT sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen, an der Luft oder im Vakuum getrocknet und in 25 µl ddH2O gelöst.
Alternativ wurde das Miniprep DNA Purifikation Kit von QIAGEN
Zur Isolierung größerer Mengen reiner, intakter Plasmid-DNA wurde das „Maxi-Plasmid Purification Kit“ der Firma QIAGEN nach den Empfehlungen des Herstellers eingesetzt. Dafür wurden 100ml Bakterienkultur verwendet. Diese DNA wurde zur Transfektion von Gewebekulturzellen eingesetzt.
Isolierung von Plasmid

3.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA im 96-well Format

Die Isolierung der DNA wurde wie bei (Neudecker and Grimm, 2000) beschrieben ausgeführt. Es wurden 1ml Über-Nacht-Kulturen von Bakterien in 96-deep well plates

(Qiagen, Hilden) angelegt. Anschließend wurden die Bakterien 5 min bei 3000g in einer Sigma-Kühlzentrifuge (Sigma 4K15) pelletiert. Die Bakterienpellets wurden in je 170 µl Puffer P1 durch Vortexen resuspendiert und anschließend durch Zugabe von je 170 µl Puffer P2 bei RT lysiert. Nach 5 min wurde die Lyse durch Zusatz von 170 µl Puffer P3 beendet. Durch 5 min Zentrifugation bei 6000 g wurde die lysierten Bakterien pelletiert, die DNA im Überstand wurde in frische 96-deep well platesüberführt. Nach Zugabe von 100µl Puffer P4 pro well wurde die Suspension bei 45 min bei 4°C gelagert und anschließend 10 min bei 6000g zentrifugiert. Die Übestände wurden in 96-well Polyoxymethyl-Microtiterplatten überführt und je 150 µl Siliciumdioxidsuspension zugesetzt. Die Platten wurden 20 min bei RT inkubiert, wodurch die DNA an die Silicaoberfläche binden konnte. Anschließend wurden die Platten 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Silicapellets wurden mit je 400 µl kaltem (-20°C) Aceton gewaschen und 30 sec gevortext. Anschließend wurden die Blöcke 3 min bei 6000 rpm zentrifugiert, das Aceton abpipettiert und die Pellets bei RT für 5 min in Vakuumkammern getrocknet.

Zur Elution der DNA wurde pro well 75 µl 60°C warmes bidest. Wasser zugegeben, 10 min bei 6000 g zentrifugiert und die Überstände in 96-well Microtiterplatten überführt. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

3.1.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionspaltungen von DNA erfolgten unter der vom Hersteller für die jeweilige Nuklease angegebenen Puffer- und BSA-Konzentrationen. Pro 1 µg DNA wurden 2 bis 5 Units Restriktionsenzym eingesetzt. Um unspezifische Spaltaktivität der Endonuklease zu verhindern, wurde darauf geachtet, daß das Reaktionsvolumen mindestens das 10fache der in Glyzerin gelösten Enzyme war. Die Dauer des Restriktionsspaltung betrug mindestens 2 h bei der vom Hersteller für das jeweilige Enzm angegebenen optimalen Temperatur. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/5 Volumen 6 x DNA-Auftragspuffer beendet. DNA-Doppelspaltungen erfolgten nach den Angaben der Herstellers oder wurden in zwei aufeinanderfolgenden Einzelansätzen durchgeführt.

3.1.7 Dephosphorylierung von DNA-Enden mit CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase)

Um eine Religation des Vektors zu vermeiden wurde das linearisierte Plasmid vor der Ligation mit Hilfe der CIAP dephosphoryliert. Der Restriktionsansatz wurde mit gleichem Volumen mit ddH_2O verdünnt und mit 1/10 Volumen 10x CIAP-Puffer (Roche) und 3 U CIAP/µg eingesetzes Plasmid versetzt. Die Dephosphorylierungs-reaktion wurde 60 min bei 37°C inkubiert. Zur Deaktivierung der CIAP wurde der Ansatz vor der Ligation durch eine Phenol-Chlormextraktion (siehe 3.1.1) aufgereinigt.

3.1.8 Auffüllen überhängender DNA-Enden

Um überhängende 5'- oder 3'-DNA-Enden, einer vorangegangenen Restriktionsendonukleasen-Spaltung zu glätten, wurde eine DNA-Polymerase I Behandlung (Klenow-Fragment) der linearisierten DNA durchgeführt. Da das Klenow-Fragment in Puffern der Restriktionsenzyme aktiv ist, wurde auf das Umpuffern der DNA verzichtet. Der Reaktionsansatz wurde auf Eis abgekühlt und auf eine Endkonzentration von 25 µM dNTP´s eingestellt. Nach Zugabe von 1 U Klenow-Fragment pro µg eingesetzter DNA wurde der Ansatz 30 min bei 14°C inkubiert und anschließend zur Inaktivierung des Klenow-Fragments 10 min bei 75°C erwärmt. Die DNA wurde nachfolgend durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und gereinigt.

3.1.9 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0,8- bis 2%ige Agarose-Gele verwendet. Zur Präparation des Gels wurde die erforderliche Menge Agarose mit TAE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle aufgekocht, bis die Agarose gelöst war. Die flüssige Agarose wurde in eine Elektrophoresekammer gegossen und ein Kamm zur Aussparung der Geltaschen eingesetzt. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel in die Elektophoreseapparatur eingesetzt und mit TAE überschichtet. Die mit 1/5 Volumen 6 x DNA-Auftragspuffer versetzten DNA-Proben wurden in die Geltaschen pitettiert und bei 5V/cm aufgetrennt (Elektrophoresis Power Supply EPS300, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die aus der Gelelektrophorese resultierenden DNA-Banden wurden

in einer Ethidiumbromidlösung (1µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer) für 5 min inkubiert und anschließend 10 min in TAE-Puffer entfärbt. Die DNA wurden im UV-Durchlicht sichtbar gemacht und digital aufgenommen (ImageMaster VDS 1D, Amersham Pharmacia Biotech).

3.1.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Isolierung eines DNA-Fragmentes aus einem Agarose-Gel erfolgte abgewandelt nach (Tautz und M 1983). Die DNA-Bande auf einem UV-Leuchttisch (365 nm) aus dem Gel geschnitten und in ein Eppendorf-Cup überführt. Anschließend wurde die DNA mit dem „Qiagen Quick Spin"-Kit nach den Angaben des Herstellers eluiert.

3.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung eines DNA-Fragments mit einem Plasmidvektor über kohäsive DNA-Enden wurden 50 bis 100 ng Plasmid-DNA und ein drei- bis fünffacher molarer Überschuß des DNA-Fragments mit 2 µl 10 x Ligasepuffer, 2,5 U T4-DNA-Ligase und ddH_2O zu einem Endvolumen von 20 µl pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde bei RT 1-3 Stunden oder bei 16°C über Nacht inkubiert. 5 µl der Ligationsreaktion wurden zur Transformation von Bakterien eingesetzt.

3.1.12 Klonierung in pSUPER Vektor

Der pSUPER-Vektor basiert auf dem pBluescript-KS-Plasmid von Stratagene. Ein doppelsträngiges DNA-Oligonukleotid wird so eingefügt, dass die transkribierte RNA als RNAi wirken kann. Die DNA-Oligos wurden wie folgt ausgewählt: ein 19 Nukleotide langer Ausschnitt der codierenden Region mit anschliessenden zwei Adenein-Nukleotiden ($(N)_{19}$AA) wurde gesucht und überprüft, ob dieses Oligonukleotid nicht mit anderen Gen-Sequenzen komplementär ist. Ausserdem sollte der Abschnitt mindestens 100 Nukleotide vom Start-Codon entfernt sein und einen GC-Gehalt von 40-50% aufweisen. Die 19 nt lange Zielsequenz wird durch eine 9 nt Spacersequenz getrennt. Das resultierende RNA bildet mit sich selbst eine 19 bp große Schleife. Diese RNA wird dann innerhalb der Zelle sehr schnell geschnitten und bildet dann das funktionelle siRNA Transkript, da die zuvor gebildete Schleife ein optimales Substrat

für das Enzym Dicer ist, das wiederum zwei Stränge mit zwei 3´-Uridinüberhängen bildet (Elbashir et al. 2001).

Hybridisierung („Annealing“) der Oligos

Die Oligos wurden in einer Konzentration von 3 mg/ml in Bidest gelöst. 1 µl des jeweiligen Oligos (5´-3´ und 3´-5´ Richtung) wurde in 48 µl *Annealing* Puffer aufgenommen und 4 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Oligos 10 min bei 70°C inkubiert und hierauf langsam auf 4°C abgekühlt.

Annealing Puffer: 100 mM KOAc
30 mM HEPES-KOH pH 7.4
2 mM MgOAc

3.1.13 Gesamt-RNA-Isolation aus Säugerzellen

Gesamt-RNA aus Gewebekulturzellen wurde durch Anionenaustauschchromatographie mittels des „RNeasy Mini Kits“ der Firma Qiagen isoliert. Bei der Isolierung von Gesamt-RNA aus transient transfizierten Zellen wurde die an die Säulenmatrix gebundene RNA zusätzlich mit RNase-freier DNase I (RNase-free-DNase-Set, QIAGEN) behandelt um störende Plasmid-DNA vollständig zu entfernen. Die RNA wurde mit ddH_2O eluiert und durch Messung der Extinktion bei 260 nm quantifiziert.

3.1.14 RNA-Isolation aus HeLa-Zellen für LightCycler PCR

Für die Präparation von Gesamt-RNA für LightCycler PCR wurde das HighPure RNA Isolation Kit von Roche nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.1.15 Reverse Transkription, cDNA-Synthese

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

Folgender Reaktionsansatz wurde jeweils verwendet:

Ansatz: 5 µl Gesamt-RNA (etwa 10 µg)

2 µl Oligo dT Primer

2 µl 0,1 M DTT

4 µl 5x Erststrangpuffer

1 µl dNTP-Gemisch (je 0,25 µl 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)

1 µl Reverse Transkriptase Superscript II

ad 20 µl ddH_2O

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

3.1.16 cDNA-Synthese für LightCycler PCR

Für die LightCycler PRC wurde alternativ das First-Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) der Firma Roche nach Angaben des Herstellers eingesetzt

3.1.17 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte wurde eine Polymerase Kettenreaktion (*PCR*) mit dem ExpandLongTemplate Polymerase-Kit (Roche) durchgeführt. Für einen Standardreaktionsansatz mit einem Endvolumen von 20 µl wurden 50 ng Plasmid oder 1 µl cDNA, je 2 pmol der beiden Primer-Oligonukleotide, je 2 nmol der vier dNTPs, 5 µl 10 x Polymerasepuffer 3 (250 mM $MgCl_2$), 1,5 U DNA-Polymerase und das erforderliche Volumen ddH_2O gemischt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 94°C durchlief der Reaktionsansatz 25 bis 30 Zyklen, jeweils bestehend aus einer Denaturierungsphase von 30 s bei 94°C, einer Hybridisierungsphase von 1 min bei 52-62°C und einer Synthesephase von 1 min/kb des zu amplifizierenden DNA-Fragments bei 68°C. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf 8°C abgekühlt. Die jeweiligen *PCR*-Produkte wurden anschließend über Agarosegelelektrophorese kontrolliert und aufgereinigt.

3.1.18 LightCycler PCR

Für diese PCR wurde das LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I Kit der Firma Roche nach Herstellerangaben eingesetzt. Folgende Temperatur-Zyklen wurden verwendet:

	Temperatur (°C)	nden)
Hotstart	95	
Amplifikation(45 Zyklen)	95	
	56	
	72	
Schmelzkurve	95	
	55	
	55 bis 95	

Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green färbt ausschliesslich DNA-Doppelstränge ein und wird zur Quantifizierung der synthetisierten DNA nach jedem PCR-Zyklus verwendet. Je nach Konzentration der Template-cDNA setzt die messbare exponentielle Verdoppelung der DNA nach einer bestimmten Anzahl von PCR-Zyklen ein, diese Zahl wird von der LightCycler Software als CP (Crossing Point) angegeben.
Mit der RelQuant1.01 Software kann aus dem Vergleich der CP-Werte einer DNA-Verdünnungsreihe unter Einbeziehung der Geschwindigkeit der Amplifikation der DNA eine relative cDNA-Konzentration berechnet werden.

3.1.19 Gerichtete in vitro Mutagenese

Die gerichtete *In-Vitro*-Mutagenese von Plasmid-DNA wurde in abgewandelter Form nach dem Protokoll des „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kits“ der Firma Stratagene über PCR durchgeführt. Die Plasmid-DNA, in die eine Mutation eingeführt werden sollte, diente dabei als Matrize für die Synthese des mutierten DNA-Abschnittes. Die dabei verwendeten Primer-Oligonukleotide waren zueinander komplementär und enthielten die gewünschten Sequenzänderungen. Für einen

Standardreaktionsansatz mit einem Endvolumen von 50 µl wurden 100 ng Plasmid, je 5 pmol der beiden Primer-Oligonukleotide, je 5 nmol der vier dNTPs, 5 µl 10 x Polymerasepuffer 3, 1,5 U ExpandLongTemplate DNA-Polymerase und das erforderliche Volumen ddH_2O gemischt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 94°C durchlief der Reaktionsansatz 25 bis 30 Zyklen, jeweils bestehend aus einer Denaturierungsphase von 30 s bei 94°C, einer Hybridisierungsphase von 1 min bei 52-58°C und einer Synthesephase von 2 min/kb des zu amplifizierenden Plasmids bei 68°C. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt. Die jeweiligen *PCR*-Fragmente wurden anschließend über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und daraufhin direkt ohne Plasmid für eine zweite PCR eingesetzt. Der zweite PCR-Ansatz enthielt die äußeren Primer-Oligonukleotide und durchlief zunächst 10 Zyklen mit einer jeweiligen Hybridisierungsphase von 2 min bei 40°C. Anschließend durchlief der Reaktionsansatz 25 bis 30 Zyklen bei Standardbedingungen.

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

Die Sequenzierreaktion wurde mit dem „Big Dye Terminator Cycle Sequencing RR-Mix" der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Dieses Reagenz enthält *Taq*-Polymerase, dNTPs und mit unterschiedlichen Fluorophoren markierte ddNTPs. Zu einem Standardansatz wurden 4 pmol Primer-DNA-Oligonukleotid, 0,5 µg DNA, 4 µl Mix, und das zum Endvolumen von 10 µl fehlende Volumen ddH_2O gemischt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 96°C, durchlief der Reaktionsansatz 40 Zyklen, jeweils bestehend aus einer Denaturierungsphase von 30 s bei 96°C, einer Hybridisierungsphase von 15 s bei 50°C und einer Synthesephase von 4 min bei 60°C. Die Auftrennung und Detektion der Reaktionsprodukte wurde von einem hausinternen Service oder einem kommerziellen Service-Anbieter durchgeführt.
Alternativ wurde DNA bei kommerziellen Anbietern sequenziert.

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

Radioaktive DNA-Sonden zur Detektion spezifischer RNA-Spezies mit Hilfe des „Random Prime Labeling Systems“ (Promega) synthetisiert. In diesem Kit sind bereits Klenow-Polymerase, Zufallshexanukleotide und dNTPs (ohne dCTP) lyophilisiert vorhanden. Die Komponenten wurden in 35 µl TE-Puffer gelöst und 50ng hitzedenaturierte und auf Eis abgekühlte cDNA zugegeben. Anschließend wurde 5 µl -[32P]-dCTP (50 µCi, 3000 Ci/mmol) zugegeben und 60 min bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig wurde als Kontrolle die humane -Aktin-cDNA markiert. Nicht eingebaute Nukleotide und Primer-Oligonukleotide wurden mit Hilfe von „Qia Quick”-Säulchen (QIAGEN) entfernt. Das Eluat wurde auf 200 µl mit TE verdünnt. Die Inkorporation von Radioaktivität wurde durch Messung der Cherenkov-Strahlung von 2 µl des Eluats überprüft.

3.1.22 Nachweis membrangebundener RNA mit [32P]-markierten cDNA-Proben

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

kochenden, 0,1%igen SDS-Lösung entfernt. Die Membran wurde anschließend mit 2 x SSC gespült und zur Hybridisierung mit weiteren Sonden verwendet.

3.1.23 Herstellung kompetenter E. coli

Herstellung chemokompetenter E. coli

Um transformierbare Bakterien zu gewinnen, wurden 500 µl einer stationären Kultur von *E. coli* DH5α, SURE oder BL21(DE3) mit 50 ml LB-Medium verdünnt und in einem Schüttelinkubator bis zu einer OD_{600} von 0,5 bis 0,8 kultiviert. Die Bakterien wurden dann bei 4°C und 2000 g abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 2 ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 500 µl 87% (w/v) Glyzerin vorsichtig gemischt. Die Suspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Herstellung elektrokompetenter E. coli

Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen wurde nach der Vorschrift von Stratagene verfahren. 100 ml einer Über-Nacht-Kultur wurden mit 900 ml frischem LB-Medium versetzt und bei 37°C und 300 rpm solange wachsen gelassen, bis die OD_{600} zwischen 0,5 und 0,7 lag. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 5000 rpm 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Pellets wurden in einem Liter eiskaltem Glycerin (10%) resuspendiert und anschließend erneut 15 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut in 500 ml eiskaltem Glycerin (10%) resuspendiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in 250 ml eiskaltem Glycerin (10%) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml eiskaltem Glycerin (10%) resuspendiert, zu je 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Anschließend wurden die Zellen bei –80°C aufbewahrt.

3.1.24 Transformation kompetenter Bakterien

Transformation chemokompetenter Bakterien

Chemokompetente Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden entweder 5µl einer Ligationsreaktion oder 1µg eines Plasmids mit 50 µl Bakterien gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Das Bakterien/DNA-Gemisch wurde für 90s bei 42°C

inkubiert (Hitzeschock) und danach sofort für 2 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 400 µl SOC-Medium zugegeben und für 30 bis 60min bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde kurz abzentrifugiert (1 min, 5000 rpm), das Bakterienpellet in 100 µl LB Medium resuspendiert und auf vorgewärmte Agar-Selektionsplatten ausplattiert. Die Inkubation der Selektionsplatten erfolgte bei 37°C bis zu 24h.

Transformation elektrokompetenter Bakterien

Elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und zu 50 µl Bakteriensuspension mindestens 20 ng des zu transformierenden Plasmids gegeben. Die Suspension wurde in Elektroporationsküvetten mit einer Breite von 0,1 cm gegeben und in der Elektroporationskammer (Bio Rad) einem elektrischen Impuls von 1,8 kV ausgesetzt. Sofort anschließend wurden die Zellen mit 1 ml SOC-Medium versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 50 µl LB_{Amp} resuspendiert und anschließend auf ampicillinhaltigen (25µg/ml) LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2 Methoden der eukaryontischen Zellkultur

3.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellinien

Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank (Heraeus, Hanau) mit sterilen Lösungen, autoklavierten Glaswaren und sterilem Kunststoffmaterial durchgeführt. Die Zellen wurden in DMEM bei 37°C, 5% CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau) in 15cm Schalen kultiviert. Das Medium wurde mit 5% bzw. 10% fötalem Kälberserum (FCS), 2mM Glutamin, 2mM Natriumpyruvat sowie 50 U/min Penicillin/Streptomycin ergänzt.

Zellen wurden aus geerntet wenn sie eine Konfluenz von ca. 80% erreichten. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 5ml 0,25% Trypsin inkubiert bis sie sich von der Kulturschale ablösten. Die Zellsuspension wurde in ein 50ml Falcon überführt und mit 15 ml DMEM versetzt, anschliessend 2 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet 10 ml frischem DMEM resuspendiert und ein passender Anteil in in neue Zellkulturschalen ausgesäht.

3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Gewebekulturzellen

Die Zellen wurden aus einer logarhythmisch wachsenden Population eingefroren. Zum Einfrieren wurden die Zellen trypsiniert und in Suspension gebracht, durch Abzentrifugation bei 1000 g für 2 min sedimentiert und mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml DMEM mit 10% FCS resuspendiert und mit 1 ml 2X Einfriermedium versetzt. Die Suspension wurde in 2 ml Cryo-Röhrchen (Eppendorf) eingebracht, vermischt und direkt auf –80°C abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen zur längerfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte schnell bei 37^{o}C im Wasserbad. Die angetauten Zellen wurden sofort mit frischem Medium 1:10 verdünnt und auf Zellkulturschalen ausgebracht.

2x Einfriermedium: DMEM
20% FCS
20% DMSO

3.2.3 Transiente Transfektion von Gewebekulturzellen

Effectene Transfektion

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

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

Die zu transfizierende DNA wurde in einer geeigneten Menge des EC-Verdünnungspuffer aufgenommen und mit Enhancer-Puffer versetzt. Diese Reaktion wurde gemischt (vortex) und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von Effectene-Reagenz wurde erneut 15 min inkubiert, die jeweilige Menge DMEM-Standartmedium zum Mix pipettiert, vorsichtig gemischt und gleich auf die Zellen pipettiert. Nach 6h wurde das Medium gewechselt. und für weitere12-48h kultiviert

Calciumphosphat-Transfektion

293T-Zellen wurden mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Die Zellen wurden im gewünschten Format gesplittet und bei einer Konfluenz von ca. 70% transfiziert. Vor der Transfektion wurde das Medium durch Medium mit 10µM Chloroquin ersetzt. Die DNA wurde in ddH_2O vorgelegt, mit 2,5 M $CaCl_2$ versetzt, anschliessend 2x HBS pH 6,9-7,1 tropfenweise zugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Anschliessend wurde das gebildete DNA-Präzipitat auf die Zellen pipettiert. 5h nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt.

Für folgende Zellkulturformate wurde jeweils eingesetzt:

Format	Vol. Medium	µg DNA	add bidest	+Vol. 2,5M CaCl2	+Vol. 2x HBS	Vol PBS
24-well	1ml	0,2-1 µg	45 µl	5 µl	50 µl	0,5 ml
12-well	2ml	0,5-2 µg	67,5 µl	7,5 µl	75 µl	1,0 ml
6-well	3 ml	1-4 µg	90 µl	15 µl	150 µl	2,0 ml
10 cm	10 ml	5-10 µg	450µl	50 µl	500 µl	5,0 ml

Metafectene-Transfektion von 293T Zellen

Eine höhere Transfektionsrate besonders in grösseren Formaten als durch die beschriebene Calciumphosphat-Methode konnte durch Metafectene erreicht werden.

Im 6-well format wurden pro well 1,2ug DNA mit 100µl zusatzfreiem DMEM Medium gemischt, in einem 2. Ansatz wurden 5ul Metafectene Transfektionsreagenz mit 100µl zusatzfreiem DMEM gemischt. Beide Ansätze wurden vereinigt und 15-20 Miunuten bei RT inkubiert bevor das Gemisch auf die Zellen pipettiert wurde. Ein Mediumwechsel war nicht nötig. Die Expression vdes Repotergens GFP setzte nach 18-20h ein, nach ca. 36h wurde eine Transfektionseffizienz von 50-70% beobachtet

3.3 Proteinchemische Standardmethoden

3.3.1 Herstellung von Gesamtzell-Lysaten

Zur Präparation von Gesamt-Zellysaten wurden die Zellen direkt im Medium vorsichtig mit einem Gummischaber abgeschabt, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, 2 min bei 1000 rpm abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Das Zellpelett wurde im etwa 5fachen Volumen des Zellpellets im geeigneten Lysepuffer resuspendiert und10 min auf Eis inkubiert. Der Rohextrakt wurde anschließend für 10 min bei 13000xg und 4°C abzentrifugiert und das Pellet verworfen. Anschließend wurde vom Überstand die Proteinkonzentration bestimmt, mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 5-10 min aufgekocht.

IGEPAL:150 mM NaCl; 50 mM Tris, pH 7,4; 0,2% (v/v) Igepal; 1 mM EDTA; 1,5 mM $MgCl_2$

Lyse mit modifiziertem RIPA-(RadioImmunoPrecipitation)Puffer:
Die Zellen wurden von den Kulturschalen abgeschabt, in kaltem PBS gewaschen und 2 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Anschliessend wurde auf die Zell-Pellets etwa ein Pellet-Volumen des RIPA-Puffers gegeben und 5 min auf Eis inkubiert, dann mit Ultraschall dreimal 25 Sekunden die Zellstrukturen zerstört. Der Rohextrakt wurde anschließend für 10 min bei 13000xg und 4°C abzentrifugiert und das Pellet verworfen. Anschließend wurde vom Überstand die Proteinkonzentration bestimmt, mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 5-10 min aufgekocht.

RIPA-Puffer:
150 mM NaCl; 10 mM Tris Cl pH 8,7; 1% Na-Desoxycholat; 1% Triton X 100; 0,1% SDS

3.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte mit dem "BioRad Protein Microassay" der Firma BioRad (München). Dazu wurde die Lösung 1:6 in ddH_2O verdünnt und 1ml davon mit je 1-5 µl der Proteinlösung versetzt. Durch Messung der Extinktion bei 595nm in Vergleich zu einem BSA-Standard konnte die Proteinkonzentration abgeschätzt werden.

3.3.3 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der diskontinuierliche Gelelektrophorese (Laemmli et al., 1970) werden Proteine zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und anschließend in einem höherprozentigen Trenngel nach Molekulargewicht aufgetrennt. Eingesetzt wurden homogene Trenngele (10%, 12%, und 15 %). Das Trenngel war jeweils mit einem ca.1 cm hohen 4%igen (w/v) Sammelgel überschichtet. Nach Polymerisation wurde das Gel in eine Vertikal-Elektrophoresekammer eingebaut und die Reservoirs mit SDS-Elektrophoresepuffer gefüllt. Vor dem Auftragen wurden die Proteinlösungen mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min im Heizblock bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 bis 20 V/cm.

3.3.4 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Gele wurde zum Färben 2-5 min in Coomassie-Färbelösung erhitzt und anschließend im Entfärbelösung (25% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure) entfärbt.

3.3.5 Autoradiografie von Gelen

Proteingele von radioaktiv markierten Proteienn nach in vitro Translationen wurden getrocknet und anschließend auf Filme belichtet (siehe auch 3.1.22).

3.4 Immunologische und immunbiochemische Methoden

3.4.1 Immunoblot-Analyse

Proteintransfer auf Membranen (Western-Blot)

Die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden über Elektrotransfer ("Semi-dry Blot") auf eine PVDF-Membran transferriert. Die PVDF-Membran wurde einige Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend 5 min in Transferpuffer inkubiert. Auf die Anode der Blot-Apparatur wurden zwei Lagen mit Transferpuffer gesättigtes Whatman 3MM-Papier, die Membran, das Trenngel, zwei weitere Lagen Whatman 3MM-Papier und die Kathode geschichtet. Zuvor wurden die Membran und das Whatman-Papier auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Der Transfer erfolgte für 60 min bei 1,5 mA /cm^2 Trenngelfläche.

Ponceau S-Färbung von Proteinen

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

Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern

Zur anschließenden spezifischen Proteindetektion wurde die Membran in Blocklösung A für mindestens 60 min bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde die Membran 2-12h bei 4°C in einer geeigneten Verdünnung des ersten Antikörpers in Blocklösung A geschwenkt. Die Membran wurde dann dreimal für je 10 min in TBS-T gewaschen und mit einem gegen den ersten Antikörper gerichteten, Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper für 50-90 min inkubiert und anschließend mehrmals in TBS-T gewaschen..

ECL-Detektion von Peroxidase-gekoppelten Antikörpern

Die ECL-Methode (ECL-Kit; Amersham-Buchler, Braunschweig) ist eine Licht emittierende, nicht-radioaktive Nachweismethode zur Detektion von immobilisierten Antigenen mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern. Die Peroxidase ist mit dem

sekundären Antikörper gekoppelt und katalysiert eine Chemolumineszensreaktion, die auf einem Röntgenfilm detektiert werden kann. Nach Inkubation der Western-Blot-Membran mit dem sekundären Antikörper wurde diese mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurden in einer Dunkelkammer unter Rotlicht gleiche Teile der Detektionsreagenzien A und B (ECL-Kit) nach Angaben des Herstellers gemischt, die Membran darin für 1 min inkubieren gelassen und anschließend ein Röntgenfilm aufgelegt und entwickelt.

3.4.2 Co-Immunpräzipitation von Proteinen

Um eine in vivo Iteraktion von zwei Proteinen nachzuweisen wurde eine Co-Immunpräziptation durchgeführt. Die entsprechenden cDNA-Konstrukte der Proteine wurden in 293T Zellen transfiziert, die Zellen nach 24h Stunden geerntet und die Zellpellets in 600 µl IP-Puffer für 10 min auf Eis lysiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13000 g und 4°C erhielt man im Überstand das Proteinextrakt. 60 µl dieses Extraktes wurden mit 60 µl 2x SDS-Probenpuffer versetzt , aufgekocht und dienten zum Test des Inputs. Mit dem Rest des Extraktes wurde die Immunpräzipitation durchgeführt. Dazu wurde das Extrakt mit 2 µg spezifischem Antikörper gegen eines der Proteine versetzt und über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad rotiert. Anschliessend wurde der Ansatz mit einer kleinen Spatelspitze Protein-A-Sepharose versetzt und 2 Stunden auf dem Drehrad inkubiert. Durch Zentrifugation für 10 min bei 3000g konnte der an die Protein-A-Sepharose gebundene Antikörper-Protein-Komplex präzipitiert werden. Nach dreimaligem Waschen mit IP-Puffer (jeweils nach 1.000g-Zentrifugation) wurden die Sepharosebeads in 100 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und nach 5-minütigem Kochen mittels SDS-PAGE/Western-Blot analysiert.

3.4.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Endogene Proteine und Proteine, die in eukaryontischen Zellen nach transienter Transfektion exprimiert wurden, können nach Fixierung der Zellen *in situ* durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Adhärente Säugerzellen, oder zuvor transfizierte Säugerzellen (24 h nach der Transfektion), wurden auf sterile Deckgläschen in 12-well-Platten ausgesät, und bis zu einer Konfluenz von 50%

kultiviert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und für 5 min in 3,7 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 10 min in 0,2% Igepal in PBS permeabilisiert und anschließend 30 min mit Blocklösung (2% BSA in PBS) inkubiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Verdünnung 1:50 – 1:1000, je nach eingesetztem Antikörper, verdünnt in Blocklösung) erfolgte bei RT für 1-2h. Die Zellen wurden dreimal mit Blocklösung gewaschen und 1 h mit dem sekundären Antikörper (FITC- oder Rodamin-konjugierte Antikörper, 1:500 in Blocklösung) bei RT im Dunklen inkubiert. Abschließend wurden die Deckgläschen zweimal mit PBS gewaschen, kurz abgetropft und mit 50 µl "Glow-mounting medium" überschichtet und mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Auswertung erfolgte an einem Axioskop 2- Fluoreszenzmikroskop (Zeiss).

3.4.4 DAPI-Färbung

Für die Versuche wurden adhärente Säugerzellen auf sterilen Deckgläsern in 12-Well Kulturschalen ausgesät, bis zu einer Konfluenz von etwa 50% kultiviert und anschließend transfiziert. 14-24 h nach der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 5 min in 3,7 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 15 min in 0,2% (v/v) Igepal (Sigma) in PBS permeabilisiert, erneut gewaschen und mit einer 50 µM DAPI-Lösung (4'-6-Diamidino-2-phenylindole, Sigma)in Methanol für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit Methanol und dreimal mit PBS gewaschen, kurz abgetropft und mit 10 µl "Glow-mounting medium" überschichtet und eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte an einem Axioskop 2- Fluoreszenzmikroskop (Zeiss).

3.4.5 ConcanavalinA-Färbung

ConcanavalinA ist ein Lektin, das spezifische Zuckerreste in der ER-Membran binden kann. Fluoreszenzgekoppeltes ConcanavalinA (Sigma) diente als ER-Marker bei Immunfluoreszenzen. ConA wurde nach der Permeabilisierung der Zellen bzw. nach der Inkubation mit Sekundärantikörpern in PBS 1:5000 verdünnt auf die Zellen gegeben und am Zellkulturmikroskop die Färbung beobachtet. Nach Erreichen der gewünschten Färbungsintensität wurde 3x mit PBS gewaschen.

3.4.6 Mitotracker-Färbung

Chloromethyl-X-Rosamin (CMX-Ros, Mitotracker) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der selektiv Mitochondrien anfärbt, die über ein Membranpotential verfügen (Macho *et al.*, 1996). Für diesen Versuch wurden HeLa-Zellen auf Deckgläschen (15 mm Kantenlänge) in 12-Loch-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit frischen Wachstumsmedium überschichtet, dem Mitotracker in einer Konzentration von 40 nM zugesetzt war. Nach einer Inkubation für 30 min bei 37°C und 5% CO_2 wurden die Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen und anschliessend bei RT für 15 min in 3,7% Formaldehyd-Lösung fixiert. Nach einem Waschschritt mit PBS erfolgte eine Inkubation bei –20°C für 10 min in Aceton. Die Deckgläschen wurden nun umgedreht auf Glyceroltropfen aufgebracht (so dass die Zellen im Glycerol eingebettet sind), und so auf Objektträgern fixiert. Bis zur Untersuchung am Mikroskop wurden die Zellen trocken und dunkel gelagert.

3.5 Methoden zum Nachweis der Apoptose

3.5.1 DNA-Leiter

293T Zellen wurden in 10cm-Schalen mit Expressionsplasmiden transfiziert. Nach Einsetzen der Apoptose wurden die Zellen abgeschabt, für 10 min bei 800g und 4°C zentrifugiert und einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl hypotonem Lysepuffer aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Es wurden 500 µl Phenol zugesetzt und gut gemischt (vortex). Anschließend wurde 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrtige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt und es wurden 500 µl Phenol/Chloroform (1:1) zugesetzt. Nachdem erneutem Mischen, wurde für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt und es wurden 30 µl 5 M NaCl und 1 ml kaltes Ethanol zugesetzt. Die Lösung wurde gemischt und für mindestens 1 h bei –20°C gelagert. Anschließend wurde für 20 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 300 µl kaltem, 70%igem Ethanol gewaschen.

Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei RT getrocknet. Das Pellet wurde in 15 µl TE-Puffer aufgenommen und 5h bei 50°C inkubiert. Dann wurden 3 µl RNAse A (10 mg/ml) zugesetzt und 90 min bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde im gleichen Volumen Ladepuffer aufgenommen und auf einem 2%igen Agarose-Gel bei 60 V für 2,5 h aufgetrennt.

3.5.2 Nachweis hypodiploider DNA mittels Durchflußzytofluorimetrie (Afanas'ev et al., 1986)

Diese Methode wurde nach Bauer et al. (1997) ausgeführt und erlaubt die Messung apoptotischer Zellen die durch DNA-Fragmentierung einen hypodiploider DNA-Gehalt aufweisen. Diese Methode beruht auf dem Austreten kleiner DNA-Fragmente aus permeabilisierten apoptotischen Zellen, welche nach Anfärbung der DNA mit Propidiumiodid und anschließender Analyse im Durchflußcytometer (FACS-Analyse mit dem Programm „Cellquest" im FACS-Calibur; Becton-Dickinson, Heidelberg) als Sub-G1-Fraktion meßbar sind. Zur Vergleichbarkeit paralleler Messungen wurde der Anteil GFP-positiver Zellen separat in der FACS bestimmt. Ein GFP-Plasmid (pLantern, Stratagene) wurde jeweils im Verhältnis 1:3 bis 1:10 zum untersuchten Expressionsplasmid cotransfiziert. Das Medium mit flotierenden (toten) Zellen wurde abgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die adhärenten Zellen trypsiniert, zu den vorher abgenommenen Medium gegeben und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in je 150µl PBS resuspendiert. Für die Messung der Transfektionseffizienz wurden je 50 µl Zellsuspension direkt in der FACS gemessen. Dabei geben die GFP-positiven Zellen in Bezug zur Gesamtpopulation Aufschluß über die Transfektionseffizienz. Für die Messung der hypodiploiden DNA wurden 100 µl der Zellsuspension mit 300 µl PI-Lysepuffer versetzt. Anschließend wurden die Zellen in der FACS gemessen.

3.5.3 Caspase-3-Aktivitätstest

Zum Test auf Caspase-3-Aktivität wurde der "Caspase-3-Activity Assay Kit" von Roche benutzt und entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. HeLa-Zellen wurden im 6-*well*-Format transfiziert, trypsiniert und mit PBS gewaschen. Nach

der Lyse wurden jeweils 50 oder 100 µg Gesamtprotein des Lysats für den Caspase-3-Aktivitätstest eingesetzt, wobei eine zuvor mit Caspase 3-Antikörper gecoatete und mit Blocklösung B (2% BSA in PBS) abgesättigte 96-*well*–Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden) für mindestens 60 min mit dem Lysat inkubiert wurde. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die Caspase-3-Aktivitätsbestimmung mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Caspase-3-Substrats.

3.6 Datenbanken:

Sammlung nützlicher Internetresourcen: http://www.expasy.org/

Datenbanksuche: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ (Altschul et al. 1997)

Signalpeptid/Schnittstelle: http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ (Nielsen et al. 1997)

Transmembran-Domänen, Signalpeptid: http://smart.embl-heidelberg.de/ (Letunic et al. 2002; Schultz et al. 1998)

Vorhersage der subzellulären Lokalisation: http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/ (Emanuelsson et al. 2000 1997)

4 Ergebnisse

4.1 Reihenuntersuchung nach dominant Apoptose induzierenden Genen: Screen

Zu Beginn dieser Arbeit wurde eine Reihenuntersuchung, im Folgenden als *Screen* bezeichnet, nach dominant Apoptose induzierernden Genen durchgeführt. Dazu wurden kleine Mengen („Aliquots“) einer normalisierten, nicht amplifizierten Maus Nieren cDNA-Bibliothek so verdünnt und im 96-*well* Format angeimpft, dass statistisch pro *well* nur ein bis maximal fünf verschiedene Bakterienklone vorhanden waren. Die cDNAs wurden anschließend ebenfalls im 96-*well* Format mittels eines speziellen „Miniprep“-Verfahrens isoliert (Neudecker und Grimm 2000) und in humane embryonale Nierenzellen (293T) in 24-*well* Platten transfiziert. 24 und 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen im Phasenkontrast-Mikroskop auf Apoptose-typische morphologische Veränderungen untersucht (siehe auch Abb. 4.6). Als Positivkontrollen für Transfektionseffizienz und Apoptoseinduktion wurde pro Platte ein *well* mit Caspase-2 (Nedd-2) oder ANT-1 transfiziert, von denen bekannt war, dass sie in diesem System deutlich Apoptose induzieren können (Bauer et al. 1999). Als interne Negativkontrolle dienten die nicht Apoptose induzierenden cDNAs aus der Genbibliothek.

Die cDNA-Klone, die zu Apoptose-typischen morphologischen Veränderung in 293T-Zellen führten, wurden in *E. coli* retransformiert, vereinzelt und wieder in 293T-Zellen transfiziert. Nur cDNA-Klone, die erneut typisch apoptotische Veränderungen induzierten, wurden sequenziert und weiter analysiert. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Apoptoseinduktion durch Einzel-cDNA-Klone und nicht durch ein Gemisch mehrerer Klone bedingt war.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt mehr als 5000 unabhängige cDNA-Klone isoliert und transfiziert, 65 wurden nach der ersten Transfektion vereinzelt und erneut getestet. 27 Klone induzierten nach ihrer Vereinzelung apoptotische Veränderungen in 293T-Zellen, was einem Anteil von ca. 0,54% der 5000 getesteten cDNAs entspricht.

Nr.	GI-Nummer	Klonbezeichnung
1. Klone mit bekannter Funktion in der Apoptose:		
#9	gi|13277639	VDAC, *Voltage dependent anion channel*
#30	gi|3114593	CIDE-B, *cell death activator*
#6	gi|15215192	UCP-2, *uncoupling protein* 2
2. Klone mit bekannter Funktion, allerdings noch keine bekannte Verbindung zu Apoptosefunktionen:		
#10	gi|3746126	E25B, Maus-Homolog des humanen Bri-Proteins
#21	gi|26081011	Integrin alpha 6
#25	gi|13277854	Cytochrom c Oxidase, Untereinheit VI a
#33	gi|13385531	Pfdn1, Prefoldin 1
#48	gi|12805068	Selenoprotein P
#51	gi|6755862	Tra1, *tumor rejection antigen* gp96, ER-Protein
#19, 22, 37	gi|38176281	ribosomale DNA
3. Klone mit weitgehend unbekannter Funktion:		
#2	gi|21410486	BTB (POZ) *domain containing protein-1*
#3	gi|26102598	DLC-1, *deleted in lung and esophageal cancer* 1
#5	gi|38083967	GEF, potenzieller *Rho guanine nucleotide exchange factor*
#13	gi|34852871	Ähnlichkeit mit Na^+ *dependent glucose transporter 1* (Rattus norvegicus)
#20	gi|12833026	ribosomales Protein L13
4. Klone ohne Hinweis auf Funktion:		
#7	gi|31581827	Mus musculus *chromosome 1 clone* RP23-8J15
#23	gi|29144915	RIKEN cDNA 1500011K16 *gene*
#24	gi|13491210	3 BAC RP23-418O21
#26	gi|33342391	*chromosome 16, clone* RP23-130N20
#29	gi|21961506	*clone* IMAGE:5364801, mRNA
#31	gi|18042902	*clone* IMAGE:3595140, mRNA
#38	gi|21961506	*clone* IMAGE:5364801, mRNA
#39	gi|33112617	*clone* LA9 *mitochondrion, complete genome*
#49	gi|26096354	*ovary cDNA* (kurze Homologie)

Tab. 4.1: Zusammenfassung der Apoptose induzierenden Klone aus dem *Screen*: *27 Klone induzierten nach Vereinzelung Apoptose, drei Gene waren bereits mit Apoptose in Verbindung gebracht, sieben mit anderen Funktionen beschrieben, für fünf Sequenzen gab es bereits Hinweise auf Struktur oder Funktion, neun waren bisher nur als cDNA-Klone beschrieben.*

Die positiven cDNAs wurden anschließend sequenziert und ein Datenbankabgleich (BLASTn) mit öffentlich zugänglichen Datenbanken im Internet unter www.ncbi.nlm.nih.gov/blast durchgeführt (Altschul et al. 1997). Die Ergebnisse sind in Tab. 4.1 zusammengefasst.

Drei der isolierten cDNA-Klone waren bereits mit Apoptosefunktionen beschrieben (siehe Tab. 4.1). Der *Voltage dependent anion channel*, VDAC, ist ein mitochondriales integrales Membranprotein der äusseren Mitochondrienmembran, das als wichtiger Bestandteil der PT-Pore (*permeability transition pore*) beschrieben wurde (Shimizu et al. 2000a; Tsujimoto und Shimizu 2002). Die Erkenntnisse über die Apoptoseinduktion durch Aktivierung von VDAC sind auch Grundlage für einen Ansatz der Therapie der Alzheimer-Erkrankung. Ein chemischer Inhibitor von VDAC soll die Neurodegeneration durch übermäßige Apoptose im Verlauf dieser Krankheit hemmen (Youdim und Weinstock 2001).

CIDE-B (*cell-death-inducing DNA-fragmentation-factor (DFF45)-like effector B*) ist ein Mitglied der proapoptotischen CIDE-Familie die Sequenzhomologien zur Caspase-aktivierten DNase (CAD bzw. DFF45, *DNA fragmentation factor* 45) aufweist. CIDE-B kann Apoptose und DNA-Fragmentierung Caspasen-unabhängig induzieren (Inohara et al. 1998; Lugovskoy et al. 1999). Im Krankheitsverlauf nach Infektion mit Hepatitis C (HCV) spielt CIDE-B eine wichtige Rolle. Eine chronische HCV-Infektion führt häufig zur Entstehung von Leberkrebs, verantwortlich ist (unter anderem) das virale Protein NS2, das die proapoptotische Wirkung von CIDE-B inhibieren kann (Erdtmann et al. 2003).

Auch das im *Screen* isolierte *Uncoupling Protein* (UCP-2) ist ein mitochondriales Membranprotein. Uncoupling Proteine können Protonenkanäle in der inneren Mitochondrienmembran bilden und die Atmungskette entkoppeln. Der Protonenausfluß aus den Mitochondrien ohne Energiekonservierung durch ATP-Synthese führt zu

Wärmeproduktion, ein Mechanismus, der im braunen Fettgewebe von Säugetieren zur zitterfreien Thermogenese dient (Bouillaud et al. 1985).

In Verbindung mit apoptoischen Vorgängen gibt es zu UCP-2 verschiedene Beobachtungen. Da eine Überexpression von UCP-2 zu einem Zusammenbruch des Protonengradienten über die Mitochondrienmembran führt, kann die Entstehung von radikalem Sauerstoff bzw. H_2O_2 bei geringer ADP-Verfügbarkeit (Hemmung der ATP-Synthetase) durch UCP-2 gehemmt werden (Argiles et al. 2002; Negre-Salvayre et al. 1997). Die Wirkung von UCP-2 ist in diesem Fall antiapoptotisch.

Anderseits ist der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotenzials ein proapoptotisches Signal, was den proapoptotischen Effekt der UCP-2-Überexpression erklären könnte.

Ein interessanter Hinweis auf die Beteiligung von UCP-2 und VDAC an apoptotischen Prozessen ist deren Hochregulation während der Apoptose nach Bestrahlung von B-Zell Lymphoma Zellen (Voehringer et al. 2000).

4.2 Charakterisierung von PSAP als Apoptose induzierendes Gen

Im Rahmen des *Screen*s wurde ein dominant Apoptose induzierendes Gen isoliert, das kurz zuvor als „*presenilin-1 associated protein*“, PSAP, beschrieben wurde (Xu et al. 1999). Zu diesem Zeitpunkt gab es keine Informationen über einen Zusammenhang zwischen PSAP und Apoptose. PSAP wurde auch als „*Mitochondrial Carrier Homolog-1*“ (MtCH-1) bezeichnet, von dem 2 Isoformen beschrieben wurden (Strausberg et al. 2002; Xu et al. 1999).

Die Presenilne 1 und 2 (PS-1 und -2) sind jene Proteine, deren Mutation Ursache der meisten Fälle der vererbten Alzheimer Krankheit (*familiar Alzheimer disease,* FAD) verantwortlich sind (Selkoe 1997). Die Krankheits-relevanten Mutationen von PS-1 führen zu einer aberranten Spaltung von β-APP (β-Amyloid-Precursor Protein). Diese Spaltung führt zur Bildung von β-Amyloid-Plaques, die schließlich Auslöser der neurogenerativen Alzheimer Erkrankung sind. Es gab bereits einige Hinweise auf eine Verbindung zwischen Presenilinen und Apoptose, genaue Mechanismen waren allerdings unbekannt. Presenilne selbst induzieren keine Apoptose in neuronalen

Zellen, können diese aber für Apoptose sensibilisieren (Vito et al. 1997). Außerdem war bereits bekannt, dass Presenilin mit Bcl-X_L interagieren (Passer et al. 1999) und durch Caspasen prozessiert werden (Loetscher et al. 1997).

PSAP als Presenilin-Interaktionspartner war als dominant Apoptose induzierendes Protein besonders interessant, da es eine direkte Verbindung zwischen Presenilin und Apoptoseinduktion herstellen konnte.

Zu einem späteren Zeitpunkt allerdings wurde die Eigenschaft von PSAP, dominant Apoptose induzieren zu können von einer anderen Arbeitsgruppe veröffentlicht (Xu et al. 2002). Ein Teil der im Rahmen meiner Arbeit gefundenen Belege der Apoptose-induzierenden Eigenschaften von PSAP sind im Folgenden nur kurz zusammengefasst.

4.2.1 PSAP induziert Apoptose in 293T und HeLa-Zellen

Die Transfektion von PSAP in 293T-Zellen führte nach etwa 20 Stunden zu deutlichen morphologischen Veränderungen, die Zellen rundeten sich ab und bildeten apoptotische Körperchen. Die Apoptose-typische internukleosomale Fragmentierung der genomischen DNA ließ sich nach Gelelektrophorese als DNA-Leiter und die resultierende Abnahme des nukleären DNA-Gehalts im Durchflußzytometer (FACS) messen (Abb. 4.1 A).

Mit Hilfe des Pancaspase-Inhibitors zVAD-fmk sollte untersucht werden, ob die PSAP-vermittelte Apoptose aktivierte Caspasen benötigt. Dazu wurden 293T und HeLa-Zellen 5 Stunden nach Transfektion mit PSAP mit 50µM zVAD-fmk behandelt und die apoptotische DNA-Fragmentierung weitere 15 Stunden später im Durchflußzytometer (FACS) gemessen. Die deutliche Abnahme der Apoptose in Anwesenheit des Caspase-Inhibitors belegt die Notwendigkeit von aktivierten Caspasen bei der PSAP-vermittelten Apoptose.

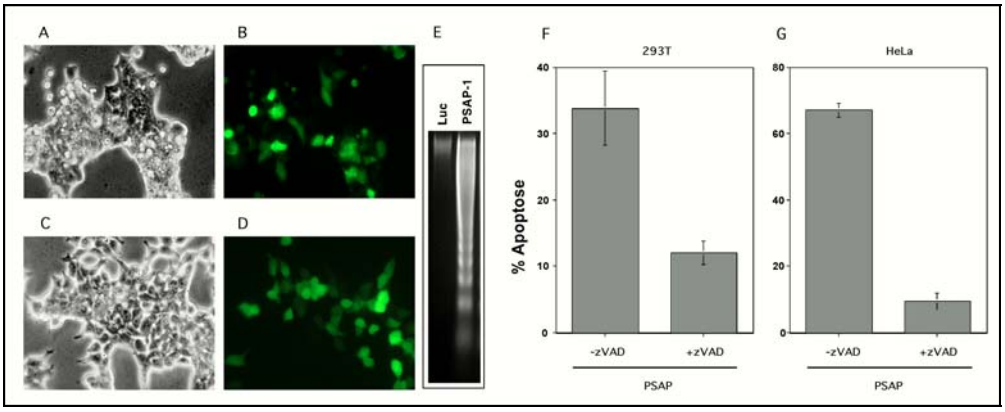


Abb. 4.1 PSAP induziert apoptotische Veränderungen in 293T und HeLa-Zellen: *20 Stunden nach Transfektion mit PSAP und GFP zeigen 293T-Zellen Apoptose-typische Veränderungen: die Zellen runden sich ab und schnüren apoptotische Körperchen ab. Phasenkontrast (A), GFP-Fluoreszenz (B); Luciferase und GFP kontroll-transfizierte Zellen zeigen diese Veränderungen nicht (C und D). Die chromosomale DNA von PSAP-transfizierten 293T-Zellen ist zu oligonukleosomalen Fragmenten degradiert (DNA-Leiter) (E). Die im Durchflusszytometer gemessene apoptotische DNA-Fragmentierung lässt sich effektiv mit dem Pancaspase-Inhibitor zVAD-fmk hemmen (F+G)*

4.2.2 PSAP-vermittelte Apoptose kann durch Bcl-X_L und Hemmung der PT-Pore inhibiert werden

Das antiapoptotische Bcl-2-Protein Bcl-X_L kann frühe apoptotische Vorgänge an den Mitochondrien (Wang 2001) sowie am ER (Zong et al. 2003) hemmen und so die Aktivierung von Initiatorcaspasen kontrollieren. Die Cotransfektion von PSAP mit Bcl-X_L sollte Hinweise liefern, ob die Inhibiton dieser frühen Ereignisse in der apoptotischen Signalkaskade die PSAP-induzierte Apoptose inhibieren kann.

Die Aktivierung der PT-Pore ist der entscheidende Schritt, der zur Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien führt (Bernardi et al. 1999; Loeffler und Kroemer 2000). Die Notwendigkeit der Aktivierung der PT-Pore für die PSAP-vermittelte Apoptose sollte durch Cotransfektion eines Inhibitors der PT-Pore, Cyclophilin D (Schubert und Grimm 2004), bzw. Zugabe des chemischen PT-Poren-Inhibitors Bongkrek-Säure (Abb. 4.2) (Belzacq et al. 2002; Kroemer und Reed 2000; Le Quoc und Quoc 1988) untersucht werden.

Die PSAP-vermittelte Apoptose wird duch cotransfiziertes Bcl-X_L eindeutig gehemmt. Die Hemmung durch die PT-Inihibitoren Cyclophilin D und Bongkrek-Säure ist

weniger stark aber dennoch deutlich. Eine Aktivierung der Mitochondrien und der PT-Pore nach Apoptoseinduktion mit PSAP ist demnach sehr wahrscheinlich.

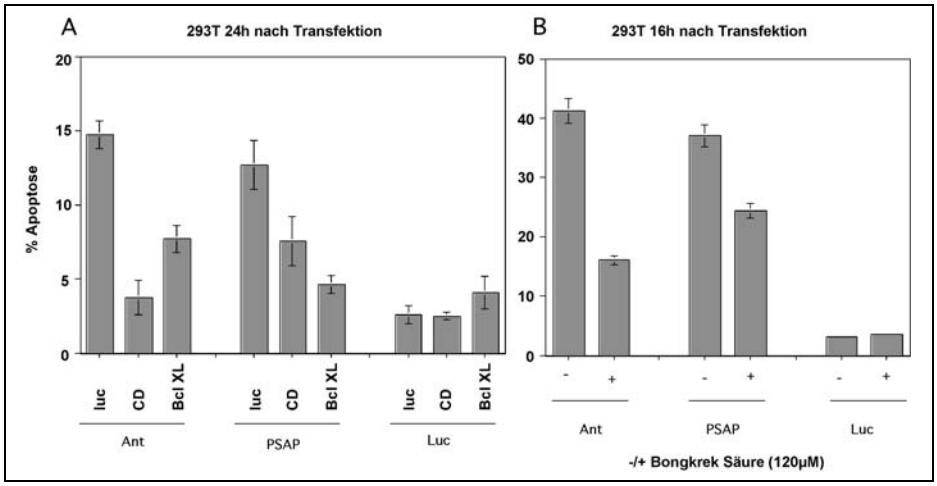


Abb. 4.2 Die Cotransfektion von antiapoptotischem Bcl-X_L und die Inhibition der PT-Pore vermindern die PSAP-induzierte apoptotische DNA-Fragmentierung in 293T-Zellen: *Bcl-X_L inhibiert sehr effizient die PSAP-vermittelte Apoptose, die Inhibition durch Cyclophilin D (CD) ist etwas schwächer (A). Bongkrek-Säure hemmt die PSAP-induzierte Apoptose ebenfalls (B). Zum Vergleich ist jeweils die Hemmung des proapoptotischen PT-Poren-Bestandteils ANT-1 gezeigt.*

4.2.3 Die Cotransfektion von Presenilin-1 beeinflusst die Apoptoseinduktion durch PSAP nicht signifikant

Erste Versuche zur funktionellen Interaktion von PS-1 in der PSAP-vermittelten Apoptose zeigten keine signifikante Beeinflussung der PSAP-induzierten Apoptose durch PS-1 (nicht gezeigt). Xu et al. konnten in einem anderen Versuch zur funktionellen Interaktion von PSAP und PS-1 nur eine geringfügige Abnahme der Apoptose in Anwesenheit von PS-1 beobachten (Xu et al. 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls die Lokalisierung von PSAP in HeLa-Zellen mit PSAP-YFP Fusionsproteinen untersucht (nicht gezeigt). Wie auch Xu et al. zeigen konnten, lokalisiert PSAP in den Mitochondrien (Xu et al. 2002). Diese Lokalisation bestätigt (neben der Sequenzhomologie), dass PSAP ein *Mitochondrial Carrier Homolog* (MtCH) sein könnte.

4.3 Charakterisierung von RAIP, einem bisher unbekannten Apoptose induzierenden Protein

Ein im Rahmen des *Screens* in unserem Labor isolierter Klon, N57, fiel durch seine schnelle und effiziente Apoptoseinduktion in 293T-Zellen auf. Die Sequenzierung und Datenbankabgleiche (BLAST) erbrachten keine Hinweise auf dessen Funktion oder Zusammenhang mit Apoptose (siehe Abschnitt 4.3.1). Dieser Klon wurde ***R**apid **A**poptosis **I**nducing **P**rotein*, **RAIP**, genannt und genauer untersucht.

4.3.1 Sequenzinformationen über RAIP

4.3.1.1 RAIP-Homologe in verschiedenen Organismen

RAIP wurde von beiden Seiten sequenziert (T7 und BGH-Primer) und mit den erhaltenen Sequenzen eine Datenbanksuche (BLAST) durchgeführt (siehe Tab. 4.2) (Altschul et al. 1997). Die stärkste Homologie zeigte sich zu einer murinen cDNA mit bisher unbekannter Funktion. Den nächsten homologen humanen cDNA-Sequenzen in Datenbanken war ebenfalls noch keine Funktion zugeordnet. Hucep-10 (*Human cerebral Protein-10*) und FLJ 10579 sind (nahezu) identisch, ein dritter Datenbankeintrag zur gleichen cDNA-Sequenz (SRL3122) erfolgte erst kurz vor Beendigung dieser Arbeit. Dieser stammt aus einem Sequenzierungs- und bioinformatischen Projekt der Firma Genentech, die RAIP in einem *Screen* nach sezernierten und Transmembranproteinen beschrieben (Clark et al. 2003).

GI-Nummer	Name	Organismus	%Identität
38173978	„unknown protein“	Maus	98%
34856697	similar to FLJ 10579	Ratte	93%
13874434	Hucep-10, human cerebral protein	Mensch	85%
7022699	FLJ 10579 fis	Mensch	-"-
37182705	SRLG3122 (11/2003)	Mensch	-"-
14270766	putative TCPTP interacting Protein	Mensch	99% zu Hucep-10
16307164	CGI-90	Mensch	33% (Protein)
39584404	I-90	C.elegans	30% (Protein)

Tab. 4.2: Ergebnis der Sequenzierung und Datenbanksuche (BLAST) von RAIP*: Die isolierte cDNA entspricht einer bisher nicht näher charakterisierten Maus-cDNA, die Sequenzabweichungen ergeben sich durch Sequenzierungenauigkeiten. Die homologe menschliche cDNA ist mit mehreren Datenbankeinträgen vertreten (identische Sequenzen, verschiedene Bezeichnungen) und ebenfalls noch nicht mit einer Funktion verknüpft. Ein humanes Gen mit Homologie zu einer C. elegans cDNA, CGI-90, weist nur geringe Übereinstimmung mit RAIP in der C-terminalen Hälfte des Proteins auf, ebenso das C. elegans Protein I-90 selbst.*

Um humane RAIP-cDNA (hRAIP) zu erhalten, wurde aus cDNA der humanen HeLa-Zellen mittels PCR die Gesamtlängen cDNA von Hucep-10 (*human cerebral protein* 10) isoliert. RAIP kodiert für ein Protein von 470 Aminosäuren, das ein theoretisches Molekulargewicht von 52 kDa und einen pI von 5.02 besitzt.

Murines und humanes RAIP sind zu ca. 85% identisch, die Abweichungen zwischen den Proteinsequenzen sind nicht auf einen bestimmten Bereich konzentriert, sondern relativ gleichmäßig verteilt; es gibt also keinen Hinweis auf besonders konservierte Bereiche (Abb. 4.3). In anderen Organismen konnten ebenfalls Homologe cDNA-Sequenzen gefunden werden. Die Sequenz des Ratten-Homologs stimmt zu über 90% mit der Maussequenz überein. Die geringe Homologie (ca. 30% im Überlappungsbereich) zu einem *Caenorhabditis elegans* Protein, I-90, beschränkt sich auf die C-terminale Hälfte von RAIP, außerdem existiert eine weiteres humanes Protein, CGI-90, mit stärkerer Übereinstimmung zur *Caenorhabditis elegans* Sequenz, wie das Alignment in Abb. 4.4 verdeutlicht. RAIP scheint also nicht das direkte menschliche Homolog von *Caenorhabditis elegans* I-90 zu sein. In anderen wichtigen Modellorganismen (z.B. Drosophila oder Hefe) konnten keine homologen Sequenzen gefunden werden.

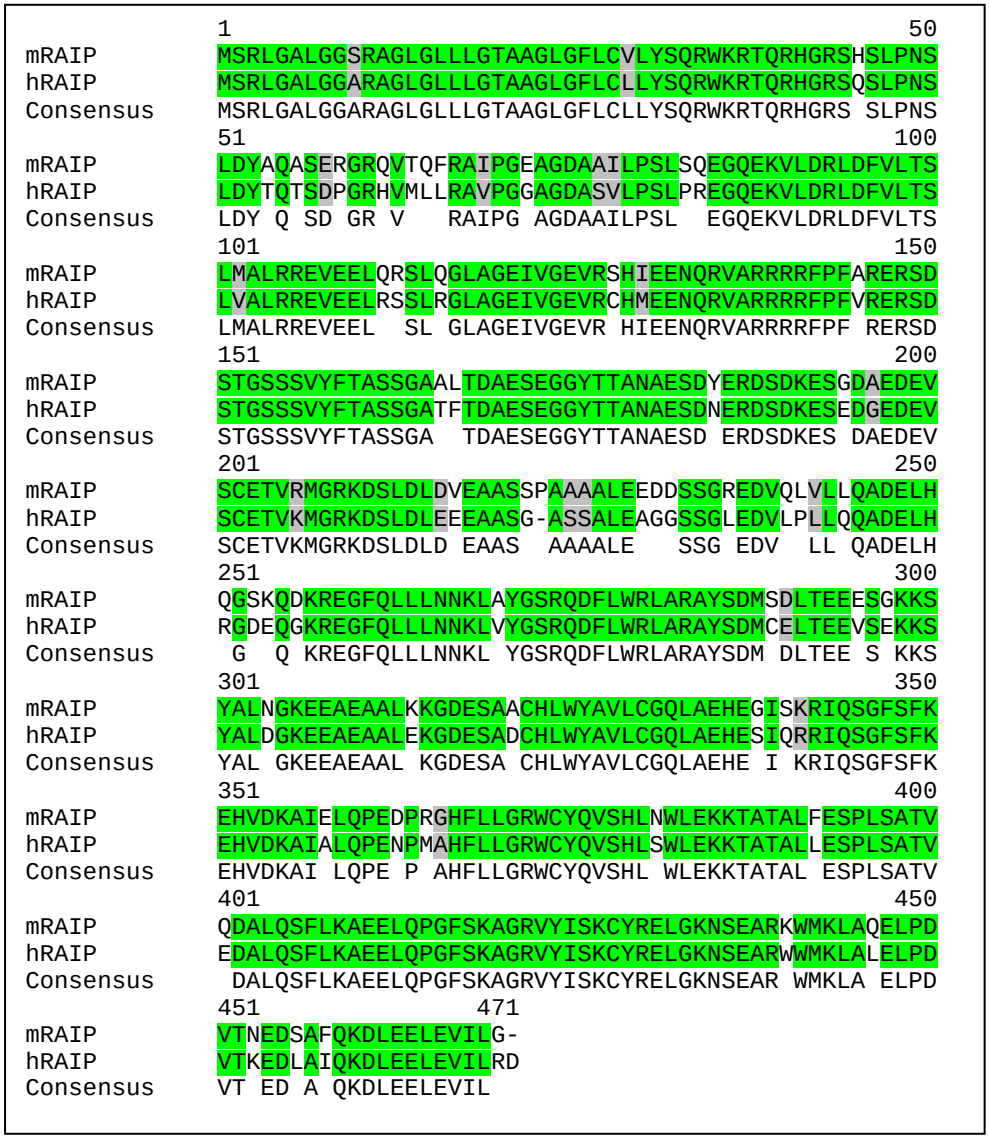


Abb. 4.3 Sequenzabgleich von murinem RAIP (mRAIP, GI: 3817397) und humanem RAIP (hRAIP, GI: 34856697): *identische Aminosäurereste sind grün, ähnliche Aminosäuren grau unterlegt. (Alignment mit dem Vector-NTI Programm)*

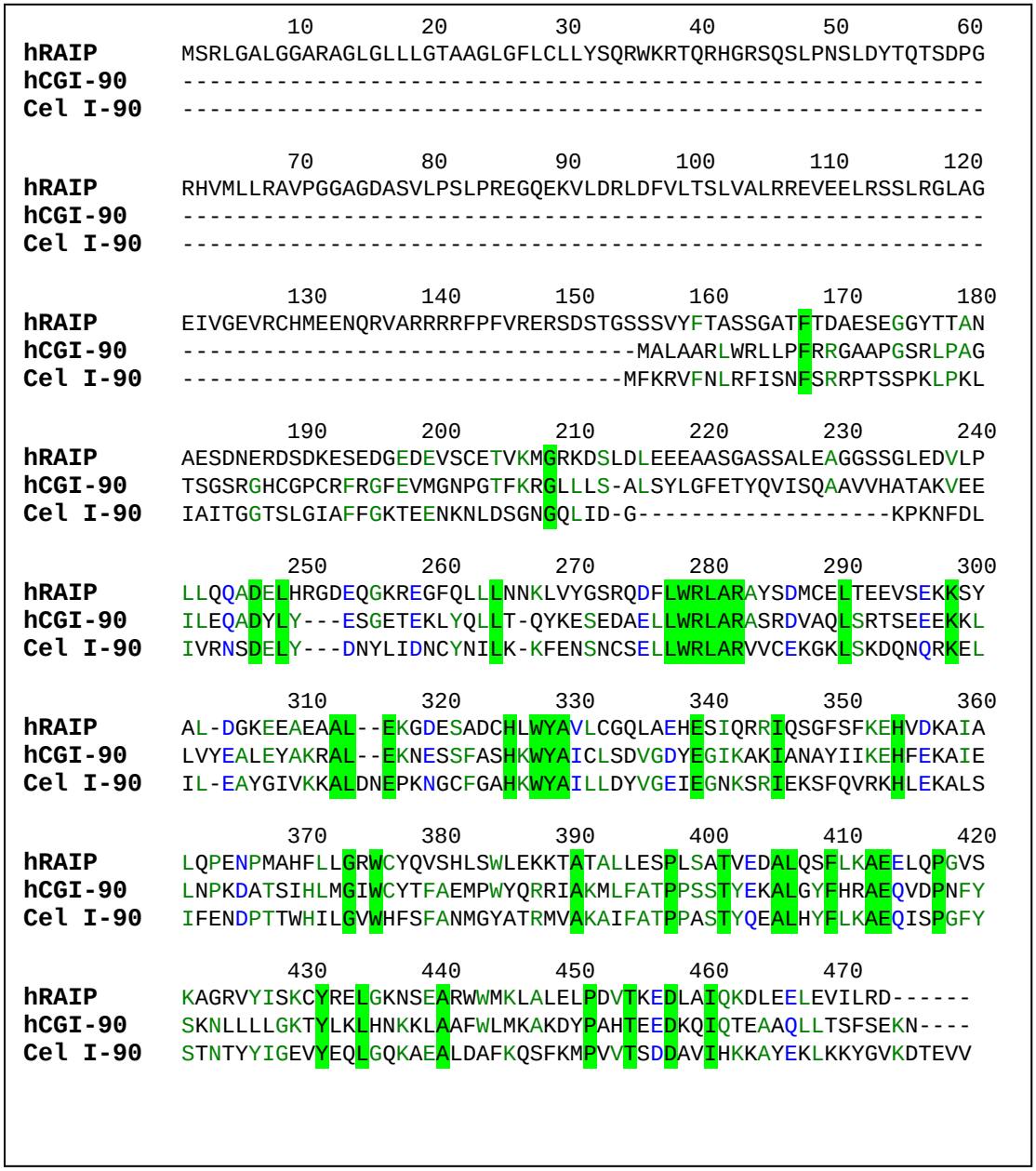


Abb. 4.4 Vergleich der Proteinsequenzen von humanem RAIP, humanem CGI-90 und *Caenorhabditis elegans* I-90: *nur in der c-terminalen Hälfte von RAIP besteht ca. 30% Identität (grün unterelegt), sowie einige ähnliche Aminosäuren zwischen den Sequenzen (blaue Schrift). Übereinstimmende Aminosäuren in 2 von 3 Sequenzen sind in grüner Schrift dargestellt. Das Alignment wurde mit dem MultAlign Werkzeug bei PBIL (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl) ausgeführt.*

4.3.1.2 Untersuchung der RAIP-Proteinsequenz

Um Hinweise über eine mögliche Funktion von RAIP zu erhalten, wurde in Datenbanken nach bekannten funktionellen Domänen, Lokalisations-Signalen und Strukturvorhersagen gesucht. Nach Vorhersageprogrammen im Internet besitzt RAIP ein N-terminales Signalpeptid (Position 1-32) mit einer potenziellen Schnittstelle (Position 32/33) (SignalIP); eine N-terminale Transmembrandomäne (Position 13-35) (DAS/SMART), sowie einen weiteren hydrophoben Bereich (Position 91-115) (DAS/SMART) (siehe Abb. 4.5).

An drei Positionen (92-95; 195-198; 211-214) besitzt die RAIP-Proteinsequenz das Motiv „DXXD“, das mögliche Caspase-Schnittstellen darstellen könnte. An Position 211-215 entspricht die Sequenz exakt der beschriebenen Caspase-3 Schnittstelle des *nuclear mitotic aparatus protein* (NuMA), DSLD(L) (Nicholson und Thornberry 1997); (Hsu und Yeh 1996). Es erschien daher möglich, dass RAIP von aktivierten Caspasen geschnitten werden kann (siehe Abschnitt 4.3.3).

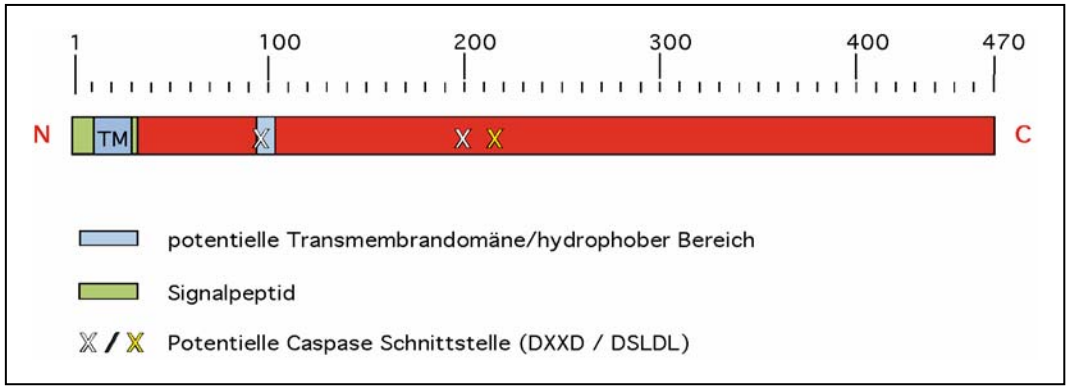


Abb. 4.5 Modell von RAIP nach Sequenzanalysen: *N-terminal befindet sich ein Signalpeptid und eine Transmembrandomäne (TM), ein weiterer hydrophober Bereich erstreckt sich von Aminosäure 95 bis 101. An 3 Stellen (92-95; 195-198; 211-214) befinden sich DXXD Motive, die potenzielle Caspase Schnittstellen sind. Das Sequenzmotiv DSLD(L) an Position 211-215 entspricht der Caspase-3 Schnittstelle des „nuclear mitotic aparatus protein“ (NuMA) (Hsu und Yeh 1996).*

4.3.2 RAIP induziert Apoptose in 293T und HeLa-Zellen

RAIP wurde im *Screen* nach dominant Apoptose induzierenden Genen in 293T-Zellen als effizienter und schneller Apoptoseinducer isoliert. Die Transfektion von RAIP in

293T-Zellen führte nach 16-24 Stunden zu deutlichen morphologischen und biochemischen Veränderungen. So ist die Bildung von apoptotischen Körperchen charakteristisch ebenso wie eine internukleosomale DNA-Fragmentierung, die nach Gelelektrophorese als apoptotische DNA-Leiter sichtbar wird (Abb. 4.6). Um sicherzustellen, dass das Translationsprodukt der RAIP-cDNA und nicht das DNA-Molekül selbst Ursache für die apoptotischen Veränderungen sind, wurde ein RAIP-cDNA-Konstrukt ohne START-codon in HeLa-Zellen transfiziert. Die apoptotische Degradierung der genomischen DNA wurde 24 Stunden nach Transfektion im Durchflußzytometer (FACS) gemessen. Das RAIP-Konstrukt ohne Startcodon führte zu keinen apoptotischen Veränderungen der Zellen und zu keiner DNA-Fragmentierung (Abb. 4.6 F).

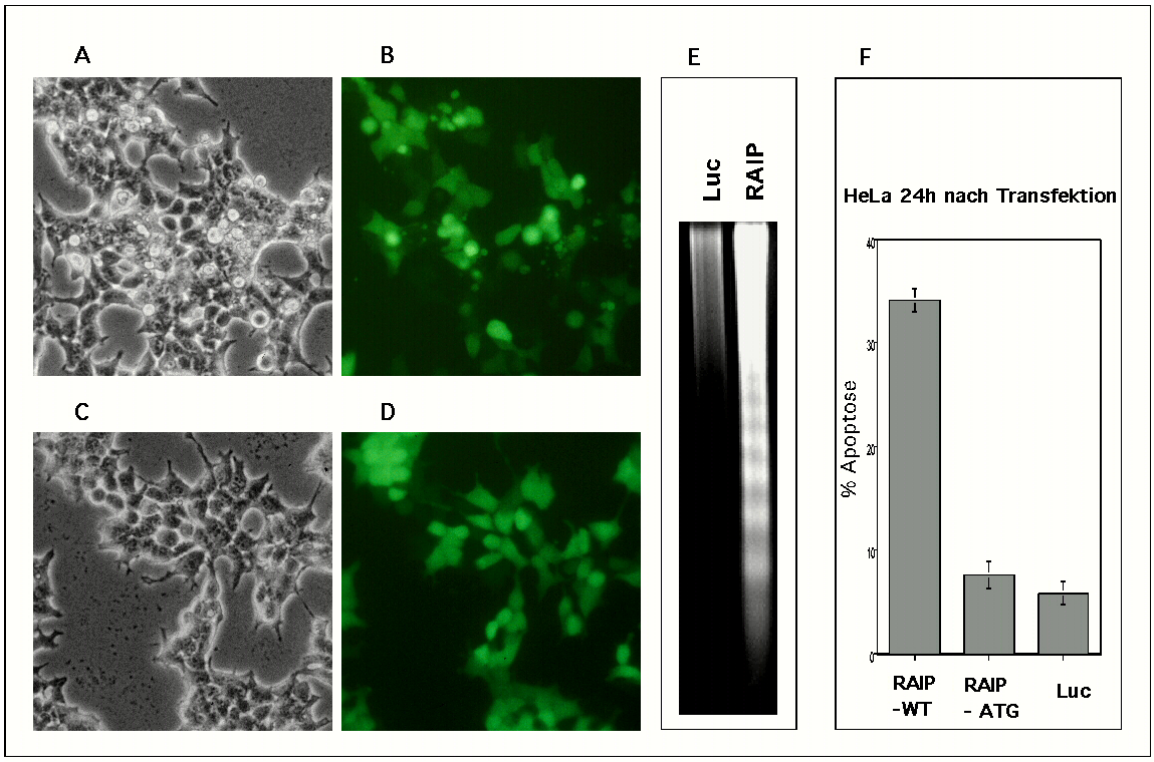


Abb. 4.6 RAIP induziert apoptotische Veränderungen in 293T und HeLa-Zellen: *20 Stunden nach Transfektion mit RAIP und GFP zeigen 293T-Zellen typisch apoptotische Veränderungen: die Zellen runden sich ab und schnüren apoptotische Körperchen ab. Phasenkontrast (A), GFP-Fluoreszenz (B); Luciferase und GFP kontroll-transfizierte Zellen zeigen diese Veränderungen nicht (C und D). Die chromosomale DNA von RAIP-transfizierten 293T-Zellen ist zu oligonukleosomalen Fragmenten degradiert (DNA-Leiter) (E). Die Transfektion einer RAIP-Mutante ohne Startcodon (RAIP – ATG) induziert keine Apoptose in HeLa-Zellen (F).*

4.3.2.1 RAIP induzierte Apoptose ist caspasenabhängig

Ein wichtiger Schritt in der apoptotischen Signalkette ist die Aktivierung der Caspasekaskade, die schließlich zur Aktivierung der Effektorcaspasen und zur Prozessierung der Caspasensubstrate führt.

Um die Aktivierung der Effektorcaspase-3 nach Transfektion mit RAIP zu untersuchen, wurden HeLa sowie 293T-Zellen mit RAIP transfiziert, nach 16 Stunden geerntet und lysiert. Zytosolische Caspase-3 wurde an immobilisierte Caspase-3 Antikörper in ELISA-Platten gebunden und die Aktivität über den Umsatz eines Caspase-3-Substrates fluorometrisch bestimmt (Abb. 4.7). In HeLa-Zellen erhöhte sich die Caspase-3 Aktivität gegenüber Luciferase kontrolltransfizierten Zellen um den Faktor 13, in 293T-Zellen sogar um den Faktor 100. In beiden Zelllinien war die gemessene Caspase-3 Aktivierung stärker als durch ANT-1, das als effizientes Apoptose-induzierendes Gen bekannt ist (Bauer et al. 1999).

Desweiteren sollte untersucht werden, ob die Aktivierung von Caspasen für die RAIP-induzierte Apoptose notwendig ist. Das chemisch modifizierte Tripeptid zVAD-fmk kann effizient die Aktivität aller Caspasen hemmen und so die Caspase-vermittelte Apoptose inhibieren. Um die Caspase-Abhängigkeit der RAIP-vermittelten Apoptose zu untersuchen, wurden 293T und HeLa-Zellen 5 Stunden nach RAIP-Transfektion mit 50µM zVAD-fmk behandelt und die apoptotische DNA-Fragmentierung weitere 17 Stunden später im Durchflußzytometer (FACS) gemessen (Abb. 4.7). Die deutliche Abnahme des Anteils apoptotischer Zellen in Anwesenheit von zVAD-fmk belegt die Notwendigkeit aktiver Caspasen für die RAIP-induzierte Apoptose.

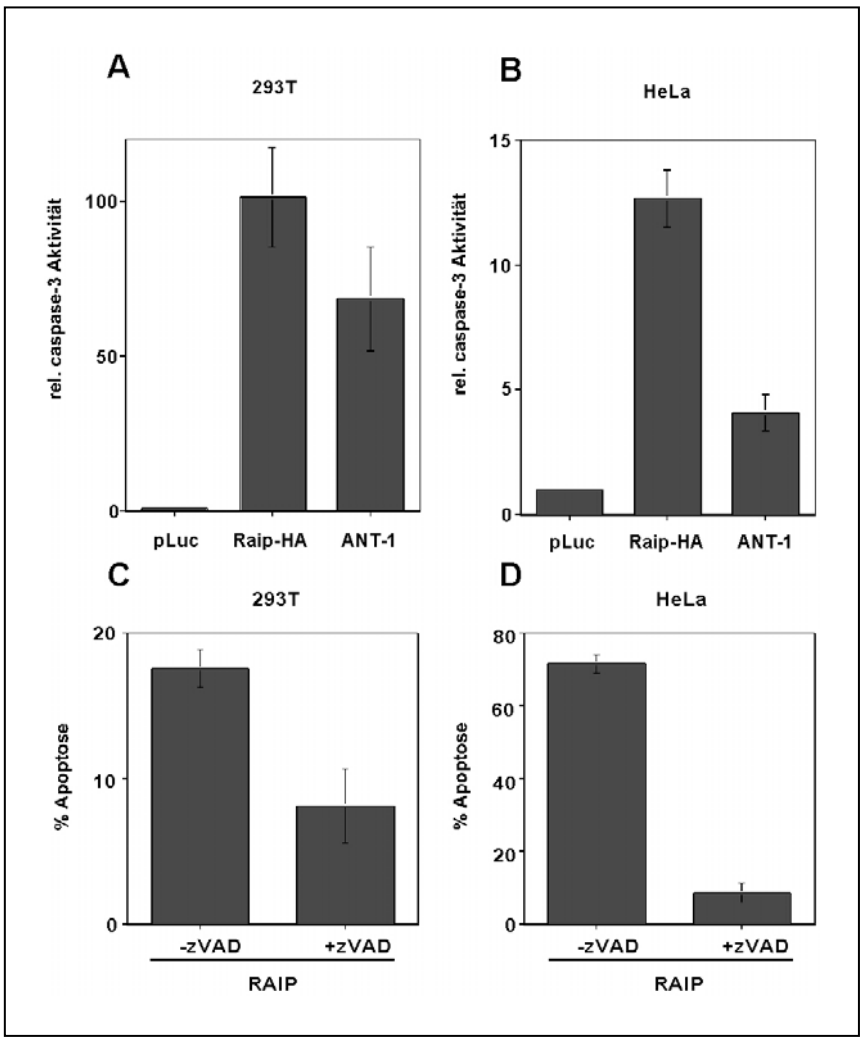


Abb. 4.7 RAIP-induzierte Apoptose benötigt aktivierte Caspasen: *16 Stunden nach Transfektion mit RAIP ist die Caspase-3 Aktivität in HeLa-Zellen ca. 13fach erhöht (A), in 293T-Zellen 100fach (B). Die Caspase-3 Aktivierung durch ANT-1 ist in beiden Zelllinien geringer (A und B). RAIP-transfizierte 293T und HeLa-Zellen wurden 5 Stunden nach Transfektion mit zVAD-fmk (50µM) behandelt und nach weiteren 17 Stunden die DNA-Framentierung mit FACS gemessen. In Anwesenheit des Caspaseinhibitors zVAD-fmk wird der Anteil von apoptotischen Zellen mit DNA-Fragmentierung in beiden Zelllinien deutlich verringert (C und D).*

4.3.2.2 Antiapoptotische Bcl-2 Proteine inhibieren RAIP-vermittelte Apoptose

Antiapoptotische Bcl-2 Proteine inhibieren apoptotische Vorgänge an den Mitochondrien (wie z.B. die Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien) (Wang 2001) sowie am ER (z.B. Ca^{2+}-Freisetzung) (Zong et al. 2003) und kontrollieren so die Aktivierung von Initiatorcaspasen. Die Cotransfektion mit Bcl-2 und Bcl-X_L sollte Hinweise liefern, ob die Inhibiton dieser frühen Ereignisse in der apoptotischen Signalkaskade die RAIP-induzierte Apoptose inhibieren kann.

Durch die Verwendung von ER- und Mitochondrien-dirigierten Bcl-2 Varianten (Bcl-2/ER und Bcl-2/MT, (Rudner et al. 2001; Zhu et al. 1996) sollte untersucht werden, ob die inhibitorischen Effekte auf eines der beiden Kompartimente begrenzt ist.
Bcl-2/ER, Bcl-2/MT und Bcl- X_L inhibierten sehr effizient die RAIP induzierte Apoptose in HeLa-Zellen, wenn sie im Verhältnis 1:3 eingesetzt wurden, und zwar unabhängig von ihrer Lokalisation (Abb. 4.8)

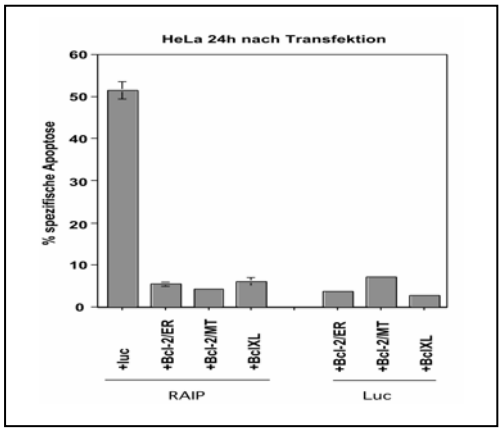


Abb. 4.8 Cotransfektion von RAIP mit Bcl-2 Konstrukten und Bcl-X_L: *ER-dirigiertes (Bcl-2/ER), mitochondriales Bcl-2 (Bcl-2/MT) sowie Bcl-X_L hemmen sehr effizient die RAIP induzierte Apoptose.*

4.3.2.3 Spike ΔN19 wirkt nicht dominant negativ auf RAIP-vermittelte Apoptose

Spike (*small protein with inherent killing effect*), ein dominant Apoptose induzierendes Protein, das in unserem Labor isoliert und charakterisiert wurde (Mund et al. 2003), lokalisiert am Endoplasmatischen Retikulum (ER) und interagiert unter anderem mit dem ER-Marker-Protein Bap31. Spike ΔN19, eine Spike-Mutante, bei der die 19 N-terminalen Aminosäuren deletiert wurden, induzierte keine Apoptose und verhinderte sogar die Apoptoseinduktion durch Wildtyp Spike (Mund et al. 2003). Spike ΔN19 inhibiert auch die Apoptoseinduktion durch das ER-lokalisierte Apoptose-induzierende Protein Saip (*small apoptosis inducing protein*) (Albayrak 2001). Da auch RAIP am ER lokalisiert (siehe Abb. 4.13), sollte durch gleichzeitige Transfektion von RAIP und Spike ΔN19 untersucht werden, ob Spike ΔN19 gegenüber RAIP-vermittelter Apoptose dominant negativ wirkt. Die Cotransfektion von Spike ΔN19 hatte keinen signifikanten

Einfluss auf die Apoptoseinduktion durch RAIP (Abb. 4.9), und ergibt somit keinen Hinweis auf eine funktionelle Interaktion zwischen RAIP, Spike und Bap31.

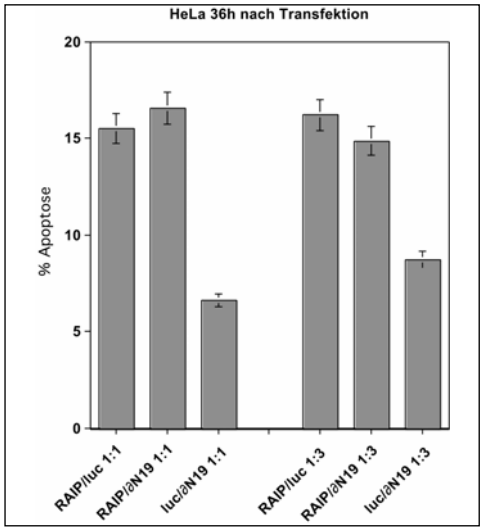


Abb. 4.9 Cotransfektion von SPIKE ΔN19: *Die Cotransfektion von SPIKE ΔN19 im Verhältnis 1:1 und 1:3 mit RAIP führt zu keiner signifikanten Abnahme der RAIP-induzierten Apoptose.*

4.3.3 Untersuchung einer Caspase-3 Schnittstelle in RAIP

Caspaseschnittstellen sind in ihrer Sequenz sehr wenig konserviert. Bisher sind mehr als 280 verschiedene Caspasesubstrate mit ihren Caspaseschnittstellen beschrieben (Fischer et al. 2003). Ein gemeinsames Merkmal vieler Caspaseschnittstellen ist das Sequenzmotiv DXXD, wobei nur das zweite Aspartat für alle Caspaseschnittstellen essentiell ist. An drei Stellen der RAIP-Proteinsequenz ist das Motiv DXXD zu finden (Positionen 92-95; 195-198; 211-214), eine der Stellen entspricht dabei exakt der bereits beschriebenen Caspase-3 Schnittstelle des NuMA (*nuclear mitotic antigen)*, DSLD(L) (Hsu und Yeh 1996; Nicholson und Thornberry 1997; Stroh und Schulze-Osthoff 1998) (siehe auch Abb. 4.5, Seite 67).

Nach diesen Hinweisen sollte untersucht werden, ob RAIP in Anwesenheit von rekombinanter, aktiver Caspase-3 geschnitten werden kann. Dazu wurde eine RAIP-Mutante (RAIPmut) kloniert, bei der DSLDL zu DSLAL mutiert wurde (Mutation D214A), um diese potenzielle Caspase-Schnittstelle (funktionell) zu deletieren. Als

Kontrolle für die Aktivität der rekombinanten Caspase-3 wurde das bekannte Caspase-3-Substrat ICAD (Fischer et al. 2003) als HA-Fusionskonstrukt kloniert.

293T-Zellen wurden mit (N-terminalen) HA-Konstrukten von RAIP (RAIPwt-HA), RAIPmut und ICAD transfiziert, nach 16 Stunden geerntet und lysiert. Die Lysate wurden mit rekombinanter Caspase-3 versetzt und die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und Erhitzen unterbrochen. Vorversuche (nicht gezeigt) ergaben, dass RAIP und ICAD in Abwesenheit von rekombinanter Caspase auch nach mehreren Stunden Inkubation nicht abgebaut wurden. Ebenso wurde deutlich, dass ICAD in 293T-Zellen nur schwach überexprimiert wird.

Die detektierten Proteinmengen von RAIP, aber auch RAIPmut waren nach 120 Minuten deutlich reduziert, allerdings konnten keine Abbaubanden detektiert werden. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis, dass RAIP Caspase-3 Schnittstellen oder Schnittstellen für andere Caspasen besitzt. An welcher Stelle die Prozessierung stattfand, konnte in diesem Versuch nicht geklärt werden, da auch RAIPmut (D214A) in Anwesenheit der aktiven Caspase-3 abgebaut wurde.

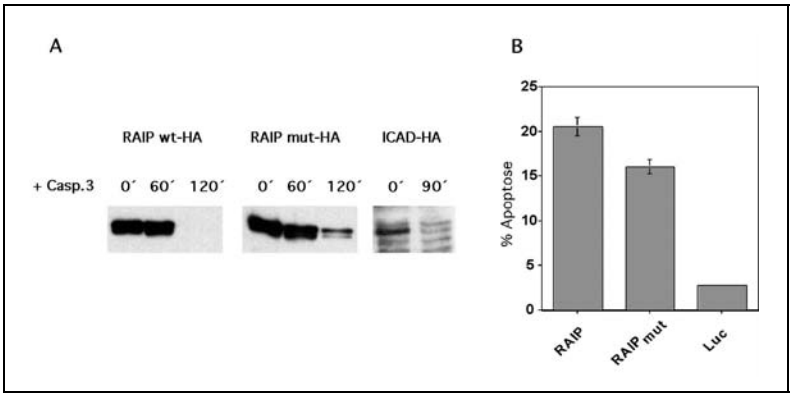


Abb. 4.10 Prozessierung von RAIP und ICAD durch rekombinante Caspase-3: *RAIP-wt und RAIP-mut werden in Anwesenheit von rekombinanter Caspase-3 nach 120 Minuten abgebaut, ICAD bereits nach 90 Minuten.*

In weiteren Versuchen zeigte sich, dass RAIPmut weiterhin in der Lage war, in HeLa-Zellen Apoptose zu induzieren (Abb. 4.10 B). Die Transfektion eines RAIPmut–YFP Fusionskonstruktes zeigte eine gleiche zelluläre Verteilung wie Wildtyp RAIP (Daten nicht gezeigt).

4.3.4 Herstellung von RAIP- spezifischem Antiserum

Für weitere biochemische Untersuchungen an RAIP sollte ein RAIP-Antiserum in Hasen hergestellt werden, wobei die Synthese der Peptidantigene, die Immunisierung der Hasen und die Gewinnung des Serums von der Firma EUROGENTEC durchgeführt wurden. Die Peptide, die zur Immunisierung verwendet wurden, waren so gewählt, dass eines im N-terminalen Bereich direkt nach der vorhergesagten Transmembrandomäne lag, das Zweite im C-terminalen Bereich von RAIP.
EUROGENTEC lieferte Präimmunserum und Serum, das vier Wochen nach der vierten Immunisierung gewonnen wurde.
Im Western Blot von Lysaten aus RAIP-transfizierten HeLa-Zellen wurde getestet, ob das erhaltene Serum in der Lage ist, denaturiertes RAIP zu binden. Das berechnete theoretische Molekulargewicht von RAIP liegt bei etwa 52 kD, eine deutliche Bande über 50 kD und mehrere Banden unter 50 kD wurden durch das anti-RAIP-Serum detektiert, das Präimmunserum reagierte nicht mit Proteinen auf dem Blot (Abb. 4.11 A). Die Bande über 50 kD ist demnach die spezifische RAIP-Bande, die weiteren könnten Abbauprodukte von RAIP oder unspezifische Antikörperbindungen darstellen.
Die Detektion von endogenem RAIP wurde durch dessen geringe Expression in Zellen erschwert. Im Westernblot von Lysaten aus acht verschiedenen Zelllinien (L929, PC3, Rat-1, Nih3T3, 293T, HeLa, BHK und MCF7) konnte kein RAIP-Signal bei ca. 52 kD detektiert werden (Abb. 4.11 C). Allerdings konnten Proteinbanden deutlich über 50 kD in einigen Zelllinien in dem gezeitgten Blot und in einigen weiteren Western-Blots (nicht gezeigt) detektiert werden. Diese Banden, die nicht immer reproduzierbar waren, könnten von posttranskriptionell modifiziertem RAIP stammen. Nach Optimierung einer Zell-Lysemethode (RIPA-Lyse) konnte in HeLa-Zellen eine sehr schwache endogene RAIP-Bande gefunden werden, dazu mußte allerdings eine große Menge Zell-Lysat (150µg) aufgetragen werden. In 150µg Lysat aus untransfizierten HeLa-Zellen wurde deutlich weniger RAIP gefunden als in 1µg Lysat RAIP-transfizierter HeLa-Zellen (Abb. 4.11 B).

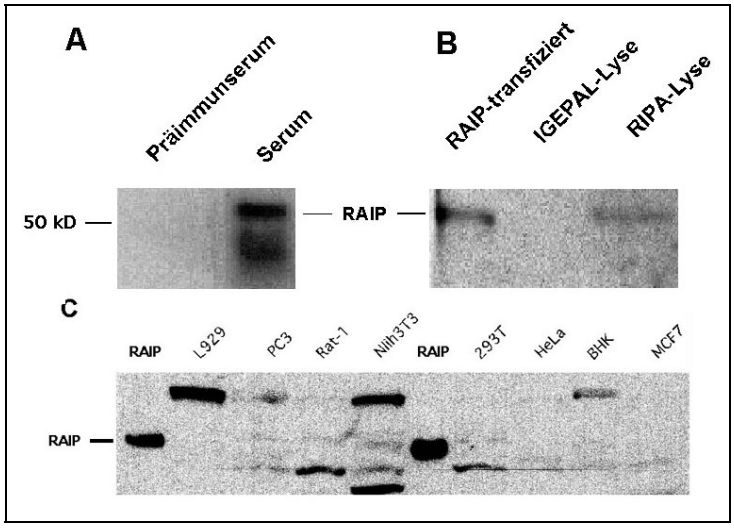


Abb. 4.11 RAIP-Serum bindet spezifisch RAIP: *je 5µg Gesamtproteinextrakt aus RAIP-transfizierten HeLa-Zellen wurden (über Nacht) mit Präimmunserum bzw. Serum 1:750 und anschliessend mit AP-gekoppeltem Sekundärantikörper (anti-Hase 1:2000) inkubiert. Mit dem Serum wurde eine Bande bei >50kD deutlich sichtbar (A). Detektion von endogenem RAIP (B): Western-Blot von 1µg Gesamtproteinextrakt von RAIP-transfizierten HeLa-Zellen bzw. 150µg Gesamtproteinextrakt aus untransfizierten HeLa-Zellen mit anti-RAIP-Serum. Geringste Mengen an überexprimiertem RAIP ließen sich nachweisen (linke Spur), endogenes RAIP ist nur sehr schwach nach RIPA-Lyse detektierbar (rechte Spur). Western-Blot mit RAIP-Serum in 8 Zelllinien (C): Aus 8 verschiedenen Zelllinien wurden Gesamtzell-Lysate gewonnen. Je 100µg Protein wurde pro Spur im denaturierenden SDS-Gel getrennt. In zwei Spuren wurde 2µg Lysat von RAIP-transfizierten HeLa-Zellen als Kontrolle aufgetragen (RAIP). Mit RAIP-Serum konnte in keiner Zelllinie endogenes RAIP detektiert werden***.***

4.3.5 Die zelluläre Lokalisation von RAIP

Die Lokalisation von überexprimiertem RAIP in verschiedenen Zelllinien (HeLa, 293T und MCF7) sollte mit Hilfe von HA- und YFP-RAIP-Fusionsproteinen gezeigt werden (siehe Abschnitte 4.3.5.1, 4.3.5.2 und 4.3.6), sowie mit RAIP-Antiserum die Lokalisation von endogenem RAIP in MCF7-Zellen (siehe Abschnitt 4.3.5.3).

4.3.5.1 Lokalisation von RAIP-YFP in HeLa-Zellen

Mit Hilfe eines RAIP-Konstruktes mit C-terminaler YFP-Fusion (*yellow fluorescence protein*, RAIP-YFP) sollte die Verteilung von überexprimiertem RAIP innerhalb der Zelle direkt sichtbar machen. HeLa-Zellen wurden mit RAIP-YFP transfiziert, nach 20 Stunden fixiert, das ER mit dem ER-Fluoreszenzmarker Concanavalin A (ConA), die

Zellkerne mit DNA-interkalierenden DAPI angefärbt und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert. In untransfizierten Zellen zeigte die rote Fluoreszenz von ConA die typische perinukleäre Lage des ER (Abb. 4.12). RAIP-YFP transfizierte Zellen zeigten die deutliche Überlagerung der ER-spezifischen ConA-Fluoreszenz mit der RAIP-YFP-Fluoreszenz (Abb. 4.13). Auffällig war die morphologische Veränderung des ER, das eine Vesikelbildung zeigte (Ausschnittsvergrößerung Abb. 4.13 E).

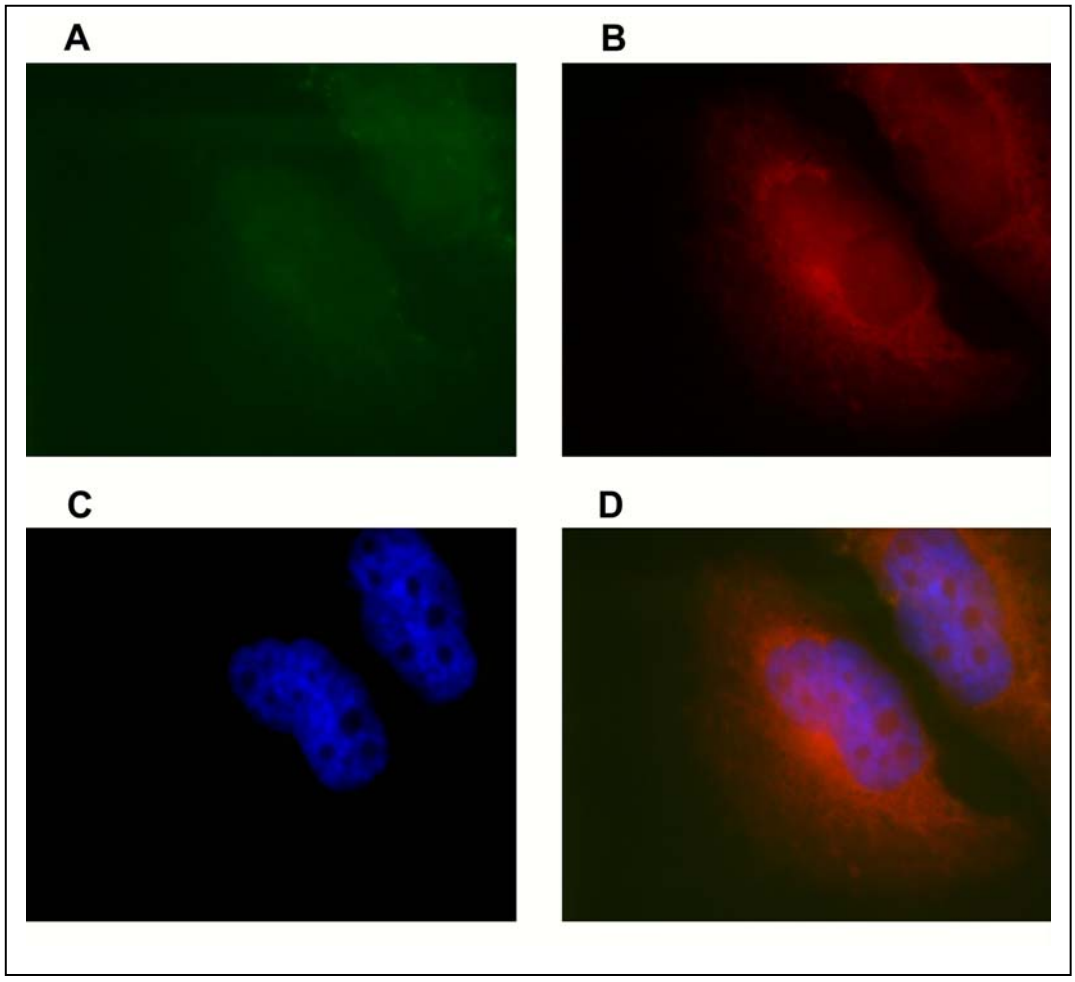


Abb. 4.12 ER-Färbung mit ConA in untransfizierten HeLa-Zellen: *Eigenfluoreszenz (A), ER-Färbung mit ConA (B), Kernfärbung mit DAPI (C), überlagerte Fluoreszenzen (D). Die ConA-Fluoreszenz zeigt die typische perinukleäre Lokalisation des ER.*

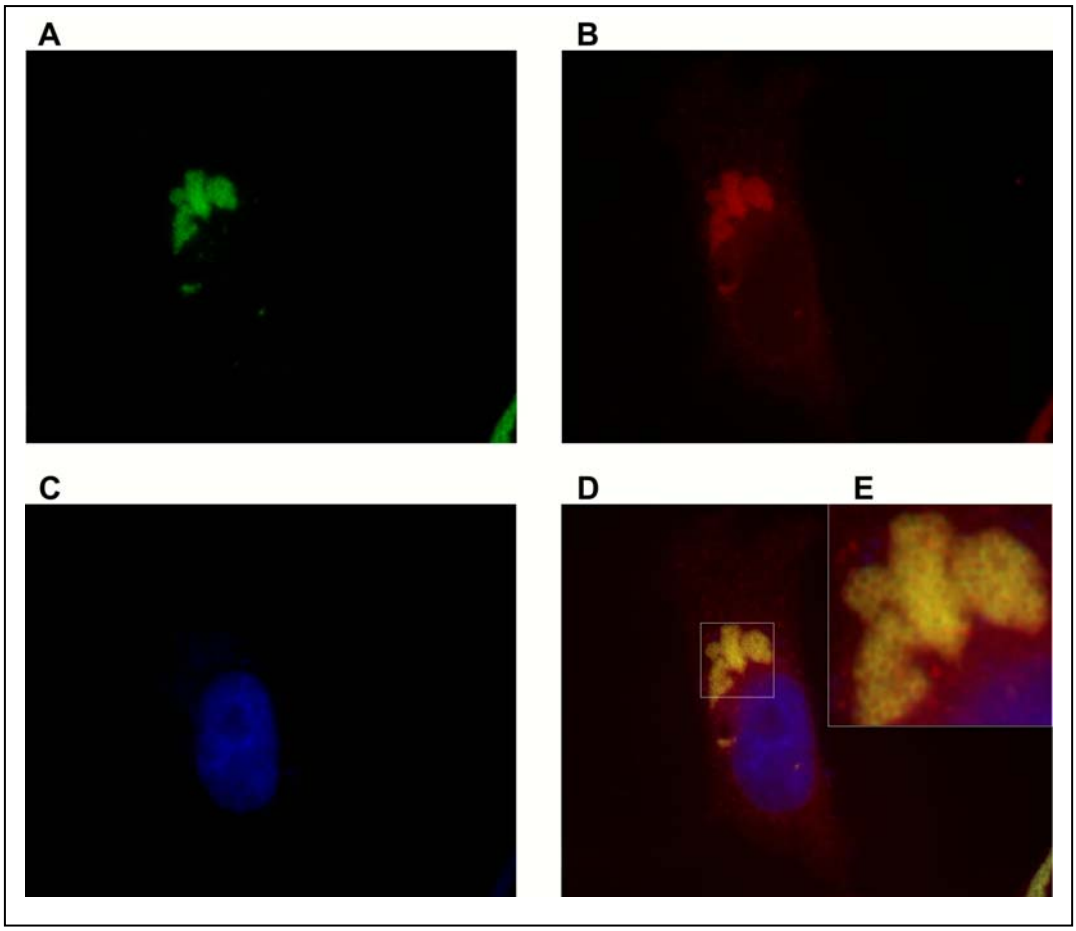


Abb. 4.13 Lokalisation von RAIP-YFP in HeLa-Zellen*: YFP-Fluoreszenz (A), ER-Färbung mit ConA (B), Kernfärbung mit DAPI (C) und überlagerte Fluoreszenzen (D), Ausschnittsvergrößerung (E). Die identische Verteilung der ConA- und YFP-Fluoreszenzen zeigt deutlich die ER-Lokalisation von RAIP-YFP. Die Morphologie des ER ist in Vergleich zu untransfizierten Zellen (siehe Abb. 4.12) deutlich verändert, es bilden sich Vesikel, in deren Membran RAIP-YFP lokalisiert (Ausschnittsvergrößerung E).*

4.3.5.2 Immunfluoreszenz gegen RAIP –HA

Um auszuschließen, dass die Veränderungen des ER nach Überexpression von RAIP-YFP durch das angehängte YFP zustande kam, wurden HeLa-Zellen mit einem weiteren RAIP-Fusionsprotein, RAIP-HA, transfiziert und 20 Stunden nach Transfektion eine Immunfluoreszenz mit anti-HA Serum durchgeführt. Auch in diesem Versuch wurde das ER spezifisch mit ConA und der Kern mit DAPI angefärbt. Eine deutliche Überlagerung der Fluoreszenzen zeigte die Lokalisation von RAIP-HA im ER. Die Überexpression des HA-Konstruktes führte wie die des YFP-Konstruktes zu einer deutlichen Vesikelbildung der ER-Membran (Abb. 4.14), die morphologische

Veränderung des ER ist daher auf die Überexpression von RAIP zurückzuführen und nicht ein unspezifischer Effekt des angehängten Markerproteins.

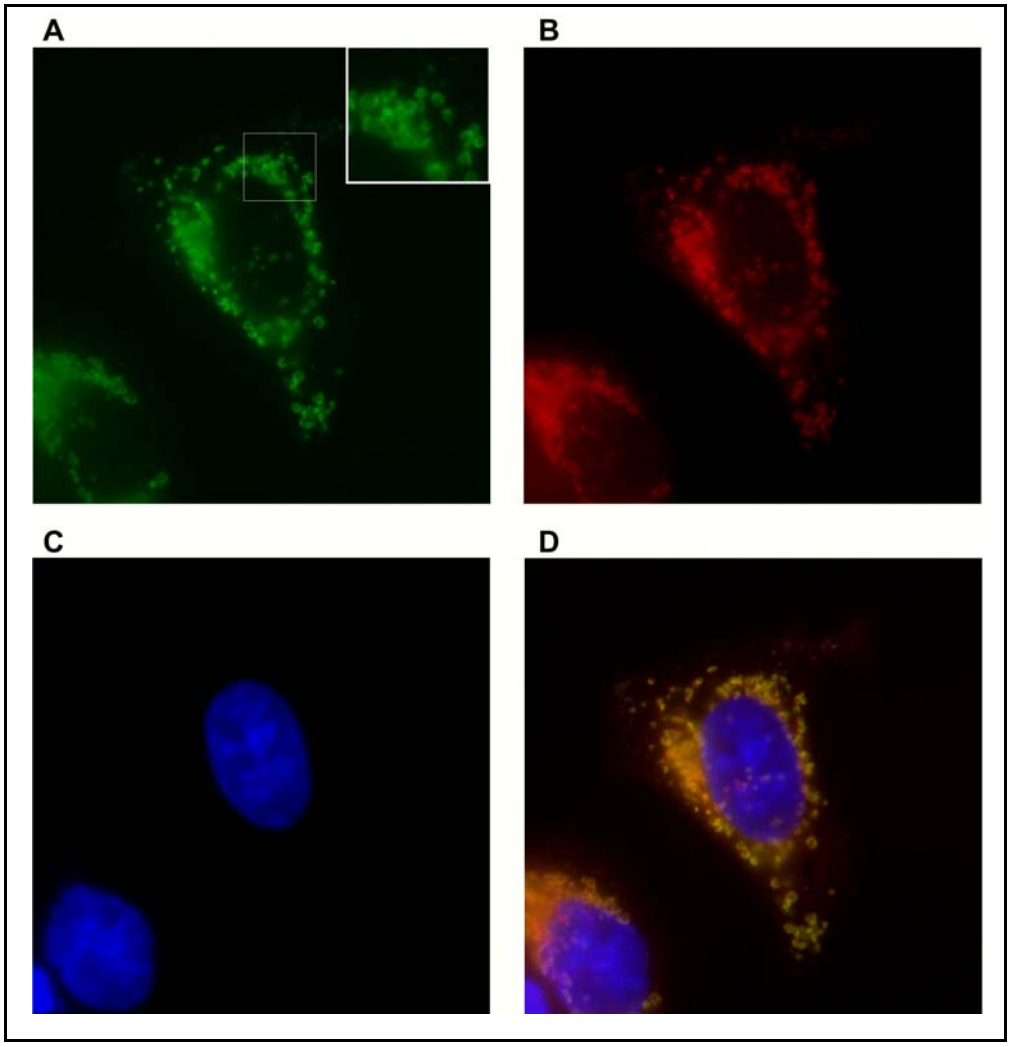


Abb. 4.14 HA-Immunfluoreszenz von RAIP-HA transfizierten HeLa-Zellen: *HA-Immunfluoreszenz mit Ausschnittsvergrößerung (A), ConA-Fluoreszenz (B), Kernfärbung mit DAPI (C), überlagerte Fluoreszenzen (D). Die HA-Immunfluoreszenz und die ConA-Fluoreszenz sind identisch lokalisiert, die Morphologie des ER ist gegenüber untransfizierten HeLa-Zellen stark verändert (vgl. Abb. 4.12)*

4.3.5.3 Lokalisation von endogenem RAIP

Nachdem die Überexpression von RAIP in HeLa-Zellen (wie auch in MCF-7 und 293T-Zellen, nicht gezeigt), deutlich eine Lokalisation im ER und eine Veränderung des ER zeigte, sollte untersucht werden, ob auch endogenes RAIP im ER lokalisiert. In Western-Blots wurde bereits gezeigt, dass die Expression von endogenem RAIP sehr

schwach ist (siehe Abb. 4.11). Auch die Immunfluoreszenz mit anti-RAIP-Serum gegen endogenes RAIP in MCF7-Zellen zeigte nur schwache Signale, die allerdings im Vergleich zu Signalen von Präimmunserum-behandelten Zellen stärker waren (Abb. 4.15). Als ER-Marker wurde in diesem Versuch anti-myc Antikörper gegen stabil in MCF7-Zellen überexprimiertes Bap31-myc verwendet.

Die Überlappung der Immunfluoreszenen gegen Bap31-myc und RAIP zeigte, dass endogenes RAIP im ER lokalisiert, wobei allerdings nicht ausgeschlossen werden konnte, dass RAIP auch in anderen Zellkompartimenten in geringeren Mengen lokalisiert.

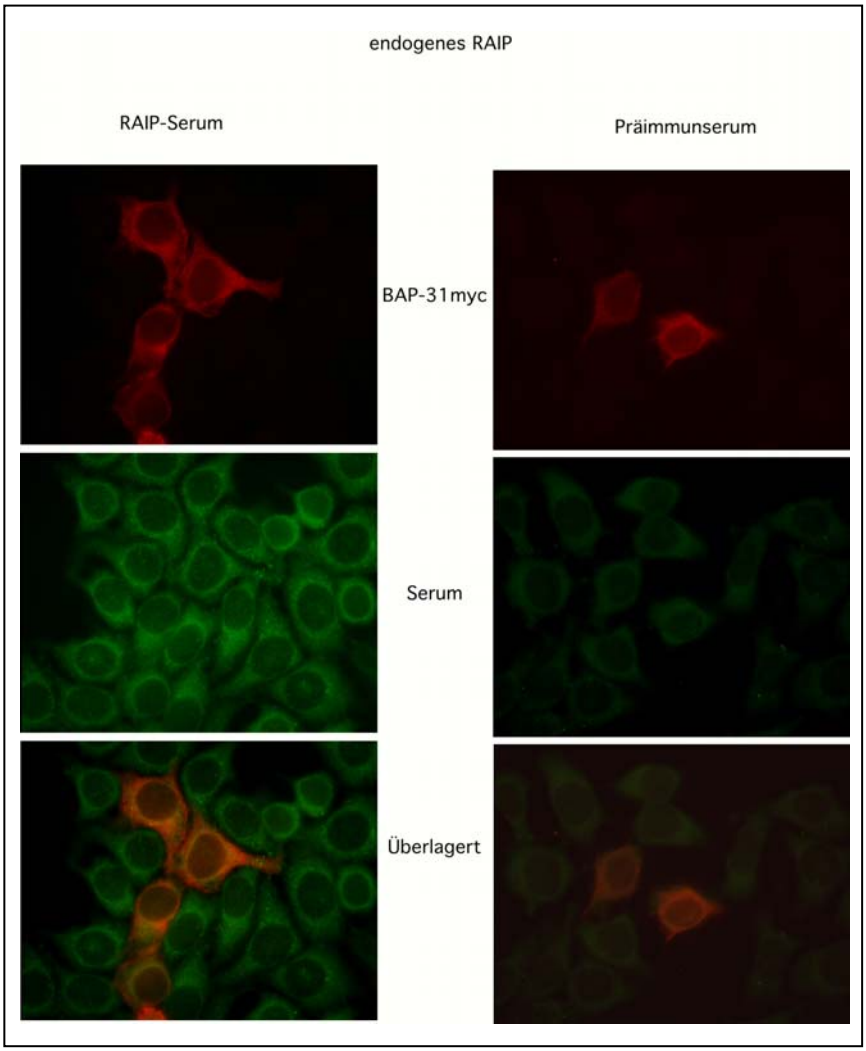


Abb. 4.15 Immunfluoreszenz von stabil Bap31myc exprimierenden MCF7-Zellen mit RAIP-Antiserum: *anti-myc Immunfluoreszenz gegen Bap31myc (rot) als ER-Marker (oben), anti-RAIP-Immunfluoreszenz (grün) mit RAIP-Serum (Mitte links) bzw. Präimmunserum (Mitte rechts), Überlagerung der Fluoreszenzen (unten) zeigt die Co-Lokalisation von RAIP und Bap31.*

4.3.6 Apoptoseinduktion und Lokalisation von RAIP-Deletionsmutanten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Überexpression von RAIP in verschiedenen Zelllinien (HeLa, 293T, MCF7) zu einer schnellen Apoptoseinduktion und zu Veränderungen in der Morphologie des ER führte, sollten mit Hilfe von RAIP-Deletionskonstrukten die apoptoseinduzierenden Domänen eingegrenzt und gleichzeitig die Lokalisation der Deletionskonstrukte beobachtet werden. Zu klären war insbesondere, ob die Lokalisation am ER bzw. die Veränderung der ER-Morphologie Bedingung für die Apoptoseinduktion durch RAIP waren.

Die Deletionen wurden gewählt wie in Abb. 4.16 gezeigt. Nur Gesamtlängen-RAIP (wt) und das N-terminale RAIP-Fragment (N) besaßen noch die N-terminale Transmembrandomäne und das Signalpeptid, alle übrigen Deletionen nicht. Eine unterschiedliche Lokalisierung der Deletionskonstrukte war demnach wahrscheinlich.

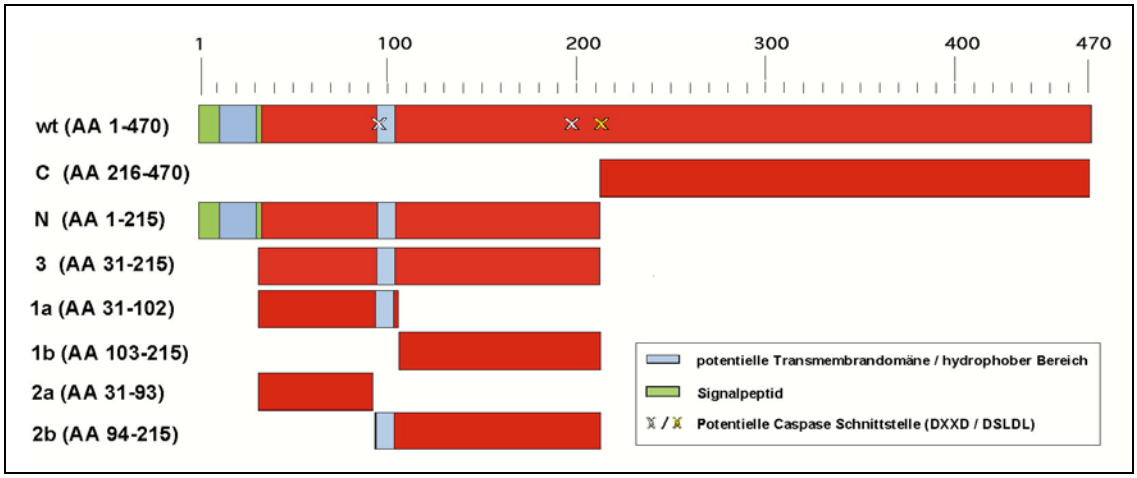


Abb. 4.16 Schema der Deletionsmutanten: *C- und N-terminale Fragmente, Konstrukt 3 entspricht dem N-terminalen Fragment ohne Transmembrandomäne und Signalpeptid, die Paare 1a/1b und 2a/2b sind Teilkonstrukte von 3.*

4.3.6.1 Lokalisation und Apoptoseinduktion von RAIP-Deletionen in HeLa-Zellen

YFP-Fusionskonstrukte der Deletionen wurden verwendet, um deren subzelluläre Lokalisation direkt zu zeigen. 24 Stunden nach Transfektion wurden die HeLa-Zellen geerntet, ein Teil für die Bestimmung der Apotoserate im Durchflusszytometer

verwendet, der Rest für den Expressionsnachweis im Western-Blot (Abb. 4.17). Vier der Deletionskonstrukte induzierten deutlich, aber unterschiedlich stark Apoptose: N, 3, 1a, 2a.

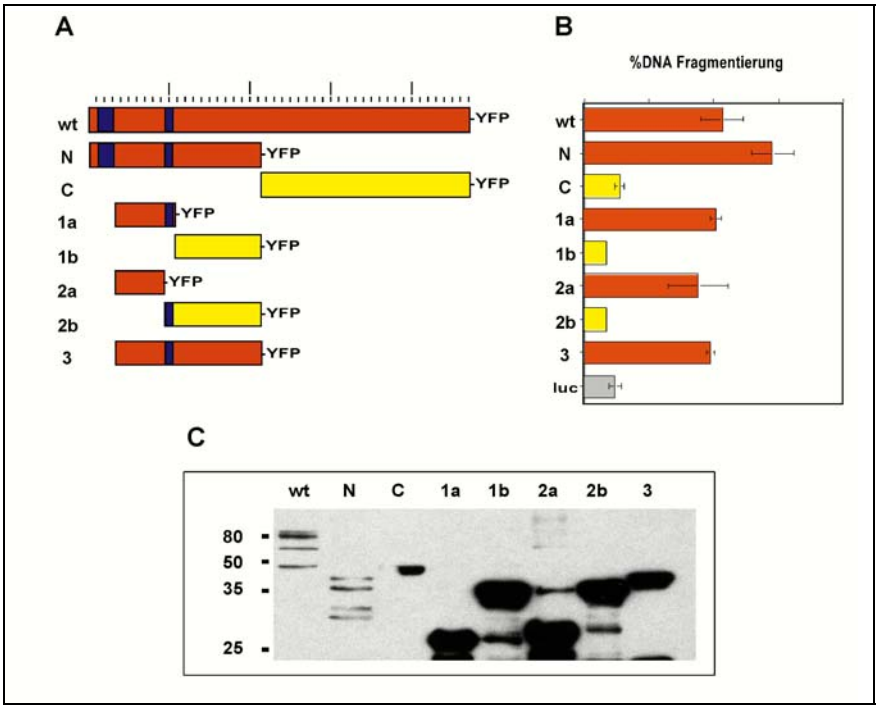


Abb. 4.17 RAIP Deletionskonstrukte (YFP) in HeLa-Zellen. Apoptoseinduktion und Expressionsnachweis: Mit den Deletionskonstrukten (Grafik A) wurden HeLa-Zellen transfiziert und nach 24 Stunden geerntet. Ein Teil der Zellen wurden für die Messung der apoptotischen DNA-Fragmentierung (B) verwendet, der Rest für den Western-Blot (C) lysiert. RAIP wt und die Deletionen N, 1a, 2a und 3 induzierten deutlich Apotose, die Deletionen C, 1b und 2b nicht. Alle Konstrukte wurden exprimiert.

Vor der Weiterbehandlung der Zellen für FACS und Western-Blot wurde die subzelluläre Verteilung der Deletionskonstrukte über deren YFP-Fluoreszenz im Zellkulturmikroskop fotografiert (Abb. 4.18). Das N-terminale Fragment von RAIP (N) zeigte die gleiche perinukleäre Verteilung wie Wildtyp-RAIP (wt) (siehe auch Abb. 4.13). Konstrukt 3, das dem Konstrukt N ohne Transmembandomäne und Signalpeptid entsprach, war ähnlich um den Kern verteilt, allerdings in größeren Aggregaten. C, 1a, 2a und 2b waren gleichmäßig in der Zelle verteilt, 1b gleichmäßig im Zytoplasma, allerdings nicht im Kern.

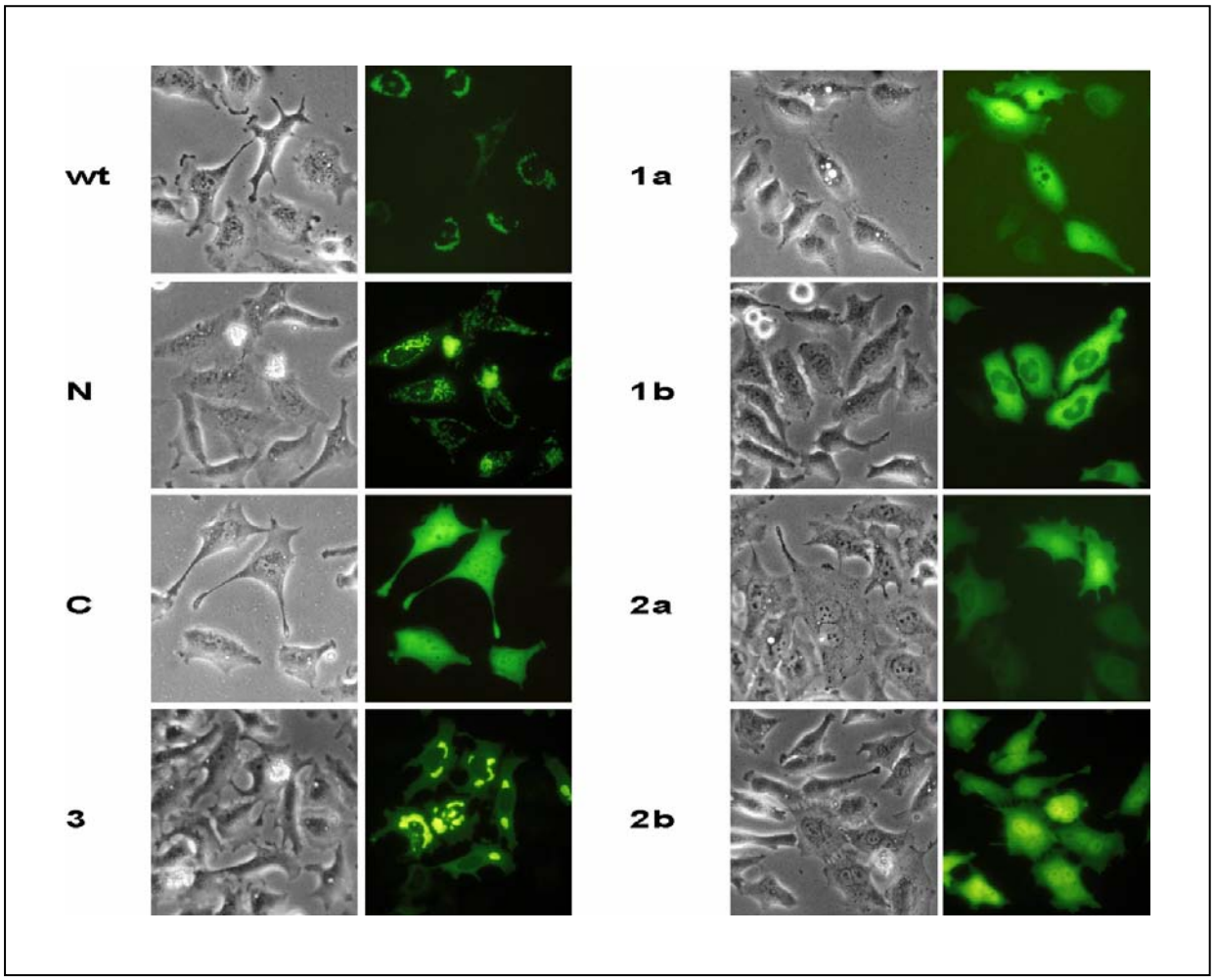


Abb. 4.18 Lokalisation der Deletionskonstrukte (YFP) in HeLa-Zellen. Phasenkontrast und YFP-Fluoreszenz: RAIP wt und N zeigen eine Verteilung in Aggregaten um den Kern, Konstrukt 3 eine ähnliche Verteilung, allerdings in größeren Aggregaten. Die Konstrukte C, 1a, 2a und 2b sind gleichmäßig in Zytoplasma und Kern verteilt. 1b zeigt eine gleichmäßige Verteilung im Zytoplasma, der Kern ist ausgespart.

Die Ergebnisse der Versuche mit den YFP-Fusionen der RAIP-Deletionen sollten mit HA-Fusionen der gleichen Deletionen überprüft werden um einen YFP-spezifischen Effekt auszuschließen. Die HA-Konstrukte wurden in HeLa-Zellen transfiziert und die Zellen wie bei den YFP-Fusions-Konstrukten beschrieben für FACS und Western-Blot behandelt. Auffällig war, dass nur zwei der Deletionskonstrukte Apoptose induzierten (N und 3), die Deletionen 1a und 2a jedoch, im Gegensatz zu den YFP-Fusionen, nicht. Im Western-Blot wurde deutlich, dass diese Deletionskonstrukte nicht (oder nur sehr schwach) überexprimiert wurden (Abb. 4.19).

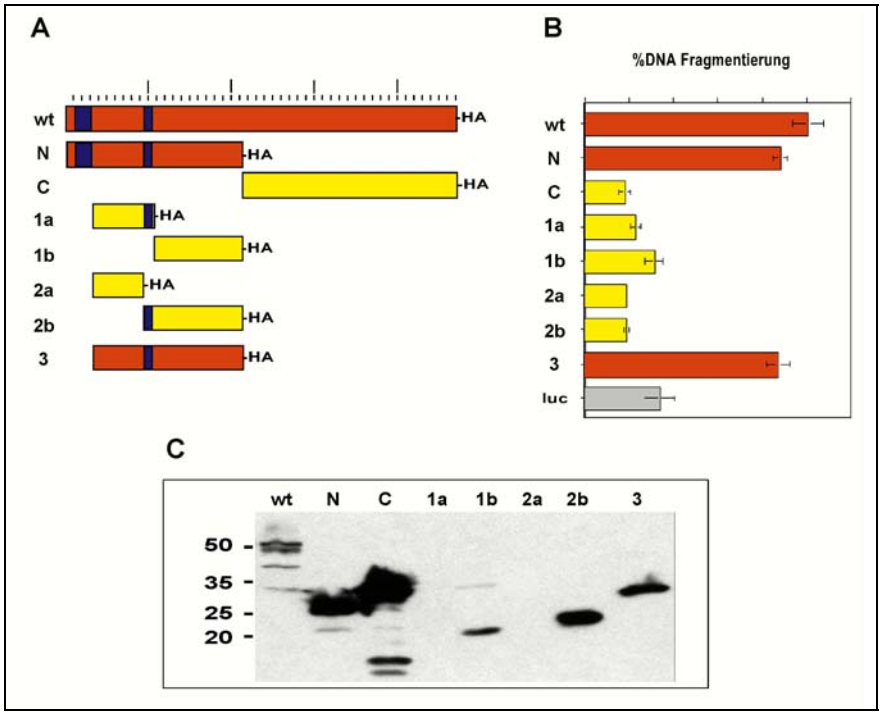


Abb. 4.19 RAIP-Deletionskonstrukte (HA) in HeLa-Zellen. Apoptoseinduktion und Expressionsnachweis: *Mit den Deletionskonstrukten (Grafik A) wurden HeLa-Zellen transfiziert und nach 24 Stunden geerntet. Ein Teil der Zellen wurden für die Messung der apoptotischen DNA-Fragmentierung (B) verwendet, der Rest für den Western-Blot (C) lysiert. RAIP wt und die Deletionen N und 3 induzieren deutlich Apotose, die Deletionen C, 1a,1b, 2a und 2b nicht. Eine Überexpression der Konstrukte 1a und 2a war im Western-Blot nicht detektierbar (C).*

Mit den HA-Deletionskonstrukten wurde ebenfalls eine Immunflureszenz in HeLa-Zellen durchgeführt. Ihre Lokalisation entsprach dabei der Verteilung der YFP-Konstrukte (teilweise gezeigt, Abb. 4.20).

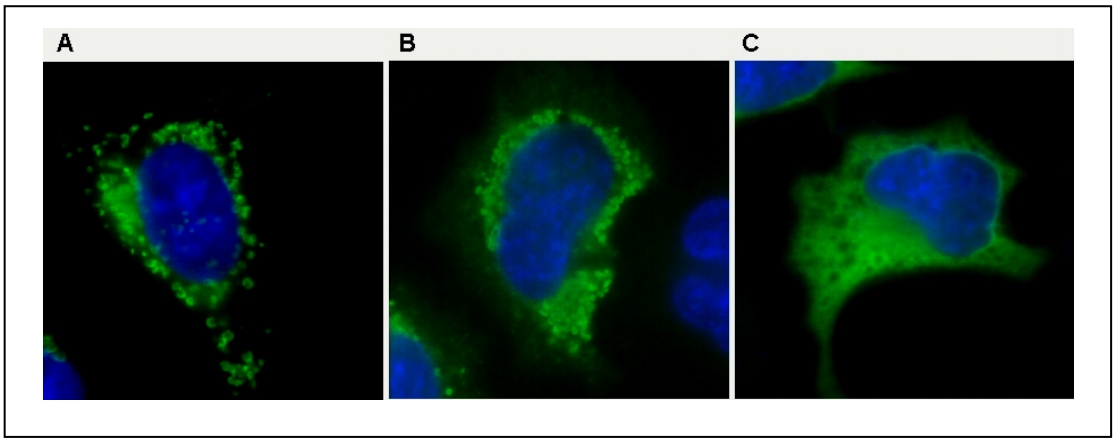


Abb. 4.20 Anti-HA Immunfluoreszenz: *RAIP wt-HA (A), RAIP N-HA (B), RAIP 1b-HA (C). RAIP wt-HA und N-HA zeigen eine perinukleäre Lokalisation in Vesikeln; die Deletion 1b-HA eine gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung.*

4.3.6.2 Lokalisation und Apoptoseinduktion von RAIP-Deletionen in 293T-Zellen

Wie in Abschnitt 4.3.6.1 in HeLa-Zellen wurden die Deletionskonstrukte zusätzlich in 293T-Zellen untersucht. Insbesondere sollte die Expression und Apoptoseinduktion der YFP- und HA-Fusionen der Deletionen 1a und 2a, die sich in HeLa-Zellen unterschieden, in einer zweiten Zellline beobachtet werden, um zu untersuchen, ob es sich dabei um einen Zelltyp-spezifischen Effekt handelte.

Wie in HeLa-Zellen führte die Überexpression der YFP-Fusionen der Deletionen N, 3, 1a, 2a in 293T-Zellen zu einer starken Apoptoseinduktion, wobei die Stärke der Apoptoseinduktion variierte (Abb. 4.21 B). Die kleineren RAIP-Fragmente 3, 2a und 1a induzierten weniger stark Apoptose als Wildtyp RAIP und N. Die erfolgreiche Überexpression aller Konstrukte wurde im Western-Blot bestätigt (Abb. 4.21 C).

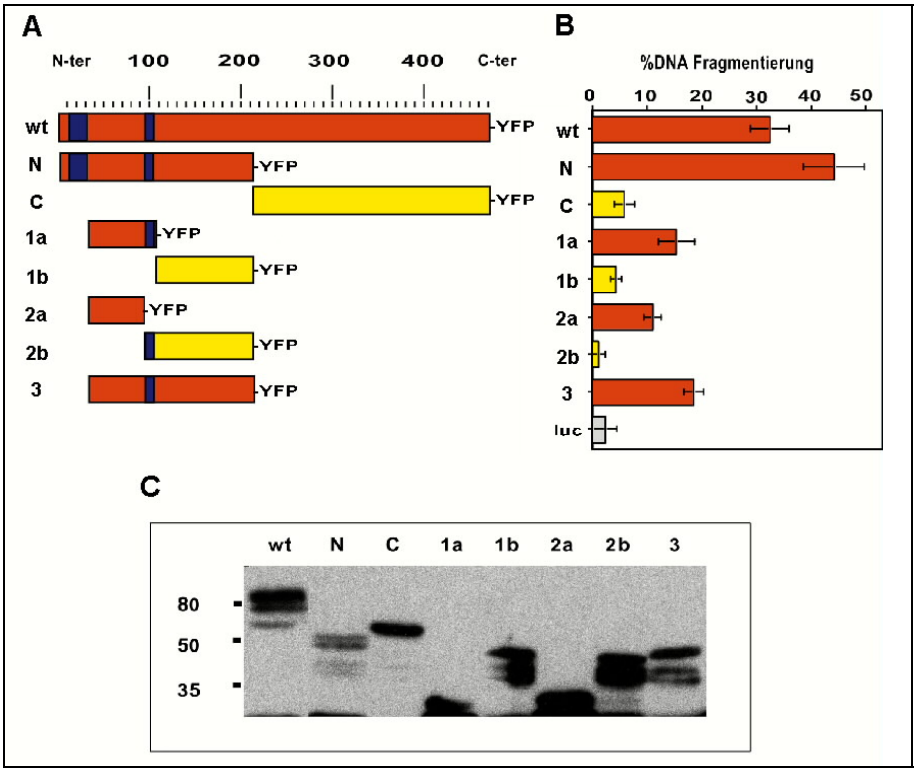


Abb. 4.21 RAIP-Deletionskonstrukte (YFP) in 293T-Zellen. Apoptoseinduktion und Expressionsnachweis: *Mit den Deletionskonstrukten (Grafik A) wurden 293T-Zellen transfiziert und nach 24 Stunden geerntet. Ein Teil der Zellen wurden für die Messung der apoptotischen DNA-Fragmentierung (B) verwendet, der Rest für den Westernblot (C) lysiert. RAIP wt sowie die Deletionen N, 1a, 2a und 3 induzierten Apotose, die Deletionen C, 1b und 2b nicht. Alle Konstrukte wurden exprimiert.*

Die Lokalisation der Deletionskonstrukte in 293T-Zellen entsprach weitgehend der in HeLa-Zellen. RAIP wt, N und 3 sind perinukleär in Aggregaten lokalisiert, C, 1a, 2a, und 2b gleichmäßig in der Zelle verteilt, 1b gleichmäßig im Zytoplasma und nicht im Kern (Abb. 4.22).

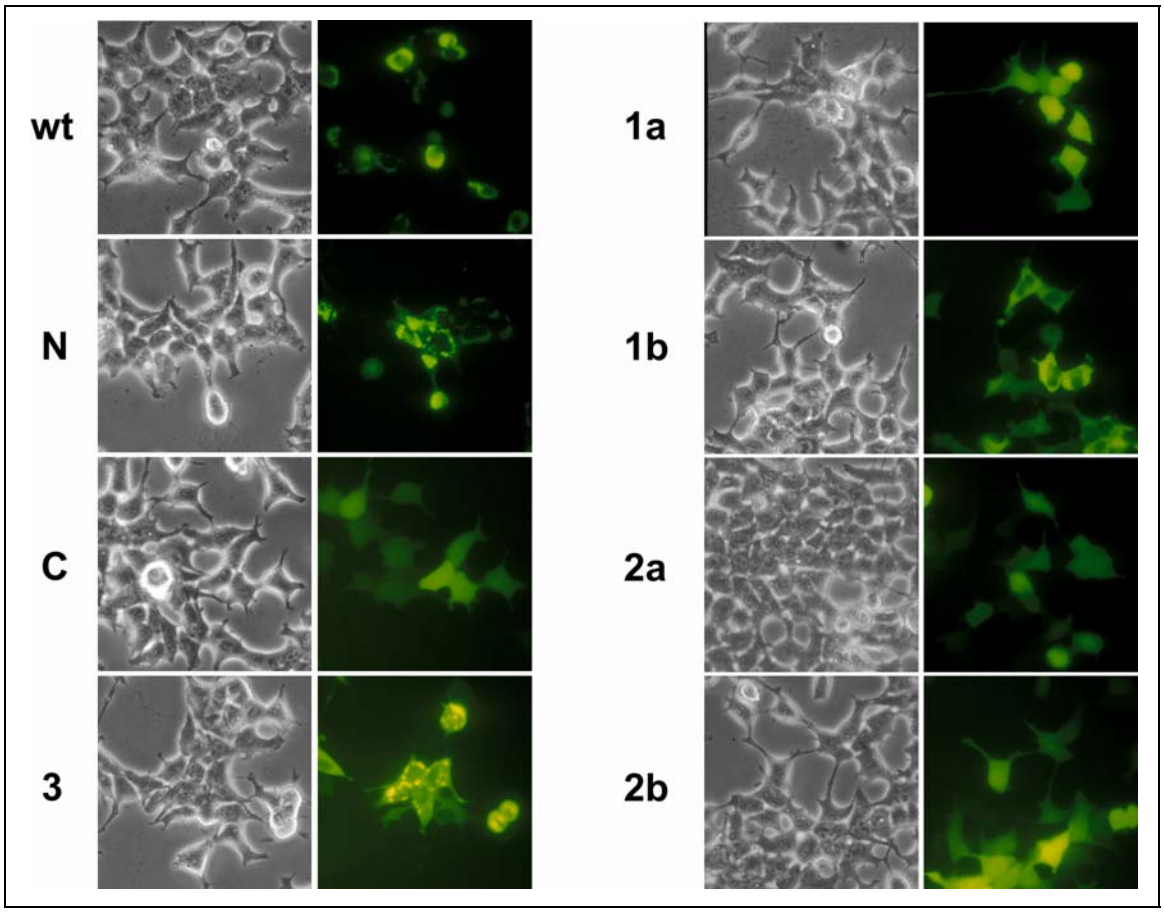


Abb. 4.22 Lokalisation der Deletionskonstrukte (YFP) in 293T-Zellen. Phasenkontrast und YFP-Fluoreszenz: *wt und N zeigen eine Verteilung in Aggregaten um den Kern, Konstrukt 3 eine ähnliche Verteilung, allerdings in größeren Aggregaten. Die Konstrukte C, 1a, 2a und 2b sind gleichmäßig in Zytoplasma und Kern verteilt. 1b zeigt eine gleichmäßige Verteilung im Zytoplasma, der Kern ist ausgespart.*

Die Transfektion der Deletionskonstrukte mit HA-Fusion führte in 293T-Zellen zu einem ähnlichen Ergebnis wie in HeLa-Zellen. Nur die Konstrukte RAIP wt-HA, N-HA und die 3-HA induzierten deutlich Apoptose, 1a-HA und 2a-HA nicht (Abb. 4.23 B). Auch in 293T-Zellen konnte die Expression von 1a-HA und 2a-HA im Western-Blot nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.23 C).

Die HA-Fusionen der Konstrukte 1a und 2a können also in beiden untersuchten Zelllinien, HeLa und 293T, im Western-Blot nicht detektiert werden, sie werden entweder nicht überexprimiert oder werden degradiert und können deshalb keine Apoptose induzieren. Als YFP-Fusionskonstrukte induzieren diese kleinen RAIP-Fragmente in beiden Zelllinien Apoptose. Das kleinste RAIP-Fragment, das in der Lage war, Apoptose zu induzieren war das nur 63 Aminosäure-Reste große 2a ($RAIP_{31-93}$).
Die Konstrukte, die Apoptose induzierten (wt, N, 3, 1a, 2a), waren deutlich unterschiedlich lokalisiert, ein Hinweis, dass eine Lokalisierung am ER und die Veränderung der ER-Morphologie keine Bedingung für die Apoptoseinduktion durch RAIP ist. Eine gleichmäßige Verteilung im Zytoplasma ermöglicht allerdings auch eine Interaktion mit Proteinen am ER, d.h. Komponenten am ER könnten weiterhin an der Vermittlung der durch RAIP-Fragmente induzierten Apoptose beteiligt sein.

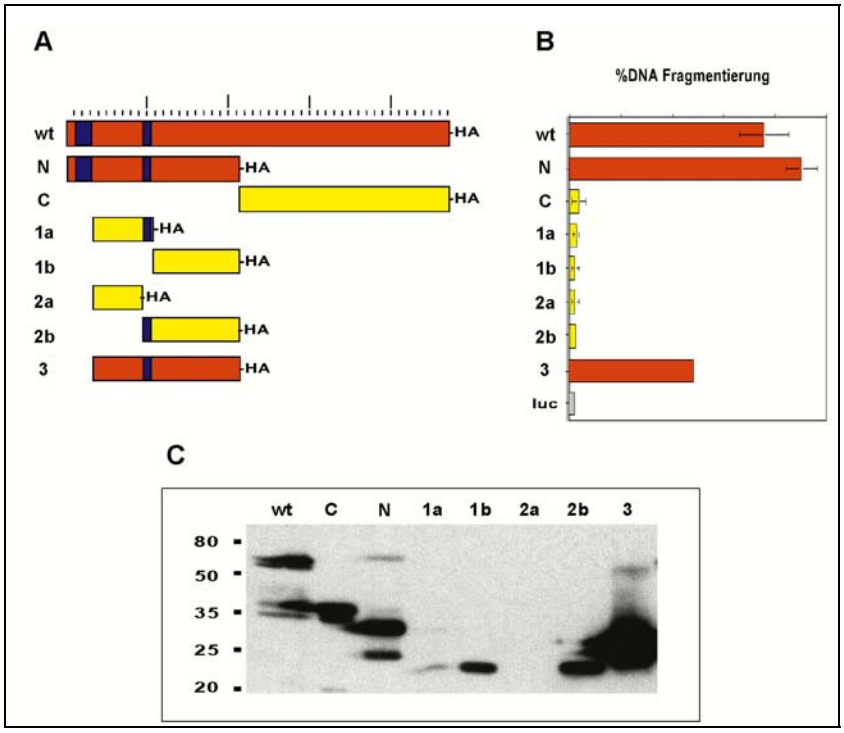


Abb. 4.23 RAIP Deletionskonstrukte (HA) in 293T-Zellen. Apoptoseinduktion und Expressionsnachweis: 293T-Zellen wurden mit den Deletionskonstrukten transfiziert und nach 24 Stunden geerntet. Ein Teil der Zellen wurden für die FACS-Messung (B) verwendet, der Rest für den Western-Blot (C) lysiert

4.3.7 RAIP-Interaktionspartner

Ein weiterer Versuch, einen Hinweis auf den Wirkmechanismus von RAIP zu erhalten, war die Suche nach RAIP-interagierenden Proteinen.

Mit einer RAIP-Protein-Sonde sollten auf einem FarWestern-Blot (Protein-Interaktionsblot Blot, auf dem 27648 verschiedenen Proteine als His-Fusionen aufgetragen sind) (Bussow et al. 1998) spezifische RAIP-Interaktionspartner identifiziert werden.

Als Sonde wurde ein RAIP-Konstrukt ohne Transmembrandomäne (RAIP ΔTM) gewählt, da es wie Wildtyp RAIP Apoptose induzieren konnte (Daten nicht gezeigt) und verhindert werden sollte, dass Proteinbereiche, die sich normalerweise in Membranen befinden, unspezifisch mit Proteinen auf dem Blot interagieren konnten. RAIP ΔTM wurde *in vitro* translatiert (IVT) und radioaktiv mit [^{35}S]-Methionin markiert. Nicht gebundene Radioaktivität wurde durch Reinigung mit Micro-Spin S-200 HR-Säulen entfernt.

Insgesamt wurden ca. 30 potenzielle Interaktionspartner auf dem Blot identifiziert, davon waren 18 Signale stark genug um weiter untersucht zu werden. Von zwei Klonen waren bereits Sequenzinformationen beim RZPD verfügbar. Von den übrigen 16 Klonen wurden die zugerhörigen cDNAs in His-Expresssionsvektoren vom RZPD als Bakterienklone angefordert, die cDNA isoliert und sequenziert. Mit den Sequenzierergebnissen wurde ein BLAST–Datenbankabgleich durchgeführt und untersucht, ob die kodierende Region (cds) mit dem 5´-His-tag im gleichen Leseraster lag. Neun Klone konnten keiner bekannten cDNA-Sequenz zugeordnet werden, lagen außerhalb von kodierenden Bereichen bekannter cDNAs oder codierten für ribosomale RNA. Drei der potenziellen Interaktionspartner wurden für weitere Interaktionsstudien (Co-IPs) ausgewählt, wobei der *Splicing Faktor* SRp40 in drei unabhängigen Klonen vorlag.

Klon-Nr.	Bezeichnung	Name/ Funktion
A4	SIRT 7	Sirtuin (SIR2-Homolog)
A5, B2, X2	SRp40	RNA-*splicing* Faktor
B4	Ferritin	Eisenspeicherprotein

Tab. 4.3 potenzielle RAIP-Interaktionspartner aus dem FarWestern.

Sirtuin 7 ist ein Homolog des Hefeproteins SIR2 (*silent information regulator*), das an der Transkriptionsregulation durch Veränderung der Chromatinstruktur beteiligt ist (Gasser und Cockell 2001). Über die Funktion des humanen Sirtuin 7 ist bisher nichts bekannt. SRp40 ist ein RNA-*splicing* Faktor (Screaton et al. 1995), Ferritin ist ein wichtiges zelluläres Eisen-Speicherprotein.

4.3.7.1 SRp-40, Ferritin und Sirtuin interagieren mit RAIP in Co-Immunpräzipitationen

Mit Co-Immunpräzipitationen sollte untersucht werden, ob die im FarWestern gefundenen potenziellen Interaktionspartner auch in einem zellulären System mit RAIP interagieren konnten. Die kodierenden Bereiche der cDNAs der ausgewählten, möglichen RAIP-Interaktionspartner aus dem FarWestern wurden aus einer HeLa cDNA-Bank isoliert und als HA-Fusionen kloniert. Die HA-Konstrukte wurden mit einem RAIP-myc Fusionskonstrukt in 293T-Zellen cotransfiziert, die Zellen nach 16 Stunden geerntet und lysiert und anschließend eine Co-Immunpräzipitation (Co-IP) durchgeführt. Dazu wurden die Lysate mit myc-Antikörper über Nacht inkubiert (Bindung von RAIP-myc), anschließend die Antikörper (zusammen mit gebundenem RAIP-myc und RAIP-Interaktionspartnern) an ProteinA-Sepharose immobilisiert. Nach mehreren Waschschritten wurde RAIP-myc und gebundene Interaktionspartner durch Aufkochen in SDS-Puffer von ProteinA-Sepharose gelöst. An RAIP gebundene Proteine konnten so von nicht gebundenen Proteinen getrennt werden. Als Negativkontrolle wurden die potenziellen Interaktionspartner mit Luciferase anstatt RAIP cotransfiziert. Die Überexpression (Input) und die Immunpräzipitation (Co-IP) von RAIP-myc wurde im Western-Blot mit Anti-myc Antikörper überprüft. Mit Anti-HA Antikörpern wurde die Überexpression der potenziellen Interaktionsproteine (Input) und deren Co-Immunopräzipitation mit RAIP (Co-IP) getestet (Abb. 4.24 A-C).
Die Interaktion der drei getesteten Proteine mit RAIP konnte eindeutig in der Co-IP bestätigt werden.

Um eine funktionelle Interaktion in der Apoptoseinduktion zwischen RAIP und seinen physikalischen Interaktionspartnern zu untersuchen, wurde RAIP mit diesen im

Verhältnis 1:3 in HeLa-Zellen cotransfiziert und die apoptotische DNA-Degradation nach 24 Stunden im Durchflusszytometer (FACS) gemessen. Keiner der drei Interaktionspartner führte zu einer deutlichen Verstärkung oder Abschwächung der Apoptoseinduktion durch RAIP (Abb. 4.24 D).

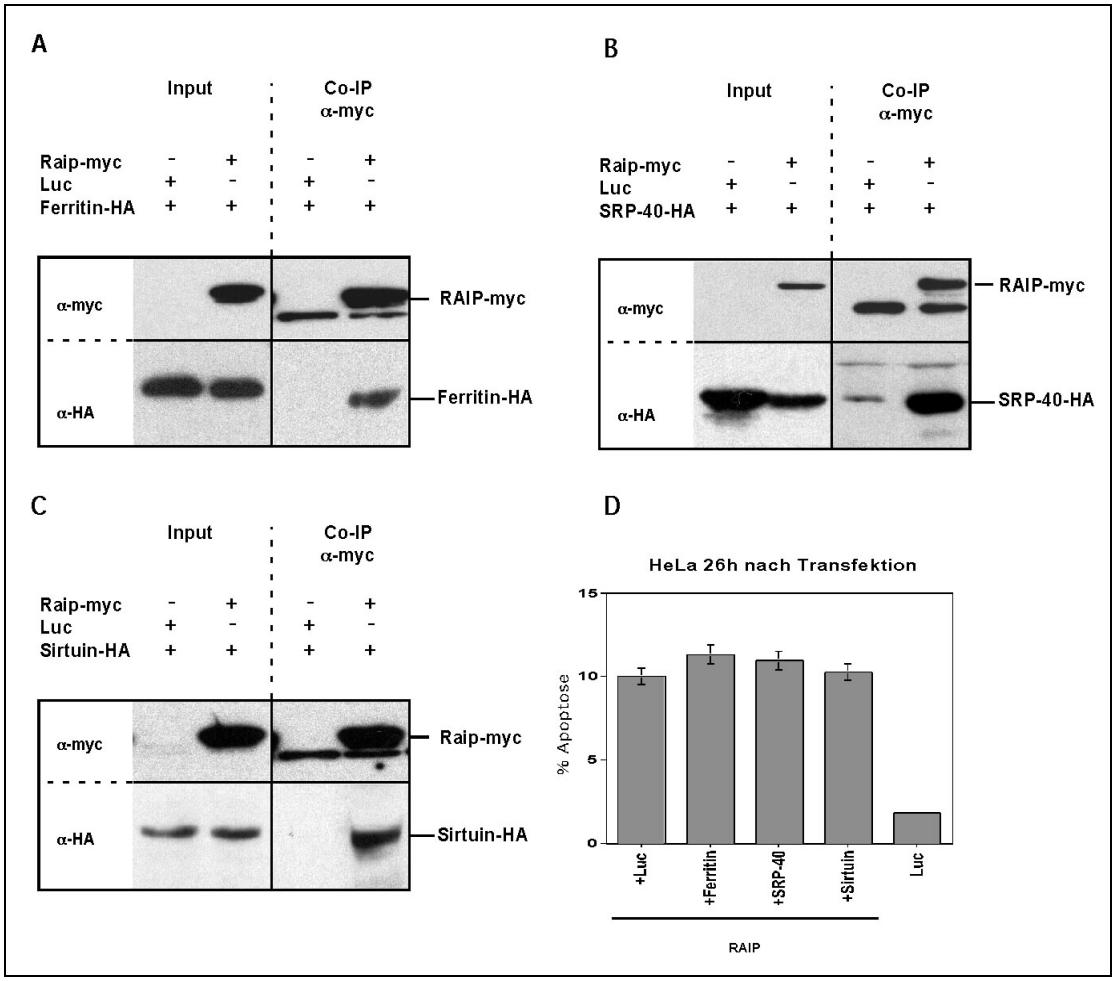


Abb. 4.24 Untersuchung der physikalischen und funktionellen Interaktion von Ferritin (A), SRP-40 (B) und Sirtuin (C) mit RAIP: *CoIP (A-C): Der Nachweis von RAIP-myc ist jeweils oben, der HA-Blot unten dargestellt. Links jeweils der Input, rechts die Co-IP. In Anwesenheit von RAIP-myc sind die jeweiligen HA-Konstrukte im IP-Blot sichtbar. Die Cotransfektion von RAIP mit den Interaktionspartner im Verhältnis 1:3 führte zu keiner signifikanten Veränderung der Apoptoseinduktion (D).*

4.3.8 Quantifizierung der endogenen RAIP-mRNA in Northern Blots

Unterschiedliche Expressionsstärken eines Genes in verschiedenen Geweben oder nach unterschiedlicher Behandlung von Zellen oder Geweben können Hinweise auf dessen Funktion liefern. Die Expressionsstärke einer spezifischen mRNA in einem Gewebe oder in einer Zelllinie läßt sich mit Northern-Blots abschätzen. Membrangebundene RNA wird von einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde sequenzspezifisch gebunden und kann durch Autoradiografie detektiert und quantifiziert werden.

Die Expression der RAIP-mRNA wurde zunächst in einem Northern-Blot verschiedener normaler, gesunder Gewebe (*multiple tissue Northern*, MTN-Blot, Clontech) untersucht (Abb. 4.25). RAIP-mRNA konnte in den meisten Geweben detektiert werden, besonders stark waren die Signale in Leber und Niere, stark in Gehirn, Herz- und Skelettmuskeln, Plazenta und Lunge. Eine schwächere Expression wurde in Thymus, Milz und Dünndarmgewebe gefunden, in Colon und peripherem Blut sehr schwache Signale. Die RAIP-cDNA-Sonde hybridisierte dabei spezifisch nur mit mRNA einer Grösse, (ca. 2,4 kb) ein Hinweis auf die Spezifität der Sonde. Diese Sonde wurde auch für die weiteren Northern-Blot Experimente verwendet (siehe unten)

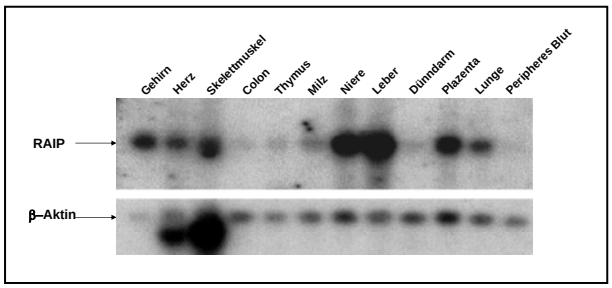


Abb. 4.25 ***Multiple Tissue Northern*** **(MTN, Clontech):** *Gewebespezifische Expression von RAIP-mRNA (oben); Kontrolle mit β-Aktin-cDNA-Sonde (unten). Die Menge der detektierten RAIP-mRNA variiert in den getesteten Geweben deutlich (siehe auch Text).*

4.3.8.1 Vergleich der RAIP-mRNA in Tumor- und Normalgewebe

Die Variation der Expressionsstärke einer spezifischen mRNA zwischen normalem, gesunden Gewebe und Tumorgewebe gleichen Ursprunges kann ein Hinweis auf die Bedeutung des entsprechenden Genes in der Entstehung des jeweiligen Tumors sein. So

ist eine verringerte Expression von proapoptotischen Tumorsuppressorgenen sowie eine erhöhte Expression von antiapoptotischen Genen (wie z.B. Bcl-2) typisch für die meisten Tumore (Strasser et al., 1997; Jäättelä et al., 1999; Hanahan und Weinberg, 2000).

Der quantitative Vergleich von RAIP-mRNA in gesundem und Tumorgewebe wurde mit einem Northern-Blot (*tumor normal array*) der Firma Clontech durchgeführt. Auf diesem Blot waren jeweils mRNA-Präparationen aus gesundem Gewebe und Tumorgewebe gleichen Ursprunges nebeneinander aufgetragen. Nach Behandlung mit einer radioaktiv markierten RAIP-cDNA-Sonde (siehe oben) wurde der Blot im PhosphoImager (Fuji BAS-2500, Fujifilm) mit Hilfe der Image Gauge V 3.01-Software densitometrisch ausgewertet. Zur Veranschaulichung wurde aus dem Verhältnis der Signalstärken von Tumor- und Normalgewebe jedes Patienten der Logarithmus gebildet und für die einzelnen Gewebearten ausgewertet (Abb. 4.26). Eine erhöhte Expression in Tumoren resultierte daher in positiven Logarithmus, eine geringere Expression in negativen Logarithmus. Dabei zeigt der Wert 0,4 / -0,4 eine Verdoppelung / Halbierung der Signalstärke an ($lg2 \approx 0,4$ / $lg \frac{1}{2} \approx -0,4$).

Eine signifikante Zu- oder Abnahme der RAIP-mRNA-Expression in den untersuchten Tumorgeweben im Vergleich zu normalem Gewebe konnte nicht beobachtet werden.

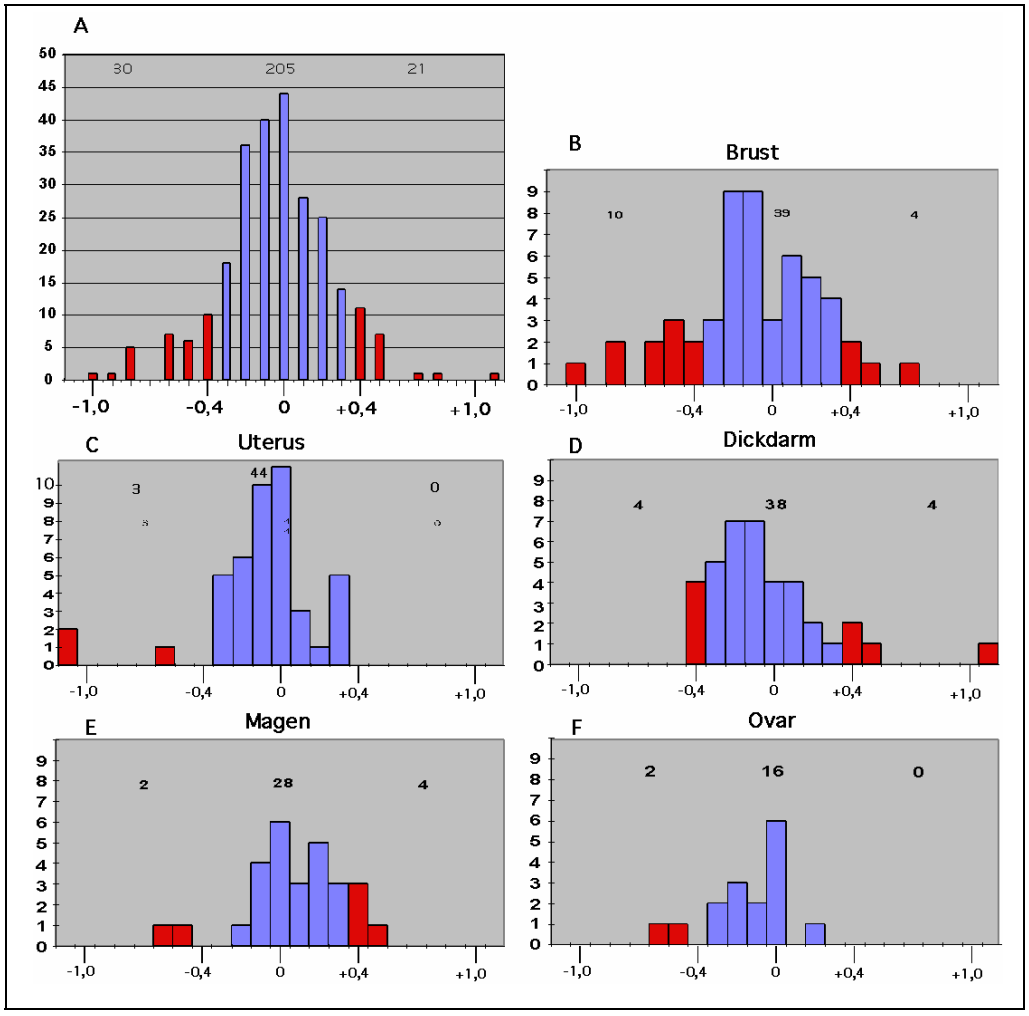


Abb. 4.26 Quantifizierung des Tumor/Normal-Blot mit RAIP-Sonde: *Veränderung der RAIP-mRNA-Menge in allen Geweben (A), Verhältnisse in den einzelnen Geweben (B-F). Die Ergebnisse entsprechen in allen Geweben weitgehend einer statistischen Verteilung, wobei einzelne Probenpaare besonders aus Brust (B), Uterus (C)und Dickdarm (D) deutliche Unterschiede zeigen.*

In einem weiteren Northern-Blot wurde die Expression von RAIP-mRNA in Tumor-Zelllinien nach Behandlung mit verschiedenen Zytostatika und Apoptose induzierenden Agentien untersucht (*cancer cell line profiling array*, Clontech). Auch in diesem Versuch konnte keine deutliche Veränderung der Expressionsstärke der RAIP-mRNA beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

4.3.9 Verminderung der RAIP-Expression durch RNAi

Mit RNA-Interferenz (RNAi) kann sequenzspezifisch mRNA in Zellen reduziert werden (Elbashir et al. 2001). Ein möglicher Weg, die benötigten doppelsträngigen RNA-Moleküle in Zellen zu schleusen, ist die Synthese eines cDNA-Konstruktes in einem Expressionsvektor (pSUPER), das sowohl für den *sense* als auch für den *antisense*-Strang der Ziel-mRNA kodiert. Nach Transfektion wird eine mRNA transkribiert, die dann einen Doppelstrang ausbildet und so als doppelsträngiges RNA-Molekül die spezifische inhibitorische Wirkung ausübt. Zwei verschiedene RAIP-RNAi-Konstrukte wurden kloniert (Konstrukt A und B) und getestet.

4.3.9.1 RAIP-RNAi vermindert die Überexpression von transfiziertem RAIP

Um die Funktionalität der pSUPER-RNAi Konstrukte zu testen, wurde RAIP-YFP mit den entsprechenden pSUPER-Konstrukten cotransfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion war eine Abnahme der YFP-Fluoreszenz bei mit Konstrukt A cotransfizierten Zellen unter dem Mikroskop deutlich sichtbar. Die Zellen wurden geerntet und die Proteinexpression im Western-Blot kontrolliert. Wie schon im Fluoreszenzmikroskop beobachtet, zeigten mit Konstrukt A cotransfizierte Zellen deutlich geringere bzw. keine RAIP-YFP Expression, mit Konstrukt B cotransfizierte Zellen zeigten nur eine geringe Abnahme der Expression (Abb. 4.27). Für weitere RNAi-Experimente wurde das RNAi-Konstrukt A verwendet.

Versuche, eine Regulation des endogenen RAIP-Levels durch RNAi im Western-Blot nachzuweisen, scheiterten an der extrem geringen endogenen Proteinmenge (siehe auch Abb. 4.11, Abschnitt 4.3.4), daher wurde die RAIP-mRNA nach Transfektion mit RNAi mit *LightCycler real time PCR (Roche)* quantifiziert (siehe Abschnitt 4.3.9.2).

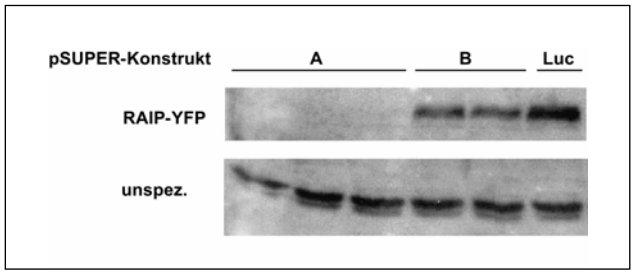


Abb. 4.27 Gleichzeitige Transfektion eines RAIP-pSUPER Konstruktes verhindert die Überexpression von RAIP-YFP in HeLa-Zellen: *Konstrukt A verhindert deutlich die Überexpression von RAIP, Konstrukt B verringert nur geringfügig die Expression im Vergleich zu Luciferase kontrolltransfizierten Zellen.*

4.3.9.2 RAIP-RNAi vermindert die endogene RAIP-mRNA Menge

In der LightCycler PCR wird mit Hilfe eines Doppelstrang-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR® Green) nach jedem PCR-Zyklus die Konzentration der doppelsträngigen cDNA quantifiziert. Aus dem Verlauf der Messkurven wird die Anzahl der Zyklen bis zum Einsetzen der logarithmisch linearen Amplfikation der cDNA, ein sog. *crossing point* (CP) berechnet, der ein Maß für die ursprüngliche Konzentration der spezifischen cDNA ist. Dabei resultiert eine geringere Konzentration in einer Verzögerung der logarithmisch linearen Amplfikation (Verschiebung der Kurven nach rechts) und damit in einem höheren CP-Wert. (siehe auch Ball, 2003).

Für eine Quantifizierung der endogenen RAIP-mRNA nach Behandlung mit dem pSUPER-RNAi Konstrukt A (siehe Abb. 4.27) wurden HeLa-Zellen (in 6-well Platten) mit Konstrukt A bzw. einem Kontroll-RNAi-Konstrukt (Saip pSUPER) transfiziert, nach 40 Stunden geerntet und in 10cm Schalen aufgeteilt. Nach weiteren 16 Stunden in Kultur wurden die Zellen geerntet und die RNA isoliert, anschließend cDNA synthetisiert.

Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe von cDNA aus Kontroll-behandelten Zellen mit Primern für das Haushaltsgen HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) gemessen (Abb. 4.27 links), dann die cDNA der RAIP-RNAi-behandelten Zellen (Abb. 4.27 rechts). Da die verwendeten RNAi-Konstrukte keinen Einfluss auf die Expression von HPRT haben sollten, wurde diese Messung zum Abgleich der cDNA-Konzentrationen von Kontroll-RNAi-behandelten und RAIP-RNAi-behandelten Zellen verwendet.

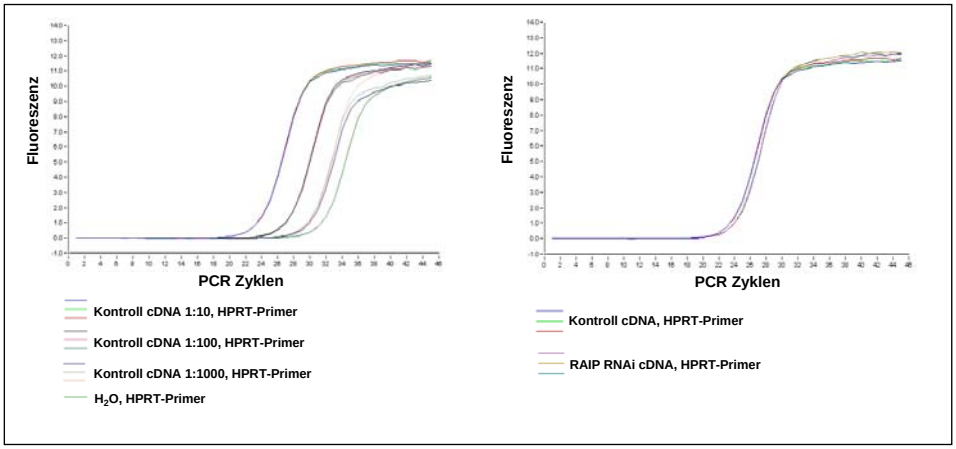


Abb. 4.28 Quantifizierung von HPRT cDNA: *Verdünnungsreihe 1:10, 1:100, 1:1000 und H_2O der kontrollbehandelten cDNA (links) und Vergleich der Kontroll-cDNA (1:10) mit cDNA (ebenfalls 1:10 verdünnt) aus RNAi behandelten Zellen (rechts). Eine leichte Rechtsverschiebung der Kurven zeigt eine geringere Konzentration der HPRT-cDNA in RNAi A behandelten Zellen, die bei der Berechnung des spezifischen RAIP-RNAi Effektes berücksichtigt werden muss.*

Mit RAIP-spezifischen Primern wurde anschließend auf gleiche Weise eine Verdünnungsreihe von cDNA aus Kontroll-behandelten Zellen mit RAIP-Primern gemessen (Abb. 4.29 links), dann die cDNA der RAIP-RNAi-behandelten Zellen (Abb. 4.29 rechts). Die unterschiedliche ursprünglich RAIP-mRNA-Menge in Kontroll-RNAi-behandelten und RAIP-RNAi-behandelten Zellen zeigte sich durch eine deutliche Rechtsverschiebung der Kurve.

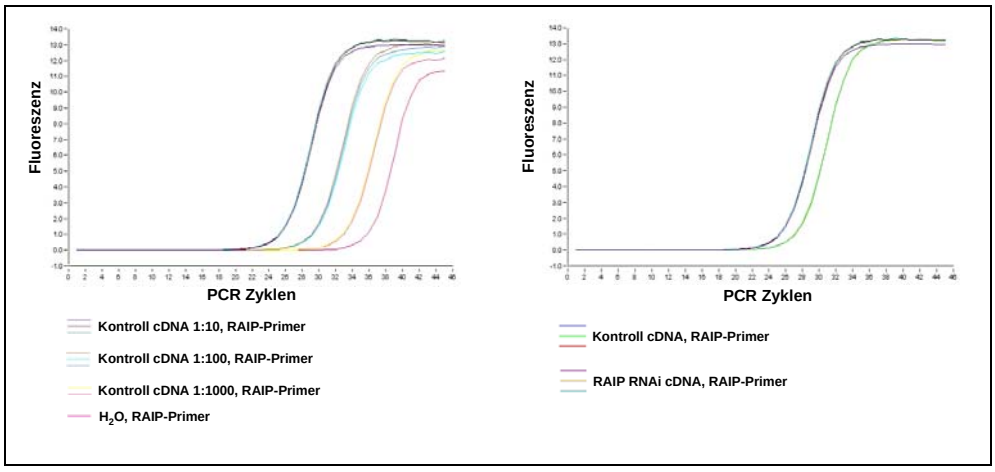


Abb. 4.29 Quantifizierung von RAIP cDNA*: Verdünnungsreihe 1:10, 1:100, 1:1000 und H_2O der kontrollbehandelten cDNA (links), Vergleich der cDNA aus RNAi A behandelten Zellen mit der aus kontrollbehandelten Zellen (rechts): die deutliche Rechtsverschiebung zeigt eine Abnahme der spezifischen RAIP-cDNA bei RNAi behandelten Zellen.*

Mit Hilfe der RelQuant 1.01 Software der Firma Roche wurden die PCR-Ergebnisse quantitativ analysiert. Aus den CP-Werten und den Ergebnissen aus den Verdünnungsreihen konnten den CP-Werten relative cDNA-Konzentrationen zugeordnet werden. Aus dem Abgleich der Ergebnisse der Ansätze mit HPRT-Primern und RAIP-Primern konnte berechnet werden, dass RAIP-mRNA in RAIP-RNAi behandelten Zellen auf 46% im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen reduziert wurde (Tab. 4.4). Somit konnte nachgewiesen werden, dass das RNAi-Konstrukt A nicht nur die Überexpression von RAIP (siehe Abb. 4.27), sondern auch die endogene RAIP-mRNA-Menge reduzieren kann.

Nr.	Probenbezeichnung	CP	∅ CP	Δ CP	Konzentrations-verhältnis.
1	Kontrolle_1:10_RAIP	25.81	25.81	2.17	1.00
2		25.86			
3		25.77			
1	Kontrolle_1:10_HPRT	23.64	23.64		
2		23.67			
3		23.63			
1	RNAi_A_1:10_RAIP	27.65	27.65	3.52	**0.46**
2		27.60			
3		27.70			
1	RNAi_A_1:10_HPRT	24.13	24.13		
2		24.19			
3		24.09			

Tab. 4.4 Ergebnis der Berechnung der relativen Reduktion von RAIP durch das RNAi-Konstrukt: *Mit dem Programm RelQuant 1.01 von Roche wurden aus den LightCycler-PCR Ergebnissen die „crossing points", CP, der einzelnen Syntheseverläufe berechnet. Anschließend wurde aus den Mittelwerten der CP-Werte (∅ CP) die relative Abnahme der RAIP-cDNA in RNAi A behandelten Zellen unter Berücksichtigung der HPRT cDNA-Verhältnisse berechnet. Die Menge der RAIP-cDNA wird demnach durch RNAi-Konstrukt A auf 46% reduziert.*

4.3.9.3 Wirkung von RAIP-RNAi auf die Apoptoseinduktion durch Zytostatika

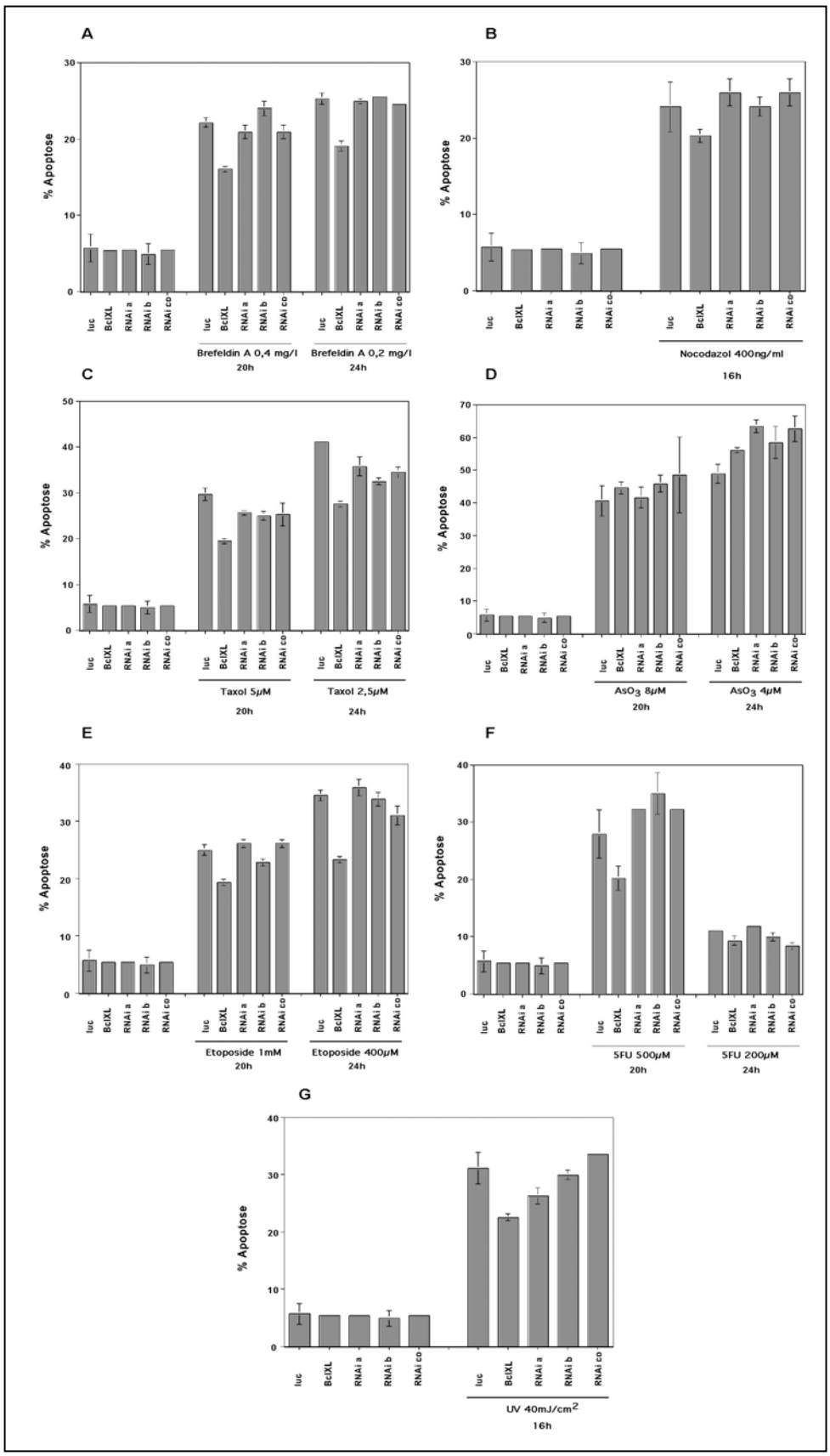
Um Anhaltspunkte über die Wirkungsweise des proapoptotischen RAIP-Proteins zu erhalten sollte die RAIP-Expression in HeLa-Zellen mit RNAi verringert und anschließend die Zellen mit verschiedenen apoptoseinduzierenden Agentien behandelt werden. Eine deutliche Abnahme der Apoptoseinduktion würde einen Hinweis liefern

auf die Beteiligung von RAIP an der apoptotischen Signalkaskade, die durch das entprechende Agens aktiviert wird.

HeLa-Zellen wurden mit den RNAi-Konstrukten A und B (als interne Kontrolle) und einem Kontroll pSUPER-Konstrukt (Saip pSUPER) in 10cm Schalen transfiziert, nach 48 Stunden in 12-*well* Platten verteilt und nochmals 20 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die apoptoseinduzierenden Agentien in zwei Konzentrationen dem Medium zugefügt, bzw. mit UV bestrahlt. Die Apotoserate wurde 20 Stunden bzw. 24 Stunden nach Zugabe der Apoptoseinducer im Durchflußzytometer (FACS) gemessen. Als Kontrolle wurden in einem parallelen Ansatz HeLa-Zellen vor Zugabe der Apoptoseinducer mit antiapoptotischem Bcl-X_L transfiziert.

Bei keinem der untersuchten Apoptoseinducer konnte eine signifikante Verminderung der Apoptoseinduktion durch RAIP-RNAi festgestellt werden. Bei den meisten apoptoseinduzierenden Agentien führte das als Kontrolle transfizierte antiapoptotische Bcl-XL zu einer leichten Reduzierung der Apoptose.

Abb. 4.30 (nächste Seite) Auswirkung von RAIP-RNAi auf die Apoptoseinduktion durch verschiedene Zytostatika: *HeLa-Zellen wurden 3 Tage nach Transfektion mit RNAi-Konstrukten (bzw. 2 Tage nach Bcl-X_L Transfektion) mit Apoptose induzierenden Agentien in den angegebenen Konzentrationen behandelt (bzw. UV-bestrahlt). 20 bzw. 24 Stunden später wurde die Apotoseinduktion im Durchflusszytometer gemessen.*


A
% Apoptose
luc
BclXL
RNAi a
RNAi b
RNAi co
Brefeldin A 0,4 mg/l
20h
Brefeldin A 0,2 mg/l
24h
B
Nocodazol 400ng/ml
16h
C
Taxol 5µM
20h
Taxol 2,5µM
24h
D
AsO3 8µM
20h
AsO3 4µM
24h
E
Etoposide 1mM
20h
Etoposide 400µM
24h
F
5FU 500µM
20h
5FU 200µM
24h
G
UV 40mJ/cm2
16h

5 Diskussion

5.1 Expressionsscreen nach dominant Apoptose-induzierenden Genen

Nachdem das menschliche Genom nun vollständig sequenziert ist, sind Sequenzinformationen von ca. 34000 verschiedenen Genen verfügbar (Venter et al. 2001). Eine grosse Herausforderung besteht jetzt darin, die grosse Anzahl von bisher nicht genauer charakterisierten Genen funktionell einzuordnen.

Eine Möglichkeit, um bisher unbekannte Gene einer bestimmten Funktion zu finden, ist die sogenannten Expressionsklonierung, für die zwei klassische Ansätze existieren (Simonsen und Lodish, 1994). Bei der ersten Vorgehensweise werden Zellen mit einer komplexen cDNA-Bibliothek transfiziert und anschließend die Zellen, die eine gesuchte Funktion ausprägen, physikalisch vom Rest der Population getrennt. Aus den selektierten Zellen wird die cDNA wieder isoliert, amplifiziert und ein weiteres Mal in Zellen transfiziert. Diese Prozedur wird mehrfach wiederholt und so kann ein Gen mit der gesuchten Funktion angereichert und schließlich isoliert werden.

Eine zweite Möglichkeit (*sib selection*) basiert auf der zunehmenden Aliquotierung einer cDNA-Bibliothek, und anschließender Untersuchung der transfizierten Zellpopulation die Ausprägung einer bestimmten Funktion. Die Aliquotierung mit wiederholter Transfektion der Plasmid-DNA erfolgt solange, bis das für diese Funktion verantwortliche Gen angereichert ist und als Einzelklon vorliegt.

Beiden Ansätzen ist gemeinsam, dass zunächst jeweils komplexe cDNA-Bibliotheken transfiziert werden und die Zahl der Kandidatengene nachträglich eingegrenzt wird. Für die Isolation proapoptotischer Gene ergibt sich daraus das Problem der geringen Sensitivität, da zunächst ein Gemisch vieler verschiedener cDNAs transfiziert wird. Die individuellen Gene sind dadurch sehr verdünnt und können unter Umständen keine deutliche Veränderung der Zellen hervorrufen. Ausserdem sterben Zellen ab, die mit proapoptischen Genen transfiziert wurden, und können nicht selektioniert werden. Ausserdem wird während der Apoptose DNA degradiert, eine Reisolierung von cDNA ist daher nicht möglich.

Aus diesem Grund wurde von Grimm und Leder ein neuer genetischer Expressions-*Screen* entwickelt, der speziell für die Isolierung von dominant Apoptose-induzierenden Genen geeignet ist. (Grimm und Leder, 1997). Ein besonderes Merkmal dieses *Screens* ist die Transfektion von Einzel-cDNA-Klonen in Zellen. Daher ist die Selektion von Zellen und Reisolierung der DNA nicht nötig, ausserdem ergibt sich nicht das Problem der geringen Sensitivität. Allerdings müssen viele Einzeltransfektionen durchgeführt werden und zunächst viele einzelne Plasmid-DNA-Klone aus einer cDNA-Bibliothek isoliert werden. Für die Isolation der Plasmid-DNA wurde ein einfach durchführbares Protokoll benutzt, das die Isolation von 96 cDNA-Klonen gleichzeitig ermöglicht (Neudecker und Grimm, 2000).

Für den *Screen* nach Genen, die an proapoptotischen Signalwegen beteiligt sind, wurde die Tatsache ausgenutzt, dass für die Weiterleitung von Apoptose-Signalen Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sind und die Überexpression von Komponenten proapoptotischer Signalwege in den meisten Fällen dominant Apoptose induziert (Yang et al. 1998).

Mit Hilfe des *Screen*s wurden bereits einige Gene isoliert, die bekanntermassen an verschiedenen proapoptotischen Signalwegen beteiligt sind. So z.B. FADD (Fas-/TNF-Rezeptor-Adapter Protein) (Boldin et al. 1995; Chinnaiyan et al. 1996), ANT-1 (ein Bestandteil der mitochondrialen PT-Pore) (Belzacq et al. 2002) und Bnip-3 (proapoptotisches Bcl-2 Protein) (Cheng et al. 1997). Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden zwei weitere cDNA-Klone isoliert, die als Bestandteile proapoptotischer Signalwege bereits bekannt waren: VDAC und CIDE-B. Der *Voltage dependent anion channel*, VDAC, ist ein integrales Membranprotein der äusseren Mitochondrien-membran, das als wichtiger Bestandteil der PT-Pore (*permeability transition pore*) beschrieben wurde (Shimizu et al. 2000b; Tsujimoto und Shimizu 2002). Die Erkenntnisse über die Apoptoseinduktion durch Aktivierung von VDAC sind auch Grundlage für einen Ansatz der Therapie der Alzheimer-Erkrankung. Ein chemischer Inhibitor von VDAC soll eingesetzt werden, um die Neurodegeneration durch übermäßige Apoptose im Verlauf dieser Krankheit zu hemmen (Youdim et al. 2001).

CIDE-B (*cell-death-inducing DNA-fragmentation-factor (DFF45)-like effector B*) ist ein Mitglied der proapoptotischen CIDE-Familie die Sequenzhomologien zur Caspase-aktivierten DNase (CAD bzw. DFF45, *DNA fragmentation factor*) aufweist. CIDE-B

kann Apoptose und DNA-Fragmentierung caspaseunabhängig induzieren (Inohara et al. 1998; Lugovskoy et al. 1999). Im Krankheitsverlauf nach Infektion mit Hepatitis C (HCV) spielt CIDE-B eine wichtige Rolle. Eine chronische HCV-Infektion führt häufig zur Entstehung von Leberkrebs, verantwortlich ist (unter anderem) das virale Protein NS2, das die proapoptotische Wirkung von CIDE-B inhibieren kann (Erdtmann et al. 2003). Wie diese Beispiele zeigen, können mit Hilfe des *Screen*s Apoptose-relevante Gene isoliert werden, die an den verschiedensten proapoptotischen Signalwegen in unterschiedlichen Zellkompartimenten beteiligt sind. Das Potenzial des *Sceens* zeigt sich darin, dass der Grossteil (ca. 80-90%) der isolierten Gene bisher noch nicht mit Funktionen in der Apoptose beschrieben wurden.

Aus den über 80 bisher im *Screen* isolierten dominant Apoptose induzierenden Gene wurden zwei besonders interessante für weitere Untersuchungen ausgewählt. Ein Gen, das als Interaktionspartner von Presenilin-1 (PS-1) beschrieben wurde, PSAP (***PS**-1 **A**ssociated **P**rotein* (Xu et al. 1999) und ein bisher nicht genauer beschriebenes Gen, das durch seine besonders effiziente und schnelle Apoptoseinduktion auffiel, und daher RAIP, ***R**apid **A**poptosis **I**nducing **P**rotein*, genannt wurde.

Die Isolation von PSAP als proapoptotisches Gen ist ein gutes Beispiel für die Vorteile des Sceens: Durch biochemische Untersuchungen war PSAP als Interaktionspartner von Presenilin-1 identifiziert, allerdings war dem Gen zu diesem Zeitpunkt noch keine Funktion zugeordnet (Xu et al. 1999). Andererseits war zwar bekannt, dass Apoptose eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der neurodegenerativen Alzheimer Krankheit spielt, genaue molekulare Mechanismen der Apoptosevermittlung sind jedoch noch unbekannt. Die Presenilline -1 und -2 (PS-1 und -2) sind jene Proteine, deren Mutation Ursache der meisten Fälle der vererbten Alzheimer Krankheit (*familiar Alzheimer disease*, FAD) verantwortlich sind (Czech et al. 2000; Selkoe 1997). Die Krankheits-relevanten Mutationen von PS-1 haben eine aberrante Spaltung von β-APP (β-*Amyloid-Precursor Protein*) zur Folge. Diese Spaltung führt zur Bildung von β-Amyloid-Plaques, die Ursache der erhöhten Apoptose von Neuronen im Gehirn im Verlauf der Alzheimer Erkrankung sind. Es gibt einige Hinweise auf eine Verbindung zwischen Presenilinen und Apoptose, genaue Mechanismen sind allerdings unbekannt. So induzieren Presenilline selbst keine Apoptose in neuronalen Zellen, können diese aber für Apoptose sensibilisieren (Czech et al. 2000; Vito et al. 1997). Außerdem ist bekannt,

dass Preseniline mit dem antiapoptotischen Bcl-2-Protein Bcl-X_L interagieren (Passer et al. 1999) und durch Caspasen prozessiert werden (Loetscher et al. 1997).

RAIP wurde ausgewählt, weil zum einen die Überexpression sehr schnell und effizient Apoptose induzieren konnte und RAIP daher als ein zentraler Faktor in der proapoptotischen Signalkette beteiligt sein könnte. Zum anderen war es eine Herausforderung, einem bisher nicht näher charakterisierten Gen bzw. Protein eine Funktion zuzuordnen.

5.2 PSAP induziert caspaseabhängig Apoptose

Im *Screen* wurde beobachtet, dass Zellen (293T und HeLa) nach Transfektion mit PSAP deutliche Apoptose-typische morphologische Veränderungen wie die Bildung von apoptotischen Körperchen (*membrane blebbing*) aufwiesen (siehe Abb. 4.1 A-D). Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass diese morphologischen Veränderungen begleitet waren von apoptotischen biochemischen Veränderungen. So konnte eine internukleosomale DNA-Fragmentierung anhand einer DNA-Leiter (Abb. 4.1 E) und die Abnahme des nukleären DNA-Gehaltes in der Durchflusszytometrie (Abb. 4.1 F) gezeigt werden. Ein wichtiger Schritt in der apoptotischen Signalkette ist die Aktivierung der Caspasekaskade, die schließlich zur Aktivierung der Effektorcaspasen und zur Prozessierung der Caspasensubstrate führt. Die Notwendigkeit der Caspasenaktivierung für die PSAP-induzierte Apoptose zeigte deren Hemmung mit dem Pancaspase-Inhibitor zVAD-fmk (Abb. 4.1 G). Ein weiterer wichtiger Hinweis auf die Beteiligung allgemeiner Apoptose-Signalwege lieferte die Inhibition der PSAP-vermittelten Apoptose in Anwesenheit des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins Bcl-X_L. Die antiapoptotischen Bcl-2 Proteine regulieren frühe apoptotische Vorgänge wie z.B die Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien (z.B. Cytochrom c oder AIF) (Annis et al. 2001; Häcki et al. 2000; Wang 2001; Yang et al. 1997), die im Zytosol zur Aktivierung von Caspasen beitragen. Die Inhibition durch Bcl-X_L zeigt, dass die Überexpression von PSAP nicht direkt Caspasen aktiviert, sondern andere vorgeschaltete Signalwege beteiligt sind (Abb. 4.2 A). Der bisher am besten beschriebene Signalweg, in den viele verschiedene proapoptotische Signale münden, ist die Aktivierung von Mitochondrien, die zur Öffnung der PT-Pore und Freisetzung von

proapoptotischen Faktoren führt (Belzacq et al. 2002). Die Inhibition der PT-Pore mit Cyclophilin D und Bongkrek-Säure konnte eindeutig die Apoptoseinduktion durch PSAP inhibieren (Abb. 4.2 A und B), die Aktivierung der PT-Pore ist also ein wichtiger Schritt in der PSAP-vermittelten Apoptose. Auch die Lokalisation von PSAP in Mitochondrien, wie mit Hilfe einer PSAP-YFP-Fusion gezeigt werden konnte, legte eine Beteiligung der Mitochondrien in der PSAP-vermittelten Apoptose nahe.

Da bisher nicht genauer bekannt ist, wie Presenilin-1 an der Vermittlung der Apoptose von Neuronen im Verlauf der neurodegenerativen Alzheimer Krankheit beteiligt ist, wurde auch der Einfluss von Presenilin-1 auf die PSAP-vermittelte Apoptose untersucht. In ersten Experimenten konnte kein Einfluss von cotransfiziertem Presenilin-1 auf die PSAP-vermittelte Apoptose erkannt werden. Zu diesem Zeitpunkt wurde PSAP in einer Veröffentlichung von Xu et al. als proapoptotisches Protein beschrieben (Xu et al. 2002). Bei dem Versuch, PSAP stabil in Zelllinien zu überexprimieren stellten die Autoren fest, dass PSAP-transfizierte Zellen starben, wie sich später herausstellte, durch apoptotische Vorgänge. Xu et al. zeigten ebenfalls eine mitochondriale Lokalisation von PSAP und eine Beteiligung von Mitochondrien an der apoptotischen Signalweiterleitung (Cytochrom c-Freisetzung), allerdings keine genaueren Hinweise auf die Aktivierung der PT-Pore oder den Einfluss von Bcl-X_L. In einem Experiment zur Beteiligung von PS-1 an der PSAP-vermittelten Apoptose konnten Xu et al. einen geringen Rückgang (ca. 10%) der Apoptose in Anwesenheit von PS-1 feststellen (Quantifizierung der PARP-Spaltung im Western-Blot).

Die Ergebnisse von Xu et al. decken sich Größtenteils mit meinen Beobachtungen. Nach der Veröffentlichung von Xu et al. war allerdings das entscheidende Kriterium, PSAP als bisher *unbekannte* Verbindung zwischen Presenilinen und Apoptose zu charakterisieren, nicht mehr gegeben. PSAP wurde daher nicht weiter bearbeitet.

5.3 RAIP, ein neues proapoptotisches Protein, induziert Apoptose über allgemeine Signalwege

Die Überexpression von RAIP führt zu Apoptose-typischen morphologischen und biochemischen Veränderungen in Zellen. Die Zellen runden sich ab, die Plasma-Membran bildet Ausstülpungen (*membrane blebbing*), die schließlich zur Auflösung der Zelle in apoptotische Körperchen führen (Abb. 4.6 A-D). Typische biochemische

Veränderungen, wie Caspase-Aktivierung, DNA-Fragmentierung und Abnahme des nukleären DNA-Gehaltes konnten nach RAIP-Transfektion nachgewiesen werden (Abb. 4.6 E und F). Ein entscheidender Schritt in der proapoptotischen Signalweiterleitung ist die Aktivierung von Caspasen. In Anwesenheit des Pancaspase-Inhibitors zVAD-fmk wurde die RAIP-vermittelte Apoptose deutlich inhibiert (Abb. 4.7), die Aktivierung von Caspasen ist demnach ein essentieller Schritt in der Signalkette der RAIP-vermittelten Apoptose.

Frühe apoptotische Ereignisse, die schließlich zur Aktivierung von Caspasen führen, werden duch Proteine der Bcl-2-Familie reguliert. So wird die Mitochondrien-Aktivierung und die Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien (Cytochrom c, AIF) (Yang et al. 1997) oder die Generierung eines proapoptotischen Signals aus dem ER (Ca^{2+}-Ausfluss) durch antiapoptotisches Bcl-2 und Bcl-X_L inhibiert (Annis et al. 2001; Häcki et al. 2000; Wang 2001). Die Inhibition von RAIP-induzierter Apoptose durch Bcl-2 und Bcl-X_L (Abb. 4.8) zeigt, dass die Überexpression von RAIP nicht direkt Caspasen aktiviert, sondern andere vorgeschaltete Signalwege beteiligt sind. Die Hemmung der Apoptose mit Bcl-2-Varianten, die in Mitochondrien (Bcl-2/MT) oder ER (Bcl-2/ER) lokalisieren, kann einen Hinweis auf die Beteiligung der entsprechenden Kompartimente bei der Vermittlung des proapoptotischen Signals geben (Rudner et al. 2001; Zhu et al. 1996). So kann z.B. Bcl-2/ER zwar Brefeldin- (Hacki et al. 2000) und c-Myc-induzierte Apoptose inhibieren (Lee et al. 1999), nicht aber Etoposid-induzierte Apoptose (Lee et al. 1999). Allerdings ist auch bekannt, dass Bcl-2/ER Strahlungs-induzierte Apoptose, die eindeutig Mitochondrien-vermittelt ist, effektiv hemmen kann. Es existiert also ein molekulares Zusammenspiel zwischen ER und Mitochondrien in der Strahlungs-induzierten Apoptose (Belka et al. 2000; Rudner et al. 2001).

Sowohl mitochondriales als auch ER-lokalisiertes Bcl-2 (Bcl-2/MT, Bcl-2/ER) hemmen die RAIP-induzierte Apoptose. Daher kann man annehmen, dass beide Kompartimente an der RAIP-vermittelten Apoptose beteiligt sind.

Ein Inhibitor von proapoptotischen Signalen am ER ist Spike ΔN19, eine dominant negativ wirkende Deletionsmutante des ER-lokalisierten proapoptotischen BH3-only Proteins Spike, das auch mit BAP31 interagiert. Spike ΔN19 wirkt nicht nur dominant negativ auf die Spike-vermittelte Apoptose (Mund et al. 2003) sondern auch die

Apoptose nach Überexpression des ER-Proteins Saip (Scherhammer 2004). Die RAIP-induzierte Apoptose wird duch ΔN19 nicht inhibiert, RAIP wirkt also wahrscheinlich nicht über gemeinsame proapoptotische Signalwege mit Spike, BAP31 und Saip oder ist in der Signalkette den proapoptotischen Signalen von Spike und Saip nachgeschaltet.

5.4 Expressionslevel von RAIP

In Western-Blots mit Serum gegen RAIP zeigte sich ein extrem geringer endogener RAIP-Expressions-Level, in den meisten getesteten Zelllinien konnte endogenes RAIP nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.11 C). In HeLa-Zellen konnte mit einem optimierten Lyse-Protokoll eine sehr schwache RAIP-Bande sichtbar gemacht werden (Abb. 4.11 B), allerdings nicht immer reproduzierbar. Das Serum war jedoch sensitiv genug um geringe Mengen von überexprimiertem RAIP zu detektieren. Die Immunfluoreszenz gegen endogenes RAIP in HeLa und MCF7-Zellen zeigte ebenfalls nur relativ schwache Signale (Abb. 4.15). Die geringe endogene Expression von RAIP und die effiziente Apoptoseinduktion bei Überexpression könnten ein Hinweis sein, dass RAIP ein sehr sensitiver Schalter zu proapoptotischen Signalwegen ist.

In Northern-Blots konnte RAIP-mRNA in verschiedener Stärke nachgewiesen werden, am stärksten waren die Signale in Leber und Niere, etwas schächer in Gehirn, Herz- und Skelettmuskel, Plazenta und Lunge (Abb. 4.25). Eine schwache Expression wurde in Thymus, Milz und Dünndarmgewebe gefunden, in Colon und peripherem Blut sehr schwache Signale. RAIP könnte also Gewebe-spezifische Funktionen ausüben. Im Vergleich zu anderen in unserem Labor getesteten Genen in Northern-Blots waren die Signale von RAIP relativ schwach, was sich in deutlich längeren Expositionszeiten, bis ein Signal detektierbar war, bemerkbar machte.

Die Reduktion der endogenen Expression von RAIP durch RNAi war wegen der geringen endogenen RAIP-Mengen schwierig nachzuweisen, konnte aber in zwei unabhängigen Ansätzen gezeigt werden. Die gleichzeitige Transfektion von RAIP mit RAIP-RNAi verhinderte die Überexpression von RAIP (Abb. 4.27), die Quantifizierung der RAIP-mRNA mit LightCycler PCR zeigte einen deutliche Abnahme nach Transfektion mit RNAi (Abb. 4.30). Dennoch zeigten sich keine Veränderungen bezüglich der Apoptose-Induktion durch verschiedene Zytostatika in RNAi behandelten Zellen (Abb. 4.30). Eine essentielle Rolle von RAIP an proapoptotischen Signalen nach

Behandlung mit Zytostatika konnte nicht nachgewiesen werden. Allerdings kann in einem solchen Experiment nur dann eine Reduktion der Apoptose erwartet werden, wenn das proapoptotische Signal hauptsächlich durch RAIP vermittelt und kein alternativer Signalweg vorhanden wäre. Eine Beteiligung von RAIP an proapoptotischen Signalen nach Zytostatika-Behandlung ist daher nicht ausgeschlossen.

5.5 Die Proteinsequenz von RAIP

Einige Proteine, die an apoptotischen Signalwegen beteiligt sind, sind evolutiv konserviert und Homologe existieren in niederen Eukaryonten wie *C.elegans* oder sogar Hefe. Homologe zu RAIP sind dagegen nur bei Säugetieren zu finden (Maus, Ratte, Tab. 4.1 und Abb. 4.3).

Die Proteinsequenz von RAIP weist auch keine Homologie zu bereits bekannten Apoptose-relevanten Proteinen oder Domänen auf. Als einziges Sequenzmerkmal, das eine Verbindung zu Apoptose darstellen könnte, besitzt RAIP drei DXXD-Motive, die Caspase-Schnittstellen sein könnten. Eine dieser Stellen ist identisch mit der Caspase-Schnitstelle von NuMA (*nuclear mitotic aparatus protein* (Hsu und Yeh 1996)). RAIP wird in Anwesenheit von aktiver Caspase-3 abgebaut, allerdings langsamer als das bekannte Caspase-3 Substrat ICAD (Abb. 4.10 A). Eine Mutation (funktionelle Deletion) der NuMA-identischen Caspase-3 Schnittstelle verhindert die Prozessierung von RAIP in Anwesenheit von Caspase-3 nicht und reduziert nur unwesentlich die Apoptoseinduktion durch RAIP (Abb. 4.10 B). An welcher Stelle die Prozessierung von RAIP durch Caspase-3 geschieht und ob diese Prozessierung im Verlauf der RAIP-induzierten Apoptose eine Rolle spielt, ist daher noch unklar. RAIP-Fragmente nach Apoptoseinduktion konnten jedenfalls nicht detektiert werden. Es ist möglich, dass RAIP nach Apoptoseinduktion von aktivierten Caspasen prozessiert wird und RAIP-Fragmente in andere Kompartimente der Zelle translozieren und dort wirken.

In der RAIP-Sequenz befindet sich ein N-terminales Signalpeptid mit möglicher Signalpeptidase-Schnittstelle und eine ebenfalls N-terminale Transmembrandomäne. Sofern das Signalpeptid funktionell ist, wird RAIP im ER für den sekretorischen Pathway synthetisiert, und eine Abspaltung des Signalpeptides würde die N-terminale Transmembrandomäne vom Rest des Proteins trennen. RAIP wurde erst kürzlich in einem *Screen* der Firma Genentech isoliert, in dem nach Proteinen gesucht wurde, die

entweder sezerniert werden oder Transmembrandomänen besitzen und sich daher für die Entwicklung von Medikamenten besonders gut eignen könnten (Clark et al. 2003). Nach den genannten Informationen könnte RAIP im Lumen des ER synthetisiert und anschließend sezerniert werden oder ein Membran-verankertes ER-Protein sein.

5.6 RAIP ist am ER lokalisiert

Das ER gewinnt immer mehr Beachtung als Kompartiment, das neben dem Mitochondrion in frühen Ereignissen der Apoptoseinduktion eine wichtige Rolle spielt. RAIP lokalisiert, wie in Flureszenz-mikroskopischen Untersuchungen (Immun-fluoreszenz gegen endogenes RAIP und überexprimiertes RAIP-HA-Fusionsprotein sowie Fluoreszenz von überexprimiertem RAIP-YFP-Fusionsprotein (Abb. 4.13-Abb. 4.15) gezeigt werden konnte, im oder am ER, bzw. in der ER-Membran. Die Überexpression von RAIP führt zudem zu einer deutlichen Vesikelbildung der ER-Membran. RAIP scheint dabei in oder an den Membranen der Vesikel lokalisiert zu sein, nicht in deren Lumen. Diese Vesikelbildung könnte eine Antwort des ER, eine sogenannte UPR (*unfolded protein response*), auf eine erhöhte Beladung des ER bei Überexpression von RAIP sein. Die UPR führt zunächst zu einer erhöhten Synthese von ER-Proteinen, die eine korrekte Faltung und Modifizierung von Proteinen gewährleisten (wie z.B. Chaperone) und einer verstärkten Synthese von Membranlipiden, um das ER zu vergrössern. Die beobachtete Vesikelbildung könnte also eine Folge der Membranvergrösserung im Rahmen einer UPR darstellen. Reichen diese Reaktionen der Zelle nicht aus, um die Synthese und korrekte Faltung der Proteine im ER innerhalb einer bestimmten Zeit zu gewährleisten, führt eine UPR zur Apoptose.

Es wäre also möglich, dass die Überladung des ER nach RAIP-Überexpression relativ unspezifisch (also unabhängig von der RAIP-Sequenz) Ursache der RAIP-vermittelten Apoptose ist. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass nicht jedes ER-Membran-Protein oder sezernierte Protein bei Überexpression Apoptose induzieren kann. Im *Screen* hätte eine grosse Menge von ER- oder sezernierten Proteinen als dominant Apoptose induzierend isoliert werden müssen, was nicht der Fall war.

Um zu untersuchen, ob eine Lokalisation im oder am ER Voraussetzung für die Apoptoseinduktion durch RAIP ist, wurden Fragmente von RAIP als YFP (*yellow*

fluorescence protein)-Fusionen überexprimiert, so sollten ebenfalls die Apoptose-induzierenden Domänen von RAIP eingegrenzt werden (siehe Abschnitt 4.3.6).

Zunächst wurden die N-terminale Hälfte („N“, $RAIP_{AA1-102}$) sowie die C-terminale Hälfte von RAIP („C“, $RAIP_{AA103-470}$) wie sie nach Caspase-Spaltung an der NuMA-identischen Caspase-Schnittstelle (Position 102, DSL**D**L) entstehen würden, untersucht. Das N-terminale Fragment lokalisierte wie Gesamtlängen-RAIP und induzierte Apoptose, das C-terminale Fragment war gleichmäßig in der Zelle verteilt und induzierte keine Apoptose (Abb. 4.17-4.23). Da die Apoptose-induzierende Eigenschaft von RAIP im N-terminus lokalisiert ist, wurde diese Hälfte in weitere Fragmente zerlegt. Das Signalpeptid und die Transmembrandomäne wurden entfernt, um die Lokalisation zu verändern. Dieses Fragment („3“, $RAIP_{AA31-102}$) induziert weiterhin deutlich Apoptose, entgegen den Erwartungen lokalisiert es in Vesikeln um den Kern, ähnlich wie Gesamtlängen RAIP und das N-terminale Fragment (Abb. 4.17-4.23). Für die ER-Lokalisation von RAIP müssen demnach weitere Signale in der N-terminalen Hälfte vorhanden sein. Das Fragment 3, $RAIP_{AA31-102}$, wurde nochmals an zwei Stellen in zwei Fragmente unterteilt, jeweils die N-terminalen Fragmente induzieren Apoptose („1a“, $RAIP_{AA31-102}$ und „2a”, $RAIP_{AA31-93}$). Diese Fragmente lokalisieren nicht im ER, sondern sind gleichmässig im Zytoplasma verteilt, wie Fluoreszenzbilder zeigen (Abb. 4.17-4.23). Damit wurde die Apoptose-induzierende Domäne auf 63 Aminosäure-Reste eingegrenzt und gleichzeitig gezeigt, dass eine Lokalisation am bzw. im ER und eine Veränderung der ER-Morphologie nicht Voraussetzung für die Apoptose-induzierende Eigenschaft von RAIP ist. Die Apoptose nach Überexpression von RAIP ist also keine unspezifische Antwort der Zelle auf eine Überladung des ER (UPR), sondern ein (Sequenz-)spezifischer Effekt von RAIP. Eine proapoptotische Wirkung am ER ist für die zytoplasmatisch lokalisierten dominant Apoptose-induzierenden Fragmente „1a“ und „2a“ weiterhin möglich, da sie als zytoplasmatische Proteine mit Proteinen am ER interagieren könnten.

Im Gegensatz zu den YFP-Fusionen der kleinen N-terminalen RAIP-Fragmente „1a“ und „2a“ können deren HA-Fusionen nicht in grösseren Mengen exprimiert werden (Abb. 4.19 undAbb. 4.23). Wahrscheinlich werden diese Fragmente in den Zellen schnell degradiert und können daher auch keine Apoptose induzieren. Die Fusion mit dem grösseren YFP-*tag* kann diese kleinen Fragmente offensichtlich stabilisieren (GFP hat

eine relativ lange Halbwertszeit von über 24h in Zellen (Akgul et al. 2000)). Andererseits zeigen die Immunfluoreszenz-Bilder der HA-Fusionen von RAIP (Abb. 4.20) die gleiche RAIP-Lokalisation und Veränderung des ER wie die YFP-Fusionen. Die Veränderung des ER beruht also nicht auf einer Stabilisierung oder Aggregierung von RAIP durch das angehängte YFP.

5.7 RAIP–Interaktionspartner

Interessante Hinweise auf die Wirkungsweise von RAIP und Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen liefern die gefundenen RAIP-Interaktionspartner Ferritin (*heavy chain*, HC), SRp-40 und Sirtuin-7. Diese Proteine interagieren sowohl als überexprimierte und aufgereinigte Proteine im Far-Western-Blot (Abschnitt 4.3.7) als auch in Zellen (Co-Immunpräzipitationen, Abb. 4.24) mit RAIP.

Dabei unterscheiden sich die Interaktionspartner deutlich in ihrer biochemischen Funktion sowie in ihrer Struktur.

Ferritin ist ein Eisen-Speicher-Protein, das einen Komplex aus 24 Einzelmolekülen bildet, das sog. Apoferritin (siehe Abb. 5.1). Ferritin ist nicht nur ein starrer Speicherkomplex, sondern ein reguliertes System, das für die Steuerung des Eisenhaushaltes und des oxidativen Status der Zelle sowie die Neutralisierung von freien Radikalen von Bedeutung ist (Arosio und Levi 2002).

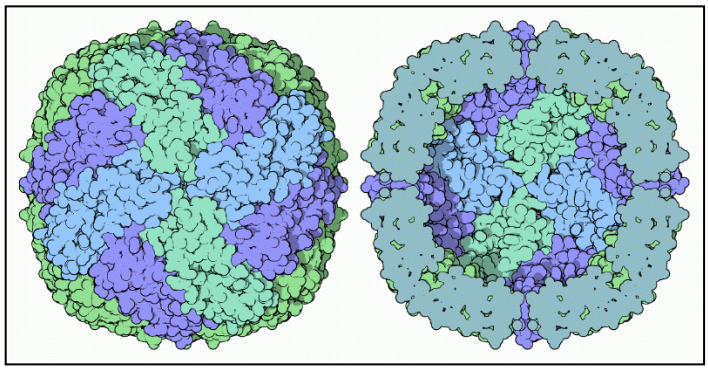


Abb. 5.1 Struktur von Apoferritin: *Apoferritin besteht aus 24 Ferritin-Molekülen, die eine Hohlkugel bilden, in der bis zu 4500 Eisen-Ionen gespeichert werden können (Lawson et al. 1991).*

Es gibt bereits einige Hinweise auf eine Wirkung von Ferritin in der Apoptose. Die Überexpression von Ferritin schützt Zellen vor Apoptose durch verschiedene Stimuli

(Berberat et al. 2003). Während TNF-induzierter Apoptose wird Ferritin 2-fach hochreguliert, und die Überexpression von Ferritin reduziert die TNF-induzierte Apoptose um ca. 50% (Cozzi et al. 2003), die Überexpression von Ferritin führt zu Wachstumsverlangsamung zum Schutz vor oxidativem Stress (Cozzi et al. 2000). Nach myc-Aktivierung (durch TNF, FAS, Serumentzug usw.) werden Eisen-Ionen aus Apoferritin freigesetzt, die Apoptose-Induktion vermitteln (Fassl et al. 2003).
Die Konzentration von freien Radikalen während der Apoptose kann durch Ferritin reduziert werden (Cozzi et al. 2000), und RAIP als direkter Interaktionspartner könnte zur Regulation von Ferritin beitragen. Somit könnte RAIP eine Funktion in der Regulation der freien Radikale in der Apoptose besitzen.

Der RAIP-Interaktionspartner SRp40 gehört zu der Familie der SR (*Serin/Arginin-rich*)-Spleiß-Faktoren (Fu 1995), die RNA binden können und die Rekrutierung anderer Spleiß-Faktoren am Spleißosom fördern (Tacke und Manley 1999).
Bei der Analyse der Daten der humanen Sequenzierprojekte wurde vorhergesagt, dass fast 60% aller humanen Gene alternativ gespleißt werden (Lander et al. 2001), daher ist anzunehmen, dass auch ein grosser Teil der Apoptose-relevanten Gene durch alternatives Spleißen reguliert werden.
Es existieren bereits einige Hinweise für die Beteiligung von Spleißen an der Regulation von apoptotischen Prozessen und bei der Entstehung von Tumoren.
Ein antiapoptotisches humanes Bcl-2 Protein, Bfl-1 existiert in zwei Spleiß-Isoformen, wobei die kleinere Isoform im Zellkern lokalisiert und Bax, Bid und so die Caspasen -3 und -8 inhibieren kann (Ko et al. 2003). Die Expressionslevel verschiedener Spleiß-Varianten des IAP (*inhibitor of apoptosis*) Survivin (Ambrosini et al. 1997) variieren in normalen und Tumorzellen, und dienen als ein Indikator für maligne Tumoren (Yamada et al. 2003). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine weitere Spleiß-Variante von Survivin, Survivin 3B, in einigen Tumoren exprimiert wird und dort evtl. eine andere Funktion ausübt, als regulär gespleißtes Survivin (Badran et al. 2004). Spleißen von pro- und anti-apopototischen Faktoren könnte demnach eine wichtige Rolle bei der Regulation von Apoptose spielen.
Humane *ras* Gene spielen eine zentrale Rolle bei der Verknüpfung von extrazellulären Signalen mit komplexen intrazellulären Signal-Netzwerken, die Zellproliferation,

Differenzierung und Apoptose regulieren (Cox und Der 2003). Das Humane c-H-ras Protoonkogen wird durch alternatives Spleißen reguliert, an dem SRp40 entscheidend beteiligt ist. SRp40 bindet c-H-ras prä-mRNA und ermöglicht so das Spleißen das ansonsten durch hnRNP (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) inhibiert ist, indem es die Anlagerung anderer Spleiß-Faktoren fördert (Guil et al. 2003).

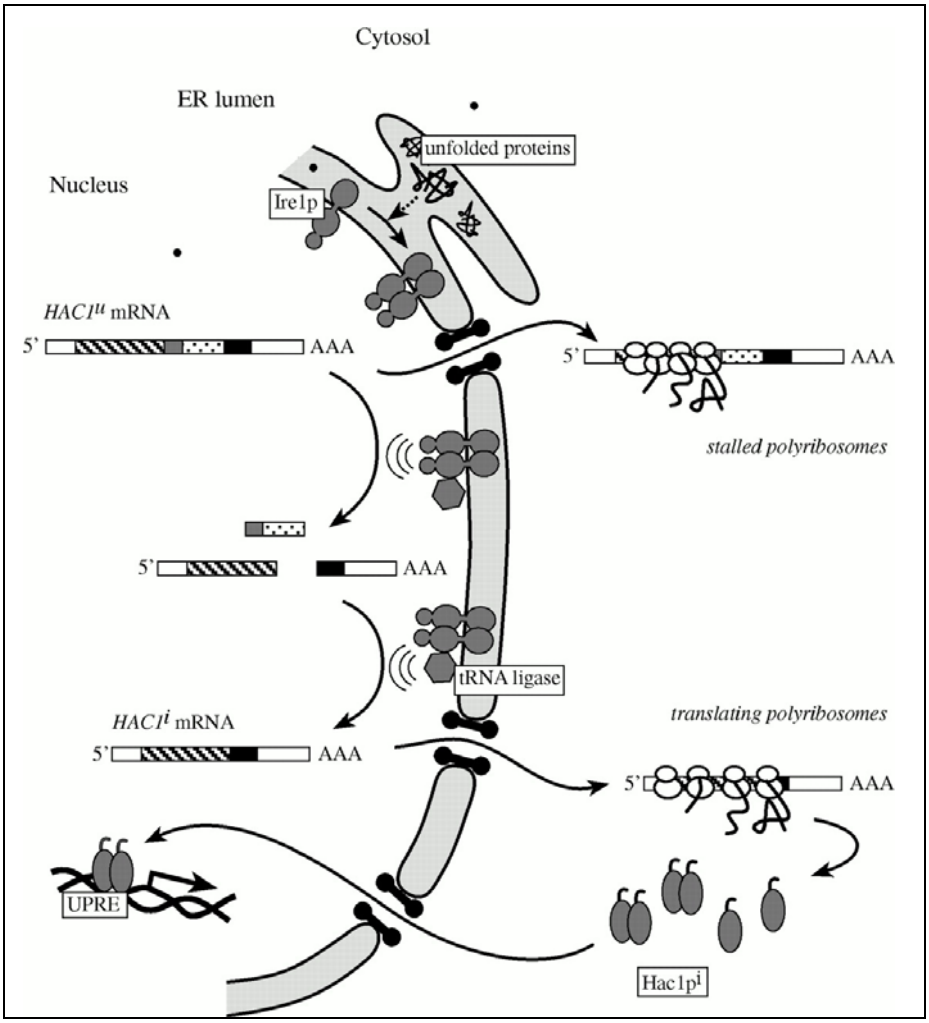


Abb. 5.2 Modell der UPR in Hefe*: Ungefaltete Proteine im ER aktivieren Ire1, das nach Phosphorylierung mit Hilfe der tRNA-Ligase HAC1-mRNA spleißen kann. Dadurch wird eine inhibitorische Sequenz aus der HAC1-mRNA entfernt und HAC1 kann translatiert werden. HAC1 bindet im Kern an UPR-responsive elements (UPRE) und verstärkt die Transkription von UPR-Proteinen (Chapman et al. 1998)*

Interessanterweise wird die *unfolded protein response* (UPR), die bei längerer Dauer Apoptose induziert, in Hefe ebenfalls durch ein Spleiß-Ereignis moduliert. Eine UPR führt zur Aktivierung des ER-Transmembranproteins Ire1, das nach Phosphorylierung

seine Konformation ändert und als Nuklease (zusammen mit der tRNA-Ligase) unabhängig vom Spleißosom die HAC1-mRNA spleißt (Chapman et al. 1998; Niwa et al. 1999; Papa et al. 2003; Sidrauski et al. 1998). So wird eine inhibitorische Sequenz aus der HAC1-mRNA entfernt und HAC1 kann translatiert werden. HAC1 bindet als Transkriptionsfaktor an UPRE (UPR *responsive elements*) und induziert die Transkription verschiedener Gene, die an der UPR beteiligt sind (z.B. Chaperone). Auch in Säugerzellen scheint Spleißen in der UPR eine Rolle zu spielen. Hefe-HAC1 mRNA wird nach Induktion einer UPR in Säugerzellen wie in Hefe-Zellen gespleißt. Säuger-Ire1 wird während einer UPR gespalten, daraufhin akkumulieren Fragmente mit Kinase- und Nuclease-Aktivität im Kern. Die Endoribonuklease-Aktivität von Ire1 wird benötigt, um die mRNA des Transkriptionsfaktior XBP1 (*X-box binding protein*) zu spleißen und so in einen effizienten transkriptionellen Aktivator der UPR zu verwandeln (Calfon et al. 2002); (Lee et al. 2002).
Die direkte Interaktion des proapoptotischen ER-Proteins RAIP (das evtl. an der Vermittlung von proapoptotischen Signalen am ER beteiligt ist) mit dem Spleiß-Faktor SRp40 könnte ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von Spleiß-Mechanismen an der Regulation von proapoptotischen Signalen aus dem ER sein.

Die humanen Sirtuine (SIRT1-7) (Frye 2002; Frye 2000) gehören zu der evolutiv konservierten Familie der SIR2 (*silent information regulator* 2) –Proteine. Das sind NAD^+-abhängige (Histon-) Deacetylasen, die zuerst in Hefe beschrieben wurden (Smith 2002). In Hefen wirkt SIR2 im transkriptionellen *silencing* über die Deacetylierung der Histone H3 und H4, und der damit verbundenen Kondensation der Chromatin-Struktur (repressive Chromatin-Struktur). Ausserdem sind die SIR2-Proteine von Hefe und *C. elegans* beteiligt an der Regulation der Lebensdauer dieser Organismen (Smith 2002). Über die Funktion der humanen SIR2-Homologen, den Sirtuinen, ist noch nicht viel bekannt. Die Wirkungsweise der Sirtuine beschränkt sich sicherlich nicht nur auf die Deacetylierung von Histonen. Auch andere Proteine werden von Histon-Acetyltransferasen (HAT) und Histon-Deacetylasen (HDAC), zu denen die SIR2-Proteine gehören, acetyliert bzw. deacetyliert und so reguliert (ähnlich wie die Regulation durch Phosphorylierung). So stimuliert die Acetylierung von p53 dessen Transkriptionsaktivierung (Luo et al. 2000) und damit Wirkung in Zell-Alterung

(Seneszenz) bzw. Apoptose. Das nächste humane SIR2-Homolog, Sirtuin-1 (SIRT1), lokalisiert im Kern und kann p53 binden und deacetylieren (Langley et al. 2002; Luo et al. 2001; Vaziri et al. 2001). So wird die p53-vermittelte transkriptionelle Aktivierung negativ reguliert und Zellen vor Seneszenz und Apoptose nach DNA-Schädigung und Stress geschützt. Die Überexpression von SIRT1 hemmt die Apoptose nach DNA-Schädigung (Etoposid), oxidativen Stress und Ionisierende Strahlung (Smith 2002).
Da SIR2-Proteine NAD^+-abhängig sind, ist die Reaktion der Zelle abhängig von ihrem metabolischen Zustand. Wenn genügend Reduktionsäquivalente (NAD^+) in der Zelle vorhanden sind, der metabolische Zustand der Zelle also gut ist, bedeutet dies ein Signal gegen Apoptose oder Seneszenz, da p53 deacetyliert und so inhibiert werden kann.
Nicht alle SIR2-Homologe haben eine Funktion als HDAC und nicht alle sind im Kern lokalisiert. Daher gibt es sehr wahrscheinlich viele weitere Proteine, die durch SIR2-Proteine reguliert werden können. So wird z.B. auch der RNA-Polymerase I-Transkriptionsfaktor TAF68 von SIRT1 deacetyliert und die Transkription von rDNA inhibiert (Muth et al. 2001).
Die SIR2-Familien-Proteine sind bisher hauptsächlich in Hefe und *C. elegans* untersucht, die Bedeutung und Wirkungsweise der Sirtuine von Säugetieren ist allerdings weitgehend unbekannt. Sicherlich werden in nächster Zeit einige weitere interessante Erkenntnisse über die Regulation von Proteinen und Signalwegen durch reversible Acetylierung gewonnen und die Bedeutung von SIR2-Proteinen genauer definiert. Die Interaktion von proapoptotischen RAIP mit Sirtuin-7 ist ein wichtiger Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von humanen SIR2-Proteinen an der Regulation von apoptotischen Signalwegen.

Keiner der drei beschriebenen RAIP-Interaktionspartner induzierte nach Überexpression in Zellen selbst Apoptose. Die Kotransfektion mit RAIP hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptose-Induktion durch RAIP, sie wirken weder inhibitorisch noch proapoptotisch (Abb. 4.24 D). Demnach sind sie entweder nicht essentiell für die RAIP-vermittelte Apoptose oder in ausreichender Menge endogen in Zellen vorhanden und daher für die RAIP-vermittelte Apoptose nicht limitierend.
In Abb. 5.3 sind die Interaktionspartner von RAIP und deren bisher bekannte Funktionen kurz zusammengefasst. Die Bedeutung von SRp40 und SIR2-Proteinen liegen in der

Regulation von Genen und Proteinen auf verschiedenen Ebenen. Der Spleiß-Faktor SRp40 reguliert die Transkription (durch Entfernung inhibitorischer Introns) und die Funktion von Genen (alternatives Spleißen). Die Deacetylierung durch SIR2-Proteine kann sowohl die Chromatinstruktur und damit die Genaktivität (durch Deacetylierung von Histonen), als auch die enzymatische Aktivität von Proteinen regulieren. Die Aufgabe von Ferritin liegt in der Regulation des Eisenhaushaltes der Zelle und in der Neutralisierung von freien Radikalen, die in der Apoptose als proapoptotische Faktoren eine Rolle spielen. Für alle drei RAIP-Interaktionspartner ist eine Bedeutung in der Regulation der Apoptose entweder bereits erwiesen oder zumindest denkbar (siehe oben). Die Interaktion mit dem proapoptotischen RAIP könnte neue Anhaltspunkte über die Bedeutung und Funktion dieser Proteine in der Apoptose liefern. Da die RAIP-Interaktionspartner auf verschiedensten Ebenen apoptotische Signale beeinflussen und regulieren, könnte RAIP eine zentrale Rolle in der Integration von Regulatorischen Mechanismen in der Apoptose spielen.

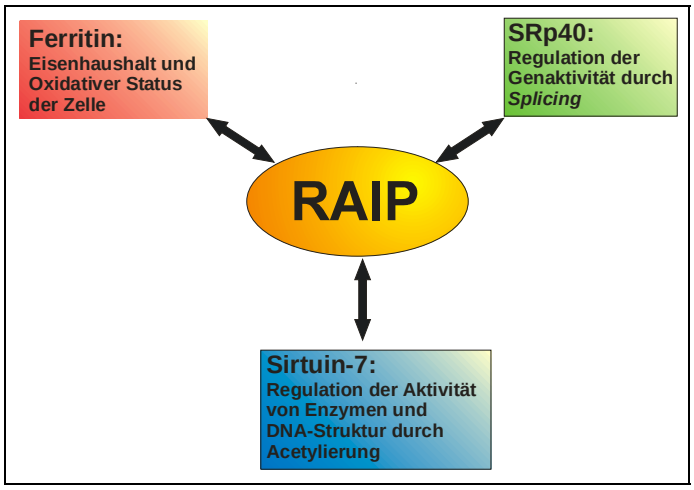


Abb. 5.3 Direkte Interaktionspartner von RAIP: *Ferritin reguliert den Eisenhaushalt der Zelle und deren oxidativen Status und kann so Apoptose regulieren; SRp40 ist ein wichtiger Faktor in der Regulation der Genaktivität durch Spleißen und das SIR2-Protein Sirtuin-7 ist vermutlich beteiligt an der Regulation von Proteinen bzw. DNA-Struktur durch Acetylierung.*

6 Zusammenfassung

Die Apoptose ist ein evolutiv konserviertes zelluläres Programm, das zum regulierten und geordneten Absterben von Zellen führt. Es reagiert auf äußere oder endogene Signale und dient dazu, überflüssige und geschädigte Zellen zu entfernen. Die Fehlregulation der Apoptose ist ein entscheidender Faktor bei der Entstehung vieler Krankheiten wie Krebs oder neurodegenerativen Erkrankungen (z.B. Alzheimer, Parkinson).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein spezieller *Screen* nach dominant Apoptose induzierenden Genen durchgeführt. Es wurden 27 Gene isoliert, die bei Überexpression in 239T-Zellen Apoptose-typische Veränderungen induzierten.

Für weitere Untersuchungen wurden zwei Gene ausgewählt, PSAP und RAIP, deren proapoptotische Eigenschaften bisher unbekannt waren. PSAP (PS-1 *associated protein*) ist ein direkter Interaktionspartner von Presenilin-1 (PS-1), das bei der Entstehung der neurodegnerativen Alzheimer Krankheit eine entscheidende Rolle spielt. RAIP ist ein noch unbeschriebenes Gen, das wegen seiner schnellen und effizienten Apoptoseinduktion ***R**apid **A**poptosis **I**nducing **P**rotein* (RAIP), genannt wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PSAP Apoptose-typische Veränderungen der Zelle, wie die Bildung von apoptotischen Körperchen, DNA-Fragmentierung und Caspase-Aktivierung hevorrufen kann. Die PSAP-vermittelte Apoptose konnte durch Hemmung der Caspasen, durch antiapoptotische Bcl-2 Proteine und duch die Inhibition der PT-Pore (*permeabilty transition pore*) gehemmt werden. Dieses Projekt wurde nicht weiter bearbeitet, nachdem in einer Veröffentlichung von Xu et al. (Xu et al. 2002) PSAP als proapoptotisches Protein beschrieben wurde.

Über die Funktion von RAIP gab es zu Beginn dieser Arbeit noch keinerlei Informationen. Die Überexpression von RAIP führt sehr schnell und effizient zu Apoptose-typischen Veränderungen der Zelle wie die Bildung von apoptotischen Körperchen, Caspase-Aktivierung und DNA-Fragmentierung. Diese Veränderungen sind Caspase-abhängig und benötigen proapoptotische Signale aus dem ER und Mitochondrion, wie durch die Hemmung mit ER- und Mitochondrien-lokalisierten Bcl-2 Varianten gezeigt werden konnte.

RAIP besitzt drei potenzielle Caspase-Schnittstellen und wird *in vitro* in Anwesenheit von aktiver rekombinanter Caspase-3 abgebaut. Es könnte demnach auch unter physiologischen Bedingungen von Caspasen reguliert sein.

Das ER ist bekannt als wichtiges Kompartiment bei der Vermittlung der Apoptose, die molekularen Mechanismen sind bisher allerdings weitgehend unklar. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RAIP am ER lokalisiert ist und die Überexpression von RAIP zu einer deutlichen Veränderung des ER führt. Es bilden sich Vesikel, an deren Membranen RAIP lokalisiert. Diese Veränderung könnte eine Antwort der Zelle auf eine Überladung des ER mit RAIP sein (*unfolded protein response,* UPR). Durch die Untersuchung immer kleinerer RAIP-Fragmente bezüglich ihrer Lokalisation und Apoptose-induzierenden Eigenschaften konnte allerdings ein Fragment aus 63 Aminosäure-Resten der N-terminalen Hälfte von RAIP gefunden werden, das gleichmäßig in der Zelle verteilt ist und weiterhin Apoptose induzieren kann. Die proapoptotische Eigenschaft von RAIP ist also nicht von einer Lokalisation am ER abhängig und sicherlich nicht ausschließlich auf eine Überladung des ER zurückzuführen sondern ist Sequenz-spezifisch.

In der vorliegenden Arbeit konnten auch drei direkte Interaktionspartner von RAIP gefunden werden: Ferritin, SRp40 und Sirtuin-7. Ferritin bildet einen regulierten Speicherkomplex für Eisen-Ionen und kann den oxidativen Status von Zellen beeinflussen und dadurch proapoptotische Signale hemmen. SRp40 ist ein Spleiß-Faktor und interessanterweise ist Spleißen bei der Regulation von apoptotischen Ereignissen, wie z.B. bei der Vermittlung der *unfolded protein response* (UPR) bereits als wichtiger Regulationsschritt bekannt. Sirtuin-7 gehört zu den bisher wenig bekannten humanen Homologen der Hefe SIR2-Proteine, die als NAD^+-abhängige Deacetylasen die Chromatinstruktur sowie die Aktivität von Proteinen regulieren können. Alle drei Interaktionspartner können proapoptotische Signale auf der Ebene der Transkription (Sirtuin-7), Translation (SRp40), Proteinaktivität (Sirtuin-7) oder des oxidativen Zustandes der Zelle (Ferritin) regulieren. Das untersuchte neue proapoptotische Protein RAIP könnte demnach eine zentrale Rolle in der Regulation von proapoptotischen Signalen aus dem ER spielen.

In dieser Arbeit konnte mit der Charakterisierung von RAIP ein Beitrag zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der ER-vermittelten Apoptose geleistet werden.

7 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
5FU	5Fluoruracil
AIF	Apoptosis-inducing factor
ANT	Adenine nucleotide translocator
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-2 agonist of cell death
Bak	Bcl-2 agonist/killer
Bax	Bcl-2 associated X-factor
Bcl	B-cell lymphoma
BFA	Brefeldin A
BH-Domänen:	Bcl-2 homology domains
BLAST	Basic local alignment search tool
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
CAD	Caspase-activated DNase
CARD	Caspase recruitment domain
cDNA	complementary DNA
CIDE	Cell death-inducing DFF45-like effector
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCPIP	Dichlorphenolindophenol
DD	Death domain
DED	Death Effector Domain
DFF	DNA fragmentation factor
DISC	Death inducing signaling complex
DMEM	Dulbeccos modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid

DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiammintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EndoG	Endonuclease G
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	Expressed sequence tag
EtBr	Ethdidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas-associated death domain protein
FasL	Fas-Ligand
FITC	Fluorescin-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FLIP	FLICE (Caspase-8)–inhibitory protein
GFP	Green fluorescent protein
IAP	Inhibitory apoptosis proteins
ICAD	Inhibitor of CAD
ICE	Interleukin 1ß converting enzyme
IFNγ	Interferon gamma
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KSS	Kearns-Sayre syndrome
kV	Kilovolt
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MELAS	Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes
MEM	Minimum essential Medium
mg	Milligramm

min	Minute
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2,5)-diphenyl-
NaAc	Natriumacetat
nm	Nanometer
OD	Optische Diche
ORF	Open reading frame
PAK	Proteinkinase
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PERK	PKR (RNA-activated protein kinase)-like endoplasmic reticulum kinase
pI	Isoelektrischer Punkt
PMS	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTP	Permeability transition pore
RAIP	Rapid apoptosis inducing protein
RING	Really interesting new gene
RNAi	RNA Interference
ROI	Reaktive Sauerstoffintermediate
Rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription und Polymerase-
SDH	Succinatdehydrogenase
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SDS-PAGE:	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese
sec	Sekunden
SERCA	Sarcoplasmatische/endoplasmatische Ca2+-ATPase
SMA	Spinal muscular atrophy
SMAC	Second mitochondrial activator of caspases
sog.	sogenannt
Spike	Small protein with inherhent killing effect
SSCP	Single-strand conformational polymorphism

tBid	truncated Bid
TBS	Tris buffered saline
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin Tetrazoliumbromid
TM	Transmembran
TNF	Tumor necrosis factor
TRADD	TNF receptor associated death domain protein
TRAIL	TNF related apoptosis-inducing ligand
TTFA	Thenoyltrifluoroaceton
ÜN	über Nacht
U	Unit
UPR	Unfolded protein response
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
VDAC	Voltage-dependent anion channel
WT	Wildtyp
XIAP	X-chromosome linked IAP
z.B.	zum Beispiel
zVAD	fmk Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone

8 Literatur

Adams, J. M. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." Science **281**: 1322-6.

Adams, J. M. and S. Cory (2001). "Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family." Trends Biochem Sci **26**: 61-6.

Adams, J. M. and S. Cory (2002). "Apoptosomes: engines for caspase activation." Curr Opin Cell Biol **14**: 715-20.

Akgul, C., D. A. Moulding, M. R. White and S. W. Edwards (2000). "In vivo localisation and stability of human Mcl-1 using green fluorescent protein (GFP) fusion proteins." FEBS Lett **478**: 72-6.

Albayrak , T. (2001). Isolierung und molekularbiologische Charakterisierung von Cytochrom bL und Saip, zweier Apoptose-induzierender Gene. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong and J. Yuan (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." Cell **87**: 171.

Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res **25**: 3389-402.

Ambrosini, G., C. Adida and D. C. Altieri (1997). "A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma." Nat Med **3**: 917-21.

Annis, M. G., N. Zamzami, W. Zhu, L. Z. Penn, G. Kroemer, B. Leber and D. W. Andrews (2001). "Endoplasmic reticulum localized Bcl-2 prevents apoptosis when redistribution of cytochrome c is a late event." Oncogene **20**: 1939-52.

Antonsson, B., S. Montessuit, B. Sanchez and J. C. Martinou (2001). "Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells." J Biol Chem **276**: 11615-23.

Arends, M. J. and A. H. Wyllie (1991). "Apoptosis: mechanisms and roles in pathology." Int. Rev. Exp. Path. **32**: 223-254.

Argiles, J. M., S. Busquets and F. J. Lopez-Soriano (2002). "The role of uncoupling proteins in pathophysiological states." Biochem Biophys Res Commun **293**: 1145-52.

Arosio, P. and S. Levi (2002). "Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage." Free Radic Biol Med **33**: 457-63.

Badran, A., A. Yoshida, K. Ishikawa, T. Goi, A. Yamaguchi, T. Ueda and M. Inuzuka (2004). "Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptopsis gene survivin." Biochem Biophys Res Commun **314**: 902-7.

Bauer, M. K., A. Schubert, O. Rocks and S. Grimm (1999). "Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis." J Cell Biol **147**: 1493-502.

Belka, C., J. Rudner, et al. (2000). "Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis." Oncogene **19**: 1181-90.

Belzacq, A. S., H. L. Vieira, G. Kroemer and C. Brenner (2002). "The adenine nucleotide translocator in apoptosis." Biochimie **84**: 167-76.

Berberat, P. O., M. Katori, et al. (2003). "Heavy chain ferritin acts as an antiapoptotic gene that protects livers from ischemia reperfusion injury." Faseb J **17**: 1724-6.

Bernardi, P., L. Scorrano, R. Colonna, V. Petronilli and F. Di Lisa (1999). "Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues." Eur J Biochem **264**: 687-701.

Boldin, M. P., E. E. Varfolomeev, Z. Pancer, I. L. Mett, J. H. Camonis and D. Wallach (1995). "A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain." J Biol Chem **270**: 7795-8.

Bouillaud, F., D. Ricquier, J. Thibault and J. Weissenbach (1985). "Molecular approach to thermogenesis in brown adipose tissue: cDNA cloning of the mitochondrial uncoupling protein." Proc Natl Acad Sci U S A **82**: 445-8.

Bouillet, P., D. Metcalf, D. C. Huang, D. M. Tarlinton, T. W. Kay, F. Kontgen, J. M. Adams and A. Strasser (1999). "Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity." Science **286**: 1735-8.

Bouillet, P. and A. Strasser (2002). "BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death." J Cell Sci **115**: 1567-74.

Bratton, S. B., G. Walker, S. M. Srinivasula, X. M. Sun, M. Butterworth, E. S. Alnemri and G. M. Cohen (2001). "Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes." Embo J **20**: 998-1009.

Braun, M. Y., B. Lowin, L. French, H. Acha-Orbea and J. Tschopp (1996). "Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease." J Exp Med **183**: 657-61.

Breckenridge, D. G., M. Germain, J. P. Mathai, M. Nguyen and G. C. Shore (2003a). "Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways." Oncogene **22**: 8608-18.

Breckenridge, D. G., M. Stojanovic, R. C. Marcellus and G. C. Shore (2003b). "Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol." J Cell Biol **160**: 1115-27.

Bussow, K., D. Cahill, W. Nietfeld, D. Bancroft, E. Scherzinger, H. Lehrach and G. Walter (1998). "A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library." Nucleic Acids Res **26**: 5007-8.

Calfon, M., H. Zeng, F. Urano, J. H. Till, S. R. Hubbard, H. P. Harding, S. G. Clark and D. Ron (2002). "IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA." Nature **415**: 92-6.

Cecconi, F., G. Alvarez-Bolado, B. I. Meyer, K. A. Roth and P. Gruss (1998). "Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development." Cell **94**: 727-37.

Chai, J., C. Du, J. W. Wu, S. Kyin, X. Wang and Y. Shi (2000). "Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO." Nature **406**: 855-62.

Chapman, R., C. Sidrauski and P. Walter (1998). "Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 459-85.

Cheng, G., R. Ray, D. Dubik, L. Shi, J. Cizeau, R. C. Bleackley, S. Saxena, R. D. Gietz and A. H. Greenberg (1997). "The E1B 19K/Bcl-2-binding Protein Nip3 is a

dimeric mitochondrial protein that activates apoptosis." J. Exp. Med. **186**: 1975-1983.

Chinnaiyan, A. M., C. G. Tepper, M. F. Seldin, K. O'Rourke, F. C. Kischkel, S. Hellbardt, P. H. Krammer, M. E. Peter and V. M. Dixit (1996). "FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis." J Biol Chem **271**: 4961-5.

Cikala, M., B. Wilm, E. Hobmayer, A. Bottger and C. N. David (1999). "Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra." Curr Biol **9**: 959-62.

Clark, H. F., A. L. Gurney, et al. (2003). "The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: a bioinformatics assessment." Genome Res **13**: 2265-70.

Cox, A. D. and C. J. Der (2003). "The dark side of Ras: regulation of apoptosis." Oncogene **22**: 8999-9006.

Cozzi, A., B. Corsi, S. Levi, P. Santambrogio, A. Albertini and P. Arosio (2000). "Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa cells: in vivo role of ferritin ferroxidase activity." J Biol Chem **275**: 25122-9.

Cozzi, A., S. Levi, B. Corsi, P. Santambrogio, A. Campanella, G. Gerardi and P. Arosio (2003). "Role of iron and ferritin in TNFalpha-induced apoptosis in HeLa cells." FEBS Lett **537**: 187-92.

Cryns, V. and J. Yuan (1998). "Proteases to die for." Genes Dev **12**: 1551-70.

Czech, C., G. Tremp and L. Pradier (2000). "Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms." Prog Neurobiol **60**: 363-84.

Denault, J. B. and G. S. Salvesen (2002). "Caspases: keys in the ignition of cell death." Chem Rev **102**: 4489-500.

Deveraux, Q. L., R. Takahashi, G. S. Salvesen and J. C. Reed (1997). "X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases." Nature **388**: 300-4.

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

Earnshaw, W. C., L. M. Martins and S. H. Kaufmann (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." Annu Rev Biochem **68**: 383-424.

Elbashir, S. M., W. Lendeckel and T. Tuschl (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." Genes Dev **15**: 188-200.

Ellis, H. M. and H. R. Horvitz (1986). "Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans." Cell **44**: 817-29.

Emanuelsson, O., H. Nielsen, S. Brunak and G. von Heijne (2000). "Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence." J Mol Biol **300**: 1005-16.

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

Erdtmann, L., N. Franck, H. Lerat, J. Le Seyec, D. Gilot, I. Cannie, P. Gripon, U. Hibner and C. Guguen-Guillouzo (2003). "The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis." J Biol Chem **278**: 18256-64.

Fadeel, B., B. Gleiss, K. Hogstrand, J. Chandra, T. Wiedmer, P. J. Sims, J. I. Henter, S. Orrenius and A. Samali (1999). "Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression." Biochem Biophys Res Commun **266**: 504-11.

Fassl, S., C. Leisser, et al. (2003). "Transferrin ensures survival of ovarian carcinoma cells when apoptosis is induced by TNFalpha, FasL, TRAIL, or Myc." Oncogene **22**: 8343-55.

Ferri, K. F. and G. Kroemer (2001). "Organelle-specific initiation of cell death pathways." Nat Cell Biol **3**: E255-63.

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

Frohlich, K. U. and F. Madeo (2000). "Apoptosis in yeast--a monocellular organism exhibits altruistic behaviour." FEBS Lett **473**: 6-9.

Frye, R. (2002). ""SIRT8" expressed in thyroid cancer is actually SIRT7." Br J Cancer **87**: 1479.

Frye, R. A. (2000). "Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins." Biochem Biophys Res Commun **273**: 793-8.

Fu, X. D. (1995). "The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors." RNA **1**: 663-80.

Gasser, S. M. and M. M. Cockell (2001). "The molecular biology of the SIR proteins." Gene **279**: 1-16.

Grimm, S., E. J. Weinstein, I. M. Krane and P. Leder (1998). "Neu differentiation factor (NDF), a dominant oncogene, causes apoptosis in vitro and in vivo." J Exp Med **188**: 1535-9.

Gross, A., J. Jockel, M. C. Wei and S. J. Korsmeyer (1998). "Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis." Embo J **17**: 3878-85.

Guil, S., R. Gattoni, M. Carrascal, J. Abian, J. Stevenin and M. Bach-Elias (2003). "Roles of hnRNP A1, SR proteins, and p68 helicase in c-H-ras alternative splicing regulation." Mol Cell Biol **23**: 2927-41.

Häcki, J., L. Egger, L. Monney, S. Conus, R. Rossé, I. Fella and C. Borner (2000). "Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2." Oncogene **19**: 2286-2295.

Hacki, J., L. Egger, L. Monney, S. Conus, T. Rosse, I. Fellay and C. Borner (2000). "Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2." Oncogene **19**: 2286-95.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**: 57-70.

Haraguchi, M., S. Torii, S. Matsuzawa, Z. Xie, S. Kitada, S. Krajewski, H. Yoshida, T. W. Mak and J. C. Reed (2000). "Apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1)-independent cell death suppression by Bcl-2." J Exp Med **191**: 1709-20.

Hawkins, T. E., D. Das, B. Young and S. E. Moss (2002). "DT40 cells lacking the Ca2+-binding protein annexin 5 are resistant to Ca2+-dependent apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **99**: 8054-9.

Hirata, H., A. Takahashi, S. Kobayashi, S. Yonehara, H. Sawai, T. Okazaki, K. Yamamoto and M. Sasada (1998). "Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis." J Exp Med **187**: 587-600.

Honarpour, N., C. Du, J. A. Richardson, R. E. Hammer, X. Wang and J. Herz (2000). "Adult Apaf-1-deficient mice exhibit male infertility." Dev Biol **218**: 248-58.

Honarpour, N., S. L. Gilbert, B. T. Lahn, X. Wang and J. Herz (2001). "Apaf-1 deficiency and neural tube closure defects are found in fog mice." Proc Natl Acad Sci U S A **98**: 9683-7.

Hsu, H. L. and N. H. Yeh (1996). "Dynamic changes of NuMA during the cell cycle and possible appearance of a truncated form of NuMA during apoptosis." J Cell Sci **109**: 277-88.

Hutchins, J. B. and S. W. Barger (1998). "Why neurons die: cell death in the nervous system." Anat Rec **253**: 79-90.

Inohara, N., T. Koseki, S. Chen, X. Wu and G. Nunez (1998). "CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor." Embo J **17**: 2526-33.

Jaattela, M. (1999). "Escaping cell death: survival proteins in cancer." Exp Cell Res **248**: 30-43.

Joza, N., S. A. Susin, et al. (2001). "Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death." Nature **410**: 549-54.

Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, P. Seiler, B. Odermatt, K. J. Olsen, E. R. Podack, R. M. Zinkernagel and H. Hengartner (1994a). "Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice." Nature **369**: 31-7.

Kagi, D., F. Vignaux, B. Ledermann, K. Burki, V. Depraetere, S. Nagata, H. Hengartner and P. Golstein (1994b). "Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity." Science **265**: 528-30.

Kaufmann, S. H. and W. C. Earnshaw (2000). "Induction of apoptosis by cancer chemotherapy." Exp Cell Res **256**: 42-9.

Kaufmann, S. H. and M. O. Hengartner (2001). "Programmed cell death: alive and well in the new millennium." Trends Cell Biol **11**: 526-34.

Kerr, J. F., C. M. Winterford and B. V. Harmon (1994). "Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy." Cancer **73**: 2013-26.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**: 239-57.

Kirby, K. S. (1957). "A new method for the isolation of deoxyribonucleotide acids: evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acids and protein." Biochem. J. **66**: 495-504.

Ko, J. K., M. J. Lee, S. H. Cho, J. A. Cho, B. Y. Lee, J. S. Koh, S. S. Lee, Y. H. Shim and C. W. Kim (2003). "Bfl-1S, a novel alternative splice variant of Bfl-1, localizes in the nucleus via its C-terminus and prevents cell death." Oncogene **22**: 2457-65.

Krammer, P. H. (2000). "CD95's deadly mission in the immune system." Nature **407**: 789-95.

Kroemer, G. and Reed (2000). "Mitochondrial control of cell death." Nature Medicine **6(5)**: 513-9.

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

Kuida, K., T. F. Haydar, C. Y. Kuan, Y. Gu, C. Taya, H. Karasuyama, M. S. Su, P. Rakic and R. A. Flavell (1998). "Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9." Cell **94**: 325-37.

Kuida, K., T. S. Zheng, S. Na, C. Kuan, D. Yang, H. Karasuyama, P. Rakic and R. A. Flavell (1996). "Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice." Nature **384**: 368-72.

Lander, E. S., L. M. Linton, et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**: 860-921.

Langley, E., M. Pearson, M. Faretta, U. M. Bauer, R. A. Frye, S. Minucci, P. G. Pelicci and T. Kouzarides (2002). "Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence." EMBO J **21**: 2383-96.

Lawson, D. M., P. J. Artymiuk, et al. (1991). "Solving the structure of human H ferritin by genetically engineering intermolecular crystal contacts." Nature **349**: 541-4.

Lazebnik, Y. A., S. H. Kaufmann, S. Desnoyers, G. G. Poirier and W. C. Earnshaw (1994). "Cleavage of poly (ADP-ribose)polymerase by a proteinase with properties like ICE." Nature **371**: 346-347.

Le Quoc, K. and D. L. Quoc (1988). "Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability: importance of the orientation of the nucleotide binding site." Arch. Biochem. Biophys.: 249-257.

Lee, K., W. Tirasophon, X. Shen, M. Michalak, R. Prywes, T. Okada, H. Yoshida, K. Mori and R. J. Kaufman (2002). "IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response." Genes Dev **16**: 452-66.

Lee, S. T., K. P. Hoeflich, G. W. Wasfy, J. R. Woodgett, B. Leber, D. W. Andrews, D. W. Hedley and L. Z. Penn (1999). "Bcl-2 targeted to the endoplasmic reticulum can inhibit apoptosis induced by Myc but not etoposide in Rat-1 fibroblasts." Oncogene **18**: 3520-3528.

Letunic, I., L. Goodstadt, et al. (2002). "Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource." Nucleic Acids Res **30**: 242-4.

Li, L. Y., X. Luo and X. Wang (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." Nature **412**: 95-9.

Lindsten, T., A. J. Ross, et al. (2000). "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues." Mol Cell **6**: 1389-99.

Liu, Q. A. and M. O. Hengartner (1999). "The molecular mechanism of programmed cell death in C. elegans." Ann N Y Acad Sci **887**: 92-104.

Liu, X., H. Zou, C. Slaughter and X. Wang (1997). "DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis." Cell **89**: 175-84.

Lockshin, R. A. and C. M. Williams (1964). "Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths." J Insect Physiol **10**: 643-649.

Loeffler, M. and G. Kroemer (2000). "The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita." Exp Cell Res **256**: 19-26.

Loetscher, H., U. Deuschle, M. Brockhaus, D. Reinhardt, P. Nelboeck, J. Mous, J. Grunberg, C. Haass and H. Jacobsen (1997). "Presenilins are processed by caspase-type proteases." J Biol Chem **272**: 20655-9.

Lugovskoy, A. A., P. Zhou, J. J. Chou, J. S. McCarty, P. Li and G. Wagner (1999). "Solution structure of the CIDE-N domain of CIDE-B and a model for CIDE-N/CIDE-N interactions in the DNA fragmentation pathway of apoptosis." Cell **99**: 747-55.

Luo, J., A. Y. Nikolaev, S. Imai, D. Chen, F. Su, A. Shiloh, L. Guarente and W. Gu (2001). "Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress." Cell **107**: 137-48.

Luo, J., F. Su, D. Chen, A. Shiloh and W. Gu (2000). "Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis." Nature **408**: 377-81.

Martinou, J. C. and D. R. Green (2001). "Breaking the mitochondrial barrier." Nat Rev Mol Cell Biol **2**: 63-7.

McLaughlin, R., C. J. Kelly, E. Kay and D. Bouchier-Hayes (2001). "The role of apoptotic cell death in cardiovascular disease." Ir J Med Sci **170**: 132-40.

Miramar, M. D., P. Costantini, et al. (2001). "NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor." J Biol Chem **276**: 16391-8.

Mund, T., A. Gewies, N. Schoenfeld, M. K. Bauer and S. Grimm (2003). "Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum." Faseb J **17**: 696-8.

Muth, V., S. Nadaud, I. Grummt and R. Voit (2001). "Acetylation of TAF(I)68, a subunit of TIF-IB/SL1, activates RNA polymerase I transcription." EMBO J **20**: 1353-62.

Nakagawa, T., H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B. A. Yankner and J. Yuan (2000). "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta." Nature **403**: 98-103.

Nechushtan, A., C. L. Smith, I. Lamensdorf, S. H. Yoon and R. J. Youle (2001). "Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis." J Cell Biol **153**: 1265-76.

Negre-Salvayre, A., C. Hirtz, G. Carrera, R. Cazenave, M. Troly, R. Salvayre, L. Penicaud and L. Casteilla (1997). "A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation." Faseb J **11**: 809-15.

Neudecker, F. and S. Grimm (2000). "High-throughput method for isolating plasmid DNA with reduced lipopolysaccharide content." Biotechniques **28**: 107-9.

Nguyen, M., A. D. Breckenridge and G. C. Shore (2000). "Caspase-Resistant BAP31 Inhibits Fas-Mediated Apoptotic membrane Fragmentation and Release of Cytochrome c from Mitochondria." Molecular and Cellular Biology **20**: 6731-6740.

Nicholson, D. W. and N. A. Thornberry (1997). "Caspases: killer proteases." Trends Biochem Sci **22**: 299-306.

Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak and G. von Heijne (1997). "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites." Protein Eng **10**: 1-6.

Niwa, M., C. Sidrauski, R. J. Kaufman and P. Walter (1999). "A role for presenilin-1 in nuclear accumulation of Ire1 fragments and induction of the mammalian unfolded protein response." Cell **99**: 691-702.

Nutt, L. K., A. Pataer, J. Pahler, B. Fang, J. Roth, D. J. McConkey and S. G. Swisher (2002). "Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca2+ stores." J Biol Chem **277**: 9219-25.

Oltvai, Z. N., C. L. Milliman and S. J. Korsmeyer (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." Cell **74**: 609-19.

Papa, F. R., C. Zhang, K. Shokat and P. Walter (2003). "Bypassing a kinase activity with an ATP-competitive drug." Science **302**: 1533-7.

Passer, B. J., L. Pellegrini, P. Vito, J. K. Ganjei and L. D'Adamio (1999). "Interaction of Alzheimer's presenilin-1 and presenilin-2 with Bcl-X(L). A potential role in modulating the threshold of cell death." J Biol Chem **274**: 24007-13.

Peitsch, M. C., H. G. Mannherz and J. Tschopp (1994). "The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death?" Trends Cell Biol. **4**: 37-41.

Puthalakath, H., D. C. Huang, L. A. O'Reilly, S. M. King and A. Strasser (1999). "The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex." Mol Cell **3**: 287-96.

Raff, M. C. (1992). "Social controls on cell survival and cell death." Nature **356**: 397-400.

Rao, R. V., S. Castro-Obregon, H. Frankowski, M. Schuler, V. Stoka, G. del Rio, D. E. Bredesen and H. M. Ellerby (2002). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway." J Biol Chem **277**: 21836-42.

Rathmell, J. C. and C. B. Thompson (2002). "Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease." Cell **109**: S97-107.

Rheaume, E., L. Y. Cohen, F. Uhlmann, C. Lazure, A. Alam, J. Hurwitz, R. P. Sekaly and F. Denis (1997). "The large subunit of replication factor C is a substrate for caspase-3 in vitro and is cleaved by a caspase-3-like protease during Fas-mediated apoptosis." Embo J **16**: 6346-54.

Richardson, H. and S. Kumar (2002). "Death to flies: Drosophila as a model system to study programmed cell death." J Immunol Methods **265**: 21-38.

Rizzuto, R., P. Pinton, D. Ferrari, M. Chami, G. Szabadkai, P. J. Magalhaes, F. Di Virgilio and T. Pozzan (2003). "Calcium and apoptosis: facts and hypotheses." Oncogene **22**: 8619-27.

Rudner, J., A. Lepple-Wienhues, W. Budach, J. Berschauer, B. Friedrich, S. Wesselborg, K. Schulze-Osthoff and C. Belka (2001). "Wild-type, mitochondrial and ER-restricted Bcl-2 inhibit DNA damage-induced apoptosis but do not affect death receptor-induced apoptosis." J Cell Sci **114**: 4161-72.

Saito, M., S. J. Korsmeyer and P. H. Schlesinger (2000). "BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes." Nat Cell Biol **2**: 553-5.

Sambrook, J., R. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor.

Saraste, A. and K. Pulkki (2000). "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis." Cardiovasc Res **45**: 528-37.

Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Krammer and M. E. Peter (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." Embo J **17**: 1675-87.

Scaffidi, C., S. Kirchhoff, P. H. Krammer and M. E. Peter (1999). "Apoptosis signaling in lymphocytes." Curr Opin Immunol **11**: 277-85.

Scherhammer, V. (2004). Dissertation.

Schubert, A. and S. Grimm (2004). "Cyclophilin D, a component of the permeability transition-pore, is an apoptosis repressor." Cancer Res **64**: 85-93.

Schultz, J., F. Milpetz, P. Bork and C. P. Ponting (1998). "SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains." Proc Natl Acad Sci U S A **95**: 5857-64.

Scorrano, L., S. A. Oakes, J. T. Opferman, E. H. Cheng, M. D. Sorcinelli, T. Pozzan and S. J. Korsmeyer (2003). "BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca2+: a control point for apoptosis." Science **300**: 135-9.

Screaton, G. R., J. F. Caceres, A. Mayeda, M. V. Bell, M. Plebanski, D. G. Jackson, J. I. Bell and A. R. Krainer (1995). "Identification and characterization of three members of the human SR family of pre-mRNA splicing factors." Embo J **14**: 4336-49.

Sedlak, T. W., Z. N. Oltvai, E. Yang, K. Wang, L. H. Boise, C. B. Thompson and S. J. Korsmeyer (1995). "Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax." Proc Natl Acad Sci U S A **92**: 7834-8.

Selkoe, D. J. (1997). "Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments." Science **275**: 630-1.

Shi, Y. (2002). "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." Mol Cell **9**: 459-70.

Shimizu, S., T. Ide, T. Yanagida and Y. Tsujimoto (2000a). "Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c." J Biol Chem **275**: 12321-5.

Shimizu, S., A. Konishi, T. Kodama and Y. Tsujimoto (2000b). "BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 3100-5.

Sidrauski, C., R. Chapman and P. Walter (1998). "The unfolded protein response: an intracellular signalling pathway with many surprising features." Trends Cell Biol **8**: 245-9.

Skulachev, V. P. (2002). "Programmed death in yeast as adaptation?" FEBS Lett **528**: 23-6.

Smith, J. (2002). "Human Sir2 and the 'silencing' of p53 activity." Trends Cell Biol **12**: 404-6.

Solomon, M., B. Belenghi, M. Delledonne, E. Menachem and A. Levine (1999). "The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants." Plant Cell **11**: 431-44.

Song, Q., S. P. Lees Miller, et al. (1996). "DN-a-dependent protein kinase catalytic subunit: a target for an ICE-like protease in apoptosis." EMBO J. **15**: 3238-3246.

Srinivasula, S. M., R. Hegde, et al. (2001). "A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis." Nature **410**: 112-6.

Strasser, A., D. C. Huang and D. L. Vaux (1997). "The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumourigenesis and resistance to chemotherapy." Biochim Biophys Acta **1333**: F151-78.

Strasser, A., L. O'Connor and V. M. Dixit (2000). "Apoptosis signaling." Annu Rev Biochem **69**: 217-45.

Strausberg, R. L., E. A. Feingold, et al. (2002). "Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences." Proc Natl Acad Sci U S A **99**: 16899-903. Epub 2002 Dec 11.

Stroh, C. and K. Schulze-Osthoff (1998). "Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates." Cell Death Differ **5**: 997-1000.

Susin, S. A., H. K. Lorenzo, et al. (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." Nature **397**: 441-6.

Suzuki, Y., Y. Imai, H. Nakayama, K. Takahashi, K. Takio and R. Takahashi (2001). "A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death." Mol Cell **8**: 613-21.

Tacke, R. and J. L. Manley (1999). "Functions of SR and Tra2 proteins in pre-mRNA splicing regulation." Proc Soc Exp Biol Med **220**: 59-63.

Taimen, P. and M. Kallajoki (2003). "NuMA and nuclear lamins behave differently in Fas-mediated apoptosis." J Cell Sci **116**: 571-83.

Tautz and R. M (1983). "An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels." Anal Biochem. **132 (1)**: 14-9.

Thome, M., P. Schneider, et al. (1997). "Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors." Nature **386**: 517-521.

Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." Science **267**: 1456-62.

Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." Science **281**: 1312-6.

Tittel, J. N. and H. Steller (2000). "A comparison of programmed cell death between species." Genome Biol **1**: REVIEWS0003.

Tsujimoto, Y., L. R. Finger, J. Yunis, P. C. Nowell and C. M. Croce (1984). "Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation." Science **226**: 1097-9.

Tsujimoto, Y. and S. Shimizu (2002). "The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis." Biochimie **84**: 187-93.

Vaux, D. L., S. Cory and J. M. Adams (1988). "Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells." Nature **335**: 440-2.

Vaziri, H., S. K. Dessain, E. Ng Eaton, S. I. Imai, R. A. Frye, T. K. Pandita, L. Guarente and R. A. Weinberg (2001). "hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase." Cell **107**: 149-59.

Venter, J. C., M. D. Adams, et al. (2001). "The sequence of the human genome." Science **291**: 1304-51.

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

Vito, P., T. Ghayur and L. D'Adamio (1997). "Generation of anti-apoptotic presenilin-2 polypeptides by alternative transcription, proteolysis, and caspase-3 cleavage." J Biol Chem **272**: 28315-20.

Voehringer, D. W., D. L. Hirschberg, J. Xiao, Q. Lu, M. Roederer, C. B. Lock, L. A. Herzenberg and L. Steinman (2000). "Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 2680-5.

Wang, G. Q., B. R. Gastman, et al. (2001). "A role for mitochondrial Bak in apoptotic response to anticancer drugs." J Biol Chem **276**: 34307-17.

Wang, X. (2001). "The expanding role of mitochondria in apoptosis." Genes Dev **15**: 2922-33.

Watanabe-Fukunaga, R., C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and S. Nagata (1992). "Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis." Nature **356**: 314-7.

Wei, M. C., W. X. Zong, et al. (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." Science **292**: 727-30.

Wolter, K. G., Y. T. Hsu, C. L. Smith, A. Nechushtan, X. G. Xi and R. J. Youle (1997). "Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis." J Cell Biol **139**: 1281-92.

Xu, X., Y. Shi, X. Wu, P. Gambetti, D. Sui and M. Z. Cui (1999). "Identification of a novel PSD-95/Dlg/ZO-1 (PDZ)-like protein interacting with the C terminus of presenilin-1." J Biol Chem **274**: 32543-6.

Xu, X., Y. C. Shi, W. Gao, G. Mao, G. Zhao, S. Agrawal, G. M. Chisolm, D. Sui and M. Z. Cui (2002). "The novel presenilin-1-associated protein is a proapoptotic mitochondrial protein." J Biol Chem **277**: 48913-22.

Xue, D. and H. R. Horvitz (1997). "Caenorhabditis elegans CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor." Nature **390**: 305-8.

Yamada, Y., T. Kuroiwa, T. Nakagawa, Y. Kajimoto, T. Dohi, H. Azuma, M. Tsuji, K. Kami and S. Miyatake (2003). "Transcriptional expression of survivin and its splice variants in brain tumors in humans." J Neurosurg **99**: 738-45.

Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C. N. Kim, A. M. Ibrado, J. Cai, T. I. Peng, D. P. Jones and X. Wang (1997). "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked." Science **275**: 1129-32.

Yang, X., H. Y. Chang and D. Baltimore (1998). "Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization." Mol. Cell **1**: 319-25.

Yang, X., L. Wei, C. Tang, R. Slack, E. Montgomery and M. Lippman (2000). "KAI1 protein is down-regulated during the progression of human breast cancer." Clin Cancer Res **6**: 3424-9.

Yoshida, H., Y. Y. Kong, R. Yoshida, A. J. Elia, A. Hakem, R. Hakem, J. M. Penninger and T. W. Mak (1998). "Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development." Cell **94**: 739-50.

Youdim, M. B. and M. Weinstock (2001). "Molecular basis of neuroprotective activities of rasagiline and the anti-Alzheimer drug TV3326 [(N-propargyl-(3R)aminoindan-5-YL)-ethyl methyl carbamate]." Cell Mol Neurobiol **21**: 555-73.

Youdim, M. B., M. Weinstock, S. Shimizu, Y. Shinohara and Y. Tsujimoto (2001). "Molecular basis of neuroprotective activities of rasagiline and the anti-Alzheimer drug TV3326 [(N-propargyl-(3R)aminoindan-5-YL)-ethyl methyl carbamate]

Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator." Cell Mol Neurobiol **21**: 555-73.

Yuan, J., S. Shaham, S. Ledoux, H. M. Ellis and H. R. Horvitz (1993). "The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme." Cell **75**: 641-52.

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

Zong, W. X., C. Li, G. Hatzivassiliou, T. Lindsten, Q. C. Yu, J. Yuan and C. B. Thompson (2003). "Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis." J Cell Biol **162**: 59-69.

Zong, W. X., T. Lindsten, A. J. Ross, G. R. MacGregor and C. B. Thompson (2001). "BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak." Genes Dev **15**: 1481-6.

Zörnig, M., A. Hueber, W. Baum and G. Evan (2001). "Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis." Biochim Biophys Acta **1551**: F1-37.

Zou, H., Y. Li, X. Liu and X. Wang (1999). "An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9." J Biol Chem **274**: 11549-56.

Zuzarte-Luis, V. and J. M. Hurle (2002). "Programmed cell death in the developing limb." Int J Dev Biol **46**: 871-6.

9 Lebenslauf

Name:	BRAZIULIS, Erik Roland	
Geboren:	09.02.1972 in Friedrichshafen	
Nationalität:	Deutsch	
Wohnort:	Stöberlstr. 50, 80686 München	
Schulausbildung:	1978-1982	Grundschule Bodenseeschule, Friedrichshafen
	1982-1991	Graf Zeppelin Gymnasium, Friedrichshafen
Abitur:	1991	
Zivildienst:	1991-1992	Kreiskrankenhaus München Pasing
Studium:	1993-1998	Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg Universität Mainz
Diplomarbeit:	1998	„Klonierung und Sequenzierung von Keratinen der Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss*“
Praktikum	1998/1999	University of Cape Town (UCT), Südafrika
Promotion:	1999-2004	Ludwigs-Maximilians-Universität München (LMU) und Max-Planck-Insitut für Biochemie Arbeitsgruppe Dr. Stefan Grimm: „Programmierter Zelltod“ (Apoptose)

Veröffentlichungen

Schaffeld M, Haberkamp M, Braziulis E, Lieb B, Markl J.: *Type II keratin cDNAs from the rainbow trout: implications for keratin evolution. Differentiation. 2002 Aug;70(6):292-9.*

Scherhammer V*, Albayrak T*, Schoenfeld N, Braziulis E, Mund T, Bauer MK, Scheffler IE, Grimm S.: *The tumor suppressor cybL, a component of the respiratory chain, mediates apoptosis induction. Mol Biol Cell. 2003 Aug;14(8):3082-96. Epub 2003 May 18*
* Gleichberechtigte Erstautoren

Braziulis E, Gewies A, Mund T, Schönfeld N, Bauer MK, Grimm S.:*Characterization of RAIP, a new proapoptotic Protein localized at the ER.*
Manuskript in Vorbereitung

Patent:

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