

**GEORG SPEYER HAUS**  
CHEMOTHERAPEUTISCHES FORSCHUNGSINSTITUT



**Molekulare und funktionelle Analyse  
des neu identifizierten APAF-1 bindenden,  
pro-apoptotisch wirkenden Proteins CABY**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
Vorgelegt dem Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (14)  
der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main



Von

**Robert Pick**

Aus Erkrath

**Frankfurt am Main, Februar 2006**

(DF 1)

*Meinen Eltern gewidmet*

*Dr. med. Alena Pick, geb. Domes*

*Dr. med. Dimitrij Pick*

## **Danksagung**

Für den erfolgreichen Abschluß der vorliegenden Arbeit schulde ich vielen Menschen meinen herzlichen Dank.

An erster Stelle möchte ich mich vor allen bei meinen Eltern für ihre kontinuierliche Unterstützung bedanken, ohne die dieser Abschnitt meines Lebens nicht möglich gewesen wäre.

Großen Dank schulde ich speziell dem Chef, Dr. Martin Zörnig, der mir viel Geduld und Vertrauen entgegengebracht hat. Neben seinen Anregungen und Ideen gab er mir die Gelegenheit und Motivation, meine eigenen Vorstellungen umzusetzen. Darüber hinaus bedanke ich mich bei sämtlichen Mitgliedern und Ehemaligen der AG Zörnig, mit denen ich im Laufe der Doktorarbeit zusammengearbeitet habe. Insbesondere möchte ich hierbei Susanne Bösser („Es ist das T!“), Dr. Wiebke Baum („Chefin!“) und Dr. Ina Oehme („Jetzt setzen wir uns erstmal hin!“) erwähnen. Die Zusammenarbeit mit ihnen war eine wichtige Voraussetzung für das Gelingen der Arbeit. In oft kontrovers geführten Diskussionen haben sie mir wertvolle Anregungen und fundierte Empfehlungen für meine wissenschaftliche Arbeit gegeben. Ihre konstruktive Kritik und tatkräftige Unterstützung haben zur erfolgreichen Durchführung dieser Doktorarbeit beigetragen.

Für die Betreuung und Unterstützung meiner Promotion und die Übernahme der Gutachten möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Bernd Ludwig und Prof. Dr. Winfried Wels bedanken. Last but not least gilt mein besonderer Dank Melanie Rothley (AG PD Dr. Jonathan Sleeman, Forschungszentrum Karlsruhe) für die sympathische Betreuung und Einführung in die Hybridoma Technologie.

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Dissertation selbständig verfasst worden ist und daß keine weiteren Hilfsmittel und Quellen als die aufgeführten verwendet worden sind. Entlehnungen aus anderen Schriften sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher Weise noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Frankfurt am Main, den .....

Robert Pick

Vom Fachbereich 14 (Biochemie, Chemie und Pharmazie)  
der Johann Wolfgang Goethe Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

Betreuer der Arbeit: Dr. M. Zörnig

Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig  
Prof. Dr. W. Wels

Datum der Disputation: .....

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>VI</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY</b>	<b>1</b>
<b><u>I. EINLEITUNG</u></b>	<b><u>7</u></b>
<b>1.1 Der apoptotische Zelltod</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Evolutionär konservierte apoptotische Signalwege</b>	<b>9</b>
<b>1.3 Caspasen bilden die zentrale Apoptose-Maschinerie</b>	<b>11</b>
<b>1.4 Signalwege der Apoptose in Typ I und Typ II Zellen</b>	<b>14</b>
<b>1.5 Regulation der mitochondrialen Apoptose durch Proteine der Bcl-2 Familie</b>	<b>17</b>
<b>1.6 Bildung des Apoptosom Komplexes</b>	<b>21</b>
<b>1.7 Regulation der Apoptosom vermittelten Caspase Aktivierung</b>	<b>24</b>
1.7.1 Inhibition von Caspase Aktivität durch Mitglieder der IAP Familie	24
1.7.2 Mitochondriale Regulation von IAPs	26
1.7.3 Die PI3K/ AKT Signalkaskade	27
1.7.4 Die anti-apoptotische Wirkung von Hitzeschockproteinen	29
<b>1.8 Mitochondrial induzierte, Caspasen-unabhängige Mechanismen der apoptotischen Signaltransduktion</b>	<b>30</b>
<b>1.9 Fehlregulation der intrinsischen apoptotischen Signalübertragung in humanen Tumoren</b>	<b>31</b>
<b>1.10 Aufgabenstellung und Zielsetzung dieser Arbeit</b>	<b>34</b>
<b><u>II. MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b><u>35</u></b>
<b>2.1 Geräte</b>	<b>35</b>
2.1.1 Zentrifugen	35
2.1.2 Inkubatoren	35
2.1.3 Heizblöcke	35
2.1.4 Netzgeräte	35
2.1.5 Elektrophorese-/ Blotting-Apparaturen	36
2.1.6 Sonstige	36

<b>2.2</b>	<b>Chemikalien und Materialien</b>	<b>37</b>
2.2.1	Kits	40
2.2.2	Häufig verwendete Lösungen	40
2.2.3	Material für die Molekularbiologie	40
2.2.4	Bakterienmedium	41
2.2.5	Bakterienstämme	42
2.2.6	Material für proteinbiochemische Analysen	42
2.2.7	Rekombinant exprimierte Fusionsproteine	44
2.2.8	Enzyme	44
2.2.9	Material für Immunfluoreszenz Analysen	45
2.2.10	Material für cytometrische Analysen	45
2.2.11	Fluoreszenzfarbstoffe	45
<b>2.3</b>	<b>Vektoren und Plasmid DNA</b>	<b>45</b>
2.3.1	Vektoren	45
2.3.2	Plasmide	46
2.3.3	Sequenzierprimer	47
<b>2.4</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>48</b>
2.4.1	Verwendete Zelllinien	48
2.4.2	Stabile Zelllinien	49
2.4.3	Zellkulturmedien und -lösungen	49
2.4.4	Zusätze	50
2.4.5	Transfektionslösungen	50
2.4.6	Material zur Apoptoseinduktion	50
2.4.7	Zellkulturmaterial	50
<b>2.5</b>	<b>Antikörper</b>	<b>51</b>
2.5.1	Antikörper für Western Blot	51
2.5.2	Antikörper für Immunpräzipitation	51
2.5.3	Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung	52
2.5.4	Sekundärantikörper für Western Blot	53
2.5.5	Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbung	53
<b>2.6</b>	<b>Online Datenbankrecherche</b>	<b>54</b>
2.6.1	Sequenzreferenznummern („Accession number“)	55

<b>2.7</b>	<b>Methoden</b>	<b>56</b>
<b>2.8</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>56</b>
2.8.1	Kultivierung von Bakterien	56
2.8.2	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	56
2.8.3	Transformation von chemokompetenten E. coli (DH5 $\alpha$ )	57
2.8.4	Transformation von elektrokompenten E. coli (KC8 + DH5 $\alpha$ )	57
2.8.5	Berechnung der Transformationseffizienz	58
2.8.6	Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse in kleinem Maßstab	58
2.8.7	Quantitative Plasmidisolierung in größerem Maßstab	59
2.8.8	Aufreinigung der DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion	59
2.8.9	Quantifizierung von Nukleinsäuren	60
2.8.10	Analyse von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese	60
2.8.11	Restriktionsverdau	61
2.8.12	Sequenz-Analyse	61
<b>2.9</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>61</b>
2.9.1	Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen	61
2.9.2	Bestimmung der Protein-Konzentration nach Bradford	62
2.9.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) nach Lämmli	62
2.9.4	Protein Transfer auf Nitrocellulose-Membranen	63
2.9.5	Immunologischer Nachweis von Proteinen („Western Blot“)	64
2.9.6	Detektion von Proteinen mit dem ECL-Verfahren: Lumineszenz-Assay	65
2.9.7	Wiederverwendung von Western Blot Membranen („Strippen“)	65
2.9.8	Co-Immunpräzipitation (Co-IP)	65
2.9.9	Gelfiltrationchromatographie	66
2.9.10	<i>in vitro</i> Transkription und Translation (TNT)	67
2.9.11	Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	67
2.9.12	GST-Pulldown-Assay	68
<b>2.10</b>	<b>Herstellung CABY spezifischer polyklonaler Antikörper</b>	<b>69</b>
2.10.1	Immunisierung von Kaninchen	69
2.10.2	Antigen-Affinitätsaufreinigung von polyklonalem Antiserum	70
2.10.3	Protein A/G Affinitätschromatographie	70

<b>2.11</b>	<b>Herstellung CABY-spezifischer monoklonaler Antikörper</b>	<b>71</b>
2.11.1	Immunisierung von Mäusen	71
2.11.2	Hybridoma-Bildung	72
2.11.3	Kultivierung und Selektion der produzierenden Hybridomzellen	73
2.11.4	Spezifitätsanalyse der Antikörper im Hybridomzellüberstand	73
<b>2.12</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>73</b>
2.12.1	Kultivierung/ Passagieren von Zellen	73
2.12.2	Zellzahlbestimmung	74
2.12.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	74
2.12.4	Transfektion von 293T und RKO Zellen	75
2.12.5	Vorbereitung der Zellen zur Transfektion	75
2.12.6	Transfektion mit Lipofecatmin	75
2.12.7	Transfektion mit Fugene	75
2.12.8	Apoptoseinduktion	76
2.12.9	Immunfluoreszenzanalyse/ Lokalisationsstudien an fixierten Zellen	76
2.12.10	Videoaufnahmen von lebenden Zellen	77
<b>2.13</b>	<b>Durchflußzytometrische Analysen/ FACS Messungen</b>	<b>77</b>
2.13.1	PI Färbung zur Zellzyklusanalyse und Apoptosequantifizierung	77
<b>2.14</b>	<b>Sequenzinformationen aus Online Datenbanken</b>	<b>78</b>
 <b>III. ERGEBNISSE</b>		 <b>79</b>
<b>3.1</b>	<b>Datenbankrecherche</b>	<b>79</b>
<b>3.2</b>	<b>Expression und Aufreinigung von rekombinantem GST-CABY-Fusionsprotein</b>	<b>84</b>
<b>3.3</b>	<b>Herstellung von polyklonalem anti GST-CABY Kaninchen Antiserum mit anschließender Affinitätsaufreinigung</b>	<b>85</b>
<b>3.4</b>	<b>Herstellung monoklonaler anti MBP-CABY Antikörpern</b>	<b>87</b>
<b>3.5</b>	<b>Interaktion von CABY mit APAF-1 in <i>in vitro</i> GST-Pulldown Experimenten</b>	<b>91</b>
<b>3.6</b>	<b>Verifikation der CABY / APAF-1 Interaktion durch <i>in vivo</i> Ko-Immünpräzipitationsexperimente</b>	<b>94</b>
<b>3.7</b>	<b><i>In vivo</i> Nachweis der Interaktion endogener CABY und APAF-1 Proteinmengen</b>	<b>97</b>

3.8	Gelfiltrationschromatographie – Untersuchungen zur Bildung eines ternären Proteinkomplexes bestehend aus APAF-1, Caspase-9 und CABY	99
3.9	Konfokale Immunfloreszenzmikroskopie – CABY- und APAF-1- Lokalisationstudien in 293T Zellen	101
3.10	Durchflußzytometrische Untersuchungen zur Rolle von CABY während der Apoptose	109
3.11	Analyse der CABY-Lokalisation während Mitomycin C-vermittelter Apoptose	117
<b>IV. DISKUSSION</b>		<b>120</b>
4.1	CABY Isoformen	121
4.2	Analyse der CABY-Bindung unter nicht apoptotischen Bedingungen	123
4.3	Die Rolle von CABY bei der Bildung des Apoptosoms	126
4.4	CABY interagiert mit APAF-1 im Zytoplasma / CABY-Lokalisation während der Apoptose	127
4.5	CABY-vermittelte Sensitisierung der Zellen gegenüber Mitomycin C-induzierter Apoptose	128
4.6	CABY Expressionslevel in humanen Tumoren / CABY als potentiell Tumorsuppressorprotein	130
4.7	Modelmechanismen	132
4.8	CABY ist ein evolutionär stark konserviertes Gen, das neben seiner Rolle für die Apoptoseregulation eine wichtige Vitalfunktion besitzt	136
V.	LITERATURVERZEICHNIS	138
VI.	ANHANG - LEBENSLAUF	152
VII.	ANHANG - ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	154

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Konservierte apoptotische Signalwege im Fadenwurm <i>C.elegans</i> , in Säugetieren und in der Fruchtfliege <i>D.melongaster</i> .	9
<b>Abbildung 2 A):</b>	Sekundärstruktur der Apoptose vermittelnden Caspasen.	11
<b>Abbildung 2 B):</b>	Mechanismen der Caspase Aktivierung.	11
<b>Abbildung 3:</b>	Extrinsischer und Intrinsischer Signalweg der Apoptose.	14
<b>Abbildung 4 A):</b>	Sekundärstruktur der Proteine der Bcl-2 Familie.	18
<b>Abbildung 4 B):</b>	Signalwege der Cytochrom-c Freisetzung durch pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie.	18
<b>Abbildung 5 A):</b>	APAF-1 und Apoptosom Bildung.	22
<b>Abbildung 5 B):</b>	Drei-Dimensionale Struktur des Apoptosomkomplexes.	22
<b>Abbildung 5 C):</b>	Modelmechanismen der Caspase-9 Aktivierung im Apoptosom.	22
<b>Abbildung 6 A):</b>	Die IAP Proteinfamilie.	25
<b>Abbildung 6 B):</b>	Funktionelle Domänen des XIAP Proteins.	25
<b>Abbildung 6 C):</b>	XIAP als zentraler Inhibitor der Caspase Aktivität.	25
<b>Tabelle 1:</b>	Fehlregulation des intrinsischen apoptotischen Signalübertragungsweges in humanen Tumoren.	32
<b>Abbildung 7 A):</b>	Sequenz- und Strukturanalyse des zum <i>CABY</i> -Gen gehörenden Lokus (ENSEMBL).	80
<b>Abbildung 7 B):</b>	Aminosäuresequenzvergleichsanalysen der DUF59 Domänen der beiden Isoformen von <i>CABY</i> weisen eine über 90%ige Identität zu einem anderen potentiellen ribosomalen Protein auf (MultiAlin).	80
<b>Abbildung 7 C):</b>	Schematische Darstellung der Sekundärstruktur der beiden Isoformen des humanen <i>CABY</i> Proteins und des ribosomalen Proteins S28e mit beinahe identischer DUF59 Domäne (NCBI).	80
<b>Abbildung 8 A)/ B):</b>	Schematische und Tabellarische Darstellung: Die Analyse der humanen cDNA Datenbank ergibt, daß <i>CABY</i> mRNA aus unterschiedlichem Gewebe kloniert und in 4 Varianten identifiziert wurde (AceView).	81
<b>Abbildung 9:</b>	<i>In silico</i> Voraussage alternativer Translations-Initiations Regionen innerhalb der <i>CABY</i> cDNA (ATG <sup>PR</sup> / NCBI).	82
<b>Abbildung 10 A):</b>	<i>CABY</i> ist evolutionär stark konserviert.	83
<b>Abbildung 10 B):</b>	Taxonomische Darstellung der in den Datenbanken der verschiedenen Organismen hinterlegten homologen <i>CABY</i> -Sequenzen (Yeast Genome).	83

<b>Abbildung 11:</b>	Vergleich der Expressionsmengen von rekombinantem GST-CABY-Protein in zwei unterschiedlichen bakteriellen Systemen.	84
<b>Abbildung 12 A):</b>	Western Blot Analyse zum Nachweis der CABY-Expression in transient transfizierten RKO Zellen mittels affinitätsaufgereinigtem Antiserum.	86
<b>Abbildung 12 B):</b>	Detektion von unterschiedlichen endogenen CABY Isoformen in verschiedenen Maus und Humanen Zelllinien.	86
<b>Abbildung 12 C):</b>	Unter reduzierenden Bedingungen bildet CABY Homodimere.	86
<b>Abbildung 13:</b>	SDS PAGE- und Western Blot-Analyse von rekombinant exprimiertem MBP-CABY Fusionsprotein vor und nach Abspaltung von MBP durch proteolytischen Verdau.	88
<b>Abbildung 14:</b>	Western Blot Analyse von rekombinant exprimiertem GST-CABY Protein zum Test der einzelnen Hybridoma-Überstände auf CABY-spezifische Antikörper.	88
<b>Abbildung 15:</b>	CABY-spezifische Maus Hybridoma Überstände detektieren im Western Blot Experiment nur rekombinant aber nicht zellulär exprimiertes CABY Protein.	89
<b>Abbildung 16:</b>	In 293T-Zellen überexprimiertes CABY kann mit monoklonalen anti-CABY Antikörpern immunpräzipitiert werden.	90
<b>Abbildung 17:</b>	Schematische Darstellung der vollständigen APAF-1 und CABY Proteine sowie verschiedener Deletionsmutanten.	91
<b>Abbildung 18 A):</b>	Kontrolle der im <i>in vitro</i> GST Pulldown eingesetzten Mengen an rekombinantem GST, GST-FADD und GST-CABY, <i>in vitro</i> Transkription und Translation der vollständigen APAF-1- und CABY-Proteine sowie verschiedener Deletionsmutanten.	92
<b>Abbildung 18 B):</b>	GST-Pulldown-Experimente.	92
<b>Abbildung 19:</b>	Caspase-9 vermittelt <i>in vitro</i> eine ternäre Komplexbildung zwischen CABY und den WD-40 Domänen von APAF-1.	93
<b>Abbildung 20 A):</b>	Nach Immunpräzipitation mit dem anti-Myc Antikörper konnte in der Western Blot-Analyse mit dem anti-FLAG Antikörper eine spezifische Bindung von CABY an APAF-1 „full length“ sowie an APAF-1 Deletionsmutanten nachgewiesen werden.	95
<b>Abbildung 20 B):</b>	Nach Immunpräzipitation mit dem anti-FLAG Antikörper konnte in der Western Blot-Analyse mit dem anti-Myc Antikörper eine spezifische Bindung von CABY an APAF-1 „full length“ sowie an APAF-1 Deletionsmutanten nachgewiesen werden.	95
<b>Abbildung 20 C):</b>	In 293T Zellen können überexprimiertes CABY, APAF-1 und APAF-1 Deletionsmutanten mit dem polyklonalen anti-CABY Serum ko-immunpräzipitiert werden.	96

<b>Abbildung 21 A)/B):</b>	Ko-Immunpräzipitationsexperimente mit unbehandelten 293T Wildtyp Zelllysaten.	97
<b>Abbildung 22:</b>	Eine Interaktion von CABY mit Caspase-9 lässt sich durch Ko-Immunpräzipitationsexperimenten mit endogenen Proteinmengen nicht nachweisen.	98
<b>Abbildung 23:</b>	Western Blot Analyse einzelner Gelfiltrationschromatographie-Fractionen.	100
<b>Abbildung 24:</b>	Lokalisation von überexprimiertem und endogenem CABY in 293T Zellen.	102
<b>Abbildung 25:</b>	Lokalisation von überexprimiertem APAF-1 in 293T Zellen.	103
<b>Abbildung 26 A):</b>	Überexprimiertes CABY und APAF-1 ko-lokalisieren im Zytoplasma von 293T Zellen.	104
<b>Abbildung 26 B):</b>	Im Zytoplasma von 293T Zellen ko-lokalisieren überexprimiertes CABY und M-APAF ebenfalls.	105
<b>Abbildung 26 C):</b>	Auch endogenes CABY und APAF-1 ko-lokalisieren im Zytoplasma von 293T-Zellen.	106
<b>Abbildung 26 D):</b>	Ko-Lokalisation von überexprimiertem CABY und Caspase-9 im Zytoplasma von 293T-Zellen.	107
<b>Abbildung 26 E):</b>	Bcl-X <sub>L</sub> ko-lokalisiert nicht mit überexprimiertem CABY in 293T-Zellen.	108
<b>Abbildung 27 A):</b>	Schematische Darstellung der Bindung der CABY A bzw. CABY B siRNA an die korrespondierenden Abschnitte innerhalb der CDS der CABY mRNA.	110
<b>Abbildung 27 B):</b>	Die Western Blot Analyse detektiert eine effiziente Herunterregulation der CABY Expression in K562 Zellen, die mit CABY A siRNA stabil transfiziert wurden.	110
<b>Abbildung 27 C):</b>	Die FACS Analyse zeigt, daß der CABY Knock-Down kein unterschiedliches Apoptoseverhalten in K562 Zellen nach UV Bestrahlung bewirkt.	110
<b>Abbildung 28 A):</b>	Kontrolle der Proteinexpression von CABY und CABY-Deletionsmutanten in transient transfizierten RKO Zellen.	113
<b>Abbildung 28 B):</b>	Die Überexpression von CABY zeigt 24h nach Induktion mit diversen Stimuli keinen Einfluss auf die Apoptoserate von RKO Zellen.	113
<b>Abbildung 28 C):</b>	Propidiumiodid-Zellzyklusprofile von Wildtyp und CABY-überexprimierenden Zellen, unbehandelt oder mit Mitomycin C inkubiert.	113
<b>Abbildung 28 D):</b>	Die Überexpression von CABY bewirkt bei Mitomycin C-induzierter Apoptose einen deutlichen Sensitisierungseffekt in RKO Zellen.	113

<b>Abbildung 29 A):</b>	Kontrolle der Proteinexpression von CABY in Zelllysaten von Wildtyp, CABY überexprimierenden und CABY Knock Down RKO Zellen.	<b>115</b>
<b>Abbildung 29 B):</b>	Durchflußzytometrische Analysen von Mitomycin C behandelten CABY Knock-Down RKO Zellen weisen auf eine moderate Inhibierung des CABY vermittelten Apoptosesensibilisierungseffekt hin.	<b>115</b>
<b>Abbildung 29 C):</b>	Western Blot Analyse von CABY Punkt- und Deletionsmutanten ergibt, daß die beiden alternativen Translations-Initiations Regionen innerhalb der CABY cDNA die Expression der beiden detektierbaren CABY Isoformen bewirken.	<b>115</b>
<b>Abbildung 29 D):</b>	Die Mutation einer Translations-Initiations Regionen innerhalb der CABY cDNA führt zur verstärkten Reduktion der Apoptoserate Mitomycin C behandelter transient transfizierter RKO Zellen.	<b>115</b>
<b>Abbildung 30 A):</b>	Lebendaufnahmen von transient transfizierten RKO Zellen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop zur Analyse der Lokalisation von N-terminal mit GFP fusioniertem CABY nach Mitomycin C-Zugabe.	<b>118</b>
<b>Abbildung 30 B):</b>	Analyse der Lokalisation von C-terminal mit GFP fusioniertem CABY in RKO Zellen nach Mitomycin C-Zugabe.	<b>119</b>
<b>Abbildung 31:</b>	Funktionelle Gruppierung von Proteinfamilien, deren Mitglieder DUF59 Domänen enthalten (SYSTERS).	<b>122</b>
<b>Abbildung 32:</b>	Intermolekulare Cystein-Disulfidbrückenbindungen vermitteln möglicherweise die Ausbildung von CABY-Dimeren.	<b>126</b>
<b>Abbildung 33:</b>	Potentielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im 5' untranslatierten Bereich des CABY Gens (TRANSFAC).	<b>130</b>
<b>Abbildung 34:</b>	In humanen GIST Tumoren ist die Expression von CABY im Gegensatz zu normalem Gewebe desselben Patienten nicht mehr detektierbar.	<b>131</b>
<b>Abbildung 35:</b>	Schematische Zusammenfassung der beobachteten CABY-Interaktionen.	<b>132</b>
<b>Abbildung 36:</b>	Verschiedene Variationen der Zusammensetzung eines möglichen Prä-Apoptosom-Komplexes.	<b>134</b>
<b>Abbildung 37:</b>	CABY als möglicher Nukleotid Austausch Faktor während der Bildung und Stabilisierung des Apoptosom-Komplexes.	<b>135</b>

## **Zusammenfassung**

Der mitochondriale Apoptose-Signalübertragungsweg spielt nicht nur bei der Death Rezeptor-induzierten Apoptose in Typ II-Zellen eine Rolle, sondern z.B. auch bei Bestrahlung und Behandlung mit Chemotherapeutika. Über Cytochrom-c Freisetzung, Apoptosombildung und Caspase-9 Aktivierung kommt es zur Spaltung und Aktivierung der Effektorcaspase-3. Die durch Bindung von dATP und zytosolischem Cyt-c induzierte Konformationsänderung von APAF-1 führt nach anschließender ATP-Hydrolyse zur Oligomerisierung von insgesamt sieben APAF-1-Molekülen unter gleichzeitiger Rekrutierung von Caspase-9 über die in beiden Molekülen vorhandene N-terminale Caspase-Rekrutierungsdomänen (CARD). Es entsteht der so genannte Apoptosomkomplex. Die autoproteolytische Prozessierung und Aktivierung von Caspase-9 mit anschließender Spaltung von Caspase-3 im Apoptosomkomplex führt zum Auslösen der apoptotischen Caspasekaskade und zur Spaltung wichtige zellulärer Substrate. Eine wichtige Rolle bei der Regulation der Apoptosom-vermittelten Caspase-9-Aktivierung spielen u.a. die Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie, die IAPs und Hitzeschockproteine. Die Blockade des intrinsischen Apoptose-Signalübertragungsweges führt in Tumoren zur Resistenzentwicklung gegenüber Chemo- und Strahlentherapie. Deshalb wurde mit Hilfe des Hefe-Two-Hybrid Systems ein Screen nach neuen regulatorischen Proteinen, die an der Apoptosomkomplex-Bildung beteiligt sind, durchgeführt und dabei ein neuer APAF-1 Interaktionspartner entdeckt, den wir CABY („CED-4 and APAF-1 binding protein found in yeast“) genannt haben.

CABY ist ein 160 Aminosäuren großes, pro-apoptotisches Protein, das eine so genannte DUF59 Domäne enthält, für die bisher noch keine Funktion beschrieben wurde. Die cDNA Datenbank führt vier unterschiedliche CABY mRNA Splice-Varianten auf, die vermutlich gewebstypspezifisch exprimiert werden. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, daß die CABY cDNA zwei alternative Translations-Initiationsregionen enthält, die zu der Expression der CABY<sub>L</sub> bzw. der um 32 Aminosäuren verkürzten CABY<sub>S</sub> Isoformen führen. CABY ist ein evolutionär stark konserviertes Protein. Bei der Analyse orthologer Sequenzen konnten in allen Modelorganismen CABY homologe Sequenzen gefunden werden, die auch bei

evolutionär entfernten Spezies wie z.B. Hefe und Mensch eine Proteinsequenzidentität von über 50% aufweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte darüber hinaus eine detaillierte molekulare und funktionelle Analyse von CABY durchgeführt werden. Als Hilfsmittel für die molekularbiologische Analyse wurden sowohl CABY-spezifische polyklonale Antiseren als auch Hybridoma-Zelllinien hergestellt, die monoklonale anti-CABY Antikörper produzieren. Mit biochemischen Untersuchungen wie *in vitro* GST Pulldown und *in vivo* Ko-Immunpräzipitationsexperimenten, sowie durch Ko-Lokalisationsstudien mit überexprimierten und endogenen Proteinmengen konnte die Bindung von CABY an APAF-1 verifiziert werden. Mit Hilfe von APAF-1-Deletionsmutanten wurden die Aminosäuren 412-420 der zentralen Linkerdomäne als verantwortlicher Bereich für die Interaktion mit CABY identifiziert. Interessanterweise bindet CABY *in vitro* zusätzlich sowohl an die N-terminale CARD Domäne von APAF-1 als auch an Pro-Caspase-9. Ko-Immunpräzipitationsexperimente mit endogenen Proteinen konnten zeigen, daß CABY in gesunden Zellen nicht nur mit dem vollständigen APAF-1 Protein, sondern auch mit der verkürzten 84 kDa großen APAF-1-Isoform in einem Komplex assoziiert vorliegt. Zudem konnte nachgewiesen werden, daß CABY-Proteine homophile Interaktionen eingehen und Dimere ausbilden können. Gelfiltrationschromatographie-Experimente konnten zeigen, daß CABY unter nicht-apoptotischen Bedingungen in bis zu 700 kDa großen Proteinkomplexen integriert wird.

Neben den Untersuchungen zur Interaktion von CABY mit APAF-1 wurden auch funktionelle Analysen mit Hilfe dominant negativer CABY Deletionsmutanten sowie mit siRNA Zellkulturexperimenten durchgeführt, um die Bedeutung von CABY für den intrinsischen mitochondrialen Apoptose Signalübertragungsweg untersuchen zu können. Es wurde festgestellt, daß bei Überexpression von CABY die Zellen für Mitomycin C-induzierte Apoptose sensitisiert werden. Die Überexpression einer C-terminal um 20 Aminosäuren deletierten CABY Mutante wie auch der N-terminal verkürzten CABYs Isoform inhibieren jedoch Mitomycin C-induzierte Apoptose. Interessanterweise konnte bei anderen apoptotischen Stimuli - wie der Zugabe von Death Rezeptor Liganden (TRAIL, FasL), Behandlung mit dem

Proteinkinaseinhibitor Staurosporin oder durch UV Bestrahlung - kein deutlicher Einfluss von CABY auf das Apoptoseverhalten der Zellen beobachtet werden.

Die Ergebnisse aus CABY siRNA-Knockdown-Experimenten lassen vermuten, daß CABY-ähnliche funktionell redundante Proteine existieren. In den mit CABY siRNA stabil transfizierten K562- und RKO-Zelllinien konnte festgestellt werden, daß der Verlust endogener CABY-Expression in diesen Zelllinien nur einen geringen Einfluss auf das Apoptoseverhalten ausübt, und zwar unabhängig von der Art des eingesetzten apoptotischen Stimulus. Einen Hinweis auf einen möglichen kompensatorischen Mechanismus liefert die Existenz des ribosomalen Proteins S28e, dessen DUF59-Domäne zu über 90% identisch ist mit der CABY-DUF59-Domäne. S28e könnte potentiell CABY-Funktionen ausüben. Im Unterschied zu humanen Zellen werden im Zebrafisch-Organismus keine Proteine exprimiert, die die Funktion von CABY redundant übernehmen können. Es stellte sich heraus, daß der durch Morpholino vermittelte Knock-Down der CABY mRNA Expression in Zebrafisch-Embryonen zu einer signifikanten Reduktion der Apoptoserate nach UV Bestrahlung führt. Somit ist UV-induzierte Apoptose im Zebrafisch fast vollständig von der Zebrafisch-CABY Expression abhängig.

Ausgehend von mit der pro-apoptotischen Funktion von CABY wurde nach Tumortypen gesucht, in denen die CABY-Expression im Vergleich zum Normalgewebe signifikant herunterreguliert wird. Die Analyse endogener CABY Expressionsmengen in humanen Tumoren konnte dabei einen Verlust an CABY Expression in GIST-Tumoren nachweisen. Dieses Ergebnis weist auf eine mögliche Rolle von CABY als Tumorsuppressorprotein hin.

Als potentieller molekularer Mechanismus lässt sich für die pro-apoptotische Funktion von CABY ein Modell diskutieren, demzufolge CABY - ähnlich wie dATP und Cyt-c - durch seine Bindung und/oder in der Funktion eines Nukelotid-Austausch-Faktors die APAF-1 Konformation so verändert, daß es zur Apoptosomkomplex-Bildung und -Stabilisierung und damit zur Caspase-9 Aktivierung kommen kann.

## **Summary**

The mitochondrial apoptotic signaling pathway plays an important role in death receptor-mediated apoptosis in type II cells and for radiation- and chemotherapy-induced cell death. The release of Cytochrome c from the mitochondrial intermembrane space, apoptosome formation and subsequent Caspase-9 activation lead to cleavage of the effector pro-Caspase-3, thereby either initiating or amplifying the apoptotic signaling cascade. The interaction of the adaptor protein APAF-1 with released cytoplasmic Cytochrome c and dATP induces conformational changes within APAF-1, resulting in oligomerisation of seven APAF-1 molecules upon ATP hydrolysis and concurrent recruitment of Caspase-9 via its CARD domain into the newly formed apoptosome complex. Autoproteolytic activation of Caspase-9 and subsequent cleavage of Caspase-3 trigger the caspase cascade, resulting in cleavage of important cellular substrates. Members of the Bcl-2 protein family as well as IAPs and heat shock proteins play an important role for the regulation of apoptosome-mediated Caspase-9 activation. Tumors show a significant correlation between mutational inhibition of the intrinsic apoptotic signaling pathway and the development of resistance to chemo- and radiotherapy. Therefore we performed yeast-two-hybrid interaction screens to identify new proteins which are involved in the regulation and/ or formation of the Apoptosome complex. During these experiments, we discovered a novel APAF-1 binding protein which we named CABY ("CED-4 and APAF-1 binding protein found in yeast").

CABY consists of 160 amino acids and contains a so-called DUF59 domain for which no function has yet been assigned. Analysis of the cDNA database led to the identification of four different CABY mRNA splice variants which were isolated from different tissues and which may be expressed in a tissue-specific manner. In addition, we could show that CABY cDNA contains two alternative translation initiation regions, leading to expression of the two different CABY<sub>L</sub> and CABY<sub>S</sub> isoforms which differ by 32 aa in length. The CABY protein sequence has been strongly conserved during evolution. Analysis of orthologous sequences in different model organisms revealed CABY-homologues proteins which for example in the case of yeast and human exhibit a sequence identity of over 50%.

The aim of this work was a further detailed molecular and functional analysis of CABY. For this purpose, a CABY-specific polyclonal antiserum, as well as monoclonal anti-CABY antibodies producing hybridoma cell lines were generated and established as tools for further biochemical analysis. *In vitro* GST pulldown assays, *in vivo* co-immunoprecipitation experiments and co-localization studies with overexpressed and endogenous proteins confirmed the interaction between CABY and APAF-1. By using APAF-1 deletion mutants, amino acids 412-420 within the central APAF-1 linker domain were identified as the responsible CABY-binding domain. Interestingly, CABY is also able to bind *in vitro* to the N-terminal CARD domain of APAF-1, as well as to Pro-Caspase-9. Co-immunoprecipitation experiments with endogenous protein levels could demonstrate that under non-apoptotic conditions CABY not only associates with the full length APAF-1 protein but also with the processed 84 kDa large APAF-1 isoform. Furthermore, CABY molecules display homophilic interactions, thereby forming homodimers. Gel filtration chromatography analysis revealed that, under non-apoptotic conditions, CABY proteins are integrated in large protein complexes of up to 700 kDa in size.

In addition, functional analysis with CABY dominant negative deletion mutants as well as with CABY siRNA was performed to evaluate the physiological relevance of CABY within the intrinsic apoptotic signaling pathway. It was observed that CABY overexpression results in sensitization towards apoptosis, specifically upon treatment with Mitomycin C. Overexpression of either a C-terminally truncated CABY mutant or the CABYs isoform alone result in inhibition of Mitomycin C-induced apoptosis. Several other apoptotic stimuli - e.g. the addition of death receptor ligands (TRAIL, FasL), treatment with the protein kinase inhibitor Staurosporine or by UV irradiation - were not influenced to the same extent as Mitomycin C-treatment by CABY expression levels in their capability to induce cell death. Experiments performed with cell lines stably expressing CABY siRNA showed that the loss of endogenous CABY expression did not influence the apoptotic behaviour significantly. This appears independent of the type apoptotic stimulus applied. Apparently, other proteins with redundant CABY functionality must exist. The ribosomal protein S28e represents one example of a protein which could potentially compensate for the loss of CABY expression since it also consists of a

DUF59 domain which is 90% identical with the DUF59 domain of CABY. In contrast to the human system, no proteins with redundant CABY function are expressed within Zebrafish. Analysis of morpholino-mediated knock-down of CABY protein expression in Zebrafish embryos revealed a significant reduction of apoptosis following UV irradiation. Apparently, UV-induced apoptosis is highly dependent on CABY expression in this model organism.

In support of CABY's pro-apoptotic properties, an investigation of endogenous CABY expression in human tumor samples was performed and revealed downregulation of CABY expression in human gastrointestinal stroma tumors (GIST). This observation might indicate a potential function for CABY as a tumor suppressor protein.

The precise molecular mechanism of how CABY is involved in the formation of a stable apoptosome complex is still not understood. CABY may - similar to Cyt-c and ATP/ dATP - either change upon binding the confirmation of APAF-1, and/ or it may serve as a potential nucleotide exchange factor to allow efficient Caspase-9 activation within the apoptosome complex. Even an APAF-1 and CABY-dependent, apoptosome-independent mechanism of Caspase-9 activation cannot be ruled out. The appropriate mechanistic experiments are subject to future studies.

# **I. Einleitung**

## **1.1 Der apoptotische Zelltod**

Mit dem Begriff Apoptose oder auch programmierter Zelltod wird ein physiologischer Prozeß definiert, der genetisch determiniert ist und unter charakteristischen morphologischen Veränderungen zum Zelltod führt. Von dem Entwicklungsbiologen Kerr 1972 eingeführt, beschreibt das Wort Apoptose einen regulierten und ATP verbrauchenden Vorgang, der von katabolischen Enzymen, wie Proteasen und Nukleasen, ausgeführt wird (Kerr et al., 1972). Typische Kennzeichen des vollständigen Zerfalls der Zelle bei der Apoptose sind das Abschnüren kleiner Membranvesikel (apoptotische Vesikel) mit zytoplasmatischem Inhalt - das sogenannte Membrane Blebbing, das Schrumpfen von Zellen und Zellkern und die Kondensation und Fragmentierung des Chromatins. Parallel dazu wird ein Verlust der Membranasymmetrie beobachtet, der zur Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche führt. Die apoptotischen Vesikel und der Rest des Zellkörpers werden anschließend von Nachbarzellen oder Makrophagen durch Phagozytose beseitigt, wodurch Entzündungsreaktionen, wie sie z.B. bei der Nekrose beobachtet werden, ausbleiben. Als typischer molekularbiologischer Nachweis gilt die Fragmentierung der DNA durch spezielle Endonukleasen in ein Leiternmuster. Die internukleosomale Spaltung der DNA führt zum Entstehen von DNA-Stücken mit einer Länge von 200 Basenpaaren und Vielfachen (Walker et al., 1988).

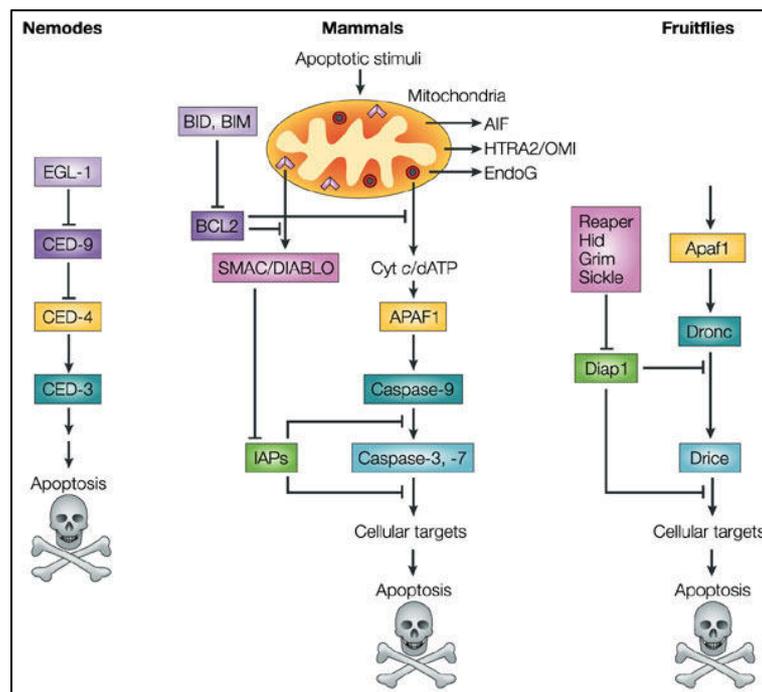
Eine andere Art des Zelltodes wird als Nekrose bezeichnet. Im Unterschied zur Apoptose ist die Nekrose jedoch kein genetisch definiertes Programm, nicht energieabhängig und keinem geregelten Mechanismus zum Abbau von Proteinen und Nukleinsäuren unterworfen. Sie ist durch ein Anschwellen der Zelle charakterisiert, was zur Zerstörung der Plasmamembran und zur Freisetzung des Zytosols und von Zellorganellen in den interzellulären Raum führt. Da keine Phagozytose durch Nachbarzellen oder Makrophagen erfolgt, kommt es zu inflammatorischen Reaktionen mit einhergehenden Gewebsschädigungen. Obwohl Nekrose und Apoptose sich in den beschriebenen Merkmalen unterscheiden, treten seit kurzem vermehrt Hinweise auf, die Ähnlichkeiten beider Signalwege aufzeigen

und somit diese klassische Trennung in Frage stellen. So scheint der nekrotische Zelltod unter bestimmten Umständen auch ein regulierbarer Prozeß zu sein, der von typischen anti-apoptotischen Proteinen inhibiert werden kann (Holler et al., 2000).

Allgemein dient Apoptose in Mehrzellern der Beseitigung unerwünschter und gefährlicher Zellen und spielt eine wichtige Rolle beim Aufbau des Gewebes während der Embryogenese (Twomey and McCarthy, 2005), bei der Homeostase von Zellpopulationen und bei der Immunabwehr (Gupta, 2005). Die Dysregulation von Apoptose führt dazu, daß die Gewebshomeostase gestört wird und trägt dadurch zu vielen pathologischen Veränderungen bei. Beispiele für zuviel Apoptose stellen neurodegenerative Erkrankungen wie z.B. Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer oder auch die Creutzfeld-Jakob Erkrankung dar. Auch bei Autoimmunerkrankungen wie z.B. Rheumatoide Arthritis und Multiple Sklerose oder bei Virusinfektionen (z.B. HIV) werden die Zellen stimuliert, Apoptose einzuleiten. Im Gegensatz dazu kommt es während der Tumorentstehung zu vermindertem Zelltod und vermehrter Zellteilung (Brown and Attardi, 2005).

In einem mehrzelligen Organismus ist das Schicksal einer einzelnen Zelle (Mitose, Apoptose, Ruhe, Differenzierung) abhängig von externen und internen Signalen. Die Summe der empfangenen Signale bestimmt, welche genetisch determinierten Programme aktiviert und welche unterdrückt werden. Apoptose selbst kann durch sehr unterschiedliche Stimuli eingeleitet werden. Dies kann zum einen durch extrazelluläre Stimuli geschehen, indem extrinsische Signalproteine wie z.B. FasL und TNF- $\alpha$  durch Stimulation von speziellen Oberflächenrezeptoren das gerichtete Absterben der dafür vorgesehenen Zellen induzieren. Zum anderen können das Fehlen von Wachstumsfaktoren (z.B. EGF/ IL-3) oder der Verlust von Kontakten zu Nachbarzellen bzw. zur extrazellulären Matrix, die die Zelle für die Stimulation spezieller Wachstumsrezeptoren bzw. der Integrine auf der Zelloberfläche benötigt, zur Inaktivierung von intrazellulären Survival-Programmen führen. Inzwischen ist eine ständig wachsende Zahl von Molekülen identifiziert worden, die das zelluläre Selbstmordprogramm entweder positiv oder negativ regulieren oder selbst Bestandteil der apoptotischen Maschinerie sind (Lahm et al., 2003).

## 1.2 Evolutionär konservierte apoptotische Signalwege



**Abbildung 1: Konservierte apoptotische Signalwege im Fadenwurm *C.elegans*, in Säugetieren und in der Fruchtfliege *D.melongaster***  
 Während Caspase-9 (in Säugern) und Dronc (in der Fliege) Initiatorcaspasen sind, gehören Caspase-3 und -7 (in Säugern) und Drice (in der Fliege) zu der Kategorie der Effektorcaspasen. Im Gegensatz dazu fungiert CED-3 („cell-death-abnormality-3“) im Wurm gleichzeitig als Initiator- und Effektorcaspase. SMAC/DIABLO („second mitochondria derived activator of caspases/ direkt IAP binding protein with low pI“) in Säugern als auch Reaper, Hid, Grim und Sickie in der Fliege heben die von IAPs vermittelte negative Regulation von Caspasen wieder auf. Die neben Cytochrom-c aus den Mitochondrien freigesetzten

Proteine AIF („apoptosis inducing factor“), EndoG („endonuclease G“) und HTRA2 („high temperature requirement protein A2“) induzieren einen Caspase-unabhängigen apoptotischen Signalweg. Funktionshomologe von Caspasen und Caspase-regulierenden Proteine der verschiedenen Spezies werden durch gleiche Färbung dargestellt. (Abbildung entnommen aus (Riedl and Shi, 2004))

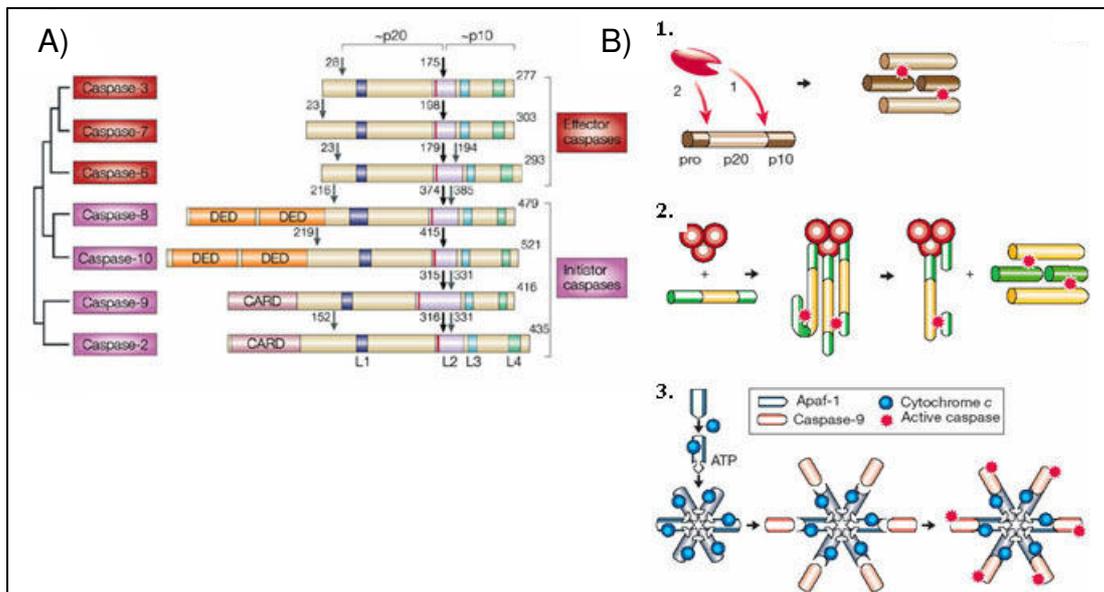
Der programmierte Zelltod stellt ein evolutionär konserviertes biologisches Prinzip dar. Intensive Untersuchungen, vor allem im Nematoden *C. elegans* und der Fruchtfliege *D. melongaster*, konnten zeigen, daß einfache genetische Apoptoseprogramme weit verbreitet sind und sich bei Vertebraten zu einem komplexen apoptotischen Programm weiterentwickelt haben. Mutationsanalysen im Modelorganismus *C. elegans*, bei dem im Verlauf der Ontogenese immer eine konstante Anzahl somatischer Zellen durch programmierten Zelltod stirbt, ermöglichten die Identifizierung und Charakterisierung einer Reihe von Genen, die diesen Prozeß beeinflussen. Besonderer Bedeutung kommt dabei den Genprodukten CED-3, CED-4 und CED-9 zu [„cell death abnormality“, (Ellis and Horvitz, 1986)]. Die Klonierung des pro-apoptotisch wirkenden *ced-3* Gens und nachfolgende Sequenzanalysen zeigten, daß das Genprodukt von CED-3 starke Homologien zur Familie der humanen ICE-Proteasen aufweist (Yuan et al., 1993).

Die Identifizierung weiterer humaner homologen Proteinsequenzen folgte: CED-9/Bcl-2 (Hengartner and Horvitz, 1994), CED-4/ APAF-1 (Zou et al., 1997) und Proteasen, die CED-3 bzw. ICE-Proteinen strukturell und funktionell ähnlich sind und deshalb als eine neue Klasse unter dem Begriff Caspasen zusammengefasst wurden [siehe Kapitel 1.3, (Alnemri et al., 1996), (Nicholson and Thornberry, 1997)].

Die evolutionäre Konservierung von Teilen des apoptotischen Programms konnte mit Hilfe von Experimenten, die auf eine funktionelle Redundanz der homologen Proteine hinwiesen, sehr deutlich gezeigt werden. So verhindert die Expression von humanem Bcl-2 in *C. elegans* und *ced-9<sup>-/-</sup>* Mutanten vollständig die Apoptose von Zellen, die bei Abwesenheit des Bcl-2-Homologs CED-9 sterben. Das humane Äquivalent des *ced-4* Genproduktes APAF-1 wurde zusammen mit APAF-2 und APAF-3 aus humanen Zellextrakten isoliert. Später wurden APAF-2 als Cytochrom-c und APAF-3 als Caspase-9 identifiziert (siehe Kapitel 1.6).

Während CED-3 im Wurm die einzige für den programmierten Zelltod verantwortliche Protease zu sein scheint, wird bei der Fruchtfliege - ähnlich wie bei den Säugern - die apoptotische Signalkaskade über Aktivierung der Initiator-Caspase Dronc [„drosophila nedd-2 like caspase“, (Dorstyn et al., 1999)] und der Effektor-Caspase Drice [„drosophila -ICE“, (Fraser and Evan, 1997)] weitergeleitet. Auch die Regulation der Caspasen Aktivität folgt einem analogen Mechanismus über die IAP und SMAC funktionshomologen Proteine DIAP-1 [„drosophila IAP 1“, (Meier et al., 2000)] und die RHGS Proteine Reaper, Hid, Grim und Sickel [ (White et al., 1994), (Grether et al., 1995), (Chen et al., 1996), (Srinivasula et al., 2002)].

### 1.3 Caspasen bilden die zentrale Apoptose-Maschinerie



**Abbildung 2A) : Sekundärstruktur der Apoptose-vermittelnden Caspasen**

Effektorcaspasen sind rot, Initiatorcaspasen violett dargestellt. Jeweils durch einen schwarzen Pfeil wird die Abgrenzung zwischen der großen und kleinen Untereinheit (p20 und p10) hervorgehoben, da dort Caspasen durch intramolekulare Spaltung aktiviert werden. Diese Untereinheiten bilden dann zusammen aktive Heterotetramere. Andere Stellen, die mit grauen Pfeilen dargestellt werden, dienen der Modulation der Caspaseaktivität und unterliegen der Regulation durch IAP Proteine. Die N-terminale Prodomäne der Initiatorcaspasen enthalten konservierte Interaktionsdomänen wie die CARD („caspase recruiting domain“) oder die DED („death effector domain“) Domänen. Die mit L1-L4 gekennzeichneten Abschnitte repräsentieren die Aminosäurebereiche innerhalb der Proteinsequenz, die für die Bildung der katalytischen Tasche benötigt werden. Im katalytischen Zentrum befindet sich immer die Aminosäure Cystein (L2). (Abbildung entnommen aus (Riedl and Shi, 2004))

**Abbildung 2 B): Mechanismen der Caspase Aktivierung**

Die Aktivierung von Initiator- und Effektorcaspasen erfolgt über unterschiedliche Mechanismen. (1) Inaktive Vorstufen der Effektorcaspasen (wie z.B. Pro-Caspase-3) werden von Initiatorcaspasen (Caspase-8/-9) durch proteolytische Spaltung zu aktiven Proteasen prozessiert. (2+3) Generell werden Initiatorcaspasen durch Rekrutierung in bestimmte Proteinkomplexe lokal angereichert und dabei aktiviert. Beispiele für diese Komplexe bzw. die darin aktivierte Caspase sind: Caspase-8 und DISC, Caspase-9 und Apoptosom, Caspase-2 und Piddosom, Caspase-1 und Inflammasom. Zwei alternative Modelle der Aktivierungsmechanismen werden im Kapitel 1.5 am Beispiel von Caspase-9 und der Apoptosom Komplex Bildung diskutiert. (Abbildung entnommen aus (Hengartner, 2000))

Caspasen nehmen beim apoptotischen Zelltod eine zentrale Rolle ein. Sie bilden eine Familie homologer Cysteinproteasen und besitzen die Eigenschaft, spezifische aspartathaltige Peptidkennungssequenzen ihrer Zielproteine zu spalten. Aufgrund dessen werden sie Cystein-Aspartasen genannt (Riedl and Shi, 2004). Caspasen werden in den lebenden Zellen als Zymogene, d.h. als inaktive Vorstufen, synthetisiert, die zu aktiven Untereinheiten prozessiert werden. Die Aktivierung der Caspasen kann durch eine Vielzahl verschiedener apoptotischer Stimuli geschehen.

Dazu gehört die Aktivierung so genannter Death Rezeptoren (wörtlich: Todesrezeptoren) wie z.B. Fas/CD95/Apo-1 (Ashkenazi and Dixit, 1998), UV-Strahlung (Rehemtulla et al., 1997) oder Zytostatika (Wesselborg et al., 1999).

Während der Apoptose werden Caspasen entweder autokatalytisch oder durch andere Caspasen oder Proteasen, wie Granzym B, in eine große und eine kleine Untereinheit gespalten. Anschließend folgt die Bildung eines enzymatisch aktiven Heterotetramers. Ein weiterer Mechanismus der Aktivierung ist die Komplexbildung von Caspasen und bestimmten Adapterproteinen, die dann gemeinsam als Holoenzym (z.B. das Apoptosom) wirken (siehe Abbildung 5 und Kapitel 1.6).

Funktionell werden Caspasen in so genannte Initiator- und Effektor-Caspasen unterteilt. Initiator-Caspasen, wie z.B. Caspase-8/FLICE oder Caspase-9, spielen als Bindeglied zwischen Death Rezeptoren/ Apoptosomkomplex und Effektor-Caspasen eine essentielle Rolle. Sie werden entweder über die DED Domäne an die intrazelluläre Domäne des Rezeptors oder mittels der CARD Domäne an APAF-1 rekrutiert und spalten dann nach Aktivierung so genannte Effektor-Caspasen wie z.B. Caspase-3, die "downstream" im Signaltransduktionsweg agieren. Zusammen bilden sie die so genannte Caspase-Kaskade, die zur Amplifikation des Signales dient.

Mittlerweise sind eine Vielzahl zellulärer Targets der Effektor-Caspasen gefunden worden (Fischer et al., 2003). Diese Substrate lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen wie DNA-Reparatur-Proteine (z.B. Poly-ADP-Ribose-Polymerase), Zellzyklusproteine, Apoptoseregulatoren wie das anti-apoptotische Bcl 2-Protein, und Zytoskelett- bzw. Strukturproteine (z.B. Aktin, Lamin), deren Spaltung für die Veränderung der Membranintegrität und die Bildung apoptotischer Vesikel verantwortlich ist.

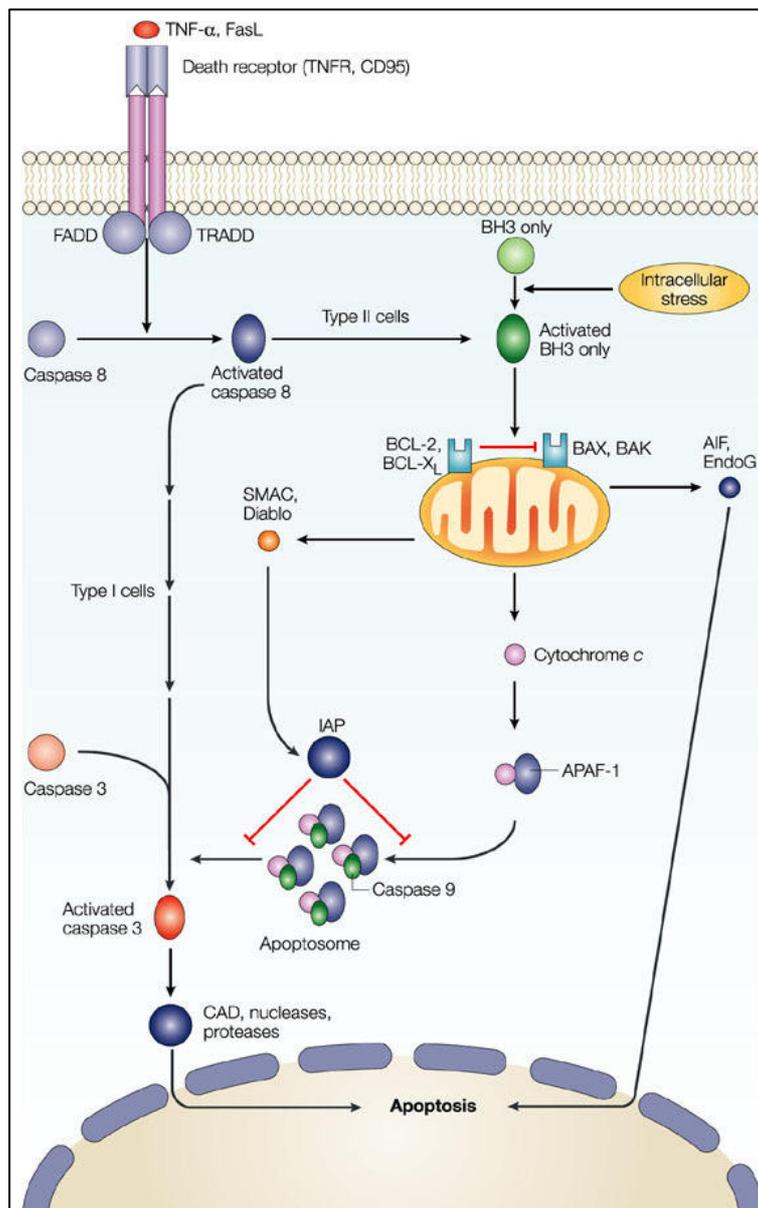
Die Caspaseaktivität steht auch mit der Induktion der DNA-Fragmentierung in direktem Zusammenhang. So kann die Effektor-Caspase-3 den Inhibitor der apoptosespezifischen Nuklease CAD (ICAD: "inhibitor of caspase activated dnase") spalten, worauf die Nuklease aus dem heterodimeren Komplex entlassen wird, in den Zellkern transloziert und die DNA fragmentieren kann (Sakahira et al., 1998).

In welchem physiologischen Kontext die Caspasen Aktivität eine große Rolle spielt, zeigen Maus Knock-Out Modelle. So kommt es z.B. bei *caspase-3*<sup>-/-</sup> und *caspase-9*<sup>-/-</sup>

defizienten Mäuse aufgrund von Defekten in der apoptotischen Signalübertragung während der embryonalen Gehirnentwicklung zu einer pathologisch erhöhten Ansammlung von neuronalem Gewebe. Beide Tiermodelle weisen einen ähnlichen Phänotyp auf und zeichnen sich durch perinatale Letalität aus [ (Kuida et al., 1996), (Kuida et al., 1998), (Hakem et al., 1998)]. Im Vergleich dazu weisen *caspase-8*<sup>-/-</sup> defiziente Mäuse sich durch eine reduzierte Menge an hämatopoetischen Vorläuferzellen und durch eine pathologische Herzmuskelentwicklung aus, die sich embryonal letal auswirkt (Varfolomeev et al., 1998).

Bestimmte genetisch bedingte humane Krankheitsbilder wie das Autoimmun Lympho-proliferatives Syndrom (ALPS) lassen sich u.a. auf eine mangelnde Caspaseaktivität zurückführen. So wurden in ALPS Typ II Patienten Mutationen in der Caspase-10 gefunden (Wang et al., 1999). In Neuroblastomen wiederum (ein maligner Tumor der embryonalen Neuralleiste des sympathisches Nervengewebes) wurden Apoptose inhibierende Mutationen und Methylierungen innerhalb des *caspase-8* Gens entdeckt [ (Teitz et al., 2000), (Fulda et al., 2001)]. Obwohl die Aktivierung der Caspase-Kaskade allgemein immer noch als "Point of no return" im apoptotischen Prozeß angesehen wird, mehren sich seit einiger Zeit Evidenzen dafür, daß programmierter Zelltod auch in Abwesenheit aktivierter Caspasen stattfinden kann [ (Kroemer and Martin, 2005), siehe Kapitel 1.8].

## 1.4 Signalwege der Apoptose in Typ I und Typ II Zellen



**Abbildung 3: Extrinsischer und Intrinsischer Signalweg der Apoptose**

In Typ I Zellen erfolgt die Aktivierung der Effektor-Caspase-3 über die extrazelluläre Bindung der trimerisierten Liganden an die entsprechenden Death Rezeptoren und der anschließenden Bildung des so genannten DISC Komplexes („death inducing signaling complex“) im Zytoplasma der Zelle. Dabei kommt es zur Rekrutierung von Procaspase-8, die durch Autoprozessierung aktiviert wird und direkt Caspase-3 spaltet. Diese ihrerseits spaltet viele zelluläre Substrate wie z.B. ICAD („Inhibitor of Caspase-activated Deoxyribonuclease“), was zur Aktivierung der Apoptose-spezifischen Nuklease CAD führt. In Typ II Zellen erfolgt die Aktivierung von Caspase-3 indirekt über den mitochondrialen Weg, da sich im Vergleich zu Typ I Zellen weniger DISC Komplexe bilden und somit auch geringere Mengen an aktiver Caspase-8 entstehen können. Jedoch kann Caspase-8 das BH3 only Protein BID spalten, welches seinerseits als tBID zu den Mitochondrien transloziert und mit Hilfe von BAX oder BAK zur Cytochrom-c Freisetzung initiiert. Zusammen mit APAF-1 und Procaspase-9 kommt es in Anwesenheit von dATP/ATP zur so genannten Apoptosombildung, die zur Aktivierung von Caspase-

9 und anschließender Spaltung von Caspase-3 führt. Zusätzlich zur Freisetzung von Cytochrom-c kommt es auch zur Translokation anderer pro-apoptischer Proteine aus dem Intermembranraum der Mitochondrien wie z.B. AIF („apoptosis inducing factor“) oder SMAC/DIABLO. SMAC/DIABLO inhibiert seinerseits die anti-apoptischen IAP Proteine („inhibitor of apoptosis“). (Abbildung entnommen aus (Byrne and Ojcius, 2004))

Die Beobachtung, daß in verschiedenen Zellen die apoptotische Signaltransduktion von so genannten Death Rezeptoren (wie z.B. TNFR („tumor necrosis factor receptor“) oder CD95) unterschiedlich reguliert wird, führte zur Identifizierung zweier CD95-Signalwege (Scaffidi et al., 1998). In „Typ I“-Zellen wie z.B. SKW 6.4 (humane B-Zelllinie) oder H9 (humane T-Zelllymphomzelllinie) wird der in Abbildung 3 schematisch dargestellte extrinsische Apoptosesignalweg ausgelöst. Dabei führt die DISC-Bildung über FADD zur Aktivierung ausreichender Mengen

Caspase-8, die wiederum direkt die Caspase-Kaskade auslöst. Im Gegensatz dazu führt in "Typ II"-Zellen wie z.B. Jurkat oder CEM (humane Leukämie T-Zelllinien) eine verminderte DISC-Bildung zu einer geringeren Menge aktivierter Caspase-8. Hier werden für die Aktivierung der Effektorcaspase-3 bei Death Rezeptor-induzierter Apoptose mitochondriale Veränderungen benötigt, die über Cytochrom-c Freisetzung, Apoptosombildung und Caspase-9 Aktivierung (siehe Kapitel 1.6) letztendlich zur Spaltung von Pro-Caspase-3 führen und dadurch den apoptotischen Signalübertragungsweg verstärken. Ausgelöst wird dieser Vorgang durch das proapoptische Bcl-2-Familienmitglied Bid, das durch Caspase-8 gespalten wird. Nach Translokation von Bid in die äußere Mitochondrienmembran gelangt Cytochrom-c in das Zytoplasma [ (Gross et al., 1999; (Han et al., 1999; (Luo et al., 1998)]. Die Freisetzung von Cytochrom-c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien spielt eine zentrale Rolle in der Aktivierung des für Typ II-Zellen wichtigen apoptotischen Signalweges. Cytochrom-c ist ein wichtiger Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette, der Elektronen von der Cytochrom-c-Reduktase auf die Cytochrom-c-Oxidase überträgt. Dieses Protein befindet sich normalerweise im Intermembranspalt, assoziiert mit der inneren Mitochondrienmembran.

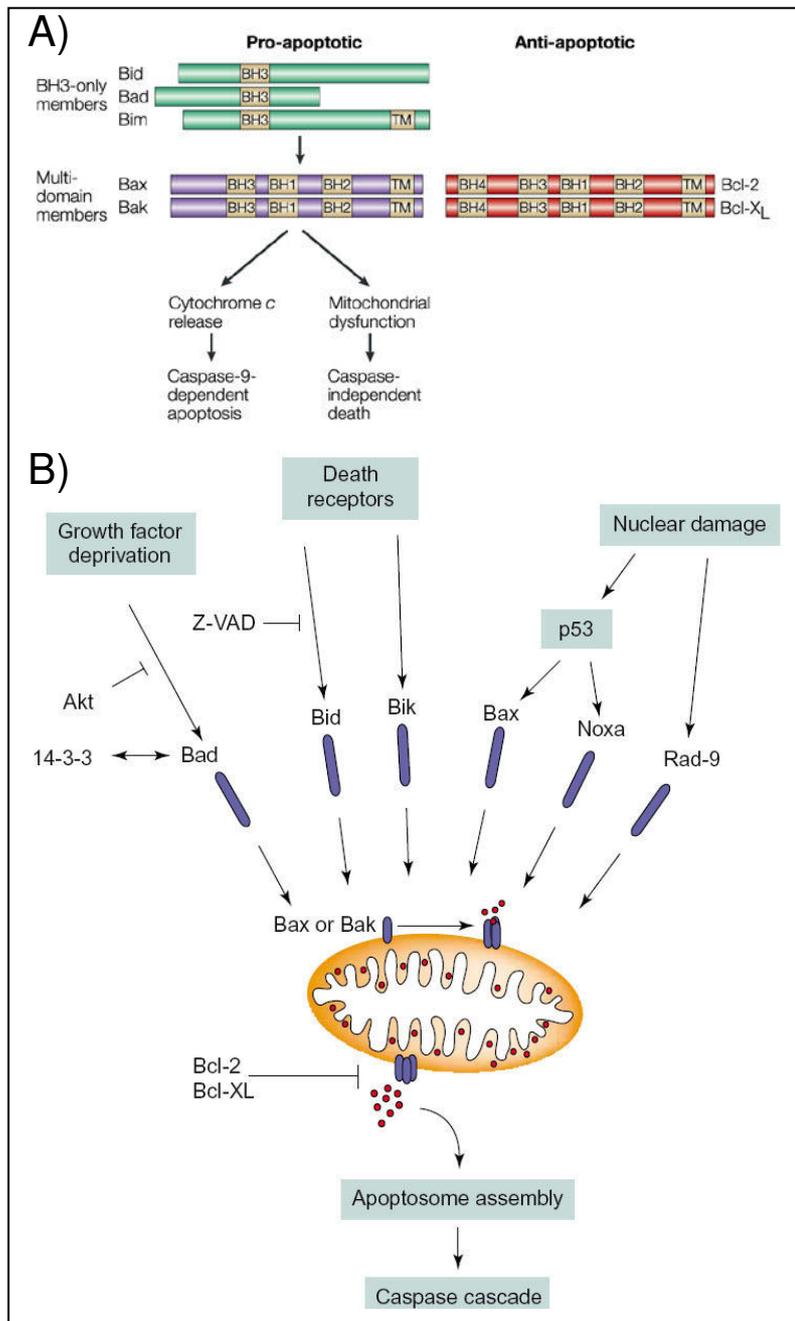
Ein universelles Ereignis während der Apoptose, das nach verschiedenen Stimuli beobachtet wird, stellt der Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials ( $\Delta\Psi$ ) dar, der noch vor der DNA-Fragmentierung beobachtet werden kann [ (Kroemer et al., 1997; (Petit et al., 1995; (Zamzami et al., 1995)]. Hervorgerufen wird dieser Vorgang, der auch "Permeability-Transition" (engl., PT) genannt wird, durch das Öffnen von so genannten PT-Poren der inneren Mitochondrienmembran (Hirsch et al., 1997). Jedoch weisen neuere Arbeiten daraufhin, daß die Translokation von Cytochrom-c aus den Mitochondrien ins Zytosol vor dem Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials ( $\Delta\Psi$ ) und davon unabhängig stattfindet [ (Bossy-Wetzel et al., 1998), (Ikemoto et al., 2000)]. Das in das Zytoplasma freigesetzte Cytochrom-c bindet an spezielle Bindungsmotive im APAF-1-Molekül. Die durch Bindung von Cytochrom-c und dATP induzierte Konformationsänderung von APAF-1 führt nach anschließender ATP Hydrolyse zur Oligomerisierung von sieben APAF-1 Molekülen unter gleichzeitiger Rekrutierung von Caspase-9 über die in beiden Molekülen vorhandenen Caspase-Rekrutierungsdomänen (CARD).

Es entsteht das so genannte Apoptosom, ein oligomerer Komplex, in dem mehrere APAF-1- und Pro-Caspase-9-Moleküle aggregieren [ (Li et al., 1997; (Qin et al., 1999)]. Die Assoziation von Caspase-9 und APAF-1 führt zu der autoproteolytischen Aktivierung von Caspase-9 (Srinivasula et al., 1998), was die Aktivierung weiterer Caspasen, wie z. B. Caspase-3, zur Folge hat und u.a. über die Spaltung des Inhibitors der Nuklease DFF45/CAD zu DNA-Fragmentierung und zu Apoptose führt. Für die Ursachen der Freisetzung von Cytochrom-c während der Typ II-Apoptose werden mehrere Modelle diskutiert. Eines dieser Modelle postuliert die Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran nach Öffnen der PT-Pore und dem nachfolgenden osmotischen Schock (Marzo et al., 1998a). Eine zweite Hypothese basiert auf der Interaktion von Bcl-2 Familienmitgliedern mit dem spannungsabhängigen Anionenkanal der PT-Pore (engl.: Voltage Dependent Anion Channel, VDAC), wonach Cytochrom-c in das Zytoplasma freigesetzt werden kann und zur Caspasenaktivierung beiträgt (Shimizu et al., 1999). Diskutiert wird in diesem Zusammenhang die Eigenschaft der pro-apoptotischen Vertreter der Bcl-2 Familie Bax und Bak, Poren in Membranen bilden zu können, denn diese Proteine besitzen eine strukturelle Ähnlichkeit zu dem Diphtheria-Toxin und sind teilweise in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert [ (Muchmore et al., 1996; (Zamzami et al., 1998)]. Die Porenformation von Bax und Bak ist bisher jedoch nur *in vitro* nachgewiesen worden. Während "Typ II-Apoptose" durch anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie (Bcl-2 oder Bcl-X<sub>L</sub>) inhibiert werden kann, ist das bei dem "Typ I- Apoptose"-Signalweg nicht der Fall. Es kommt zwar auch hier zur Cytochrom-c Freisetzung, die für den Fortgang der Apoptose jedoch nicht essentiell ist. Ein zusätzliches Kriterium für die Unterscheidung der beiden CD95-vermittelten Signalwege ist, daß einige Stimuli, wie z.B. Zugabe von Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung oder Ceramid, nur in bestimmten Zelllinien, die sich dem Typ II zuordnen lassen, unter Zugabe des Proteinsynthesehemmstoffes Cycloheximid Apoptose auslösen (Linsinger et al., 1999; (Scaffidi et al., 1999)]. Zum Schluß soll auch erwähnt werden, daß das hier präsentierte Modell von "Typ I-/ Typ II" -Zellen im Zusammenhang mit CD95-induzierter Apoptose durchaus kontrovers diskutiert wird. Nach Auffassung einiger Forscher wird die "physiologische" Aktivierung und Apoptose des Fas-Rezeptor in keinem Fall durch Bcl-2 inhibiert (Huang et al., 2000).

## 1.5 Regulation der mitochondrialen Apoptose durch Proteine der Bcl-2 Familie

Eine wichtige Rolle bei der Regulation des intrinsischen apoptotischen Signalübertragungsweges spielen die Mitglieder der Bcl-2 Familie. Sie sind evolutionär hoch konservierte Proteine, die sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten nachgewiesen wurden (Kirkin et al., 2004). Benannt wurde diese Familie nach dem Genprodukt Bcl-2 („B-Cell Lymphoma“), welches in den meisten malignen follikulären B-Zelllymphomen aufgrund der Chromosomentranslokation t(14,18) überexprimiert wird. *Bcl-2* fungiert als ein Proto-Oncogen, daß bei Überexpression den programmierten Zelltod inhibiert (Chao and Korsmeyer, 1998). Wie in Abbildung 4 A) schematisch dargestellt, werden die Mitglieder dieser Familie bezüglich ihres Apoptoseverhaltens in zwei Gruppen unterteilt. Während die Proteine Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> an der Hemmung der apoptotischen Signale beteiligt sind, wirken z.B. die Proteine BAX und BAK pro-apoptotisch (Cory et al., 2003), (Daniel et al., 2003)]. Sie werden gemeinsam als Multi Domänen Proteine bezeichnet, da sie mindestens aus den drei konservierten BH 1-3 („bcl-2 homologue“) und einer Transmembrandomäne bestehen. Die Domänen BH 1-3 sind dabei für die Interaktion der Bcl-2 Familienmitglieder untereinander zuständig. In Ergänzung dazu ist die BH4 Domäne für die anti-apoptotische Aktivität der Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> Proteine notwendig. Die Mitglieder der pro-apoptotischen Bcl-2 Proteine werden wiederum in zwei Untergruppen eingeteilt. Wie der Name „BH3-only“ schon andeutet, besitzen die Mitglieder dieser Untergruppe wie z.B. BIM, BAD und BID nur die konservierte BH 3 Domäne, die allerdings für die pro-apoptotische Aktivität dieser Proteine von essentieller Bedeutung ist [ (Huang and Strasser, 2000), (Kelekar and Thompson, 1998)].

Der Mechanismus der Signaltransduktion durch Proteine der Bcl-2 Familie beruht auf Interaktionen verschiedener Familienmitglieder und ihrer Fähigkeit zur Porenbildung in Lipidmembranen. Bcl-2 Homologe können sich sowohl zu Homo- wie auch Heterodimeren zusammenschließen (Sattler et al., 1997). Die Aktivierung der pro-apoptotische BH3-only Familienmitglieder erfolgt auf unterschiedliche Weisen (siehe Abbildung 4 B)).



**Abbildung 4 A): Sekundärstruktur der Proteine der Bcl-2 Familie**

Die B Cell Lymphoma-2 (Bcl-2) Familie umfasst sowohl anti- wie auch pro-apoptische Mitglieder.

Die anti-apoptischen Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> Proteine sind Multidomänproteine, die aus den konservierten Sequenzmotiven BH 1-4 (Bcl-2 Homology) bestehen. Die pro-apoptischen Mitglieder können weiter in zwei Untergruppen aufgeteilt werden. Während BAX und BAK zu der Gruppe der BH1-3 Multidomänproteine gehören, enthalten so genannte „BH3 only“ Proteine wie Bim, Bad, Bid oder NOXA nur die BH3 Domäne.

Alle Mitglieder besitzen die Eigenschaft, Heterooligomere zu formen. Sowohl die pro- wie auch die anti-apoptischen Multidomänproteine der Bcl-2 Familie lagern sich mit ihrer C-terminalen Transmembran-Domäne (TM) in der äußeren Mitochondrienmembran ein, wo sie über die Regulation der Cytochrom-c Freisetzung den intrinsischen apoptotischen Signalübertragungsweg kontrollieren. (Abbildung entnommen aus (Jesenberger and Jentsch, 2002))

**Abbildung 4 B): Signalwege der Cytochrom-c Freisetzung durch pro-apoptische Mitglieder der Bcl-2 Familie**

„BH3 only“ Proteine wie Bid, Bim oder Bad fungieren als kontextspezifische intrazelluläre Sensoren, die viele von einander unabhängige Arten des zellulären Stresses (z.B. DNA Schädigung, Serumentzug) registrieren, diese Signale integrieren und in die Freisetzung von Cytochrom-c umsetzen. Nach posttranslationaler Modifikation lagern sie sich entweder in die äußere mitochondriale Membran ein und/oder induzieren durch Konformationsänderung die Oligomerisierung der pro-apoptischen Bcl-2 Proteine BAX und BAK. Der sich anschließende Prozess der Freisetzung von Cytochrom-c, die zur Apoptosomenbildung/ Caspasen Aktivierung benötigt wird, kann durch die anti-apoptischen Bcl-2 Proteine Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> inhibiert werden. Es wird angenommen, daß sie mit BAX und BAK interagieren und dadurch deren pro-apoptische Funktion neutralisieren können. (Abbildung entnommen aus (Adrain and Martin, 2001))

So wird BAD z.B. als Antwort auf den Entzug von Wachstumsfaktoren dephosphoryliert, so daß die inaktivierende Bindung an das 14-3-3 Protein

aufgehoben wird [ (Datta et al., 2002; (Franke and Cantley, 1997)]. Die Aktivierung von BID, einem anderen BH3-only Protein, erfolgt nach proteolytischer Spaltung durch Caspase-8 oder Granzym B [ (Li et al., 1998b), (Heibein et al., 2000)]. Die physiologische Relevanz von Bid und Bad für die Übertragung apoptotischer Signalkaskaden erscheint unterschiedlich und zelltypspezifisch zu sein. So entwickeln BAD Knock-Out Mäuse sich normal, jedoch entstehen mit der Zeit B Zellymphome (Ranger et al., 2003). Aus *bid*<sup>-/-</sup> Mäusen isolierte Hepatozyten sind bei Behandlung mit agonistischen anti-Fas Antikörpern im Vergleich zu sensitiven Wildtyp-Zellen gegenüber der Death Rezeptor-vermittelten Apoptose resistent (Yin et al., 1999). Auch entwickeln diese Mäuse schwere myeloproliferative Erkrankungen (Zinkel et al., 2003).

Allen BH3 Familienmitgliedern ist gemeinsam, daß ihre apoptoseauslösende Funktion von den pro-apoptotischen Bcl-2 Multidomän-Proteinen BAX und BAK abhängig ist. BAX z.B., welches zunächst im Zytosol im inaktiven Zustand vorliegt, transloziert nach Induktion der Apoptose zu den Mitochondrien und integriert in die mitochondriale Membran (Korsmeyer et al., 2000). Verhindert werden kann dies durch Dimerisierung mit anti-apoptotischen Familienmitgliedern wie Bcl-2 oder Bcl-X<sub>L</sub>. Jedoch gelang es mit Hilfe von biochemischen Methoden bislang nicht BAX/Bcl-2 bzw. BAX/Bcl-X<sub>L</sub> Heterodimere aus lebenden Zellen zu isolieren (Green, 2005). Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> spielen bei der während der Embryonalentwicklung stattfindenden Apoptose eine wichtige Rolle, was bei Maus Knock-Out Modellen deutlich wird. Für den Phänotyp *bcl-2* defizienter Mäuse ist der zum Wildtyp vergleichsweise hohe Verlust (und somit eine extrem reduzierte Anzahl) u.a. an Lymphozyten charakteristisch (Nakayama et al., 1993). Der *bcl-xl* Knock-Out ist in Mäusen embryonal letal, verursacht durch eine erheblich erhöhte Apoptoserate im Bereich des Gehirns und des zentralen Nervensystems (Motoyama et al., 1995). BH3-only Proteine wiederum binden an Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> und setzen so BAX und BAK aus den inhibierten Komplexen mit Bcl-2/ Bcl-X<sub>L</sub> frei (Antonsson, 2001). Also bestimmt das Verhältnis zwischen apoptose-induzierenden und anti-apoptotischen Bcl-2 Proteinen, ob Cytochrom-c aus den Mitochondrien freigesetzt und Caspasen aktiviert werden. Die Funktionen von BAX und dem homologen Protein BAK sind weitgehend redundant. Die jeweiligen Einzelgen Knock-Out Studien zeigen, daß sich

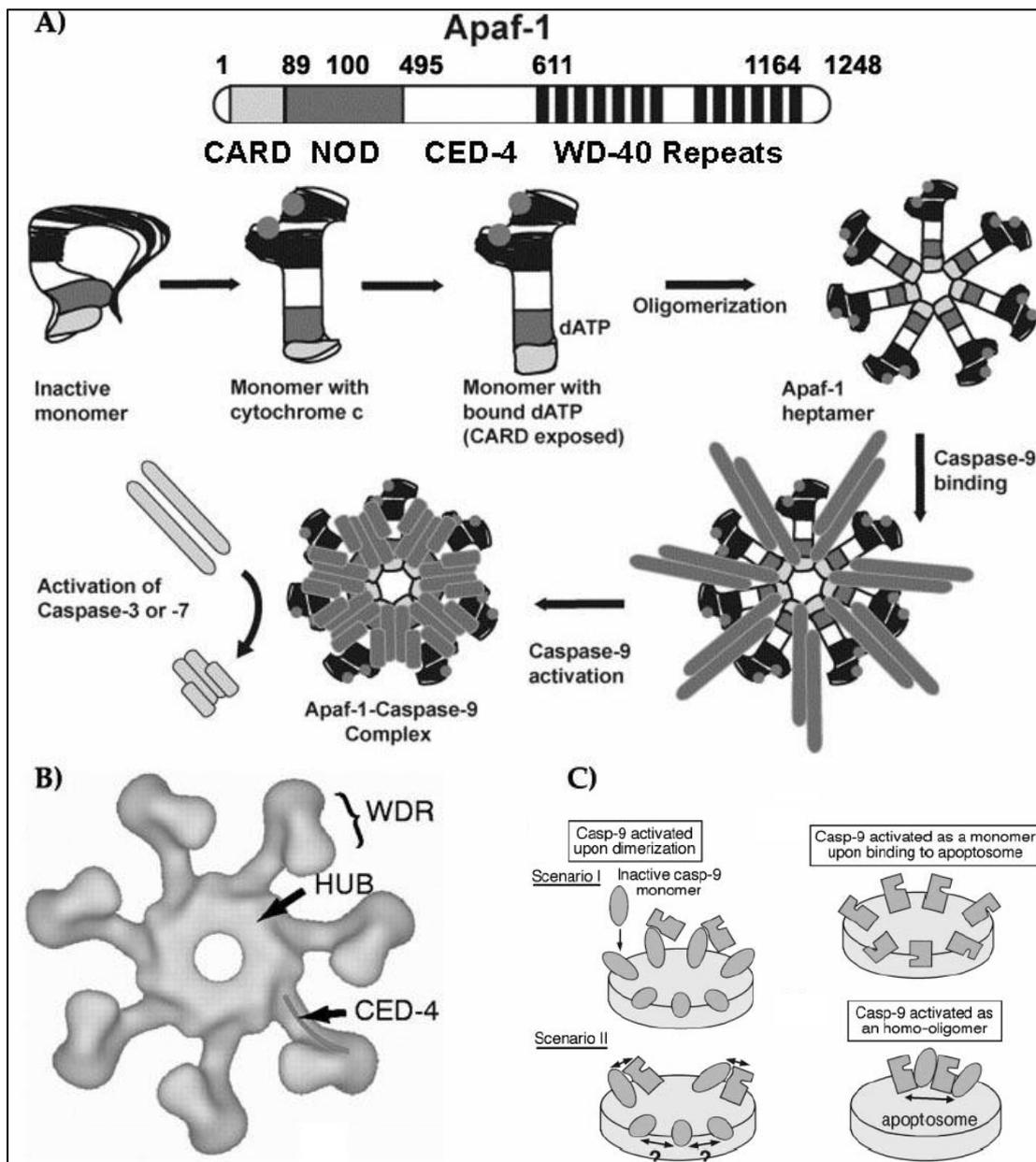
diese Mäuse normal entwickeln. Jedoch sterben (*bax*<sup>-/-</sup>/*bak*<sup>-/-</sup>) Mäuse kurz nach ihrer Geburt, da sie schwere Entwicklungsstörungen (z.B. in Form einer massiv erhöhten Anzahl an Lymphozyten) aufweisen [ (Knudson et al., 1995; (Lindsten et al., 2000), (Wei et al., 2001)].

BH3-only Proteine können nur in Anwesenheit der pro-apoptotischen Bcl-2 Multidomän-Proteine BAX und/oder BAK Apoptose auslösen (Willis and Adams, 2005). Über den Mechanismus der BAX-vermittelten Freisetzung von Cytochrom-c und anderen pro-apoptotischen Faktoren wie AIF und SMAC aus dem mitochondrialen Intermembranraum existieren verschiedene Theorien. Zum einen konnte mittels künstlicher Membranen nachgewiesen werden, daß BAX durch Oligomerisierung Poren bilden kann. Weitere Proteine wie BID und BAK sind auch daran beteiligt [ (Kroemer and Reed, 2000), (Antonsson, 2001)]. Ein anderer möglicher Mechanismus besteht in der Regulation des VDAC („voltage dependent anion channel“) durch BAX in der äußeren Mitochondrienmembran. Durch Bindung wird die Aktivität von VDAC moduliert. Es kommt zur Öffnung dieses Kanals, so daß Cytochrom-c ins Zytoplasma freigesetzt wird (Shimizu et al., 1999). Durch Bcl-2 wird diese Porenbildung negativ reguliert (Gottlieb, 2000). BAX scheint auch an der Regulation der PTP („permeability transition pore“) beteiligt zu sein. Dieser Proteinkomplex erstreckt sich über die äußere und innere Mitochondrienmembran und kann durch Bindung von BAX geöffnet werden (Antonsson, 2001). Der sich anschließende Einstrom von Ionen durch Osmose, der Zusammenbruch des Protonengradienten der inneren Mitochondrienmembran und die Unterbrechung der Atmungskette führen zum Anschwellen der Mitochondrien und zur Schädigung der äußeren Mitochondrienmembran. PTP Inhibitoren können zwar die Freisetzung von Cytochrom-c und das Zusammenbrechen des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_M$ ) verhindern, jedoch lassen sich in bestimmten Zellsystemen auch während der Apoptose funktionsfähige Mitochondrien nachweisen (Green and Reed, 1998). Das bedeutet, daß PTP an der BAX-vermittelten Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum beteiligt ist (Zamzami et al., 1996), jedoch dieses per se das  $\Delta\Psi_M$  in der Regel nicht beeinflusst. Möglicherweise sind neben BAX mehrere verschiedene regulatorische Systeme an der Permeabilitätskontrolle der inneren und äußeren Mitochondrienmembran beteiligt.

## 1.6 Bildung des Apoptosom Komplexes

Die zentrale Schaltstelle vieler verschiedener apoptotischer Signale sind die Mitochondrien. Sie integrieren die Signale, die z.B. durch Zytostatika, Hitzeschock, Bestrahlung oder durch den Entzug von Wachstumsfaktoren hervorgerufene Schädigungen der Zelle ausgelöst werden. Die erste Verbindung zwischen Apoptose und Mitochondrien wurde in einem *in vitro* System beobachtet, in dem gezeigt werden konnte, daß angereicherte Mitochondrienfraktionen für die Auslösung des Apoptoseprogramms benötigt wurden (Newmeyer et al., 1994). Neben der Beeinflussung des zytoplasmatischen pH-Wertes und der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kommt es zu einer Freisetzung einer Vielzahl von Proteinen aus dem mitochondrialen Intermembranraum, die für die Induktion der intrinsischen Apoptose Signalkaskade wichtig sind und die ins Zytoplasma translozieren. Die verantwortlichen Proteine und der jeweilige Mechanismus werden nun im Folgenden näher erläutert.

Cytochrom-c (Cyt c), ein wichtiger Bestandteil der mitochondrialen Elektronentransportkette, initiiert nach Verlassen der Mitochondrien die Bildung des so genannten Apoptosomkomplexes. Lin und Kollegen konnten 1996 zeigen, daß in zellfreien Systemen zur Aktivierung der Effektor-Caspase-3 dATP und Cytochrom-c benötigt werden (Liu et al., 1996). Wie in Abbildung 5 A) dargestellt, interagiert Cyt c mit APAF-1 („apoptotic protease activating factor 1“) und induziert durch Bindung an die C-terminalen WD-40 Domänen des inaktiven APAF-1 Monomers eine Konformationsänderung. Diese Öffnung der Struktur erhöht die Affinität der APAF-1 Nukleotid bindenden Domäne (NOD: „nucleotide binding and oligomerisation domain“) zu dATP/ ATP. Unter dATP Bindung oligomerisieren APAF-1-Moleküle. Die dadurch exponierte N-terminale APAF-1 CARD Domäne („caspase recruiting domain“), welche ansonsten durch die C-terminalen WD-40 Repeats intramolekular autoinhibiert wird, ermöglicht die Rekrutierung von Pro-Caspase-9 über die N-terminale APAF-1 CARD Domäne in dem entstehenden ca. 700 kDa großen Apoptosomkomplex.



**Abbildung 5 A): APAF-1 und Apoptosom Bildung**

Das APAF-1 Molekül setzt sich aus folgenden vier Domänen zusammen: Der N-terminalen CARD Domäne („caspase recruiting domain“) folgen die NOD Domäne („nucleotide binding and oligomerization domain“) und die CED-4 homologe Linker Region. Abschließend befinden sich am C-Terminus 12-13 Wiederholungen so genannter WD-40 Motive (WD-40 Repeats). APAF-1 liegt zunächst im Zytosol als inaktives Monomer vor.

Das aus den Mitochondrien freigesetzte Cytochrom-c bindet an die C-terminalen WD-40 Repeats und verursacht dabei eine dATP/ ATP abhängige Konformationsänderung. Diese ermöglicht den APAF-1 Proteinen zu oligomerisieren und einen heptamer angeordneten Komplex zu bilden. Über CARD-CARD Interaktion vermittelte Rekrutierung von Pro-Caspase-9 wird das so genannte Apoptosom Holoenzym gebildet, in dem Caspase-9 aktiviert vorliegt. (Abbildung entnommen aus (Czerski and Nunez, 2004))

**Abbildung 5 B): Drei-Dimensionale Struktur des Apoptosomkomplexes**

Die sieben zum Apoptosom oligomerisierten APAF-1 Proteine bilden einen Komplex, der ähnlich wie eine Felge aufgebaut ist. Im Zentrum (HUB) liegen die N-terminalen CARD Domänen zusammen mit den für die Oligomerisierung verantwortlichen NOD Domänen. Die kreisförmig wie Speichen aus dem Zentrum nach außen ragenden Bereiche bestehen aus der CED-4 Linker Region, an der sich die C-terminalen WD-40 Repeats anschließen. (Abbildung entnommen aus (Acehan et al., 2002))

**Abbildung 5 C): Modelmechanismen der Caspase-9 Aktivierung im Apoptosom**

Gegenwärtig werden drei mögliche Szenarien der Caspase-9 Aktivierung diskutiert. Zum einen führt die lokale Konzentration von inaktiven Caspase-9 Monomeren im Apoptosom zu einer zusätzlichen Rekrutierung von inaktiven Caspase-9 Molekülen aus dem Zytosol. Dabei kommt es nach Dimerisierung zur Aktivierung.

Zum anderen besteht die Möglichkeit, daß die im Apoptosom gebundenen inaktiven Caspase-9 Monomere miteinander assoziieren und sich dabei gegenseitig aktivieren. Möglich wäre auch, daß die Aktivierung der Caspase-9 Monomere allein durch die Bindung an den heptameren APAF-1 Komplex erfolgen kann. (Abbildung entnommen aus (Shi, 2004))

Anschließend kommt es, vergleichbar der DISC-abhängigen Aktivierung von Pro-Caspase-8, zu einer Autoaktivierung der Initiator-Caspase-9 und zur proteolytischen Aktivierung der Effektor-Caspase-3 (siehe Abbildung 5 A/ B)), welche dann durch die Spaltung von vielen zellulären Substraten das eigentliche Apoptoseprogramm ausführt [ (Zou et al., 1997), (Li et al., 1997)]. Prozessierte Caspase-3 aktiviert jedoch auch die Pro-Caspasen -2 und -6 (Thornberry and Lazebnik, 1998), die wiederum in der Lage sind, Cytochrom-c aus isolierten Mitochondrien in einem sich selbstverstärkenden Mechanismus freizusetzen (Marzo et al., 1998b). Weitere Experimente, bei denen durch Mikroinjektion von Cyt c in das Zytoplasma gesunder Zellen Apoptose ausgelöst wurde, belegen zusätzlich die wichtige Rolle von Cytochrom-c bei der Apoptosom Aktivierung (Zhivotovsky et al., 1998).

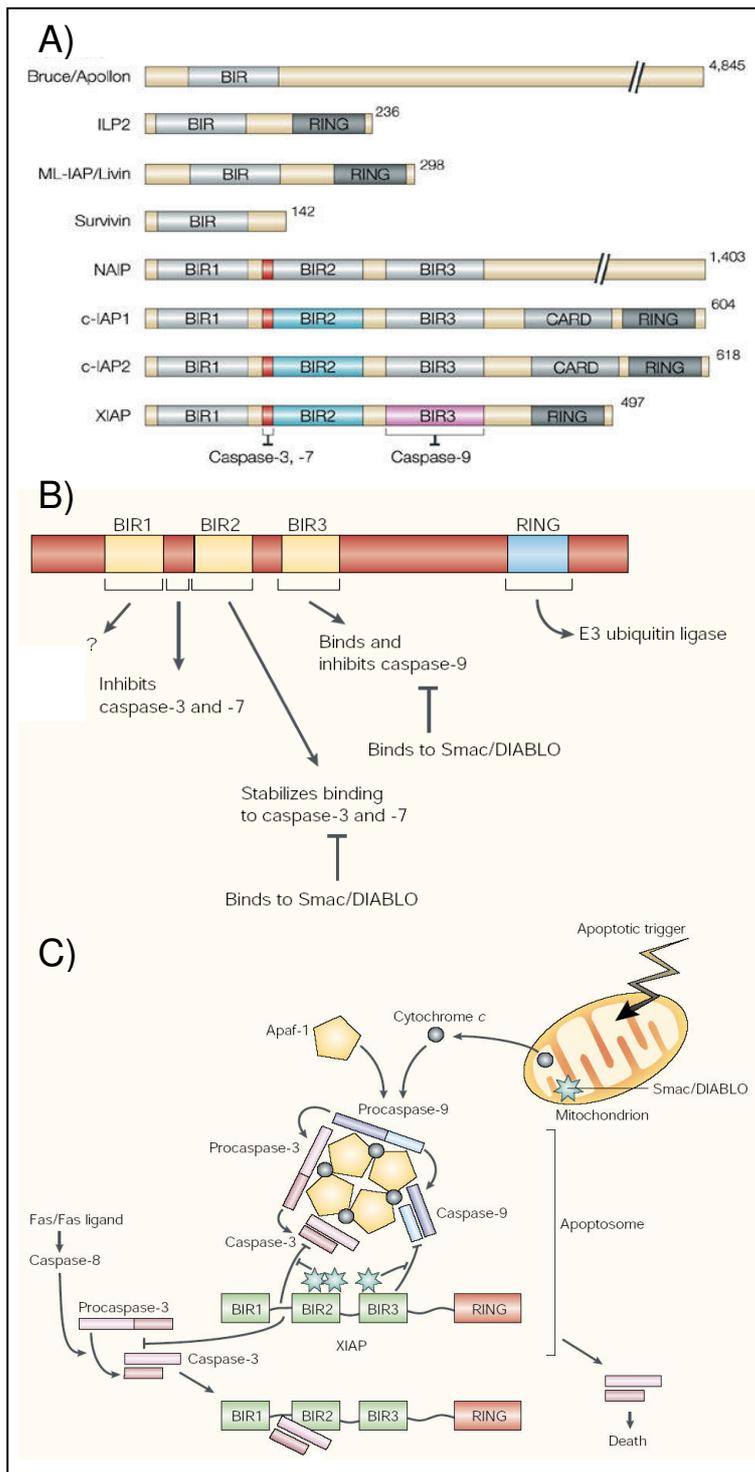
Die zentrale Bedeutung der Apoptosom-induzierten Caspase Aktivierung lässt sich an Mäusen ohne funktionales APAF-1 (APAF-1 Knock-Out Mäuse) demonstrieren. Diese Tiere sterben am Tag 16 der Embryonalentwicklung und zeigen – in Analogie zu *caspase-9*<sup>-/-</sup> defizienten Mäusen – schwere Defekte bei der Gehirn- und Schädelentwicklung [ (Kuida et al., 1998), (Cecconi et al., 1998)]. Seit kurzem jedoch werden Daten diskutiert, die auf die Existenz eines zwar APAF-1 abhängigen, aber von Cyt c und der Formierung des Apoptosoms unabhängigen Mechanismus der Caspasen Aktivierung hinweisen. Mit Hilfe so genannter *Cyt c* Knock-Out/ Knock-In Mäuse, die eine *Cyt c*-Mutante exprimieren, die zwar innerhalb der mitochondrialen Atmungskette normal funktioniert, aber durch eine Punktmutation die Eigenschaft verloren hat, an APAF-1 im Zytoplasma zu binden, konnte gezeigt werden, daß in Thymozyten nach  $\gamma$ -Bestrahlung Pro-Caspase-9 auch *Cyt c*- bzw. Apoptosom-unabhängig aktiviert werden kann. (Hao et al., 2005)

## 1.7 Regulation der Apoptosom vermittelten Caspase Aktivierung

Die in Kapitel 1.6 beschriebenen Erkenntnisse über die Mechanismen der Apoptosom Komplex Bildung basieren auf *in vitro* Experimente und spiegeln nur zu einem Teil die *in vivo* Situation wieder, da in der Zelle zusätzliche Apoptosom-regulierende Proteine für eine effiziente Caspase-9 Aktivierung bzw. Inhibierung benötigt werden.

### 1.7.1 Inhibition von Caspase Aktivität durch Mitglieder der IAP Familie

IAPs („inhibitor of apoptosis protein“) bilden eine konservierte Proteinfamilie mit bisher acht bekannten Mitgliedern bei Säugern [ (Richter and Duckett, 2000), (Salvesen and Duckett, 2002)]. Der Prototyp der IAP Familie, Baculovirus IAP, wurde mit Hilfe genetischer Screening-Experimente entdeckt, bei denen nach Proteinen gesucht wurde, die das Überleben der Wirtszelle nach Infektion durch Baculoviren regulieren (Crook et al., 1993). Alle bisher bekannten IAPs verfügen über ein Zinkfinger ähnliches Strukturmotiv, die so genannte BIR Domäne [„baculovirus IAP repeat“, siehe Abbildung 6 A)]. Die in bis zu drei Tandem Repeats vorkommenden BIR Domänen sind essentiell für die anti-apoptotischen Eigenschaften der IAPs. Das am besten charakterisierte IAP Molekül ist das in fetalem und adultem Gewebe ubiquitär exprimierte XIAP Protein. Es verfügt über drei BIR Domänen, die verschiedene Aufgaben erfüllen. Die Linkerregion zwischen der BIR 1 und 2 Domäne ermöglicht die Bindung an das aktive Zentrum von Caspase-3, während die BIR 3 Domäne mit der kleinen Untereinheit von Caspase-9 (die erst nach der vorangegangenen proteolytischen Aktivierung von Pro-Caspase-9 im Apoptosom entsteht (Srinivasula et al., 2001)) interagiert (siehe Abbildung 6 B)/ C)). Beides führt zur Inaktivierung der Caspasen, jedoch besitzt XIAP zusätzlich über eine C-terminal lokalisierte RING Domäne („really interesting new gene“) mit Ubiquitin-Ligaseaktivität (Freemont et al., 1991), so daß gebundene Caspasen nach erfolgter Ubiquitinierung proteosomal degradiert werden können [ (Suzuki et al., 2001b), (Yang and Li, 2000)].



**Abbildung 6 A): Die IAP Proteinfamilie**

IAPs („inhibitor of apoptosis“) sind anti-apoptotische Proteine, die an Caspasen binden und deren Aktivität negativ regulieren können. Zu dieser Proteinfamilie gehören u.a. c-IAP1, c-IAP2 und XIAP („X linked IAP“). Sie enthalten bis zu drei konservierte BIR Domänen („baculoviral IAP repeat“) und besitzen am C Terminus eine CARD Domäne und/ oder ein RING Finger Motiv. (Abbildung entnommen aus (Riedl and Shi, 2004))

**Abbildung 6 B): Funktionelle Domänen des XIAP Proteins**

Während für das Hemmen von Caspase-3 und -7 ein konserviertes Linkerpeptid verantwortlich ist, das sich N-terminal der BIR2 Domäne befindet, wird Caspase-9 durch Bindung an die BIR3 Domäne von XIAP inhibiert. Das C-terminale RING Finger Motiv besitzt E3 Ubiquitin Ligase Aktivität, so daß an XIAP gebundene Caspasen proteosomal abgebaut werden können. (Abbildung entnommen aus (Holcik and Korneluk, 2001))

**Abbildung 6 C): XIAP als zentraler Inhibitor der Caspase Aktivität**

Sowohl der mitochondriale wie auch der Todesrezeptor vermittelte apoptotische Signalübertragungsweg können durch XIAP negativ reguliert werden, da sowohl die Initiatorcaspase-9 als auch die Effektorcaspase-3 an XIAP binden. SMAC/DIABLO jedoch kann diesem entgegensteuern, da nach Freisetzung aus dem mitochondrialen Intermembranraum die BIR2 und BIR3 Domänen des XIAP Proteins im Zytosol blockiert und somit für die Caspase Bindung unzugänglich gemacht werden. (Abbildung entnommen aus (Holcik and Korneluk, 2001))

Die Aktivität der IAPs ist jedoch nicht nur auf die Inhibierung von Caspasen beschränkt, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Mitose und Zytokinese [ (Li et al., 1998a), (Reed and Bischoff, 2000), (Giodini et al., 2002)]. Knock-Out Mausmodelle weisen eine funktionelle Redundanz der IAP Familienmitglieder untereinander auf. So entwickeln sich z.B. XIAP defiziente Mäuse

normal, und ihre Zellen zeigen keinen Unterschied im Vergleich zu XIAP Wildtyp-Zellen nach apoptotischen Stimuli. Jedoch sind erhöhte Mengen an c-IAP-1 und -2 innerhalb dieser Zellen zu detektieren, was auf einen kompensatorischen Mechanismus schließen lässt (Harlin et al., 2001).

### 1.7.2 Mitochondriale Regulation von IAPs

Die Aktivitäten von IAPs unterliegen wiederum der Regulation durch zwei Proteine, die während der Apoptose aus dem mitochondrialen Intermembranraum freigesetzt werden: Smac/ DIABLO [„second mitochondria derived activator of caspases/ direct IAP binding protein with low pI“; (Du et al., 2000), (Verhagen et al., 2000)] und HtrA2/ Omi [„high temperature requirement protein A2/ Omi stress related regulated serine protease“; (Suzuki et al., 2001a)].

Smac besitzt am N-Terminus eine  $\alpha$  helicale mitochondriale Zielsequenz, die beim Import in das Organell abgespalten wird. Nach Freisetzung aus den Mitochondrien liegt Smac im Zytoplasma als symmetrisches Homo-Dimer vor, das sowohl mit der BIR 2 als auch mit der BIR 3 Domäne von XIAP interagieren kann (Chai et al., 2000), siehe Abbildung 6 B/ C). Dabei spielt das nach der Abspaltung der mitochondrialen Translokationssequenz freigesetzte N-terminale Tetrapeptid für die pro-apoptische Wirkung eine große Rolle (Verhagen et al., 2000). Durch seine Bindung an IAPs antagonisiert Smac deren Caspase inhibierende Wirkung und führt somit zu einer Aktivierung der Caspase-9 und -3. Es kommt zum einen zu einer Kompetition zwischen Caspase-9 und Smac um die Bindung des Inhibitors XIAP, da die Peptidsequenz der XIAP Bindungsstelle in Caspase-9 von Smac imitiert wird (Srinivasula et al., 2001). Zusätzlich kann durch einen so genannten „feed-back“ Mechanismus das von XIAP gebundene Linkerpeptid durch aktive Effektor-Caspase-3 abgespalten und somit der inaktive Zustand von Caspase-9 aufgehoben werden (Zou et al., 2003). Smac-Peptide, die aus dem N-Terminus des Proteins generiert wurden und die an XIAP binden, konnten darüber hinaus in humanen lymphatischen Zellen die Sensitivität für Epothilon B und TRAIL-induzierte Apoptose erhöhen (Guo et al., 2002). Ferner wurde gezeigt, daß die lokale Injektion von N-terminalen Peptiden in Kombination mit TRAIL im murinen Xenotransplant-

Modell eine Regression von Glioblastomen *in vivo* bewirken konnte (Fulda et al., 2002). Interessanterweise zeigen jedoch homozygot Smac deletierte Mäuse *in vitro* und *in vivo* keinen detektierbaren Phänotyp bezüglich ihrer Fertilität und im Ansprechen auf unterschiedliche Apoptosestimuli (Okada et al., 2002).

Ein weiteres Säugerprotein mit einem N-terminalen IAP Bindemotiv ist HtrA2/ Omi. Omi gehört zu der Klasse der Serinproteasen und weist eine hohe Homologie zu dem E.coli Chaperon HtrA auf (Gray et al., 2000). Zunächst im mitochondrialen Periplasma lokalisiert, wird es wie Cytochrom-c und Smac bei Induktion von Apoptose ins Zytosol der Zelle freigesetzt. Dort bindet Omi in einem ähnlichen Mechanismus wie Smac an XIAP und inaktiviert somit dessen Caspase-inhibitorische Funktion (Vaux and Silke, 2003). Zusätzlich ermöglicht die Serinprotease Aktivität von Omi die proteolytische Prozessierung der IAPs und ermöglicht damit den weiteren Fortgang der apoptotischen Signalkaskade [(Verhagen et al., 2002), (Yang et al., 2003)]. Allerdings kann Omi mittels seiner Protease Funktion auch eine Caspasen unabhängige Form des Zelltodes vermitteln (Blink et al., 2004). Die physiologische Rolle von Omi in Säugetierzellen ist noch nicht vollständig verstanden. Omi scheint sowohl während der Pathogenese des Magenkrebs wie auch in der Entwicklung der Alzheimer Erkrankung involviert zu sein [(Lee et al., 2003), (Park et al., 2004)]. Bei der embryonalen Entwicklung Omi <sup>-/-</sup> homozygoter Knock-Out Mäuse wird zwar keine reduzierte Apoptoserate beobachtet, jedoch ist ein erhöhter Verlust an Neuronen detektierbar. Dieser Phänotyp entspricht der neurodegenerativen Parkinsonschen Krankheit und hat den Tod der Tiere innerhalb von 30 Tagen nach Geburt zur Folge. Hierbei scheint für die normale neuronale Entwicklung die Protease Aktivität von Omi eine wichtigere Rolle zu spielen als die IAP bindende Aktivität (Martins et al., 2004).

### 1.7.3 Die PI3K/ AKT Signalkaskade

Ein wichtiger Mediator der Apoptosehemmung ist die Serin/ Threonin Kinase AKT (Proteinkinase B), die über viele Signalwege aktiviert werden kann. Extrazelluläre Signale in Form von Wachstumsfaktoren wie PDGF („platelet derived growth factor“), Zytokine wie IL-2 („interleukin 2“), aber auch Wechselwirkungen mit der extrazellulären Matrix werden im weiteren Verlauf über korrespondierende

Rezeptoren bzw. Integrine auf Ras-GTPasen/ PI3K („phosphatidylinositol-3 kinase“) übertragen (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000). Ein zentrales Molekül im Zytoplasma, an dem diese anti-apoptotischen Signale integriert werden, ist AKT.

Die Aktivierung von AKT steuert das Überleben über pleiotrope Modulationsmechanismen verschiedener Faktoren. So führt AKT über Phosphorylierung zum Abbau von BAD und Caspase-9, zur Hemmung so genannter Forkhead Transkriptionsfaktoren (welche die Transkription apoptoseinduzierender Gene wie z.B. CD95L kontrollieren) und zur vermehrten Expression des anti-apoptotischen IAP Protein Survivin [ (Datta et al., 1997), (Brunet et al., 1999), (Tran et al., 1999), (Cardone et al., 1998)]. Die Aktivierung der PI3K/ AKT Signaltransduktionskaskade erfolgt durch Bindung an ligandenaktivierte Rezeptortyrosinkinasen. Nach induzierter Autophosphorylierung des Rezeptors wird zunächst inaktive PI3K rekrutiert und durch anschließende Freisetzung der katalytischen Untereinheit p110 aktiviert, die ihrerseits PIP2 zu PIP3 („phosphatidylinositol-phosphat“) phosphoryliert. Letzteres wiederum aktiviert PIP3 abhängige Kinasen (PDK), die daraufhin AKT an Serin- und Threonin-Resten phosphorylieren. Aktivierte AKT kann nun selbst mit seinen Substraten interagieren und diese wiederum phosphorylieren. Die Überexpression von konstitutiv aktiver PI3K oder Akt führt zu einer erhöhten Überlebensrate nach Apoptose auslösenden Behandlungen wie z. B. Wachstumsfaktorentzug, UV-Bestrahlung oder Verlust der Matrixbindung. In verschiedenen Tumoren wurden erhöhte Aktivitäten von PI3-Kinase und Akt gefunden. Akt spielt also auch in der Tumorentstehung eine wichtige Rolle, da es die Zellzyklusregulation stören und zu anti-apoptotischen Effekten führen kann (Vivanco and Sawyers, 2002).

Das Tumorsuppressorprotein PTEN antagonisiert die PI3K/ AKT Signalkaskade. Mit Hilfe seiner Phospholipidphosphatase Aktivität werden die Lipidprodukte der PI3K (PIP3) dephosphoryliert und somit die AKT Aktivierung inhibiert. Tumorzellen, die PTEN nicht mehr exprimieren, weisen einen erhöhten PIP3 Spiegel auf, der zu konstitutiven Aktivierung von AKT mit verstärkter Apoptoseresistenz führt (Thakkar et al., 2001).

### **1.7.4 Die anti-apoptotische Wirkung von Hitzeschockproteinen**

Einer anderen Klasse von Proteinen, den Hitzeschockproteinen (Hsps), konnte ebenfalls eine Funktion bei der Kontrolle apoptotischer Prozesse zugeordnet werden. Die Expression von Hsps wird durch eine große Anzahl von Stressfaktoren wie z.B. Temperaturerhöhung induziert und dient neben einer Beteiligung am Faltungsprozeß anderer Proteine dem Schutz der Zelle. Mehrere Studien konnten zeigen, daß Hsps die Aggregation der für die Formierung des Apoptosomkomplexes benötigten Proteine inhibieren. So hemmt Hsp70 die Rekrutierung von Caspase-9 an oligomerisiertes APAF-1 [ (Beere et al., 2000), (Saleh et al., 2000)]. Hsp27 bildet einen Komplex mit Cytochrom-c und verhindert dessen Bindung an APAF-1 [ (Bruey et al., 2000), (Garrido et al., 1998)], während Hsp90 durch Interaktion mit APAF-1 die Cytochrom-c vermittelte Oligomerisierung von APAF-1 antagonisiert (Pandey et al., 2000). Darüber hinaus können Hsps unabhängig von Apoptosom-vermittelter Caspasenaktivierung anti-apoptotisch wirken. Hsp70 z.B. schützt APAF-1 *-/-* defiziente Zellen vor durch Wachstumsfaktorentzug induzierter Apoptose, indem es an AIF (einem weiteren mitochondrialen pro-apoptotischen Intermembraumprotein, das nach Freisetzung ins Zytoplasma und Zellkern transloziert (siehe Kapitel 1.8) inaktivierend bindet [ (Ravagnan et al., 2001), (Susin et al., 1999)].

Einige Studien weisen auf eine onkogene Funktion der Hsps hin. Hsps werden in einer Vielzahl von menschlichen Tumoren und Metastasen (u.a bei Brust- und Lungenkrebs) überexprimiert, und dieses korreliert mit einer schlechteren Prognose bei der klinischen Therapie [ (Jolly and Morimoto, 2000), (Ciocca et al., 1993)]. So ist Hsp70 z.B. bei Brustkrebs für eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapie verantwortlich (Vargas-Roig et al., 1998). Weitere Hinweise auf eine anti-apoptotische Wirkung von Hsps liefern Krebszelllinien, die ein erhöhtes Hsp70 Expressionsniveau zeigen und sensitiv gegenüber verschiedenen apoptotischen Stimuli werden, wenn durch Transfektion von Antisense-DNA die intrazellulären Mengen an Hsp70 reduziert werden (Wei et al., 1995).

## 1.8 Mitochondrial induzierte, Caspasen-unabhängige Mechanismen der apoptotischen Signaltransduktion

AIF („apoptosis inducing factor“) ist ein Flavoprotein mit Homologien zu bakteriellen Oxidoreductasen und nimmt in der intakten Zelle zwei wichtige Funktionen wahr. Zu einen ist dieses Protein ein Radikalfänger, das in der Lage ist, Wasserstoffperoxid abzubauen (Klein et al., 2002), und zum anderen wird eine Funktion in der Atmungskette als Redoxpartner von NADH diskutiert (Mate et al., 2002). Neben dieser Funktion ist AIF auch an der Regulation der Caspasen unabhängigen Apoptose beteiligt. AIF wird nach Apoptoseinduktion aus den Mitochondrien freigesetzt und transloziert anschließend in den Zellkern (Susin et al., 1999). Dort katalysiert es caspasenunabhängig Chromatinkondensation, sowie eine Spaltung des Chromatins in 50 kbp große Fragmente (van Gurp et al., 2003).

Bei der klassischen Caspase vermittelten Apoptose treten diese 50 kbp Fragmente zwar auch auf, diese werden aber durch aktivierte CAD weiter zerkleinert und in 180 bp kleine oligonukleosomale Fragmente gespalten. Der genaue Mechanismus, wie AIF zur Degradation von DNA beiträgt, ist unbekannt, da das Protein selbst keine intrinsische Nuklease Aktivität besitzt [ (van Gurp et al., 2003), (Miramar et al., 2001)]. Studien in *C. elegans* weisen darauf hin, daß AIF mit der Endonuclease G (EndoG) interagiert und beide zusammen an der DNA Degradation mitwirken [ (Wang et al., 2002), (Hansen and Nagley, 2003)]. Neben den Veränderungen innerhalb des Kernes löst AIF auch weitere, für den apoptotischen Zelltod typische Veränderungen in der Zelle aus, wie die Exposition des Phagozytosesignals Phosphatidylserin an der Zelloberfläche oder den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (van Gurp et al., 2003). Bei traumatischem Hirnschaden (Zhang et al., 2002) sowie zerebraler Ischämie (Zhu et al., 2003) konnte nachgewiesen werden, daß AIF-Freisetzung ohne jegliche Aktivierung von Caspasen zum programmierten Zelltod führt.

In neueren Experimenten jedoch zeigen Seth und Kollegen, daß für die während der mitochondrialen Apoptose induzierte Freisetzung von AIF aktivierte Caspase-2 benötigt wird (Seth et al., 2005). Hierbei erscheint das Tumorsuppressorprotein p53 indirekt eine wichtige Rolle zu spielen, da es nach Cisplatin vermittelter Apoptose

die Expression des pro-apoptotischen p53 Targetgenproduktes PIDD („p53 inducible protein with a death domain“) induziert (Lin et al., 2000). PIDD bildet zusammen mit RAIDD („RIP associated Ich-1/CED homologous protein with death domain“) den so genannten PIDDosom Komplex, der, analog zur Caspase-9 Aktivierung im Apoptosom, Pro-Caspase-2 rekrutiert und aktiviert [ (Berube et al., 2005), (Tinel and Tschopp, 2004)] Dabei wird die anschließende Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien ermöglicht. Am Model der AIF -/- Knock-Out Mäuse konnte gezeigt werden, daß AIF essentiell an der Kontrolle von Apoptose während der embryonalen Entwicklung beteiligt ist (Joza et al., 2001).

EndoG ist eine mitochondriale Nuklease, der eine Rolle bei der Replikation mitochondrialer DNA zugeschrieben wird (Cote and Ruiz-Carrillo, 1993). Sie wird in Caspase unabhängiger Weise während der Apoptose aus den Mitochondrien freigesetzt und transloziert in den Zellkern, wo sie - ebenfalls unabhängig von Caspaseaktivität - die Fragmentierung genomischer DNA induziert (Li et al., 2001). Es existieren in der Literatur weitere Hinweise, daß neben CAD und EndoG noch weitere Endonukleasen an der apoptotischen DNA-Fragmentierung beteiligt sein könnten [ (Nagata et al., 2003), (Shiokawa and Tanuma, 2004)].

### **1.9 Fehlregulation der intrinsischen apoptotischen Signalübertragung in humanen Tumoren**

Tumorgenese findet statt, wenn das Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zelltod unterbrochen wird. Defekte bei der Ausführung des Apoptoseprogrammes basieren auf einer veränderten Regulation, die entweder durch Verlust pro-apoptotischer oder durch Überexpression anti-apoptotischer Signale den Zelltod verhindert und zu anomalem Zellwachstum beiträgt.

Eine Auswahl humaner Tumoren, deren mitochondrial vermittelter apoptotischer Signalübertragungsweg fehlreguliert ist, wird in Tabelle 1 zusammengefaßt. So ist das Gleichgewicht pro- zu anti-apoptotischer Bcl-2 Familienmitglieder z.B. in Lymphomen entweder durch eine Überexpression des Bcl-2 Onkogens oder durch inaktivierende Mutationen im BAX Tumorsuppressorprotein erheblich gestört (siehe Kapitel 1.5).

**Tabelle 1: Fehlregulation des intrinsischen apoptotischen Signalübertragungsweges in humanen Tumoren**  
(Tabelle modifiziert nach (Hajra and Liu, 2004))

Intrinsischer Signalweg	Spezifischer Defekt	Art des Tumors	Referenz
Cytochrom-c Freisetzung	• Bcl-2 Überexpression	Follikuläres Lymphom	(Menendez et al., 2004)
	• Bcl-X <sub>L</sub> Überexpression	Brust-, Pankreas-, Kolorektal-Karzinom	(Bai et al., 2005), (España et al., 2004)
	• BAX/ BAK inaktivierende Mutationen	Kolon, Cervixkarzinom,	(Ionov et al., 2000), (Wani et al., 2003)
	• AKT Überexpression (Bad Phosphorylierung)	Brust-, Pankreas-, Ovar-, Prostata-Karzinom	(Altomare et al., 2004), (Schlieman et al., 2003), (Sun et al., 2001)
Apoptosom Bildung	• Keine oder reduzierte APAF-1 Aktivität	Melanom, Leukämie	(Soengas et al., 2001), (Jia et al., 2001)
	• Hsp Überexpression	Brust-, Lungen-Karzinom	(Magdalena et al., 2000), (Jolly and Morimoto, 2000)
Caspase Aktivierung	• AKT Überexpression (Phosphorylierung von Pro-Caspase-9)	Brust-, Pankreas-, Ovar-, Prostata-Karzinom	(Altomare et al., 2004), (Schlieman et al., 2003), (Sun et al., 2001)
	• Survivin Überexpression	Brust-, Pankreas-, Ovar-, Prostata-, Lungen-, Kolon-Karzinom, Melanom, Lymphom	(O'Driscoll et al., 2003) (Tamm et al., 2000)
	• XIAP Überexpression	Akute myeloische Leukämie (AML)	

Auch die Überexpression der AKT Kinase (siehe Kapitel 1.7.3), die durch Phosphorylierung von BAD und Caspase-9 inhibierend in die apoptotische Signalkaskade eingreift, kann in einer Vielzahl epithelialer Tumore beobachtet werden. Defekte in der Apoptosomentstehung, bewirkt z.B. durch erhöhte HSP oder erniedrigte APAF-1 Expressionsmengen oder durch eine Blockade der Freisetzung von Cytochrom-c und dessen Bindung an APAF-1 (siehe Kapitel 1.7.4), werden als Ursachen für die Entstehung vieler humaner Tumoren diskutiert. Aus der Gruppe der anti-apoptotischen IAP Proteine (siehe Kapitel 1.7.2) scheint Survivin die klinisch relevanteste Verbindung zur Krebsentstehung zu haben (Zaffaroni et al., 2005).

Die oben erwähnten Beispiele der Fehlregulation der intrinsischen apoptotischen Signalübertragung spielen eine große Rolle bei der Resistenzentwicklung humaner Tumore gegenüber Chemotherapie und Strahlentherapie während der klinischen Krebsbehandlung (Kaufmann and Vaux, 2003). Therapeutische Strategien verfolgen den Ansatz, die Chemosensitivität der Krebszellen wiederherzustellen und damit die Induktion des programmierten Zelltodes zu erleichtern. Als Beispiel hierfür wären die so genannten Smac Peptide zu erwähnen. So konnten Fulda und Kollegen durch extrazelluläre Applikation eines rekombinant hergestellten zellpermeablen pro-apoptotischen Smac-Peptides (das nicht wie das vollständige Smac Protein zunächst aus den Mitochondrien freigesetzt werden muß, sondern direkt im Zytosol aktiv vorliegt) im Tiermodell die Sensitivität von maligner Glioblastome gegenüber TRAIL induzierter Apoptose erhöhen (Fulda et al., 2002).

## 1.10 Aufgabenstellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Bei der Aktivierung des intrinsischen Apoptose-Signalübertragungsweges kommt es zur Cytochrom-c-Freisetzung aus den Mitochondrien. Die Bindung von Cytochrom-c - zusammen mit dATP oder ATP - an das zytoplasmatische Adaptorprotein APAF-1 führt zu dessen Oligomerisierung. Gemeinsam mit Caspase-9 bildet sich der so genannte Apoptosom-Proteinkomplex. Anschließend wird die Effektor-Caspase-3 zum Apoptosom rekrutiert und aktiviert.

Diese Beobachtungen basieren auf *in vitro* Experimente und spiegeln nur zu einem Teil die Situation *in vivo* wieder, da hier weitere Apoptosom-regulierende Proteine benötigt werden (siehe Kapitel 1.7). Daher wurde von uns nach neuen Proteinen gesucht, die in Hefe-Two-Hybrid Experimenten an das homologe humane APAF-1 Protein binden können. Dabei wurde u.a. ein neues und unbekanntes proapoptotisches Protein gefunden, das von uns CABY („CED-4 and APAF-1 binding protein in yeast“) genannt wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun eine detaillierte molekulare und funktionelle Analyse von CABY durchgeführt werden. Für die molekularbiologische Analyse sollten zunächst CABY spezifische Antikörper als Hilfsmittel für weiterführende Experimente generiert werden. Da CABY ein bisher unbekanntes und noch nicht charakterisiertes Protein war, wurden für die Recherche und das Auswerten der Sequenzinformationen diverse Online Datenbanken benutzt. Biochemische Untersuchungen in Form von *in vitro* GST Pulldown- und *in vivo* Co-Immunopräzipitations-Experimenten wie auch Co-Lokalisationsstudien mit Hilfe der Konfokalen Fluoreszenz Mikroskopie dienten der Verifikation der Bindung von CABY an APAF-1 und der Ermittlung der dafür verantwortlichen Sequenzbereiche. Funktionelle Analysen, die eine Beteiligung von CABY an der Bildung bzw. Aktivierung des Apoptosomkomplexes und damit die Bedeutung von CABY für den intrinsischen mitochondrialen Apoptose Signalübertragungsweg untersuchen sollten, wurden mittels dominant negativer CABY Deletionsmutanten sowie mit siRNA in Zellkulturexperimenten durchgeführt. Schließlich wurde das CABY Expressionsniveau in humanen Tumoren untersucht, um eine mögliche Rolle von CABY als Tumorsuppressorprotein erkennen zu können.

## II. Material und Methoden

### 2.1 Geräte

#### 2.1.1 Zentrifugen

- Tischzentrifugen Typ Biofuge pico für 1,5 und 2 ml Reaktionsgefäße  
(Fa. Heraeus/Hanau)
- Kühlzentrifuge 2K15 für 2 ml Reaktionsgefäße  
(Fa. Sigma/Deisenhofen)
- Kühlzentrifuge Modell Varifuge 3.2. RS für PP-Röhrchen  
(Fa. Heraeus/Hanau)
- Kühlzentrifuge Modell J2-21 M/E mit Rotoren JA 10 und JA 20  
(Fa. Beckman/München)
- Ultrazentrifuge Model L8-M mit Rotor 70 TI (Fa. Beckman/München)

#### 2.1.2 Inkubatoren

- Bakterienkultur : Brutschrank "Function Line", 37°C, nicht begasbar,  
(Fa. Heraeus/Hanau)  
Schüttelinkubator, 37°C, Modell Multitron  
(Fa. Infors AG/Bottmingen, Schweiz)
- Hefekultur : Brutschrank BK600, 30°C, nicht begasbar,  
(Fa. Heraeus/Hanau)  
Schüttelinkubator, 30°C, Modell Multitron  
(Fa. Infors AG/Bottmingen, Schweiz)
- Zellkultur : Brutschrank, IR-Sensor, 37°C, CO<sub>2</sub> begasbar  
(Fa. Sanyo, Wiesbaden)

#### 2.1.3 Heizblöcke

- Thermomixer compact (Fa. Eppendorf/Hamburg)
- Dri-Block DB-3 (Fa. Techne/Dexford-Cambridge, England)

#### 2.1.4 Netzgeräte

- Electrophoresis Power Supply EPS 301 (Fa. AmershamPharmacia Biotech)

### **2.1.5 Elektrophorese-/ Blotting- Apparaturen**

- DNA Minisubcell für Agarosegele (Fa. BioRad/München)
- Gelkammer und -schlitten Modell Hoefer HE 33-GNA 200 (Fa. Pharmacia/Freiburg)
- Vertical-Minigelapparatur MV 120 für PAGE: 8,6 cm x 7,7 cm (Fa. Savant, New York, USA)
- Hoefer SemiPhor (Fa. Pharmacia/Freiburg)

### **2.1.6 Sonstige**

- Autoklav Tuttnauer Systec 2540 EL (Fa. Systec/Wettenberg)
- Perkin Elmer Thermocycler (Fa. Perkin-Elmer/Boston, USA)
- UV-Schirm Modell Transluminator mit Videokamera, Bildschirm und Videoprinter (Fa. UVP Inc./San Gabriel, USA)
- Gel Trockner Modell 483 (Fa. BioRad/München)
- Speed Vac Univapo 150 H (Fa. Kraupa/Martinsried)
- UV/Vis Diode Array Spectrophotometer (Fa. WPA, England)
- UV-Quarzküvetten 6030/40 (Fa. Zeiss/Jena)
- Stickstofftank Typ Chronos Biosafe (Fa. Messer-Griesheim/Düsseldorf)
- Sicherheitswerkbank Typ HA 2448 (Fa. Heraeus/Hanau)
- Laminar Air Flow Gelaire Class 100 (Fa. Gelman/Mailand)
- Milli-Q Water System (Fa. Millipore/Eschborn)
- Kühlschrank (4°C), Gefrierschrank (-20°C) "Glassline" (Fa. Liebherr/Ochsenhausen)
- Gefrierschrank CFC Free (-80°C) (Fa. Sanyo/Wiesloch)
- Wasserbäder (Fa. GFL/Burgwedel)
- Vortex Genie2 (Fa. Bender & Hobein AG/Zürich, Schweiz)
- Magnetrührer Modell IKA-Combimag RCH (Fa. IKA Labortechnik/Staufen)
- pH-Meter Modell PHM 83 autocal (Fa. Radiometer, Dänemark)
- Mikrowelle Privileg 7533P (Fa. Quelle/Fürth)
- Waage Modell 1219 MP, Feinwaage Modell H10T (Fa. Satorius/Göttingen)

- Drehrad für 1,5 ml Reaktionsgefäße (Fa. Gerlinde Kister/Mühlhausen)
- Elektroporationsanlage/-küvetten Gene-Pulser (Fa. BioRad/München)
- Pipetten 2, 20, 200, 1000 µl (Fa. Abimed/Düsseldorf)
- Pipetus-Akku für Glaspipetten (Fa. Hirschmann/Neckartenzlingen)
- Filmkassette Hypercassette (Fa. Amersham, England)
- Bunsenbrenner Usbeck Typ 1230/1
- Zytometer FACS Calibur (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg)
- UV-Cross-Linker Stratalinker 2400 (Fa. Stratagene, Heidelberg)
- Ultraschall-Desintegrator Sonifier 250 (Fa. Branson, Danbury, USA)
- Sterilbank Microflow (Fa. Nunc, Wiesbaden)
- Saugpumpe Laboport N86 (Fa. KNF Neuberger, Freiburg)
- Reaktionsgefäße 1,5 ml (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Pasteurpipetten (Fa. Medox, Dietzenbach)
- Parafilm (Fa. Medox, Dietzenbach)
- Dialysemembran SnakeSkin 10.000 MWCO (Fa. Pierce, Rockford, USA)
- Fluoreszenzmikroskop (Fa. Nikon, Düsseldorf)
- Konfokales Laser Scanning Mikroskop TCS SL (Fa. Leica, Bensheim)
- ÄKTA FPLC Superose 6 Gelfiltrationschromatograph (Fa. Amersham)

### 2.2 Chemikalien und Materialien

β-Mercaptoethanol	Sigma, Karlsruhe
[ <sup>35</sup> S] Methionin (>1000 Ci/mmol; 10 mCi/ml)	AmershamPharmacia
ABTS Tabletten + Puffer	Roche, Mannheim
Acrylamidlösung mit 0,8 % Bisacrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose (Electrophoresis Grade)	LifeTech., USA
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
APS (Ammoniumpersulfat) 10% in H <sub>2</sub> O	Sigma, Steinheim
Borsäure	Sigma, Steinheim
Bradford-Reagenz	BIO-RAD, München
Bromphenolblau	Fluka, Buchs (CH)
BSA (bovines Serumalbumin)	PAA, Linz, Österreich

## II. Material und Methoden

Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliantblau	Merck, Darmstadt
Cycloheximid	Sigma, Steinheim
DABCO (1,4 Diazabicyclo(2.2.2)octan)	Fluka, Buchs, Schweiz
DMEM	BioWhittaker, Belgien
DNA-Marker (1kb ladder)	Gibco, Karlsruhe
DMSO (Dimethyl Sulfoxid)	Merck, Darmstadt
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Steinheim
ECL-Lösung	Amersham, Freiburg
EDTA (Ethylen Diamin Tetra Acetat)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
EtOH (Ethanol)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FCS (fetales Kälberserum)	Gibco, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glutathion-Agarose	Sigma, Steinheim
Glutamin	BioWhittaker, Belgien
H <sub>2</sub> O Bidest (Milli-Q gereinigt und autoklaviert)	
HCl	Roth Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
HygromycinB	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
IPTG (Isopropylthio-beta-D-galactoside)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
LB Broth Base	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Fluka, Buchs, Schweiz
Magnesiumsulfat	Fluka, Buchs, Schweiz
Methanol	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Mowiol	Aventis, Frankfurt

## II. Material und Methoden

Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumsulfat	Roth, Karlsruhe
Natronlauge	AppliChem, Darmstadt
Nitrocellulose Membran	Fa. Schleicher, Daßel
Objektträger	Roth, Karlsruhe
PBS	BioWhittaker, Belgien
Penicillin/ Streptomycin	BioWhittaker, Belgien
Polyacrylamid 30% Acrylamid / 1% Bisacrylamid-Lösung	Roth, Karlsruhe
PEG 4000 (Polyethylenglykol)	AppliChem, Darmstadt
Protein Molekulargewichtsstandard	Gibco, Karlsruhe
Protease-Inhibitor Mix (COMPLETE)	Roche, Mannheim
Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
PMSF	Roth, Karlsruhe
Ponceaurot	Fluka, Buchs, Schweiz
Polylysine	Sigma, Steinheim
RPMI	Invitrogen, Karlsruhe
Protein A/G Sepharose	Santa Cruz, USA
Puromycin	Calbiochem, Bad Soden
RNase A	Roche, Mannheim
RNasin	Promega, Heidelberg
Saponin	Sigma, Taufkirchen
Staurosporin	Alexis, Grünberg
TRAIL (Killer-TRAIL)	Alexis, Grünberg
Tris-HCl	AppliChem, Darmstadt
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin)	Roth, Karlsruhe
Triton-X 100	Fluka, Buchs, Schweiz
Trypsin/ EDTA	Gibco, Karlsruhe
Tween 20	Pharmacia, Schweden

### 2.2.1 Kits

- Mini/ Maxi Präp Kit (Fa. Qiagen)
- Reticulozyten Lysate: *In vitro* Transkription/ Translations Kit (TNT) plus RNasin (Fa. Promega) und [<sup>35</sup>S] Methionin (Fa. Amersham)
- HiTrap Protein A/G Affinity Columns (Fa. Pharmacia Biotech, Heidelberg)

### 2.2.2 Häufig verwendete Lösungen

- 10 x TE                      0,1 M Tris-HCl 10 mM EDTA  
(Tris-EDTA)                      pH 7,5 (mit konz. HCl einstellen, steril filtrieren)
- 1 M Tris                      pH 7,5 (mit konz. HCl einstellen, steril filtrieren)
- 1,5 M Tris-HCl              pH 8,6 (mit konz. HCl einstellen, steril filtrieren)
- 0,75 M Tris-HCl             pH 6,8 (mit konz. HCl einstellen, steril filtrieren)
- 50 % (w/v) PEG              (steril filtrieren)
- 10 M NaOH
- 0,5 M EDTA                  pH 8,0 (mit konz. NaOH einstellen)
- 5 M KOAc                      147,2 g KAc in 300 ml H<sub>2</sub>O  
57,5 ml Eisessig  
142,5 ml H<sub>2</sub>O  
pH 7,5 (mit Eisessig einstellen, steril filtrieren)
- 3 M NaOAc                    pH 5,2 (mit Eisessig einstellen)

### 2.2.3 Material für die Molekularbiologie

- Phenol: Chloroform: Isoamyl-Alkohol (25:24:1, Fa. Sigma)
- GTE                              50 mM Glucose  
(für Bakterien-                      10 mM EDTA  
Plasmidisolation)                25 mM Tris, pH 8,0 (steril filtrieren)
- Bakterien-Lysispuffer 0,2 N NaOH  
(für Plasmidisolation) 1 % SDS
- 6 x Auftragepuffer            50% (w/v) Glycerin  
(für DNA-Agarose-                1 mM EDTA  
Gelelektrophorese)            0,4% (w/v) Bromphenolblau  
0,4% (w/v) Xylencyanol

- 10 x TBE                      108 g Tris-Base  
(Tris-Borat-EDTA,            55 g Borsäure  
für Agarose-                    40 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0) → 1 l H<sub>2</sub>O  
Gelelektrophorese)
- DNA Farbmarker            40µl 1kb DNA Größenmarker (Fa. NEB)  
→ 600µl H<sub>2</sub>O

### 2.2.4 Bakterienmedium

- LB-Medium                    1% (w/v) Bacto-Trypton (Fa. Difco/Detroit, USA)  
(Luria Broth)                    0,5% (w/v) Hefeextrakt (Fa. Difco/Detroit, USA)  
172 mM NaCl, pH 7,5
- LB-Agar                        LB-Medium 1% (w/v) Bacto-Agar  
(Fa.Difco/ Detroit, USA)
- Antibiotika                    Amp, Ampicillin (Fa. Boehringer/Mannheim)  
Stammlösung: 50 mg/ml in H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert mit  
Einmalfilter  
(0,2 µm Membran, Fa. Schleicher & Schuell/Daßel),  
Lagerung bei -20°C  
Cm, Chloramphenicol (Fa. Boehringer/Mannheim)  
Stammlösung: 34 mg/ml in EtOH, sterilfiltriert mit  
Einmalfilter (0,2 µm Membran, Fa. Schleicher &  
Schuell/Daßel),  
Lagerung bei -20°C

Alle Medien wurden mit Millipore-Wasser angesetzt und autoklaviert (121 °C, 15 Min.). Den Agarmedien wurde nach Abkühlung auf mindestens 50°C sterilfiltriertes Ampicillin (für Bakterien, Endkonzentration = 50µg/ml) zugegeben und in Petrischalen (Fa. Greiner/ Nürtlingen) gegossen. Die Agarplatten wurden bis zu zwei Wochen im Kühlschrank aufbewahrt. Zum LB-Medium wurden die Antibiotika erst kurz vor Gebrauch hinzugefügt.

### 2.2.5 Bakterienstämme

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der *E.coli*-Stamm DH5 $\alpha$  verwendet. Die Bakterienstämme BL21(c+/pLysS) wie auch HMS(-) wurden zur Expression von GST-Fusionsproteinen genutzt.

- **DH5 $\alpha$**  (Fa. Clontech)

Genotyp: *supE44 lacU169 (80lacZM15) hsdR17*  
*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

- **BL21** (codon<sup>+</sup>) (Fa. Stratgene)

Genotyp: *dcm, ompT, hsdS (rB- mB-), gal  $\lambda$  (DE3), [pLysS Camr]*

- **HMS 174** (Fa. Novagen)

Genotyp: *endA1 hsdR17 (r<sub>K12</sub>-m<sub>K12</sub><sup>+</sup>) supE44 thi-1 recA1 gyrA96*  
*relA1 lac [F' proA+B+ lacI<sup>q</sup>ZDM15]*

### 2.2.6 Material für proteinbiochemische Analysen

- LysS Puffer  
(für Bakterien-Lyse,  
Proteinextrakte)
  - 50 mM Tris-HCl pH 7,8
  - 0,4 M NaCl
  - 0,1% NP-40
  - 0,6 mM EDTA
- Bindungspuffer PPI  
(für GST-Pulldown)
  - 20 mM Tris pH 7,9
  - 100 mM NaCl
  - 1 mM EDTA
  - 4 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 0,02 % NP-40
  - 10 % Glycerin
- Lysispuffer  
(für Gesamtzelllysate)
  - 10 mM KCl
  - 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 10mM Tris-HCl pH 7,4
  - 10% SDS
  - 100 nM PMSF + Tablette Protease Inhibitor Mix
- Protein-Färbelösung  
(Bradford)
  - 5 $\mu$ l Gesamtprotein Lysat
  - 200  $\mu$ l Roti-Quant
  - 800  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

## II. Material und Methoden

- Coomassielösung (für SDS-PAGE) 0,08% Coomassie G250  
in 1,6% Phosphorsäure  
8% Ammoniumsulfat  
20 % Methanol
- Coomassie-Entfärbelösung 100 ml Methanol  
100 ml Eisessig auf 1 l H<sub>2</sub>O
- "Gel Dry Solution" 10 % Essigäure  
40 % Methanol
- Sammelgelpuffer (für SDS-PAGE) 500 mM Tris-HCl  
pH 6,8 (mit konz. HCl einstellen)
- Trenngelpuffer (für SDS-PAGE) 1,5 M Tris-HCl  
pH 8,8 (mit konz. HCl einstellen)
- 10 x SDS Laufpuffer 0,25 M Tris-Base  
1,92 M Glycin  
1% SDS
- 2 x SDS Protein Probenpuffer 190 mM Tris/HCl pH 6,8  
5 % (v/v) β-Mercaptoethanol  
6 % (w/v) SDS  
40 % (w/v) Glycerin  
1 % (w/v) Bromphenolblau / Xylencyanol
- PBS (für Western Blot) 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
2,5 mM KCl  
140 mM NaCl  
pH 7,25 (mit konz. HCl einstellen)
- PBS Elutionspuffer (Antigenaufreinigung) PBS, pH 11 (mit konz. NaOH einstellen)
- PBS Elutionspuffer (Antikörperaufreinigung) PBS, pH 1 (mit konz. HCl einstellen)
- 1 x Transferpuffer (für Western Blot, Semidry) 3,02 g Tris  
14,42 g Glycin  
200 ml Methanol auf 1 l H<sub>2</sub>O

- Blockmilch 5% (w/v) Milchpulver  
0,05% (v/v) Tween-20  
PBS
- Stripping Puffer 62,5 mM Tris pH 7,9  
2 % (w/v) SDS  
100mM  $\beta$ -Mercaptoethanol
- IP-Puffer 150mM NaCl,  
20mM Tris-Hcl pH 6,8  
1% Triton X-100
- Gelfiltrationspuffer 50 mM Kaliumacetat,  
pH 7,0, 20 % Glycerol  
0,5 % Digitonin

### 2.2.7 Rekombinant exprimierte Fusionsproteine

- Glutathione-S-Transferase (GST)
- GST-mCABY
- GST-mFADD
- Maltose Binding Protein (MBP)
- MBP-hCABY (AG Dötsch, Uni Frankfurt)
- hCABY (nach proteolytischem Verdau von MBP-hCABY mit TEV)

### 2.2.8 Enzyme

Restriktionsenzyme (Fa. New England Biolabs)

- *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *PstI*, *NotI*, *XhoI*, *KpnI*

Sonstige

- T7-RNA-Polymerase (Fa. Promega/ Heidelberg)
- RNaseA (Fa. Roche/ Mannheim)
- Lysozym (Fa. Roth/ Karlsruhe)

### 2.2.9 Material für Immunfluoreszenz Analysen

- Mowiol (Einbettmedium) 9 g Glycerin  
3,6 g Mowiol 4-88 (Fa. Aventis)  
9 ml H<sub>2</sub>O  
18 ml 0,2M Tris-HCl pH 8,5  
0,1% (v/v) DABCO (Fa. Fluka)
- Coating Puffer 0,1% (v/v) Polylysine (Fa Sigma)
- Fixierungspuffer 3% (v/v) Formaldehyd in PBS
- Permeabilisierung 0,1% Triton X-100 in PBS
- Blocking Puffer 5% (w/v) BSA in PBS

### 2.2.10 Material für cytometrische Analysen

- PI-Färbepuffer 38 mM NaCitrat, pH 7,4,  
50 µg/ml Propidiumiodid (2,5mg/ml H<sub>2</sub>O),  
5 µg/ml RNaseA (Stocklösung:10mg/ml)

### 2.2.11 Fluoreszenzfarbstoffe

- DRAQ5 Alexis, Grünberg
- TO-PRO-3 Molecular Probes, Holland
- PI Sigma, Steinheim

## 2.3 Vektoren und Plasmid DNA

### 2.3.1 Vektoren

Name	Verwendungszweck	Resistenz	Bezugsquelle
pGEX-AHK	bakterieller GST-Fusions Expressionsvektor	Amp	Fa. Amersham
pGEM 7-Zf	Vektor für <i>in vitro</i> TNT	Amp	Fa. Promega
pcDNA3.1(-) Zeo <sup>r</sup>	eukaryontischer Expressionsvektor	Amp	Fa. Invitrogen

Name	Verwendungszweck	Resistenz	Bezugsquelle
pDEST15	bakterieller GST-Fusions Expressionsvektor	Amp	Fa. Invitrogen
pcDNA- DEST47	eukaryontischer Expressionsvektor, C-terminales GFP-Fusionstag	Amp	Fa. Invitrogen
pcDNA- DEST53	eukaryontischer Expressionsvektor, N-terminales GFP-Fusionstag	Amp	Fa. Invitrogen

### 2.3.2 Plasmide

Name/ Insert	Vektor	Bezugsquelle	korrespond. Aminosäuren
Myc hAPAF-1 f.l.	pcDNA3.1(-) Zeo <sup>r</sup>	Dr. X. Wang (UT SW, Dallas)	1-1195
Myc hAPAF-1 (M)	pcDNA3.1(-) Zeo <sup>r</sup>	Dr. X. Wang (UT SW, Dallas)	412-602
Myc hAPAF-1 (C)	pcDNA3.1(-) Zeo <sup>r</sup>	Dr. X. Wang (UT SW, Dallas)	602-1195
Myc hAPAF-1 (3+4)	pcDNA3.1(-) Zeo <sup>r</sup>	Dr. X. Wang (UT SW, Dallas)	1-420
Myc hAPAF-1 (3)	pcDNA3.1(-) Zeo <sup>r</sup>	Dr. X. Wang (UT SW, Dallas)	1-102
Myc hAPAF-1 (4)	pcDNA3.1(-) Zeo <sup>r</sup>	Dr. X. Wang (UT SW, Dallas)	89-402
hCABY f.l	pcDNA3.1(+) Zeo <sup>r</sup>	AG Zörnig (GSH, Frankfurt)	1-160
FLAG hCABY f.l.	pcDNA3.1 (+) Zeo <sup>r</sup>	AG Zörnig (GSH, Frankfurt)	2-160
hCABY C2	pcDNA3.1(+) Zeo <sup>r</sup>	AG Zörnig (GSH, Frankfurt)	1-139

Name/ Insert	Vektor	Bezugsquelle	korrespond. Aminosäuren
FLAG hCABY C2	pcDNA3.1(+) Zeor <sup>r</sup>	AG Zörnig (GSH, Frankfurt)	2-139
ΔN hCABY	pcDNA3.1(+) Zeor <sup>r</sup>	AG Zörnig (GSH, Frankfurt)	33-160
FLAG ΔN hCABY	pcDNA3.1(+) Zeor <sup>r</sup>	AG Zörnig (GSH, Frankfurt)	33-160
hCABY f.l. (1.ATG M→A mut*)	pcDNA3.1(+) Zeor <sup>r</sup>	AG Zörnig (GSH, Frankfurt)	2-160
hCABY f.l. (2.ATG M→A mut*)	pcDNA3.1(+) Zeor <sup>r</sup>	AG Zörnig (GSH, Frankfurt)	1-160
GST mCABY f.l.	pDEST15	AG Zörnig (GSH, Frankfurt)	2-160
GST mFADD f.l.	pGEX-AHK	AG Zörnig (GSH, Frankfurt)	2-205
GFP mCABY f.l.	pcDNA-DEST53	AG Zörnig (GSH, Frankfurt)	2-160
mCABY GFP f.l.	pcDNA-DEST47	AG Zörnig (GSH, Frankfurt)	1-160
Caspase-8	pcDNA3.1(+)	AG Zörnig	1-479
Caspase-9	Zeor <sup>r</sup>	(GSH, Frankfurt)	1-416
hBcl-X <sub>L</sub>	pcDNA3.1(+) Zeor <sup>r</sup>	AG Zörnig (GSH, Frankfurt)	1-233

### 2.3.3 Sequenzierprimer

- pcDNA3.1-5' (T7 Promoter): TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
- pcDNA3.1-3' (reverse): TAG AAG GCA CAG TCG AGG
- pGEX-5' (N-term. GST): CTG GTT CCG CGT GGA TCT CGT
- pDEST 15-5' (N-term. GST): GTG ATC ATG TAA CCC ATC CTG AC
- pDEST 53- 5' (N-term. GFP): CGA CAC AAT CTG CCC TTT CG
- pDEST 47- 3' (C-term. GFP): GGG TAA GCT TTC CGT ATG TAG C

## 2.4 Zellkultur

### 2.4.1 Verwendete Zelllinien

Name	Medium	Beschreibung	Herkunft
293T	DMEM, 10% FCS	Humane Embryonale Nierenzellen, epithelial, adhärent	AG Grez (GSH, Frankfurt)
RKO	DMEM, 10% FCS	Humane Kolon Karzinom Zellen, epithelial, adhärent	ATCC CRL-2577
RKO: - LV - E2F4 - CABY A - CABY B	DMEM, 10% FCS, 5µg/ml Puromycin	RKO, stabil transfiziert mit verschiedenen siRNAs, Puromycin resistent	M. Truss (Charite, Berlin)
K562	RPML, 10% FCS	Humane Lymphoblast, Suspensionszellen	ATCC CCL-243
K562: - LV - E2F4 - CABY A - CABY B	RPML, 10% FCS, 4µg/ml HygromycinB	K562, stabil transfiziert mit verschiedenen siRNAs, HygromycinB resistent	M. Truss (Charite, Berlin)
SP2/0	RPML, 10% FCS	Maus Myelom Zelllinie, Suspensionszellen	ATCC CRL-2288
Maus B-Zell Hybridoma: Anti-hCABY	RPML, 20% FCS	Maus B-Zell Klone, stabile Expression von Anti-hCABY Antikörpern, Suspensionszellen	AG Zörnig (GSH Frankfurt)

### 2.4.2 Stabile Zelllinien

Für die stabile Expression von CABY siRNA wurden die Zelllinien K562 und RKO mit den folgenden Konstrukten transfiziert und unter entsprechender Antibiotikaresistenzselektion kultiviert:

- pRepH1 dsRedA CABY A: GTGGTCTCGGAAAGTTGTG  
(siRNA Sequenz)
- pRepH1 dsRedA CABY B: GCCAACAGTACCTCATTGC  
(siRNA Sequenz)

### 2.4.3 Zellkulturmedien und -lösungen

- DMEM "Dulbeccos modified eagle medium"  
(Fa.Boehringer/Ingelheim)
- RPMI "Roswell Park Memorial Institute"  
(Fa.Boehringer/Ingelheim)
- AH Medium 50x Azaserine/ Hypoxanthine/ ECGS (Fa. Sigma)  
OPI suplement medium (Fa. Sigma)  
RPMI, 20% FCS
- H Medium 100 µM Hypaxanthine (Fa. Sigma)  
RPMI, 20% FCS
- OptiMEM serumreduziertes Medium (Fa.GibcoBRL/Eggenstein)
- Einfriermed. DMSO 10% (v/v), 90% FCS (v/v)
- FCA Freund/s Complete Adjuvance
- FCS "Fetal calf serum" (Fa.GibcoBRL/Eggenstein)
- FIA Freund/s Incomplete Adjuvance
- L-Glutamine 200mM Lösung (Fa.Boehringer/Ingelheim)
- PEG 50% (v/v)
- Pen/Strep 10.000 U Penicillin, 10.000µg/ml Streptomycin  
(Fa.Cambrex/Verviers/Belgien)
- Sucrose 0,34 M in PBS
- Trypanblau (Fa.Sigma, Steinheim)
- Trypsin/EDTA 0,02% Trypsin, 0,05% EDTA (Fa.Seromed/Berlin)
- DMSO Dimethylsulfoxid (Fa.Merck/Darmstadt)

### 2.4.4 Zusätze

Puromycin: 5 mg/ml (Fa. Calbiochem/Merck/Schwalbach)

Hygromycin B: 4 mg/ml (Fa. Calbiochem/Merck/Schwalbach)

### 2.4.5 Transfektionslösungen

FUGENE (Fa. Roche, Mannheim)

Lipofectamin 2000 (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

### 2.4.6 Material zur Apoptoseinduktion

- TRAIL Endkonz.: 20 ng/ml TRAIL („Killer TRAIL“ Fa. Alexis)  
Endkonz.: 0, 1µg/ml Cycloheximid (Fa. Sigma)
- FasL Endkonz.: 20 ng/ml FLAG-FasL (Fa. Alexis)  
Endkonz.: 0, 1µg/ml Cycloheximid (Fa. Sigma)  
Endkonz.: 1 µg/ml anti-FLAG Antikörper (M2, Fa. Sigma)
- Staurosporin Endkonz.: 500 ng/ml Staurosporine (Fa. Sigma)
- Mitomycin C Endkonz.: 4 µg/ml Mitomycin C (Fa. Roche)
- Serumentzug Endkonz.: 0,1 % FCS (v/v) in DMEM
- UV 80 mJ/cm<sup>2</sup>, 16h

### 2.4.7 Zellkulturmaterial

Neubauer-Zählkammer	GLW, Würzburg
Steril-Filter (0,45µm)	Millipore, Eschborn
Pipetten (5, 10, 25 ml)	BD Falcon, Heidelberg
Polypropylen Röhrchen (15, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturschalen (10 cm und 14,5 cm)	Greiner, Frickenhausen
6/ 12/ 96 -Loch-Platte	Corning, Holland

## 2.5 Antikörper

### 2.5.1 Antikörper für Western Blot

Name (Klonbezeichnung)	Firma	Immunogen	Isotyp	Eingesetzte Konzentration
Myc-tag (9B11)	Cell Signalling	Myc-tag	Maus IgG <sub>2a</sub>	1:1000
M2	Sigma	FLAG-Tag	Maus IgG <sub>1</sub>	1:1000
Anti Caspase-9 (96-2-22)	Biomol	hCaspase-9	Maus IgG <sub>1</sub>	1:1000
Anti APAF-1 (18H2)	Alexis	hAPAF-1	Ratte IgG	1:1000
Anti APAF-1	Pharmingen	hAPAF-1	Kaninchen polyklonal	1:1000
Anti Bcl-X <sub>L</sub> (2H12)	Pharmingen	hBcl-X <sub>L</sub>	Maus IgG <sub>2a</sub>	1:1000
Anti GST-mCABY	Pineda	GST-mCABY	Kaninchen affinitätsauf- gereinigt, polyklonales Antiserum	1:500
Anti MBP-hCABY	hergestellt in der AG Zörnig	MBP-hCABY	Maus Hybridoma Überstände	1:10-1:100

### 2.5.2 Antikörper für Immunpräzipitation

Name (Klonbezeichnung)	Firma	Immunogen	Isotyp	Eingesetzte Konzentration
Myc-tag (9B11)	Cell Signalling	Myc-tag	Maus IgG <sub>2a</sub>	4 µg/ml

## II. Material und Methoden

Name (Klonbezeichnung)	Firma	Immunogen	Isotyp	Eingesetzte Konzentration
M2	Sigma	FLAG-Tag	Maus IgG <sub>1</sub>	4 µg/ml
Anti Caspase-9 (96-2-22)	Biomol	hCaspase-9	Maus IgG <sub>1</sub>	4 µg/ml
Anti APAF-1	Pharmingen	hAPAF-1	Kaninchen polyklonal	1:200
Anti APAF-1 (18H2)	Alexis	hAPAF-1	Ratte IgG	4 µg/ml
Anti GST-mCABY	Pineda	GST-mCABY	Kaninchen affinitätsauf- gereinigt, polyklonales Antiserum	1:10
Anti MBP-hCABY	AG Zörnig	MBP-hCABY	Maus Hybridoma Überstände	1:10
Prä-Immunsrum	Pineda	-	Kaninchen, polyklonales Antiserum	1:10

### 2.5.3 Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung

Name (Klonbezeichnung)	Firma	Immunogen	Isotyp	Eingesetzte Konzentration
Myc-tag (9B11)	Cell Signalling	Myc-tag	Maus IgG <sub>2a</sub>	1:100
M2	Sigma	FLAG-Tag	Maus IgG <sub>1</sub>	1:100
Anti Caspase-9 (96-2-22)	Biomol	hCaspase-9	Maus IgG <sub>1</sub>	1:100

## II. Material und Methoden

Name (Klonbezeichnung)	Firma	Immunogen	Isotyp	Eingesetzte Konzentration
Anti APAF-1 (18H2)	Alexis	hAPAF-1	Ratte IgG	1:100
Anti GST-mCABY	Pineda	GST-mCABY	Kaninchen affinitätsauf gereinigt, polyklonales Antiserum	1:10
Prä-Immuns Serum	Pineda	-	Kaninchen, polyklonales Antiserum	1:10

### 2.5.4 Sekundärantikörper für Western Blot

Name	Firma	Immunogen	Isotyp	Eingesetzte Konzentration
Anti- Kaninchen	Amersham Biosciences	Kaninchen IgG	Ziege, polyklonal	1: 2000
Anti-Maus	Amersham Biosciences	Maus IgG	Ziege, polyklonal	1: 2000
Anti-Ratte	Amersham Biosciences	Ratte IgG	Ziege, polyklonal	1: 2000

### 2.5.5 Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbung

Name	Firma	Immunogen	Isotyp	Eingesetzte Konzentration
Alexa Fluor 488 Anti Kaninchen	Molecular Probes	Kaninchen IgG	Ziege, polyklonal, 488 fluorochrom	1:1000-2000

Name	Firma	Immunogen	Isotyp	Eingesetzte Konzentration
Alexa Fluor 546 Anti Kaninchen	Molecular Probes	Kaninchen IgG	Ziege, polyklonal 546 fluorochrom	1:1000-2000
Alexa Fluor 488 Anti Maus	Molecular Probes	Maus IgG	Ziege, polyklonal 488 fluorochrom	1:1000-2000
Alexa Fluor 546 Anti Maus	Molecular Probes	Maus IgG	Ziege, polyklonal 546 fluorochrom	1:1000-2000
Alexa Fluor 546 Anti Ratte	Molecular Probes	Ratte IgG	Ziege, polyklonal 546 fluorochrom	1:1000-2000

## 2.6 Online Datenbankrecherche

- National Center for Biotechnology Information (NCBI)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>
- ENSEMBL  
<http://www.ensembl.org>
- Yeast Genome Database  
<http://www.yeastgenome.org>
- SwissProt/Treml  
<http://www.expasy.org>
- SMART  
<http://smart.embl-heidelberg.de>
- MultiAlin  
<http://prodes.toulouse.inra.fr/multialin/multialin.html>

- Helix Research Institute (ATG<sup>PR</sup>)  
<http://www.hri.co.jp/atgpr>
- SYSTERS Protein Family Database  
<http://systems.molgen.mpg.de/>
- AceView (NCBI)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/index.html>
- ELM (The Eucaryotic Linear Motif Resource)  
<http://elm.eu.org>
- TESS (Transcription Element Search System)  
<http://www.cbil.upenn.edu/tess>

### 2.6.1 Sequenzreferenznummern („Accession number“)

Name [Organismus]	cDNA (Datenbank)	Protein (Datenbank)
mCABY, hypothetical protein FLJ22875 <i>[Mus musculus]</i>	NM_026635 (NCBI)	NP_080911 (NCBI) Q9DCL2 (SwissProt)
hCABY, isoform a hypothetical protein FLJ22875 <i>[Homo sapiens]</i>	NM_032231 (NCBI)	NP_115607 (NCBI) Q9H5X1 (SwissProt)
hCABY, isoform b hypothetical protein FLJ22875 <i>[Homo sapiens]</i>	NM_001014812 (NCBI)	NP_001014812 (NCBI)
PREDICTED: similar to hypothetical protein FLJ22875 <i>[Homo sapiens]</i>	XM_497735 (NCBI)	XP_497735 (NCBI)
zCABY, hypothetical protein LOC406300, <i>[Danio rerio]</i>	ENSDARG00000016731 (ENSEMBL)	ENSDARP00000008136 (ENSEMBL)
cCABY, Protein conserved (3O528), <i>[Caenorhabditis elegans]</i>	F45G2.10 (ENSEMBL)	F45G2.10 (ENSEMBL)

Name [Organismus]	cDNA (Datenbank)	Protein (Datenbank)
dCABY, UPF0195 protein CG30152, [ <i>Drosophila melanogaster</i> ]	CG30152 (ENSEMBL)	CG30152-PA (ENSEMBL)
yCABY, Protein required for cell viability, [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	YHR122W (Yeast Genome)	YHR122W (Yeast Genome)

## 2.7 Methoden

Gängige Methoden sowie die Rezepte für Puffer wurden entweder aus "Molecular Cloning" (Sambrook *et al.*, 1989, CSHL Press), "Current Protocols in Molecular Biology" (Wiley Verlag, 2001) oder "Current Protocols in Cell Biology" (Wiley Verlag, 2002) entnommen. Etwaige Modifikationen sind an entsprechender Stelle vermerkt.

## 2.8 Molekularbiologische Methoden

### 2.8.1 Kultivierung von Bakterien

Die Lagerung und Vermehrung von *E.coli* erfolgte stets in sterilen Glas- oder Plastikgefäßen. Für eine Langzeitlagerung wurden 5 ml einer Kultur exponentiell wachsender *E.coli* für 10 Min. bei 3.000 UpM abzentrifugiert, das Bakterienpellet in 1 ml LB-Medium mit 40% (v/v) Glycerin resuspendiert und in 1,5 ml - Reaktionsgefäßen bei -80°C eingefroren.

### 2.8.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

#### a) chemokompetent (DH5 $\alpha$ *E.coli*)

Eine Behandlung mit eiskalten Magnesium- und Calciumchloridlösungen befähigt die Bakterien zur spontanen Aufnahme von Fremd-DNA (Transformation).

Die Bakterien wurden wie folgt behandelt: 5 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie DH5 $\alpha$  angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. 300 ml LB-Medium wurden mit der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 (logarithmische Wachstumsphase)

kultiviert. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien bei 4°C und 2.500 UpM abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterienpellets in jeweils 25 ml eiskalter, steriler 0,1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert und die Pellets in insgesamt 12 ml eiskalter, steriler 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und vereinigt. Nach einer weiteren Inkubationsphase von 2 Stunden auf Eis wurden 4 ml Glycerin (steril) hinzugegeben, die Bakterien aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### **b) elektrokompent (KC8 und DH5α *E.coli*)**

Eine einzelne Bakterienkolonie wurde über Nacht in 5 ml LB-Medium angezogen und am nächsten Tag in 500 ml LB bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 wachsen gelassen. Die Zellen wurden anschließend für 10-15 Min. auf Eis gekühlt und 20 Min. bei 5.000g und 2°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen. Zur Lagerung wurden die Bakterien mit 10% Glycerin versetzt, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Die durchschnittliche Transformationseffizienz für diese Zellen betrug  $\geq 10^9$  pro  $\mu\text{g}$  DNA. (Chung et al., 1989)

### **2.8.3 Transformation von chemokompetenten *E. coli* (DH5α)**

Aliquots transformationskompetenter Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Circa 20 ng Plasmid-DNA-Ansätze wurden mit 50  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension gemischt und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 90s auf 42°C erwärmt ("Hitzeschock") und gleich danach für 2 Min. auf Eis abgekühlt. Nachfolgend wurde 1ml LB-Medium (ohne Antibiotika) zugegeben und die Bakterien für 30 Min. im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden dann auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### **2.8.4 Transformation von elektrokompentem *E.coli* (KC8 + DH5α)**

Die Transformation durch Elektroporation erzielt im Vergleich zur Hitzeschock-Methode mit chemokompetenten Bakterien i.a. eine bessere Transformationseffizienz. Dieses Prinzip der Aufnahme von DNA basiert auf durch Elektroschock-vermittelte transiente Perforation der Bakterienmembran.

Die Elektroporations-Apparatur wurde auf eine Spannung von 2,5 kV, eine Feldstärke von 25  $\mu\text{F}$  und einem Widerstand von 200  $\Omega$  eingestellt. Es wurden 5  $\mu\text{l}$  der Hefe-Plasmid Präparation zu 45  $\mu\text{l}$  eisgekühlten elektrokompenten Zellen gegeben und für 1 Min. auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in vorgekühlte Elektroküvetten transferiert und wie oben beschrieben elektroporiert. Die Bakterien wurden in 1 ml SOC-Medium aufgenommen, 30-60 Min. bei 37°C inkubiert, abzentrifugiert, erneut in 80  $\mu\text{l}$  SOC-Medium aufgenommen und auf LB-Amp Platten (DH5 $\alpha$ ) oder auf M9 Platten (+Amp/ -Leu; KC8) ausplattiert. (Dower et al., 1988)

### **2.8.5 Berechnung der Transformationseffizienz**

Um die Transformationseffizienz bestimmen zu können, wurde eine zusätzliche Transformation mit 1-10 pg Kontroll-Plasmid (pUC19) durchgeführt. Die Bakterien, die das Kontroll-Plasmid erfolgreich aufgenommen hatten, konnten auf LB-Amp Platten wachsen. Die Transformationseffizienz wird in Kolonien pro  $\mu\text{g}$  eingesetzter DNA angegeben. (Hanahan, 1983)

### **2.8.6 Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse in kleinem Maßstab**

Das Prinzip der Plasmidisolierung basiert auf der Entfernung eines Großteils der bakteriellen Proteine, Membranen und des bakteriellen Genoms, da die chromosomale DNA aufgrund ihrer Größe, Struktur und Verankerung gemeinsam mit den Zellresten abzentrifugiert wird, während die kleineren und freien Plasmid-Moleküle im Überstand bleiben.

Zur analytischen Plasmidisolierung wurden 3 ml ampicillinhaltiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37°C kultiviert. Am nächsten Morgen wurden 1,5 ml der Übernachtskultur in ein Reaktionsgefäß überführt und 2 Min. bei 13.000 UpM abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 100  $\mu\text{l}$  GTE resuspendiert. Die endgültige Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  NaOH/ SDS, mehrfaches Invertieren des Ansatzes und 5 Min. Inkubation bei RT. Anschließend wurden zum Fällen von Proteinen und genomischer DNA 150  $\mu\text{l}$  5M KOAc zu pipettiert und der Ansatz durch Invertieren vorsichtig gemischt. Nach 10 Min. auf Eis wurde für 20 Min. bei 13.000 UpM zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA konnte durch Zugabe von 900  $\mu\text{l}$  EtOH

gefällt und durch 30 minütige Zentrifugation bei 13.000 UpM pelletiert werden. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Entfernung des Überstandes bei RT getrocknet. Nachdem das getrocknete Pellet in 23 µl H<sub>2</sub>O (+ 20 µg/ml RNase A) resuspendiert worden war, wurden 5 µl dieses Ansatzes durch Restriktionsverdau und anschließende Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C. ( (Shapiro, 1981); (Birnboim, 1983); (Good and Nazar, 1997))

### **2.8.7 Quantitative Plasmidisolierung in größerem Maßstab**

Größere Mengen an Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad wurden mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi-bzw. Maxi-Kit (Fa. Qiagen/Hilden) isoliert. Dazu wurde tagsüber zunächst eine Vorkultur angelegt, d.h. 1 Bakterienkolonie wurde in 4 ml ampicillinhaltigem LB-Medium angeimpft und ca. 8 h im Schüttelinkubator bei 37°C kultiviert. Diese Vorkultur wurde in 300-500 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Bakteriensuspension mit 5.000 UpM bei 4°C abzentrifugiert. Die Plasmidisolierung aus dem Bakterienpellet wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Anionenaustauschersäulen. Nach Aufnahme der DNA-Pellets in sterilem 10 mM Tris-Cl pH 7,5 wurde die Konzentration photometrisch bestimmt, die DNA-Qualität durch Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese überprüft (2.8.10)

### **2.8.8 Aufreinigung der DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion**

Die Aufreinigung von Mini-Prep-Plasmid-DNA erfolgte mittels Phenol/Chloroform-Extraktion. Zu 200 µl DNA-Lösung wurde das gleiche Volumen Phenol/Chloroform zupipettiert, auf einem Vortexer geschüttelt und eine Minute lang bei 13.000 UpM zentrifugiert. Die DNA befindet sich nun in der oberen wässrigen Phase. Bei diesem Prozeß werden die zu entfernenden Proteine größtenteils denaturiert und sind deshalb in der unteren Phenolphase gelöst. Nichtvollständig denaturierte Proteine, die ihre Löslichkeit in der wässrigen Phase teilweise noch behalten haben, werden in der so genannten Interphase sichtbar. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis keine Interphase mehr zu erkennen war. Zur Fällung der DNA wurden 1/10 Volumen 3 M

NaOAc pH 5,2 plus 2 Volumen 100% EtOH zugegeben. Nach dem Vortexen wurde der Ansatz für mindestens 30 Minuten bei -20°C gelagert. Die restlichen Schritte - das Waschen mit 70% EtOH und das Trocknen der DNA-Pellets - entsprechen dem normalen Plasmidisolierungsprotokoll (2.8.6/ 2.8.7).

### 2.8.9 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgte entweder über Abschätzung im Agarosegel (Vergleich zum standardisierten DNA-Marker) oder mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers. Dabei wurde die Konzentration von Plasmid-DNA durch Messung der Extinktion in Quarzküvetten bei 260 nm bestimmt. Diese Wellenlänge wird von den delokalisierten  $\pi$ -Elektronen der Pyrimidin- bzw. Purinringsysteme der einzelnen Nukleotide absorbiert. Eine  $OD_{260}$  ( $OD$  = optische Dichte) von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA. Die Formel zur Umrechnung der Extinktion in die DNA Konzentration lautet:  $\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = E_{260} \cdot 50 \mu\text{g/ml} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$ . Der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  dient als Index für die Reinheit der DNA Lösung und sollte bei 1,8 oder höher liegen. (Wilfinger et al., 1997)

### 2.8.10 Analyse von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung restriktionsverdauter Plasmid-DNA bzw. von PCR-Produkten wurden horizontale 1%-ige Agarosegele (Auftrennungsbereich: 0,5 – 6 kb) mit 0,5 x TBE und 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid verwendet. Die Elektrophorese wurde in 0,5 x TBE-Puffer durchgeführt. Die Proben sowie 0,5  $\mu\text{g}$  Größenmarker (1 kb-DNA Ladder, Fa. Gibco-BRL/Eggenstein; "Smart Ladder", Fa. Eurogentec.) wurden mit 1/5 ihres Volumens an 6x Probenpuffer versetzt und bei 10 V/cm aufgetrennt. Da die DNA-Moleküle ein negativ geladenes Phosphatrückrat besitzen, wandern sie bei einem von außen angelegtem elektrischen Feld in Richtung der Anode. Die Auftrennung der unterschiedlich langen DNA-Fragmente erfolgte über die quervernetzten Agarosepolymere. Die Beweglichkeit der DNA-Moleküle im Gel ist sowohl umgekehrt proportional zu ihrer Länge und sinkt mit zunehmender Agarosekonzentration. Über das interkalierende Ethidiumbromid konnte die DNA unter UV-Licht ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ) sichtbar gemacht und mittels einer CCD-Kamera fotografisch dokumentiert werden. (Helling et al., 1974)

### **2.8.11 Restriktionsverdau**

Die Restriktionsverdaue wurden mit Enzymen und Reaktionspuffern der Firmen GibcoBRL und Boehringer-Mannheim durchgeführt. Die Wahl des geeigneten Reaktionspuffers erfolgte laut Angabe des Herstellers. Für den analytischen Restriktionsverdau wurden 0,2–1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes hängt von der Menge der eingesetzten DNA und der eingesetzten Enzyme ab. Bei einem Mehrfachverdau muß auf die Verträglichkeit ihrer Reaktionspuffer geachtet werden. Wichtig für einen quantitativen Restriktionsverdau ist, daß die Summe des Volumens der eingesetzten Enzyme nicht 10% überschreitet, d.h. es muß darauf geachtet werden, daß die Konzentration an Glycerin, das in der Enzymlösung enthalten ist, nicht zu hoch wird und damit die Reaktion inhibieren könnte. Die Inkubationszeit betrug 1-2 Stunden bei einer Temperatur, die dem Temperaturoptimum der bakteriellen Enzyme entspricht (meistens 37°C). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/5 Volumen 6 x DNA-Ladepuffer abgestoppt. (Roberts and Macelis, 1996)

### **2.8.12 Sequenz-Analyse**

Die DNA wurde in einem ABI377-Sequenzierautomaten sequenziert. Dabei wurden in der Regel mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Sequenzierprimer eingesetzt ("dye primer chemistry"). Die Sequenzierung wurde durch den Institut-Service durchgeführt. Um Homologien zu anderen, bereits in Genbanken deponierten Sequenzen zu ermitteln, wurden die Sequenzen im Internet mit BLASTN (Vergleich der Nucleotidsequenz mit der Nucleotidsequenzdatenbank) und BLASTX (Vergleich der Nucleotidsequenz in allen Leserahmen mit der Proteinsequenzdatenbank) untersucht (2.14).

## **2.9 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.9.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen**

Zur Proteinextraktion wurden die Zellen folgendermaßen geerntet:

Der Zellüberstand, das zum Waschen benutzte PBS und die in Medium aufgenommenen trypsinisierten Zellen wurden in einem Falcon-Röhrchen

gesammelt und bei 800x g abzentrifugiert. Das entstehende Zellpellet wurde einmal mit PBS gewaschen und zur Proteinextraktion verwendet. Das Zellpellet wurde in Lysispuffer aufgenommen (z.B. 700µl Lysispuffer pro Zellpellet einer konfluenten 10cm-Zellkulturschale) und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Das Lysat wurde 30 Min. auf Eis inkubiert, dreimal 15 Sekunden sonifiziert (insgesamt 75 Watt), 20 Min. bei 4°C und 12.000x g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Kurz vor Gebrauch wurde eine Proteaseinhibitortablette (COMPLETE-Mini Protease Inhibitor Mix/10 ml Lysispuffer, Fa. Roche) zugegeben.

### **2.9.2 Bestimmung der Protein-Konzentration nach Bradford**

Die Proteinkonzentration von Zellextrakten wurde mit einem kommerziell erhältlichen Nachweissystem (Bio-Rad-Assay, Fa. Bio-Rad, München) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Nachweis beruht auf einer unspezifischen Interaktion des Farbstoffes Coomassie-Blau mit aromatischen Aminosäuren.

1 bis 10 µl eines Zellextraktes oder Proteinlösung wurden für 10 Min. bei RT mit 1000 µl des 1:5 in H<sub>2</sub>O verdünnten Reagenz inkubiert und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Zur Erstellung einer Titrations-Eichkurve wurde ein BSA-Standard verwendet.

### **2.9.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) nach Lämmli**

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht werden Proteine u.a. mit Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und mit β-Mercaptoethanol reduziert. Durch die Bindung von SDS an hydrophobe Regionen der Proteine werden negative Ladungen eingeführt, welche die Eigenladung des Proteins überdecken. Dadurch hängt die Mobilität der Proteine im Acrylamidgel nicht mehr von ihrem isoelektrischen Punkt, sondern nur noch von ihrer Größe ab. Die Zugabe von β-Mercaptoethanol führt zur Reduktion und Spaltung inter- wie auch intramolekularer Disulfidbrücken. Proteingele bestehen aus einem Sammel- und einem Trenngel mit unterschiedlichen Konzentrationen an Polyacrylamid, Salzen und pH-Werten. Im Sammelgel werden die Proteine konzentriert, so daß sie gleichzeitig in das Trenngel eintreten. Die Konzentration des Trenngels ist abhängig von dem Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins.

## II. Material und Methoden

Die Sammel- und Trenngellösungen wurden entsprechend der nachfolgenden Tabelle angesetzt (jeweils für zwei Gele):

	<b>Trenngel 12,5 %</b>		<b>Sammelgel 5 %</b>
H <sub>2</sub> O	3,2 ml	H <sub>2</sub> O	2,8 ml
30 % PAA-Lsg.	4,2 ml	30 % PAA-Lsg.	0,5 ml
Trenngelpuffer (1,5 M Tris pH 8,8)	2,5 ml	Sammelgelpuffer (0,5 M Tris pH 6,8)	1,2 ml
10% SDS	0,1 ml	10% SDS	0,05 ml
10% APS	0,07 ml	10% APS	0,07 ml
TEMED	0,007 ml	TEMED	0,0033 ml
<b>Gesamtvolumen</b>	10 ml		5 ml

Es wurden Mini-Gelapparaturen (Fa. Biometra/Göttingen) mit 1 mm dicken Abstandshaltern verwendet. Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses sofort mit Isopropanol überschichtet, damit eine glatte Oberfläche entstand. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proben in 2 x SDS Probenpuffer aufgenommen und 5 Min. bei 95°C zur Denaturierung der Proteine erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x SDS Laufpuffer, wobei im Sammelgel eine Spannung von 100 Volt und im Trenngel eine Spannung von 120 Volt angelegt wurde. Als Längenstandard diente der "prestained protein marker BENCH MARK™" (Fa. GibcoBRL/ Eggenstein).

### 2.9.4 Protein Transfer auf Nitrocellulose-Membranen

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Protran, Fa. Schleicher) transferiert. Bei diesem Transfer handelt es sich um ein "semi-dry" - Verfahren, bei dem lediglich die zum Aufbau des Western Blots verwendeten Whatman-Filterpapiere und die Nitrocellulose-Membran mit Transfer-Puffer angefeuchtet werden. Zum Transfer (Blot) wurde eine "Semi-dry"-Blotapparatur (Fa. Keutz/ Reiskirchen) verwendet.

Der Blotaufbau sah folgendermaßen aus: Auf die Anode der Blotapparatur wurden zunächst vier mit 1 x Transferpuffer befeuchtete, auf die Größe des Gels zugeschnittene, Whatman-Filterpapiere gelegt, worauf die ebenfalls in Transferpuffer angefeuchtete Nitrocellulose-Membran positioniert wurde.

Das Trenngel (2.9.3) wurde direkt auf die Membran gelegt, und den Abschluß bildeten vier mit 1xTransferpuffer getränkte Papiere. Vor dem Aufsetzen der Kathode der Blotapparatur wurde mit einer Pipette vorsichtig über den "Blotturm" gerollt, um sicherzustellen, daß die einzelnen Schichten luftblasenfrei aufeinander lagen. Der Protein-Transfer dauerte 2 Stunden, die gewählte Stromstärke variierte je nach der Fläche des Gels und wurde anhand folgender empirischer Formel ausgerechnet:

$$\text{Stromstärke (mA)} = 0,8 \cdot \text{Fläche der Membran (cm}^2\text{)}$$

Die Membran wurde mit Ponceau-Lösung kurz angefärbt, wodurch die auf die Membran transferierten Proteine rötlich gefärbt wurden. Dieses erlaubte eine Überprüfung, ob die Proteinbeladung der Membran gleichmäßig erfolgt worden war. Zusätzlich wurde das SDS-Gel nach dem Blot mit Coomassie Blau gefärbt, um beurteilen zu können, ob z.B. Luftblasen vorhanden waren, die den Transfer verhindert hatten.

### 2.9.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen („Western Blot“)

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran können Proteine durch einen immunologischen Nachweis detektiert werden. Dazu wurde die Membran zunächst für mindestens 30 Min. (bei RT) bzw. über Nacht bei 4°C in PBS (mit 5% (w/v) Magermilchpulver und 0.05% Tween) auf einem Kippschüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Diese Blockierungslösung wurde ebenfalls zur Verdünnung der Antikörper (AK) verwendet (2.5.1). Der 1.AK, der für das interessierende Protein spezifisch ist, wurde 1-2 h bei RT mit der Membran inkubiert. Danach wurde die Membran im Laufe von 30 Min. fünfmal mit PBS (+ 0,05% Tween, PBST) gewaschen, bevor der mit dem Enzym HRP (engl.: "horseradish peroxidase") gekoppelte Zweitantikörper für 1 h hinzugegeben wurde. Abschließend wurden nicht gebundene AK durch gründliches Waschen mit PBST (6 x 5 Min.) entfernt.

### 2.9.6 Detektion von Proteinen mit dem ECL-Verfahren: Lumineszenz-Assay

Die Proteinbanden wurden mit Hilfe des "ECL-Detection-Kit" (Fa. Amersham/Braunschweig) sichtbar gemacht. Der Nachweis beruht auf folgendem Prinzip:

Das Enzym HRP, welches an den 2. AK gekoppelt ist, bewirkt eine chemische Reaktion des in der ECL-Lösung vorhandenen Substrates (Luminol), was zu dessen Anregung führt. Als Folge tritt Lumineszenz auf, wobei das emittierte Licht einen Röntgenfilm genau an der Stelle schwärzt, wo der 1. AK spezifisch an ein Protein auf der Membran gebunden hat. Die ECL-Detektion wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Abhängig von der Stärke der Chemolumineszenz betrug die Expositionszeit der Röntgenfilme BIOMAX MR (Fa. Kodak/ New Haven) 1 Min. bis zu mehreren Stunden.

### 2.9.7 Wiederverwendung von Western Blot Membranen („Strippen“)

Nach Filmentwicklung können Primär- und Sekundärantikörper durch Inkubation in Strip-Puffer (2.2.6) abgelöst werden. Nach erneutem Abblocken steht die Membran für eine weitere Erstantikörperinkubation zur Verfügung.

Die Durchführung geschah folgendermaßen: Nach Zugabe von 250 µl β-Mercaptoethanol zu 25 ml Strip-Puffer wurde die Membran darin für 30 Minuten im zuvor auf 56 °C erhitzten Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Membran in Blockmilch mindestens 30 Minuten lang gewaschen, bevor eine weitere Erstantikörperinkubation erfolgen konnte.

### 2.9.8 Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Bei einer Immunpräzipitation kann ein bestimmtes Protein aus einem Zelllysat isoliert werden. Interagiert dieses Protein mit anderen Proteinen, werden auch diese immunpräzipitiert. Dabei wird das Protein an einen spezifischen Antikörper gebunden, welcher wiederum über seinen Fc-Teil an Protein A oder Protein G, die an einer Sepharosematrix fixiert vorliegen, bindet.

In den meisten Fällen wurden transfizierte 293T Zellen ( $5 \times 10^6$  Zellen pro 10cm Schale) verwendet. Nach Lyse dieser Zellen in 700µl Co-IP-Lysispuffer (150mM NaCl, 20mM Tris-Hcl pH 6,8, 1% Triton X-100) mit anschließender Sonifizierung wurde eine so genannte "Pre-Clearing" mit Sepharose 4CL-B durchgeführt. So

wurde ein erhöhter Hintergrund durch unspezifische Bindung des Proteins an die Agarosematrix verhindert. Zu diesem Zellextrakt wurde meist 1 µg des spezifischen Antikörpers (2.5.2) gegeben, 1h auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert und nach Zugabe von Protein A/G Agarose weitere 2h oder länger gemischt. Die Beads wurden dreimal mit Co-IP-Lysispuffer ohne Detergenzien gewaschen, die gebundenen Proteine durch Zugabe von SDS-Gelladepuffer eluiert und der Überstand auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen.

### **2.9.9 Gelfiltrationchromatographie**

Die Gelfiltration diente der Analyse der Zusammensetzung nativer Proteinkomplexe und der Abschätzung ihres Molekulargewichtes. Bei der Gelfiltration werden die Moleküle aufgrund ihrer Größe und damit in erster Näherung nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Die Trennung beruht darauf, daß kleinere Moleküle in die Poren des Säulenmaterials diffundieren können, während dies für große Moleküle unmöglich ist. Damit steht den großen Molekülen ein wesentlich geringeres Säulenvolumen zur Verfügung als den kleinen, sie laufen daher schneller durch die Säule.

Vor der Gelfiltration wurden aus auf zwei 10 cm Gewebekulturschalen konfluent gewachsenen 293T Zellen Zellysate hergestellt und anschließend unlösliches Material durch Zentrifugation abgetrennt (10 min, 30000x g). Der Überstand wurde auf eine Superose 6 Gelfiltrationssäule aufgetragen (25 ml Säulenvolumen, Amersham Pharmacia Biotech), die vorher mit Gelfiltrationspuffer (50 mM Kaliumacetat, pH 7,0, 20 % Glycerol, 0,5 % Digitonin) äquilibriert worden war.

Die Chromatographie erfolgte mit Hilfe einer FPLC Anlage (ÄKTA, Amersham Pharmacia Biotech) bei einer Flussrate von 0,25 ml/min; die Fraktionsgröße betrug jeweils 0,5 ml. Der Verlauf der Elution wurde mit einem UV-Monitor verfolgt, je 30 µl der gesammelten Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und nach Transfer der Proteine auf Nitrocellulosemembranen mittels Western Blot Analyse detektiert.

Die Eichung der Gelfiltrationssäule erfolgte mit den extern zugesetzten Markerproteinen Thyreoglobulin (669 kDa), Apoferritin (440 kDa), Amylase (232 kDa) und Alkoholdehydrogenase (158 kDa).

### 2.9.10 *in vitro* Transkription und Translation (TNT)

Für die zellfreie *in vitro* Translation wurde das TNT Coupled Rabbit Reticulocyte Lysate System von Promega (Heidelberg) verwendet, das alle notwendigen zellulären Komponenten für die mRNA und Proteinsynthese [(Pelham and Jackson, 1976), (Jackson et al., 1983)] enthält. Somit ermöglicht dieses Kit eine gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation. Um das gewünschte Protein synthetisieren zu können, muß nur die zu exprimierende cDNA einen funktionellen Promotor enthalten oder in einem Expressionsvektor (pGEM) vorliegen (wodurch sie ebenfalls einen Promotor enthält).

Für die Reaktion wurde 1 µg zirkularisierte Plasmid-DNA benötigt. In einem 50 µl Reaktionsansatz wurde 1 µg Template-DNA in 16 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O mit 25 µl Kaninchen-Retikulozyten-Lysat, 2 µl TNT-Reaktionspuffer, 1 µl T7-RNA-Polymerase (10 U/µl), 1 µl RNasin-Inhibitor (40 U/µl), 1 µl Aminosäure-Mix ohne Methionin (1 mM) und 2 µl [<sup>35</sup>S]-Methionin (10 µCi/µl, spez. Aktivität >1000 Ci/mmol, Amersham) auf Eis gekühlt und für 90 Min. bei 30°C inkubiert. 1/10 des Proteinansatzes wurde mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt, für 3 Min. bei 95°C gekocht und durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem 12,5%igen SDS-Trenngel aufgetrennt. Als Proteinstandard diente der 'Prestained SDS Molecular Weight'-Marker (BibcoBRL). Das Gel wurde für 30 Min. in Fixierlösung ("Gel Dry Solution") und für 15 Minuten in die Färbelösung gelegt. Anschließend wurde 30 Minuten lang nichtgebundener Farbstoff mit Entfärberlösung ("Coomassie-Destain") aus dem Gel entfernt. Zur Reduktion des Hintergrundes wurde das Gel kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen und auf einem Geltrockner unter Vakuum für 30 Minuten bis 1 Stunde bei 80°C auf Whatmann-Papier getrocknet. Die Exposition erfolgte auf einseitig beschichteten <sup>35</sup>S-sensitiven Kodak BIOMAX MR Röntgenfilmen mit Verstärkerfolie bei - 80 °C.

### 2.9.11 Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Für die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen wurden Bakterien des Stammes E.coli BL21 (codon+) verwendet. Dieser Bakterienstamm ist Chloramphenicol (Cm) resistent, da er das pLys-Plasmid trägt, mit dem diese Bakterien zusätzlich in der Lage sind, endogenes Lysozym zu exprimieren. Diese Bakterien wurden mit dem pDEST-mCABY Plasmid transformiert, das für die bakterielle Expression von GST-

mCABY-Fusionsprotein verwendetet wurde und das unter Kontrolle des *lacZ*-Promotors die Transkription des GST-Fusions-Gens reguliert. Die Expression der GST-Fusionsproteine wird durch Lactose oder das Lactose-Analogon IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) induziert. Die Aufreinigung aus den Bakterienlysaten erfolgte durch Bindung an eine Glutathion-Agarose-Matrix.

300 ml Übernachtskultur wurden in LB (+Amp/ +Cm) überführt und bei 37°C und 220 rpm in einem Schüttler bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.6 wachsen gelassen. Nach Zugabe von 0,5 mM IPTG wurden die Bakterien für weitere 3 h bei 30°C geschüttelt, anschließend durch zehnmünütige Zentrifugation bei 5.000 Upm pelletiert und in 20 ml LysS-Puffer lysiert, wobei 0,2 mg/ml Lysozym, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,5 mM PMSF und 1 Tablette Protease Inhibitor Mix pro 10 ml (COMPLETE, Fa. Roche) frisch zugegeben wurden. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Kühlung auf Eis für 15 Minuten wurde die Bakteriensuspension viskös. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C ausgeführt, um die Enzymaktivität vorhandener Proteasen zusätzlich zu verhindern. Durch 30 minütige Zentrifugation bei 45.000 Upm in einer Ultrazentrifuge (Fa.Beckmann, Typ L8-M) wurden die Zelltrümmer entfernt. Das im Überstand enthaltene rekombinante Protein wurde im anschließenden Schritt mit seinem GST-Anteil an zugesetzte 2-5 ml Glutathion-Agarose gebunden, die zuvor mit dem LysS-Puffer (ohne Lysozym) äquilibriert worden war. Nach 1 h Inkubation wurden die Glutathion-Agarose-Partikel 3-4 mal mit 0,5 x LysS-Puffer (ohne Lysozym und ohne Protease-Inhibitoren) gewaschen.

Die Lagerung erfolgte bei -80°C unter Zugabe von 1 mg/ml BSA. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration und der Reinheit der GST-Fusionsproteine wurde eine 12,5% SDS-PAGE durchgeführt. Zuvor jedoch mußte die Glutathion-Agarose nach Aufkochen in 2 x SDS-Probenpuffer durch Zentrifugation abgetrennt werden.

### 2.9.12 GST-Pulldown-Assay

In einem GST-Pulldown wurde das in einem Hefe-Two-Hybrid-System gefundene APAF-1-bindende-Proteine CABY *in vitro* auf sein Bindungsverhalten überprüft. Dabei wurden verschiedene mit <sup>35</sup>S-markierten, *in vitro* translatierte APAF-1-

Mutanten entweder zusammen mit dem Fusionsprotein GST-CABY oder mit GST alleine als Kontrolle inkubiert und im SDS-Polyacrylamidgel nachgewiesen.

GST-Fusionsproteine wurden wie beschrieben in *E. coli* exprimiert (2.9.11) und aufgereinigt. Als erstes wurde das GST-CABY Fusionsprotein bzw. GST alleine im Bindungspuffer PPI aufgenommen und für 20 Minuten im Kühlraum bei 4°C gut durchmischt. 2 bis 20 µl in vitro translatierte <sup>35</sup>S-markierte Proteine wurden mit 1 bis 5 µg GST-Fusionsprotein-Rohextrakt und 100 µl Bindungspuffer PPI (+0,5 mM PMSF + 1mg/ml BSA) gemischt. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 20 Minuten, wobei alle 5 Minuten gemischt wurde. Anschließend wurde die Agarose 1 Min. lang pelletiert und 3 mal mit Bindungspuffer gewaschen. Danach wurde der Überstand möglichst vollständig entfernt und das Agarose-Proteinpellet mit 2 x SDS-Probenpuffer 3 Min. gekocht. Die Agarose wurde abzentrifugiert und der Proteinüberstand auf einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zum Vergleich wurden 10% der eingesetzten Menge an <sup>35</sup>S-markiertem Protein in 1 x Probenpuffer aufgetragen ("Input"). Das Gel wurde nach Elektrophorese 10 Min. mit Coomassie-Blau gefärbt und 30 Minuten lang entfärbt, um die Reinheit und Menge der eingesetzten GST-Fusionsproteine abzuschätzen. Anschließend wurde das Gel für 30 Min. in Fixierlösung ("Gel Dry Solution") gelegt, auf 3MM Whatman Papier 2 Stunden bei 60°C im Vakuumtrockner getrocknet und mit einem Röntgenfilm bei -80°C über Nacht exponiert.

### 2.10 Herstellung CABY spezifischer polyklonaler Antikörper

#### 2.10.1 Immunisierung von Kaninchen

Die Immunisierung von Kaninchen wurde von der Firma Pineda (Berlin) durchgeführt. Dabei wurden pro Tier insgesamt 500 µg an rekombinantem GST-CABY Fusionsprotein verwendet, das nach Aufreinigung (2.9.11) mit 500 µl Elutionspuffer (PBS, pH 11) von den Beads eluiert und anschließend in einer mit Dialysemembran (SnakeSkin, 10.000 MWCO, Fa. Pierce) umschlossenen Kammer über Nacht im Kühlraum gegen PBS (pH 7) dialysiert wurde. Die Konzentration der i.v. injizierten Proteinlösung betrug 1 µg/µl.

### 2.10.2 Antigen-Affinitätsaufreinigung von polyklonalem Antiserum

Dieser Aufreinigungsschritt wurde durchgeführt, um Immunglobuline (Antikörper) aus dem Serum zu entfernen, die andere Proteine als das Zielantigen erkennen (→ keine unspezifischen Banden im Western Blot).

Das Serum von immunisierten Kaninchen wurde zunächst durch kurze Zentrifugation (800 x g, 5 Minuten) von zellulären Resten entfernt. Es erfolgte ein so genanntes „Pre-Clearing“, wobei in einem Batch-Verfahren durch Zugabe von Beads-gekoppelten rekombinanten GST-Protein anti-GST-Antikörper aus dem Serum entfernt wurden. Die anschließende Aufreinigung von anti-CABY-spezifischen polyklonalen Antikörpern wurde über eine Inkubation mit Beads-gekoppeltem rekombinanten GST-CABY-Fusionsprotein durchgeführt. Die Antikörper wurden weiterhin mit 500 µl Elutionspuffer (PBS, pH 1) von den Beads eluiert und anschließend in einer mit Dialysemembran (SnakeSkin, 10.000 MWCO, Fa. Pierce) umschlossenen Kammer über Nacht im Kühlraum gegen PBS (pH 7) dialysiert.

### 2.10.3 Protein A/G Affinitätschromatographie

Das polyklonale Antiserum wurde auch mit Hilfe einer Affinitätschromatographiesäule („HiTrap Protein A/G Affinity Columns“, Pharmacia Biotech, Heidelberg) aufgereinigt. Die Verwendung von Protein G und Protein A erlaubt die Aufreinigung eines breiteren Spektrums von IgG-Subklassen und ist deshalb gut für die Abtrennung von anderen Nicht-Antikörper-Proteinen im Serum geeignet.

Zur Entfernung des Lager-Puffers (20 % (v/v) Ethanol) wurde die Chromatographiesäule zu Beginn mit drei Säulenvolumina Start-Puffer (20 mM Natriumdihydrogenphosphat, pH 7) äquilibriert und danach die Probe aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit mindestens fünf Säulenvolumina Start-Puffer gewaschen, wobei übermäßiges Waschen die Ausbeute an aufgereinigten Antikörpern vermindern kann. Die Elution wurde danach mit ein bis drei Säulenvolumina Elutionspuffer (100 mM Glycin-HCl, pH 2,7) durchgeführt. Alle Durchflüsse wurden in Eppendorfreaktionsgefäßen, die je 100 µl 1 M Tris/HCl pH 9,5 enthielten, aufgefangen und pH neutralisiert.

### 2.11 Herstellung CABY-spezifischer monoklonaler Antikörper

Die Herstellung monoklonaler Antikörper beruht auf der Hybridoma-Technik von Köhler und Milstein (Kohler and Milstein, 1975). Dabei werden die antikörperbildenden B-Lymphozyten nach der Immunisierung in der Regel aus der Milz oder aus gut zugänglichen peripheren Lymphknoten von Mäusen isoliert. Da die B-Lymphozyten *in vitro* nur eine geringe Wachstumskapazität zeigen, werden sie mit Myelomzellen fusioniert. Die Myelomzellen können zwar keine Antikörper bilden, haben aber die Eigenschaft des steten Teilungswachstums (d.h sie sind immortalisiert). Durch die Fusion dieser beiden Zelltypen entsteht eine so genannte Hybridomazelle, die beide Fähigkeiten, das stete Teilungswachstum und die Antikörpersynthese, in sich vereinigt. Die durch Hybridisierung entstandenen Klone sind von Natur aus homogen. Das bedeutet, daß jeder Klon nur Immunglobuline mit gleicher molekularer Struktur und antigener Spezifität sezerniert. Die so entstandenen Immunglobuline werden als monoklonale Antikörper bezeichnet. Die Immunisierungsschritte, sowie die sich anschließende Hybridomabildung und Selektion, wie auch das Testen der Überstände der einzelnen Klone auf spezifische monoklonale Antikörper hin wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. Jonathan Sleeman (Forschungszentrum Karlsruhe) durchgeführt.

#### 2.11.1 Immunisierung von Mäusen

Für die Immunisierung wurden Balb/C Mäuse genommen, denen das Immunogen (rekombinantes MBP-CABY-Fusionsprotein) subkutan sechsmal innerhalb von 21 Tagen injiziert wurde (immer in einer Konzentration von etwa 10µg/Maus). Dabei wurde das Immunogen bei der ersten Injektion als eine Emulsion mit Freund/s Complete Adjuvance (FCA) und bei der zweiten als eine Emulsion mit Freund/s Incomplete Adjuvance (FIA) gegeben. Bei den vier restlichen Injektionen wurde es gelöst in PBS zugegeben. Am Ende der Immunisierung wurden die Mäuse getötet, die poplitealen Lymphknoten (aus den Kniekehlen) entnommen und zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern mittels einer Hybridoma-Bildung verwendet.

### 2.11.2 Hybridoma-Bildung

#### a) Vorbereitung

Als erstes wurden SP2/0-Maus-Myelomazellen in Kultur genommen und in ausreichender Menge produziert (etwa  $5 \times 10^8$ ). Am Tag vor der eigentlichen Hybridoma-Bildung wurden die so genannten Feeder-Zellen (Macrophagen) aus dem Peritoneum von nicht immunisierten Mäusen mittels einer 0,34 molaren Sucrose-Auspülung isoliert. Die Zellen wurden in Hybridoma-Medium (AH Medium, 2.4.3) aufgenommen und auf zehn 96-Loch-Platten verteilt.

#### b) PEG vermittelte Zellfusion

Die immunisierten Mäuse wurden nach der Tötung in Ethanol getaucht, um sie steril zu halten. Dann wurden unter der Sterilbank die poplitealen Lymphknoten entnommen und in RPMI-Medium überführt. Die B-Zellen aus den mit einem Skalpell entnommenen Organen wurden vorsichtig mit Hilfe eines sterilen Filters (Fa. Falcon, 40 $\mu$ m Porengröße) voneinander isoliert. Die gewonnene Zellsuspension wurde zur Entfernung von Geweberesten nachfolgend über ein feines Gazesieb filtriert und in 10 ml RPMI aufgenommen. Nachdem man die Zellen, möglichst ohne Organstückchen, in 50ml Falcon-Röhrchen transferiert hat, wurden die B-Zellen und die Myelomazellen 3x in RPMI gewaschen (1200U/min, 5min). Nach dem letzten Waschen wurden die Myeloma- und B-Zellen vereinigt, nochmals zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nun erfolgte die Fusionierung mittel 50% PEG (Polyethylenglykol). Dazu wurden die vereinigten Zellen in 400 $\mu$ l RPMI aufgenommen und 600 $\mu$ l PEG hinzugegeben. Durch leichtes Schütteln wurde alles vermischt und dann bei 1200U/min für 5min zentrifugiert. Dann wurden etwa 500 $\mu$ l Überstand abgenommen und durch leichtes Klopfen die Zellen wieder resuspendiert. Es wurden nun vorsichtig 5ml RPMI und dann 10ml Hybridoma-Medium hinzugegropft, um die Fusionsreaktion zu stoppen. Nach erneutem vorsichtigem Mischen wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 100ml Hybridoma-Medium aufgenommen. Als letztes wurden die Hybridoma-Zellen auf den zehn 96-well-Platten ausgesät.

### **2.11.3 Kultivierung und Selektion der produzierenden Hybridomzellen**

Die Anzucht der Hybridomzelllinien erfolgte 37°C, 5% CO<sup>2</sup> mit RPMI-Medium als Basisnährlösung. Die Gewinnung von Hybridomzellen erfolgte mittels HAT-Selektion (Davis et al., 1982). Nach einer mehrwöchigen Selektionsphase wurde das AH-Medium schrittweise durch H-Medium und schließlich durch RPMI-Medium ersetzt.

### **2.11.4 Spezifitätsanalyse der Antikörper im Hybridomzellüberstand**

Die 96-Loch-Platten wurden ab dem siebten Tag nach der Hybridoma-Bildung fast täglich auf wachsende Klone hin untersucht. Bei Klonen die etwa ein Drittel der Einzelllochfläche ausfüllten, wurde das Medium fast vollständig abgezogen und neues Medium gegeben. Am nächsten Tag wurde etwa 100µl Medium abgenommen und dieses Medium mit den enthaltenen Antikörpern mittels eines ELISA (ABTS, Fa. Roche) getestet. Verfahren wurde dabei nach Protokoll des Herstellers. Separate 96 Loch Platten wurden durch Zugabe 0,2 µM konzentrierter Proteinlösungen sowohl mit rekombinantem MBP als negative Kontrolle wie auch mit rekombinantem MBP-CABY Fusionsprotein beschichtet. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände in einem indirekten Maus-IgG-ELISA mit Anti-Maus-IgG-Antikörper aus Kaninchen konjugiert mit HRP („horse raddish peroxiadse“) als Sekundärantikörper auf die Produktion von CABY-spezifischen Immunglobulinen hin getestet.

## **2.12 Zellbiologische Methoden**

### **2.12.1 Kultivierung/ Passagieren von Zellen**

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre (89% Luftfeuchtigkeit) in BBD-6220 Brutschränken kultiviert. Dem jeweiligen Medium wurden FCS (10% v/v Endkonzentration), Glutamin (2% v/v, Konzentration der Stammlösung: 200mM) und Penicillin/Streptomycin (1% v/v, Konzentration der Stammlösung 10mg/ml) zugesetzt. Je nach Wachstumseigenschaften wurden die Zellen regelmäßig alle 3 bis 5 Tage in 10cm-Kulturschalen (Fa. Nunc/Wiesbaden) im Verhältnis 1:10 passagiert. Zur Passagierung adhärenter Zellen wurde der Zellrasen mit kaltem PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Nachdem sich

die Zellen abgerundet hatten, wurden sie durch mehrmaliges, vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vom Boden der Zellkulturschale gelöst und vereinzelt. Die Zellen wurden anschließend in das entsprechende Wachstumsmedium aufgenommen und in dem angegebenen Verhältnis ausplattiert. Das vorhandene Trypsin wird dabei durch den im Serum vorhandenen Trypsininhibitor inaktiviert. Suspensionszellen wurden vor der Passagierung resuspendiert und 1/10 der Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit frischem Medium versetzt.

### 2.12.2 Zellzahlbestimmung

Damit für alle Experimente gleiche Versuchsbedingungen vorlagen, wurden die Zellen in gleicher Dichte ausgesät. Hierfür wurde die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Dazu wurde die Zählkammer mit den suspendierten Zellen beladen und die Anzahl der Zellen unter dem Mikroskop ermittelt.  $\text{Zellzahl/ml} = X \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10^4$

Der Mittelwert der in vier Quadraten ausgezählten Zellen entspricht X. Der Verdünnungsfaktor (1:5) ergibt sich aus der Zugabe von 80µl Trypanblaulösung zu 20 µl trypsinierter Zellsuspension. Da das Volumen in einem Quadrat 0,1 µl entspricht, muß zur Umrechnung auf 1 ml mit dem Faktor  $10^4$  multipliziert werden.

### 2.12.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Sollten Zellen über einen längeren Zeitraum gelagert werden, wurden sie nach Trypsinbehandlung in Medium aufgenommen und nach Überführung in ein Falcon-Röhrchen 5 min bei 800x g abzentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde in 900µl FCS und 100µl DMSO (10%) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 1ml-Einfrier Röhrchen (Fa.Nunc/Wiesbaden) überführt, langsam bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in Styroporbehältern eingefroren und anschließend dauerhaft in flüssigem Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) aufbewahrt. Bei Bedarf wurden die Zellen wieder in Kultur genommen. Im Gegensatz zum Einfrieren erfolgte das Auftauen der Zellen sehr schnell in einem  $37^{\circ}\text{C}$  Wasserbad, so lange, bis nur noch ein kleiner Klumpen gefrorenem Einfriermediums übrig geblieben war. Die Zellsuspension wurde in ein 15ml-Falcon-Röhrchen mit 5 ml Medium gegeben und 5 Min. bei 800x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 10ml Medium resuspendiert und auf einer 10cm Zellkulturschale ausgesät.

### **2.12.4 Transfektion von 293T und RKO Zellen**

Säugerzellen können unter bestimmten Bedingungen Fremd-DNA aufnehmen (Transfektion) und die von dieser DNA kodierten Gene exprimieren.

### **2.12.5 Vorbereitung der Zellen zur Transfektion**

Die Zellen wurden für eine Transfektion grundsätzlich am Vortag auf Zellkulturschalen ausplattiert. Für eine Konfluenz von 60-70% am Tag der Transfektion wurden  $3-4 \times 10^5$  Zellen auf 3,5cm-Schalen und  $1-2 \times 10^6$  293T bzw. RKO Zellen auf 10cm-Schalen ausgesät.

### **2.12.6 Transfektion mit Lipofecatmin**

Die effiziente transiente Transfektion der RKO Zellen mit Plasmiden erfolgt mit Hilfe von kationischen Lipiden wie z.B. Lipofectamin (Fa. Invitrogen). Diese binden an die negativ geladene DNA und können als Liposomen-Nukleinsäure-Komplex mit der Plasmamembran der Zelle fusionieren.

Verfahren wurde nach Angabe des Herstellers: DNA und das Lipofectamin wurden im serumfreien Medium (Optimem, Fa. Invitrogen; Verhältnis 1  $\mu\text{g}$  DNA zu 3 $\mu\text{l}$  Lipofectamin) verdünnt. Beide Ansätze wurden gemischt und für mindestens 20 min bei RT inkubiert. Vor Überschichtung mit dem Transfektionsansatz wurden die Zellen zwei Mal mit Serum- und Antibiotika-freiem Medium gewaschen. Nach Inkubation für 6 Stunden im CO<sub>2</sub>-begasten Brutschrank bei 37 °C (ca. 18 Stunden) wurde das serumfreie Medium durch Medium mit 10% FCS und Antibiotika ersetzt. Die Zellen wurden über Nacht im CO<sub>2</sub>-begasten Brutschrank inkubiert.

### **2.12.7 Transfektion mit Fugene**

Für die transiente Transfektion von 293T Zellen wurde die DNA (z.B. 5 $\mu\text{g}$  pro 10cm Schale) in 100 $\mu\text{l}$  serumfreiem Medium verdünnt und mit der dreifachen Menge Fugene6 (je 3 $\mu\text{l}$  pro 1 $\mu\text{g}$  DNA) gemischt. Basierend auf den Angaben des Herstellers (Fa. GibcoBRL/Eggenstein) wurde die Transfektionsmethode modifiziert und optimiert. Die zuvor gewaschenen Zellen wurden über Nacht mit dieser DNA/Fugene-Lösung inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde das DNA-enthaltende Medium durch das übliche DMEM Medium ersetzt.

### 2.12.8 Apoptoseinduktion

Zur Induktion von Apoptose wurden Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase je nach Versuchsansatz in 10 cm Kulturschalen oder 6 Loch Platten ausgesät. Nach 24 stündiger Kultivierung erfolgte die Behandlung mit apoptoseauslösenden Substanzen (2.9.6). Da es sich bei RKO Zellen um so genannte TypII Zellen handelt, wurde zur Apoptoseinduktion über die Todesrezeptoren Cycloheximid (Fa. Sigma) in einer Konzentration von 0,1 µg/ml zugegeben. Zum Vernetzen wurde zusammen mit FLAG-gekoppelten hFasL auch ein anti-FLAG Antikörper in der Konzentration von 1 µg/ml verwendet. TRAIL wurde als His-Tag fusioniertes „Killer-TRAIL“ (Fa. Alexis) eingesetzt. Der Proteinkinaseinhibitor Staurosporin wurde in einer Konzentration von 500 ng/ml zugegeben. Serumentzug induzierte Apoptose wurde durch Austausch des normalen Zellkulturmediums (10 % FCS) mit 0,1 % FCS enthaltendem DMEM Medium ausgelöst. Die Inkubationszeiten vor der weiteren Behandlung zur Apoptosequantifizierung (2.13.1) betragen 24 Stunden. Zur UV Behandlung wurden die ausplattierten Zellen einer 80mJ/cm<sup>2</sup> Bestrahlung (UV-Cross-Linker Stratalinker 2400, Fa. Stratagene, Heidelberg) ausgesetzt und über Nacht (16h) im Brutschrank inkubiert.

### 2.12.9 Immunfluoreszenzanalyse/ Lokalisationsstudien an fixierten Zellen

Die Analyse der Lokalisation zellulärer Proteine erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung. Dazu wurden die Zellen auf Deckgläser in einer Zellkulturschale ausgesät, die vorher zur besseren Adhärenz mit Poly-Lysin (0,1% w/v, Fa.SigmaAldrich) beschichtet worden waren. Vor der Färbung wurden die Zellen für 10 Min. mit 3%-Formaldehyd bei Raumtemperatur (RT) fixiert und zweimal je 5 Minuten mit PBS gewaschen. Um die Zellmembran für die Aufnahme der Antikörper zu permeabilisieren, wurde das Präparat mit 0,1% Triton X-100/PBS 5 Min. inkubiert. Nach erneutem Waschen und nach 1h Blocken (3% BSA in PBS) wurde das PBS abgesaugt, und es erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (verdünnt in Blocklösung) für 1h bei RT oder bei 4°C über Nacht. Nicht gebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt, woraufhin die Zellen für 1h bei RT im Dunkeln mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper (1:1000) gefärbt wurden. Falls erforderlich, wurde anschließend

ein zweites Protein mit einem spezifischen Primärantikörper und einem Sekundärantikörper, der mit einem anderen Fluorochrom markiert war, gefärbt. Voraussetzung dafür ist, daß sich die beiden Primärantikörper in ihrer Spezieszugehörigkeit unterscheiden, damit die Färbung durch den jeweiligen Sekundärantikörper spezifisch ist. Die zusätzliche Anfärbung des Zellkerns erfolgte durch Zugabe der zellpermeablen DNA spezifischen Farbstoffe To-PRO-3 (1  $\mu$ M) oder DRAQ5 (5  $\mu$ M). Nach erneutem Waschen wurde das Präparat auf einen Objektträger aufgebracht und im Einbettmedium (Mowiol, siehe 2.2.9) fixiert. Anschließend konnten Bilder mit einem konfokalem Laser-Fluoreszenzmikroskop (Konfokal Laser Scanning Mikroskop, Leica DM IRBE, Fa. Leica, Bensheim) aufgenommen und mit der Leica Confocal Software (LCS) ausgewertet werden. Verwendete Konfokal-Laserlinien: 488nm, 543nm, 633nm

### 2.12.10 Videoaufnahmen von lebenden Zellen

Um Proteintranslokation und morphologische Veränderungen der Zellen unter apoptotischen Bedingungen untersuchen zu können, wurden transient transfizierte RKO Zellen, die ein CABY-GFP Fusionsprotein überexprimieren, mit Mitomycin C (4 $\mu$ g/ml) behandelt und anschließend mit einem konfokalem Laser-Fluoreszenzmikroskop (Konfokal Laser Scanning Mikroskop, Leica DM IRBE, Fa. Leica, Bensheim) beobachtet. Die Zellen befanden sich während der Videoaufnahmen in einer 37°C beheizten und mit CO<sub>2</sub> begasten Inkubationskammer. Über 24 Stunden wurde jeweils im 5 Minuten-Intervall ein Bild aufgenommen.

## 2.13 Durchflußzytometrische Analysen/ FACS Messungen

### 2.13.1 PI Färbung zur Zellzyklusanalyse und Apoptosequantifizierung

Mit Hilfe von Propidiumiodidfärbung lässt sich nach Ethanolfixierung der unterschiedliche Gehalt an genomischer DNA in apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellkernen detektieren (Nicoletti et al., 1991). Neben den vitalen diploiden und den sich gerade teilenden tetraploiden Zellen der G2/M-Phase lassen sich im FACS apoptotische Zellen mit hypoploidem DNA-Gehalt identifizieren. Dabei wird die in apoptotischen Zellen vorhandene, von Nukleasen hydrolysierte

DNA aus den permeabilisierten Zellkernen ausgewaschen, so daß apoptotische Zellen durch einen verminderten DNA-Gehalt gekennzeichnet sind.

Für die Durchführung wurden die Zellen zuerst unter tropfenweiser Zugabe von 1ml eiskaltem 70%igem Ethanol fixiert und dann für mehrere Stunden oder länger bei 4°C gelagert. Zur Analyse wurden die fixierten Zellen in 38mM NaCitrat, pH 7,4 gewaschen und anschließend in der FACS-Färbelösung (2.2.10) für 25 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Messung erfolgte im FL-2 Kanal des FACS, und die Daten wurden mit der CellQuest-Pro-Software (Beckton Dickinson) ausgewertet.

### 2.14 Sequenzinformationen aus Online Datenbanken

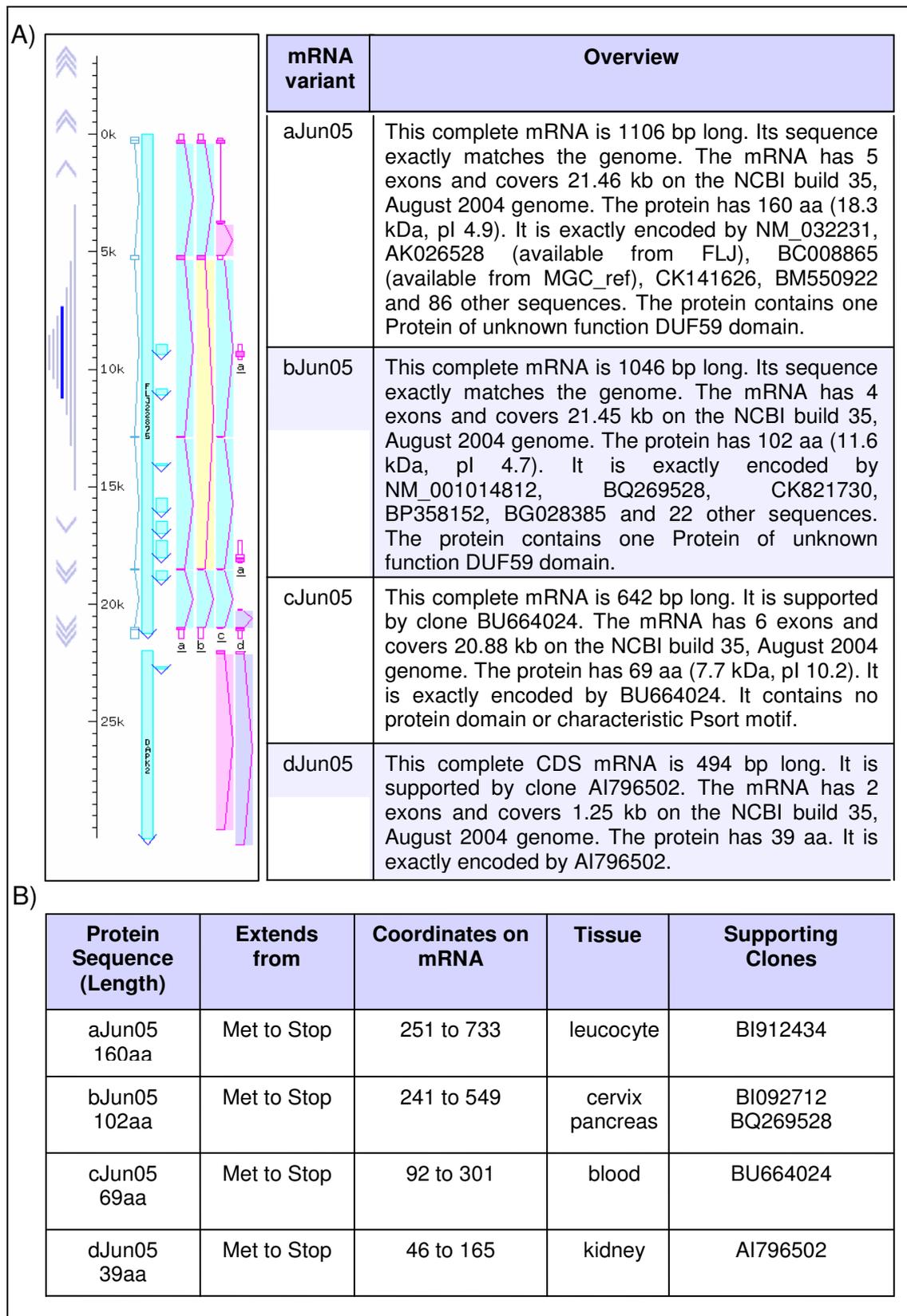
Die Informationen isoformspezifischer CABY cDNA Sequenzen und eines weiteren mutmaßlichen homologen Gens wurden der NCBI Datenbank entnommen. Zusätzlich konnten mit dem Programm AceView (NCBI) verschiedene CABY mRNA Varianten identifiziert und auf unterschiedliche Gewebetypsexpression hin untersucht werden. Alternative Translationsinitiationssequenzen (KOZAK) innerhalb der CABY cDNA wurden mit dem ATG<sup>PR</sup> Programm ermittelt. Weitere *in silico* Analysen beinhalteten die Charakterisierung des genomischen CABY Locus mittels der ENSEMBL Datenbank. Diese wurde auch dazu benutzt, CABY homologe Sequenzen in verschiedenen Modelorganismen zu identifizieren. Die anschließenden Aminosäuresequenzvergleichsanalysen wurden mit dem MultiAlin Programm durchgeführt. Für die weitere Charakterisierung der CABY Protein-Sekundärstruktur in Kombination mit der Suche nach potentiell funktionellen Motiven wurden die ENSEMBL und die ELM Datenbank benutzt. Nachforschungen mit Hilfe der SYSTERS Datenbank ermöglichten die Zuordnung von CABY in eine Gruppe von Proteinen, deren Mitglieder die gleiche Domäne in ihrer Sekundärstruktur enthalten. Die jeweils korrespondierenden Internetadressen der Online Datenbanken sind auf den Seite 54 und 55 aufgelistet.

## III. Ergebnisse

### 3.1 Datenbankrecherche

Bei der Suche nach neuen APAF-1 Interaktionspartnern, die potentiell an der Regulation der Apoptosomkomplex-Bildung beteiligt sind, wurde von uns mit Hilfe von Hefe-Two-Hybrid Experimenten CABY („CED-4 and APAF-1 binding protein found in yeast“) entdeckt. Da CABY ein bisher unbekanntes und noch nicht charakterisiertes Protein war, wurden zunächst Sequenzinformationen aus diversen Online Datenbanken gesammelt und ausgewertet. Wie in Abbildung 7 A) schematisch dargestellt, befindet sich der genomische Locus von humanem CABY auf Chromosom 15 im Abschnitt q22.31, erstreckt sich über eine Länge von 21,4 kB und enthält 5 Exone. Die CABY mRNA wird laut NCBI in zwei alternative Splice-Varianten prozessiert, so daß zwei isoforme CABY Proteine - Isoform A (160 aa) und Isoform B (102 aa) - translatiert werden können (Abbildung 7 C)). Eine Sekundärstrukturanalyse ergibt, daß beide Isoformen am N-Terminus ein potentielles Signalpeptid enthalten, gefolgt von der so genannten DUF59 Domäne („domain of unknown function“), der bisher noch keine Funktion zugewiesen werden konnte. Der einzige Unterschied zwischen beiden Isoformen besteht darin, daß Isoform B C-terminal um 60 Aminosäuren verkürzt wird und somit der DUF59 Domäne im Vergleich zur Isoform A 20 Aminosäuren abgeschnitten werden. Interessanterweise führen Sequenzvergleichsanalysen im humanen Genom zusätzlich zur Identifikation eines CABY homologen Genproduktes. Dieses ribosomale Protein enthält im Vergleich zu CABY eine zu über 90% identische DUF59 Domäne (Abbildung 7 B)). Eine genauere Analyse der humanen cDNA Datenbank (AceView) zeigt, daß verschiedene CABY mRNA Varianten aus unterschiedlichen Geweben kloniert wurden und weist somit auf eine gewebetypspezifische Expression und Funktion der CABY Isoformen hin. Zu den bereits erwähnten kommen noch zwei weitere CABY mRNA Varianten hinzu, die beide für sehr kurze CABY Peptid-Fragmente (69 aa bzw. 39 aa; beide ohne DUF59 Domäne; siehe Abbildung 8 A: cJun05/ dJun05). Wie der Tabelle 8 B) zu entnehmen ist, findet man endogene CABY mRNA Expression in verschiedenen Organen wie Pankreas, Niere oder Blut.



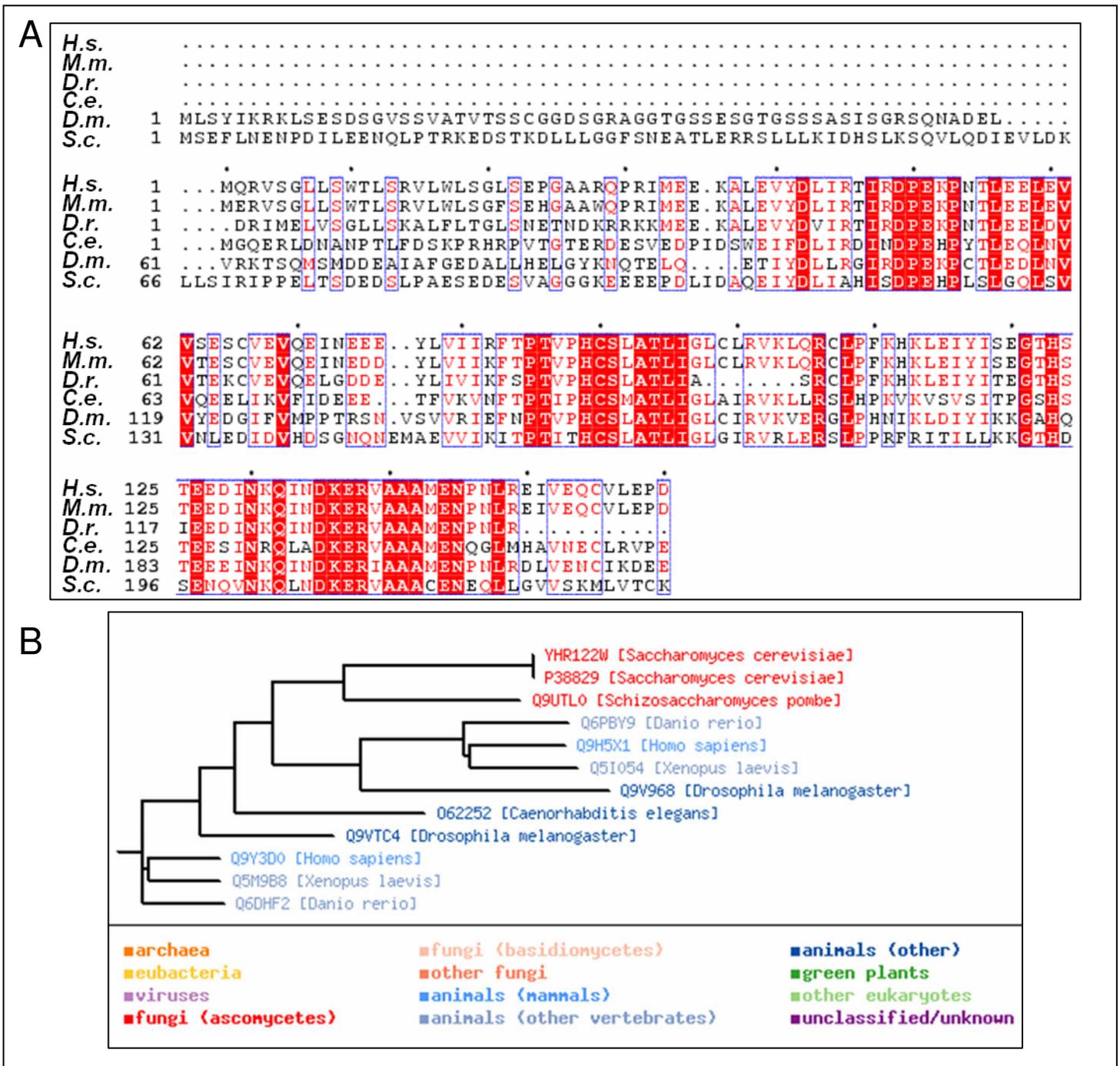


**Abbildung 8 A)/ B):** Schematische und Tabellarische Darstellung: Die Analyse der humanen cDNA Datenbank ergibt, daß CABY mRNA aus unterschiedlichem Gewebe kloniert und in 4 Varianten identifiziert wurde (AceView).



**Abbildung 9:** *In silico* Voraussage alternativer Translations-Initiations Regionen innerhalb der CABY cDNA (ATG<sup>PR</sup>/NCBI).

Neben dem alternativen Splicing-Mechanismus der CABY mRNA lassen sich innerhalb der CABY cDNA zwei Translations-Initiationsregionen - so genannte KOZAK-Sequenzen – voraussagen. Mit Hilfe des ATG<sup>PR</sup> Programms konnte dabei ein zweites „in frame“ Startkodons identifiziert werden, daß sich 96 bp 3' vom 1. ATG befindet. Somit würde gleichzeitig neben dem 160 aa langen „full length“ CABY Protein eine weitere 128 aa große CABY Isoform exprimiert werden (Abbildung 9). Diese Isoformen werden bei den später aufgeführten Experimenten als CABY<sub>L</sub> (long; 160 aa) bzw. als CABY<sub>s</sub> (short; 128 aa) bezeichnet.



**Abbildung 10 A):** CABY ist evolutionär stark konserviert. Aminosäuresequenzvergleichsanalysen weisen eine bis zu 50%ig Identität zwischen homologer CABY-Sequenzen aus verschiedenen Modelorganismen auf (MultiAlin). H.s. (Homo sapiens): FLJ22875 (NCBI), M.m. (Mus musculus): NP080911 (NCBI), D.r. (Danio rerio): ENSDARP00000008136 (ENSEMBL), C.e. (Caenorhabditis elegans): F45G2.10 (ENSEMBL), D.m. (Drosophila melongaster): CG30152-PA (ENSEMBL), S.c. (Saccharomyces cerevisiae): YHR122W (Yeast Genome).

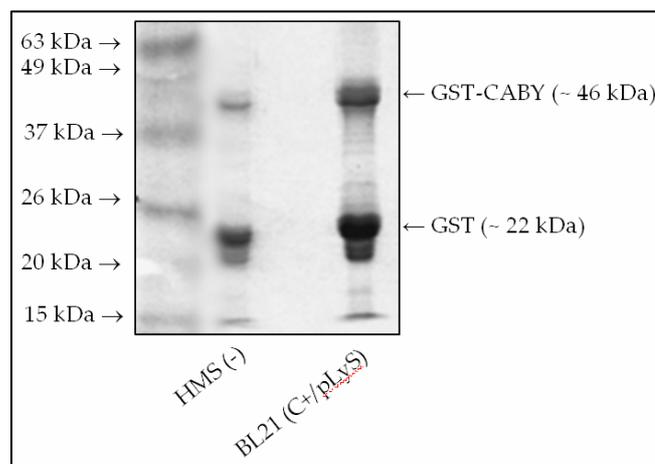
**Abbildung 10 B):** Taxonomische Darstellung der in den Datenbanken der verschiedenen Organismen hinterlegten homologen CABY-Sequenzen (Yeast Genome).

Wie die taxonomische Darstellung in Abbildung 10 B) graphisch darstellt, stellte sich bei der Suche nach orthologen CABY-Sequenzen in verschiedenen Modellorganismen heraus, daß die CABY Aminosäuresequenz evolutionär stark konserviert ist. In jedem der in Abbildung 10 A) aufgeführten Organismen lassen

sich zum humanen CABY Protein homologe Sequenzen finden, die erstaunlicherweise alle eine mindestens 50%ige Identität aufweisen. Bei der Aminosäuresequenzvergleichsanalyse fällt auch auf, daß die meisten Proteinsequenzen ähnlich lang sind und alle die DUF59 Domäne enthalten. Die Funktion der zusätzlichen N-terminal 60 Aminosäuren bei *D. melongaster* (D.m.) und *S. cerevisiae* (S.c.) ist nicht bekannt bzw. wurde bisher nicht charakterisiert.

### 3.2 Expression und Aufreinigung von rekombinantem GST-CABY-Fusionsprotein

Für *in vitro* GST-Pulldown-Experimente sowie für das Herstellen von polyklonalen anti-CABY Antiseren mit anschließender Affinitätsaufreinigung wurde rekombinantes GST-CABY-Fusionsprotein benötigt. Die Expression in bakteriellen Expressionssystem sowie die Aufreinigung mittels Glutathion-Agarose, an die der GST-Anteil des Fusionsproteins bindet, erfolgte nach dem im Kapitel 2.9.11 beschriebenen Protokoll. Die Expressionsmengen wurden auf einem SDS-PAGE-Gel abgeschätzt. Beim Vergleich zweier unterschiedlicher bakterieller Expressionssysteme fällt auf, daß sich aus Lysaten von BL21 E.coli Bakterien nach IPTG Induktion eine deutlich höhere Menge an GST-CABY-Fusionsprotein aufreinigen ließ als in HMS Bakterien (Abbildung 11). In diesem Bakterienstamm wurde eukaryotische tRNA in das Genom integriert, womit die „Codon Usage“ auf die Translation eukaryotischer mRNA abgestimmt und optimiert wurde.



**Abbildung 11:** Vergleich der Expressionsmengen von rekombinantem GST-CABY-Protein in zwei unterschiedlichen bakteriellen Expressionssystemen.

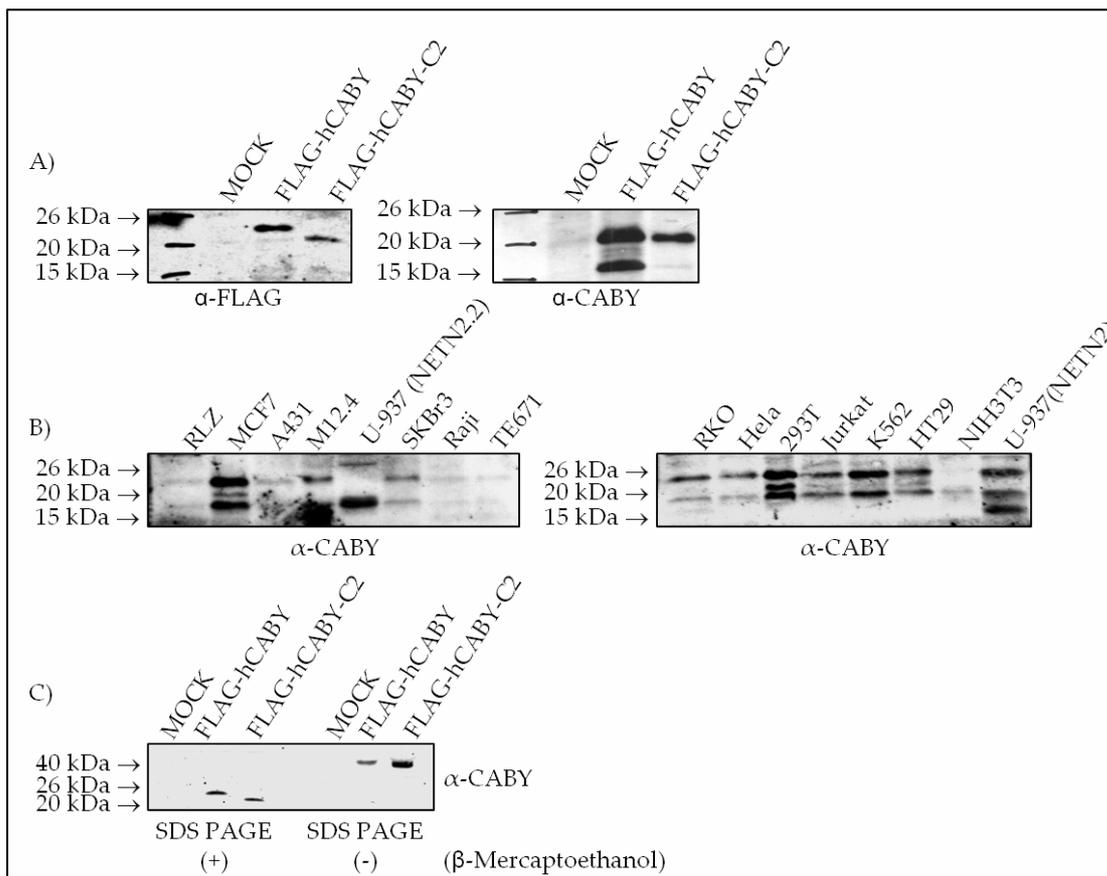
Damit kann die erhöhte Expression und Aufreinigung an rekombinant exprimiertem GST-CABY-Fusionsprotein erklärt werden, jedoch fällt auch auf, daß - wahrscheinlich verursacht

durch einen frühzeitigen Translationsabbruch - im Verhältnis mehr GST (22 kDa) als GST-CABY-Fusionsprotein (46 kDa) exprimiert wurde.

### **3.3 Herstellung von polyklonalem anti GST-CABY Kaninchen Antiserum mit anschließender Affinitätsaufreinigung**

Für das CABY Protein waren keine Antikörper kommerziell erhältlich, somit wurden zunächst mit Hilfe von Kaninchen, die mit rekombinantem GST-CABY Protein immunisiert wurden, polyklonale anti GST-CABY Antisera hergestellt und anschließend affinitätsaufgereinigt werden. (Protokoll siehe Kapitel 2.10.1/2) Zuvor jedoch musste eine genügende Menge rekombinanten GST-CABY Fusionsproteins exprimiert, mit Glutathion-Beads aufgereinigt und anschließend wieder effizient eluiert werden, so daß ca. 1mg an löslichem GST-CABY Protein für die i.v. Injektion pro Tier zur Verfügung stand. Zusätzlich wurden vor dem Verabreichen die Proben massenspektrometrisch analysiert und als GST-CABY verifiziert.

Die affinitätsaufgereinigten Kaninchen-anti-CABY Antisera wurden zunächst bei der Western Blot Analyse zum Nachweis der Expression von N-terminal FLAG getagtem CABY in transient transfizierten RKO Zellen eingesetzt. In Abbildung 12 A) wird deutlich, daß überexprimiertes FLAG-CABY und FLAG-CABY-C2 (eine um 21 aa C-terminal verkürzte Deletionsmutante) sowohl vom FLAG Antikörper wie auch vom polyklonalen anti-CABY Antiserum erkannt wird. Jedoch lässt sich zusätzlich im anti-CABY-Western Blot eine zweite CABY-Isoform detektieren, die im Kontroll-Western Blot mit dem anti-FLAG Antikörper nicht erscheint. Dieses lässt sich mit der alternativen Translations-Initiationsregion innerhalb der CABY cDNA erklären, so daß nur das „full length“ CABY-Protein ein N-terminal fusioniertes FLAG Tag enthalten kann (siehe Abbildung 9). Weiterhin fällt auf, daß sämtliche Isoformen von CABY im Western Blot ein größeres Molekulargewicht aufweisen als theoretisch vorausgesagt wird (18 kDa). Dieses könnte entweder durch post-translationale Modifikation oder durch eine nur partielle Denaturierung des CABY-Proteins während der SDS-PAGE erklärt werden. Untersucht man nun mit Hilfe der Western Blot-Analyse und anti-CABY Antiserum Lysate diverser Maus- und Humanzelllinien (Abbildung 12 B)), so stellt man fest, daß unterschiedliche endogene Expressionsmengen an CABY detektiert werden. In den meisten Fällen lassen sich die oben genannten CABY<sub>L/S</sub> Isoformen detektieren, wobei sich in einigen Zelllinien, wie z.B. MCF7 und 293T, eine dritte CABY-Bande nachweisen lässt, die bei 19 kDa detektiert wird.



**Abbildung 12 A):** Western Blot Analyse zum Nachweis der CABY-Expression in transient transfizierten RKO Zellen mittels affinitätsaufgereinigtem Kaninchen-anti-CABY Antiserum.

**Abbildung 12 B):** Detektion von unterschiedlichen endogenen CABY Isoformen in verschiedenen Maus und Humanen Zelllinien. (Human: MCF-7[Mammakarzinom], A431[epidermales Karzinom], U-937[Leukämie], SKBr3[Mammakarzinom], Raji[B-Zell Burkitt's Lymphom], TE671[Medulloblastom], RKO[Kolonkarzinom], HeLa[Cervixkarzinom], 293T[embryonale Nierenzellen], Jurkat[T-Zell Lymphom], K562[myeloische Leukämie], HT29[Dickdarmkarzinom]; Murin: RLZ[Renca-lacZ, Nierenkarzinom stabil transfiziert mit dem lacZ Gen], NIH3T3[Fibroblasten], M12.4[B-Zell Lymphom])

**Abbildung 12 C):** Unter reduzierenden Bedingungen bildet CABY Homodimere.

Auch erscheint die Komposition des Zelllysispuffers einen Einfluss auszuüben, welche der CABY Banden vom anti-CABY Antiserum erkannt werden können. Vergleicht man z.B. die beiden U-937 Zelllysatproben - deren einziger Unterschied darin besteht, daß der Lysispuffer NETN2.2 mehr DTT enthält als NETN2 - fällt auf, daß sich unter reduzierenden Pufferbedingungen sogar eine noch kleinere CABY Isoform nachweisen lässt, während unter vergleichbar oxidierenden Bedingungen eine etwas größere Isoform als die „normale“ endogene CABY-Bande sichtbar wird. Einen weiteren Hinweis auf den Einfluss des Redoxzustandes des Probenpuffers auf das Laufverhalten des CABY Proteins im SDS-PAGE liefert Abbildung 12 C). Unter reduzierenden Bedingungen (d.h. ohne Zugabe von β-Mercaptoethanol) sind die CABY-spezifischen Signale im Western Blot bei einem ungefähr doppelt so großen

Molekulargewicht zu detektieren wie für CABY-Monomere zu erwarten wäre. Daraus kann man schlussfolgern, daß unter reduzierenden Bedingungen CABY Homodimere ausbilden kann und zwar auch dann, wenn die C-terminalen 21 aa fehlen. Die Vermutung liegt nahe, daß die in der CABY-Proteinsequenz befindlichen Cysteine in der Lage sind, homophile intermolekulare Disulfidbrücken-Bindungen auszubilden.

#### **3.4 Herstellung monoklonaler anti MBP-CABY Antikörpern**

Monoklonale anti-CABY Antikörper haben gegenüber dem polyklonalem anti-CABY Antiserum den Vorteil, daß die anti-CABY Antikörper-produzierenden B-Zell Klone in Zellkultur gehalten werden können und somit diese Antikörper im Zellkulturüberstand als Hilfsmittel für weiterführende Experimente quasi unbegrenzt zur Verfügung stehen. Das Verfahren der Hybridoma Herstellung, die Isolierung der einzelnen Klone sowie das Protokoll für den Screen der Überstände auf CABY-spezifische Antikörper sind den Kapiteln 2.11.1 - 2.11.4 zu entnehmen.

Im Unterschied zur Herstellung polyklonaler anti-CABY Antiseren wurde hierbei rekombinant exprimiertes MBP-CABY Fusionsprotein - das uns freundlicherweise von der AG Dötsch (Universität Frankfurt) zur Verfügung gestellt wurde - als Antigen für die Immunisierung der Mäuse verwendet. Vorteile hierbei waren die im Vergleich zum GST-CABY Fusionsprotein höheren Ausbeuten an rekombinatem Protein sowie die Möglichkeit eines sich anschließenden Proteaseverdaus zur Herstellung ungetagtem CABY Proteins. Mit Hilfe von SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse konnte die effiziente CABY-Abspaltung im MBP-CABY-Fusionsprotein mit Hilfe des Kaninchen anti-GST-CABY-Antiserums nachgewiesen werden. (Abbildung 13 A)/ B))

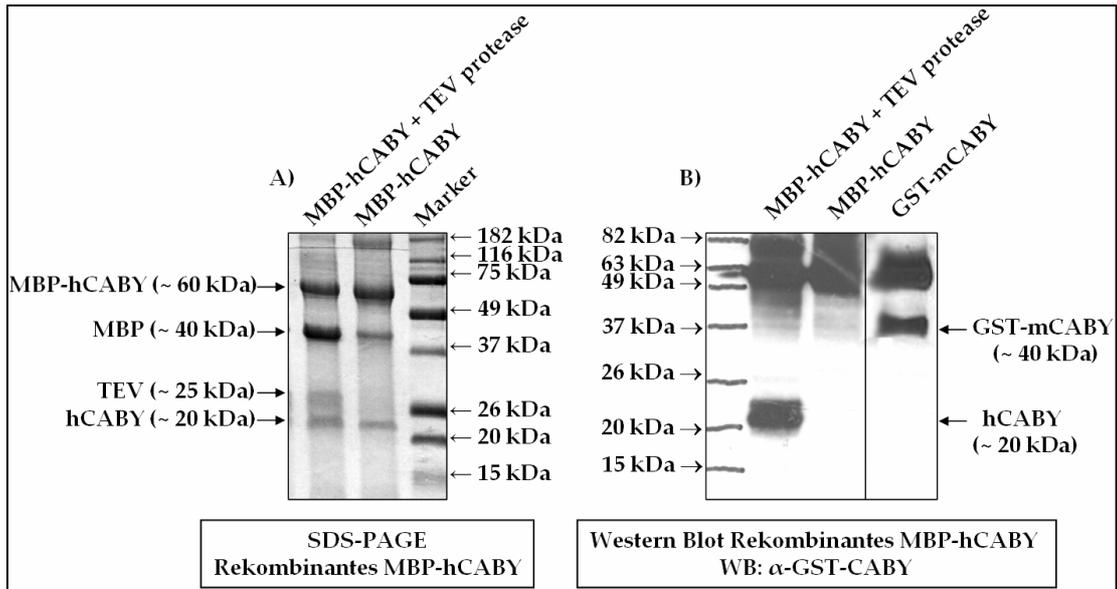


Abbildung 13: SDS PAGE- und Western Blot-Analyse von rekombinant exprimiertem MBP-CABY Fusionsprotein vor und nach Abspaltung von MBP durch proteolytischen Verdau.

Die nach drei Runden positiver und negativer Selektion im ELISA getesteten Überstände der einzelnen Hybridoma-Klone auf anti-MBP-CABY spezifische Antikörper wurden - wie Abbildung 14 zeigt - anschließend mittels Western Blot-Analyse auf ihre Fähigkeit hin untersucht, rekombinant exprimiertes GST-CABY Fusionsprotein zu erkennen. Damit sollten Antikörper ausgeschlossen werden, die an den MBP bzw. den MBP-CABY-Linkerbereich binden. Es wurde nur mit den Hybridoma-Überständen derjenigen Klone weitergearbeitet, die nachweislich CABY-spezifische Epitope erkennen konnten (z.B. Klon 56, 90, 97).

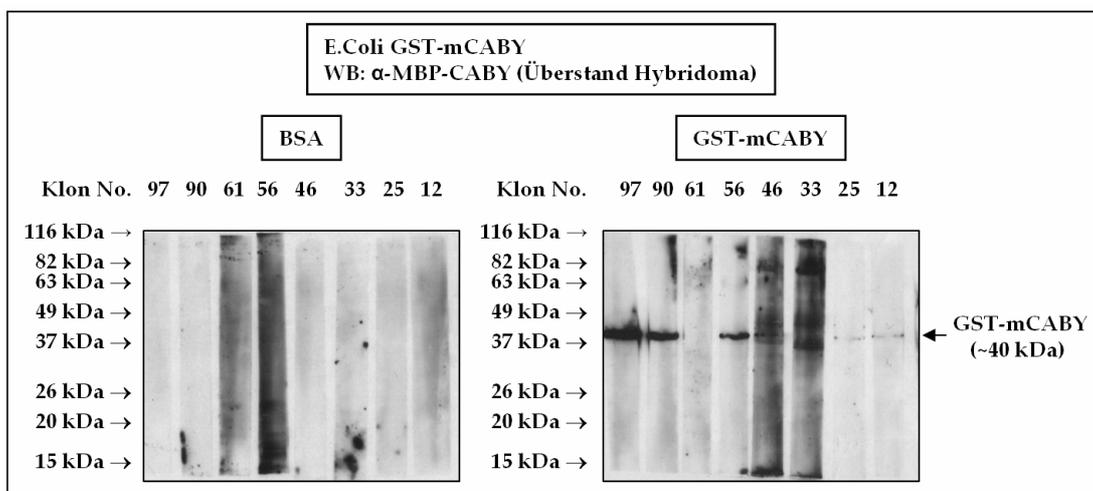
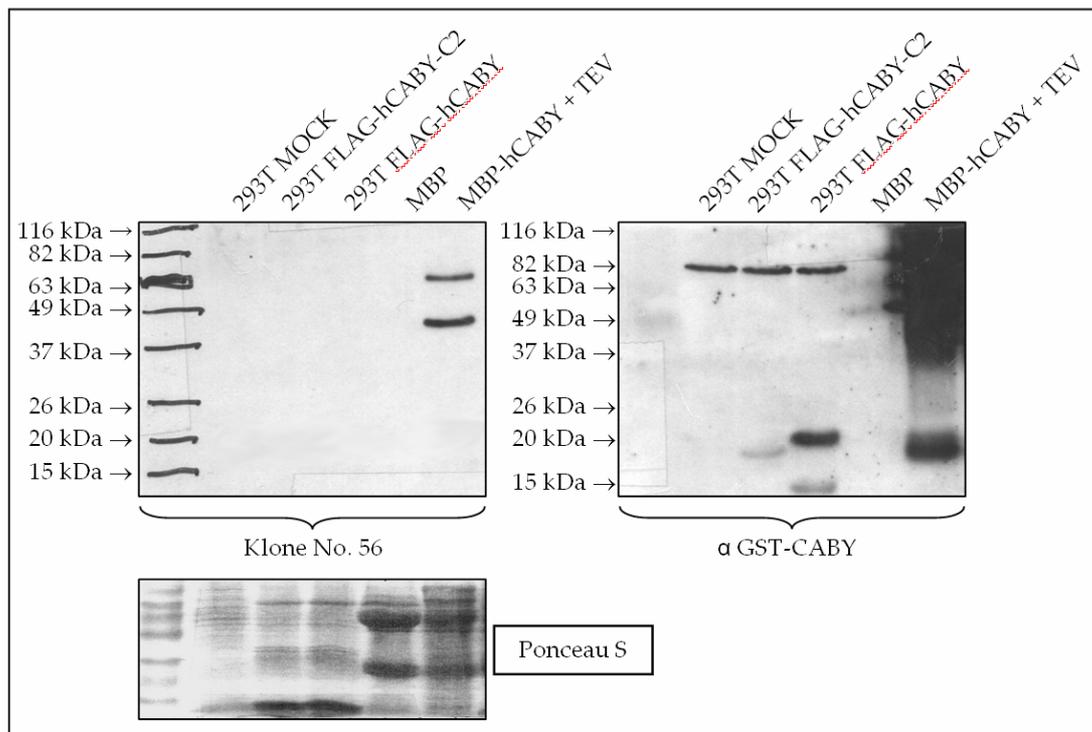


Abbildung 14: Western Blot Analyse von rekombinant exprimiertem GST-CABY Protein zum Test der einzelnen Hybridoma-Überstände auf CABY-spezifische Antikörper.

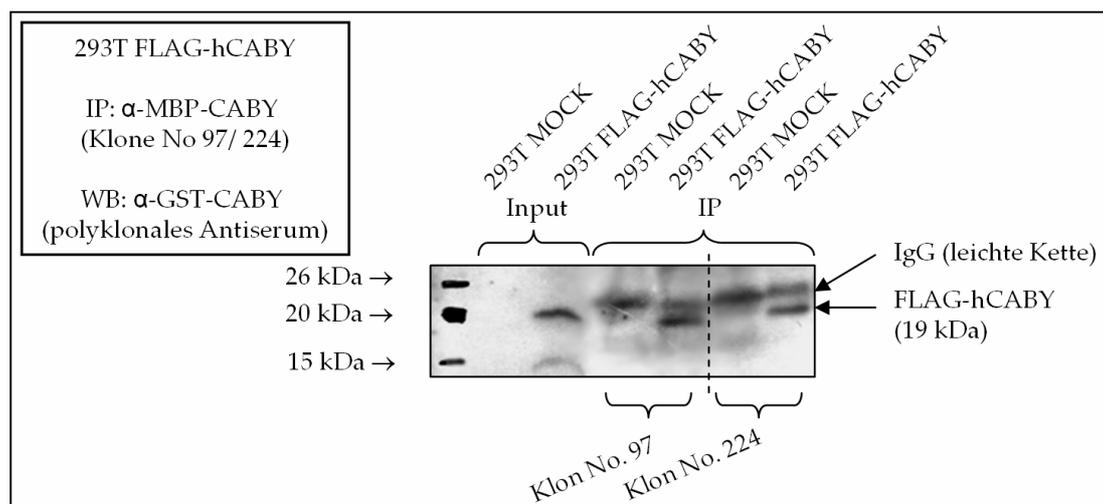
### III. Ergebnisse

Abbildung 15 zeigt am Beispiel des Klons 56, daß mit Hilfe von CABY-spezifischen Maus Hybridoma Überständen im Western Blot kein zellulär exprimiertes CABY-Protein, sondern nur rekombinantes, N-terminal mit MBP fusioniertes CABY Protein zu detektieren war. Im Western Blot werden zwei Banden sichtbar, die einmal das „volle Länge“ (63 kDa) als auch potentiell ein nicht vollständig translatiertes (45 kDa) MBP-CABY Fusionsprotein-Fragment repräsentieren. Die Schlussfolgerung daraus ist, daß die immunogenen Epitope sich aus den ersten Aminosäuren des CABY-N-Terminus zusammensetzen müssen. Das vom MBP-Fusionsprotein abgespaltene CABY konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Im Unterschied dazu war das polyklonale anti-CABY Antiserum sehr wohl in der Lage, zellulär und rekombinant exprimiertes CABY Protein zu detektieren. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, daß die monoklonalen Antikörper an Konformationsepitope im CABY-Protein binden, die in Abwesenheit des MBP als Fusionspartner und während denaturierender SDS-PAGE zerstört und somit nicht mehr erkannt werden können.



**Abbildung 15:** CABY spezifische Maus Hybridoma Überstände detektieren im Western Blot Experiment nur rekombinant aber nicht zellulär exprimiertes CABY Protein.

Möglich wäre auch, daß „abgeschnittenes“ CABY Protein nicht in ausreichenden Mengen bei der SDS-PAGE aufgetragen wurde und der Hybridoma Überstand nicht genügend Antikörper enthält, um die CABY-Bande zu erkennen. Um untersuchen zu können, ob die monoklonalen Antikörper an native Epitope im CABY-Protein binden können, wurden Immunpräzipitationsexperimente (Kapitel 2.9.8) durchgeführt, denen sich eine Western Blot-Analyse mit polyklonalem anti-CABY Antiserum anschloss.

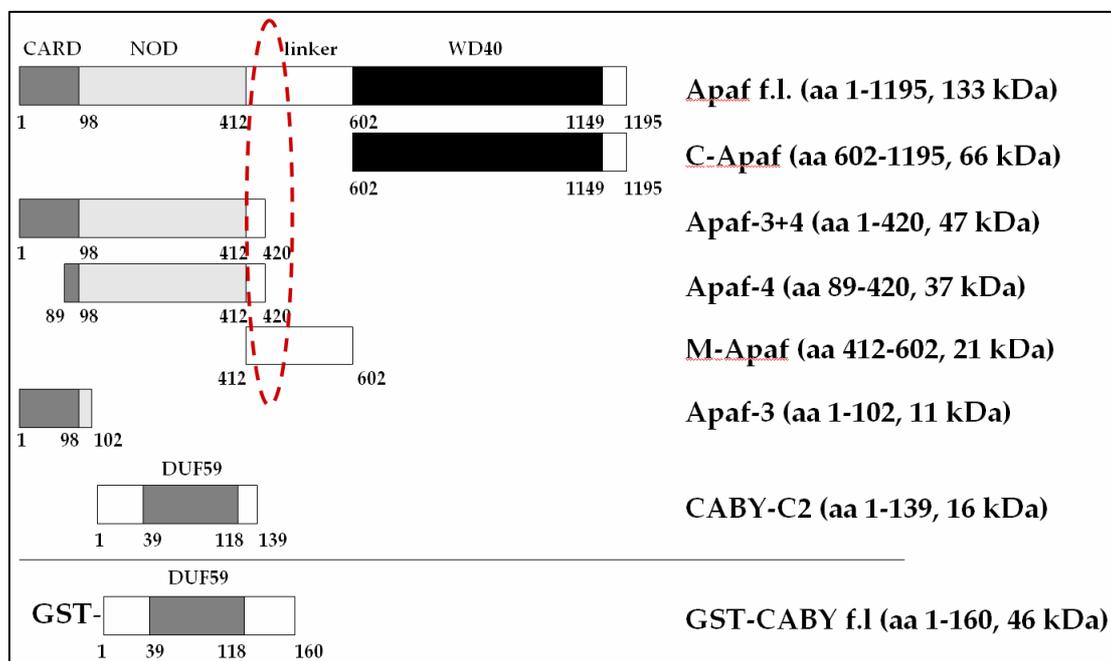


**Abbildung 16:** In 293T-Zellen überexprimiertes CABY kann mit monoklonalen anti-CABY Antikörpern immunpräzipitiert werden.

Wie in Abbildung 16 zu erkennen ist, sind die monoklonalen Antikörper aus den sekretierten Überständen der Klone 97 und 224 in der Lage, an zellulär exprimiertes CABY zu binden. Dabei fällt auf, daß die beiden monoklonalen Antikörper nur überexprimierte Mengen der CABY<sub>L</sub> Isoform immunpräzipitieren. Somit befinden sich entweder die von den monoklonalen Antikörpern gebundenen Epitope exklusiv innerhalb des im Vergleich zur CABY<sub>S</sub> Isoform um 32 aa verlängerten N-Terminus von CABY<sub>L</sub>, oder die deutlich geringeren Mengen an CABY<sub>S</sub> (siehe Inputkontrolle) ermöglichen keinen Nachweis. Um Immunpräzipitationsexperimente mit endogenen CABY Proteinmengen durchführen zu können, müssten die Antikörper wahrscheinlich in höheren Konzentrationen eingesetzt werden.

### 3.5 Interaktion von CABY mit APAF-1 in *in vitro* GST-Pulldown Experimenten

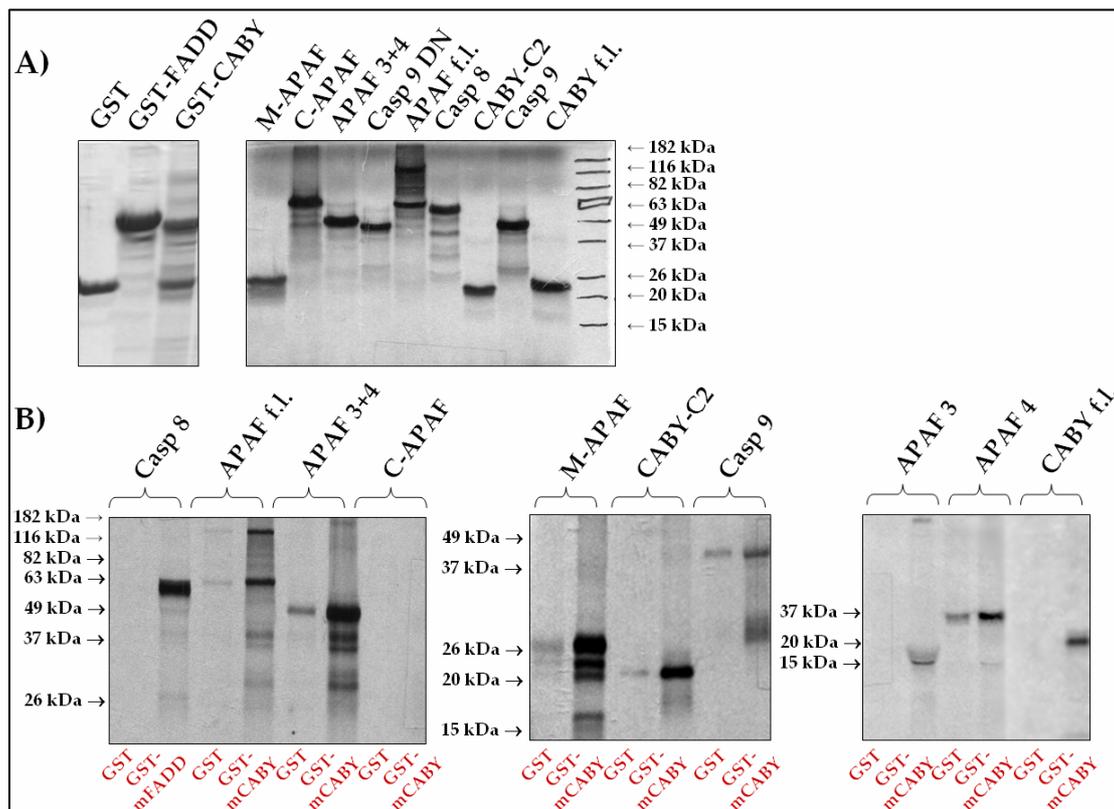
Zunächst sollte die in Hefen gefundene Interaktion zwischen CABY und APAF-1 *in vitro* bestätigt werden. Hierfür wurden GST-Pulldown Experimente durchgeführt, mit deren Hilfe eine direkte Interaktion zweier Proteine *in vitro* nachgewiesen werden kann. Dabei liegt eines der beiden Proteine als bakteriell exprimiertes Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase (GST) vor, während der potentielle Interaktionspartner *in vitro* transkribiert und translatiert und dabei mit radioaktivem  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert wird.



**Abbildung 17:** Schematische Darstellung der vollständigen APAF-1 und CABY Proteine sowie verschiedener Deletionsmutanten. Die für die Interaktion mit CABY verantwortlichen Aminosäuren 412-420 innerhalb der Linker Domäne von APAF-1 sind rot eingezeichnet.

Der *in vitro* GST-Pulldown wurde wie in Kapitel 2.9.12 beschrieben durchgeführt. Das aufgereinigte GST-Fusionsprotein wurde mit einem *in vitro* translatierten,  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierten Protein inkubiert. Binden die beiden Proteine spezifisch aneinander, verbleibt das *in vitro* translatierte Protein zusammen mit dem GST-Fusionsprotein auch nach mehreren Waschschrinen an der Glutathionagarose und wird nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Autoradiographie detektiert. Als Negativkontrolle wurde GST alleine eingesetzt, woran das *in vitro* translatierte Protein nicht binden sollte. Die Proteingele wurden mit Coomassie-Blau angefärbt,

um zeigen zu können, daß für jeden Pulldown die gleiche Menge an GST, GST-FADD und GST-CABY eingesetzt worden waren. Um abschätzen zu können, wie viel *in vitro* translatiertes Protein (Kapitel 2.9.10) für den GST-Pulldown eingesetzt worden ist, wurde auf einem separatem Gel jeweils 10 % Input der verschiedenen Konstrukte aufgetragen (Abbildung 18 A)). Abbildung 17 stellt schematisch die verschiedenen Deletionsmutanten der im *in vitro* Pulldown eingesetzten APAF-1 und CABY Proteine dar. Das Ergebnis des GST-Pulldowns, durchgeführt mit GST-CABY und den verschiedenen *in vitro* translatierten APAF-1-Mutanten, wird in Abbildung 18 B) gezeigt. Caspase-8 als schon bekannter Bindungspartner von FADD wurde hier als Positivkontrolle eingesetzt und diente zur Überprüfung des GST-Pulldown Assays. Caspase-8 interagiert spezifisch mit FADD und nicht mit dem GST-Anteil im Fusionsprotein.

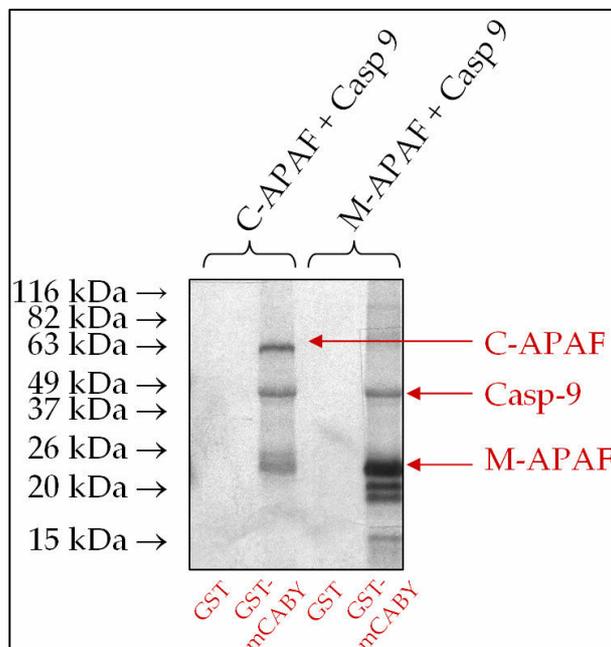


**Abbildung 18 A):** Kontrolle der im *in vitro* GST Pulldown eingesetzten Mengen an rekombinantem GST, GST-FADD und GST-CABY; *In vitro* Transkription und Translation der vollständigen APAF-1- und CABY-Proteine sowie verschiedener Deletionsmutanten.

**Abbildung 18 B):** GST-Pulldown-Experimente: Die Aminosäuren 412-420 der Nucleotid- und Dimerisierungs-Domäne (NOD) des APAF-1 Moleküls sind für die Interaktion mit CABY verantwortlich. CABY-homophile Interaktionen werden auch beobachtet.

### III. Ergebnisse

Die Bindung von APAF-1 und CABY konnte demnach auch *in vitro* nachgewiesen werden. Sowohl „full length“ APAF-1 wie auch alle APAF-1-Deletionsmutanten, die die Aminosäuren 412-420 der zentralen Linkerdomäne besitzen, zeigen eine spezifische Bindung an rekombinantes GST-CABY-Fusionsprotein. Einzig die C-terminale WD-40 Domäne von APAF-1 interagiert nicht mit CABY. Erstaunlicherweise scheint mit der CARD Domäne eine zweite Interaktionsregion für CABY im APAF-1 Molekül zu existieren (siehe Pulldown von GST-CABY mit APAF-3). Im GST-Pulldown wird auch deutlich, daß CABY zudem an Caspase-9 spezifisch bindet. Zusätzlich konnten die im Kapitel 3.3 gewonnenen Erkenntnisse, die auf eine homophile Interaktion zwischen CABY-Proteinen hinweisen, mit *in vitro* GST-Pulldown Experimenten bestätigt werden, denn CABY f.l. bindet an GST-CABY.



**Abbildung 19:** Caspase-9 vermittelt *in vitro* eine ternäre Komplexbildung zwischen CABY und den WD-40 Domänen von APAF-1

Da CABY *in vitro* sowohl mit Caspase-9 wie auch mit APAF-1 interagiert, lässt sich durch GST Pulldown Experimente mit GST-CABY die Bildung eines ternären Komplexes zwischen diesen drei Proteinen *in vitro* nicht eindeutig

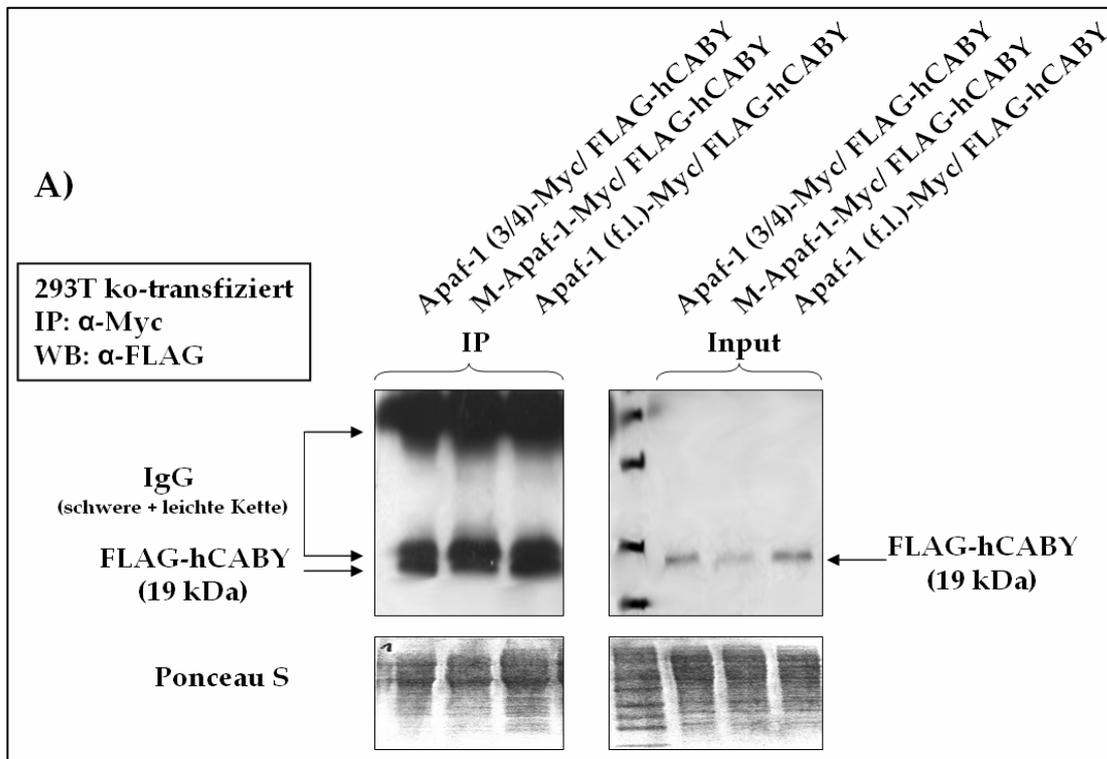
nachweisen. In dem in Abbildung 19 (rechte Hälfte) gezeigten Experiment werden sowohl M-APAF als auch Caspase-9 zusammen mit GST-CABY präzipitiert, dieses kann aber auch vollkommen unabhängig von einer ternären Komplexbildung geschehen. Erstaunlicherweise jedoch scheint die C-terminale APAF-1 Mutante (C-APAF) an einer Komplexbildung mit CABY und Caspase-9 beteiligt zu sein (Abbildung 19, linke Hälfte). Diese wird durch Caspase-9 vermittelt, da CABY selbst nicht mit der WD-40 Domäne von APAF-1 *in vitro* interagiert (siehe Abbildung 18 B)). Zwar ist bekannt, daß Caspase-9 und APAF-1 über ihre N-terminalen CARD Domänen aneinander binden können (Qin et al., 1999), jedoch die Beobachtung, daß auch der C-Terminus von APAF-1 Caspase-9 rekrutieren kann, ist bisher nicht in der

Literatur beschrieben worden. Mehrere Gründe sind für das beobachtete Ergebnis zu diskutieren: Zum einen sind diese Experimente unter Bedingungen durchgeführt worden, die nicht zur Apoptosombildung führen, d.h. ohne Zugabe von Cyt c und dATP. Zum anderen können Bedingungen in diesen *in vitro* Experimenten vorgelegen haben, die zu einer artifiziellen Bindung führten. Generell kann aber auch ein zweites Caspase-9-Interaktionsmotiv im APAF-1 Protein nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Kritisch zu erwähnen wäre auch, daß dieses Experiment nicht wiederholt und nur einmal durchgeführt wurde.

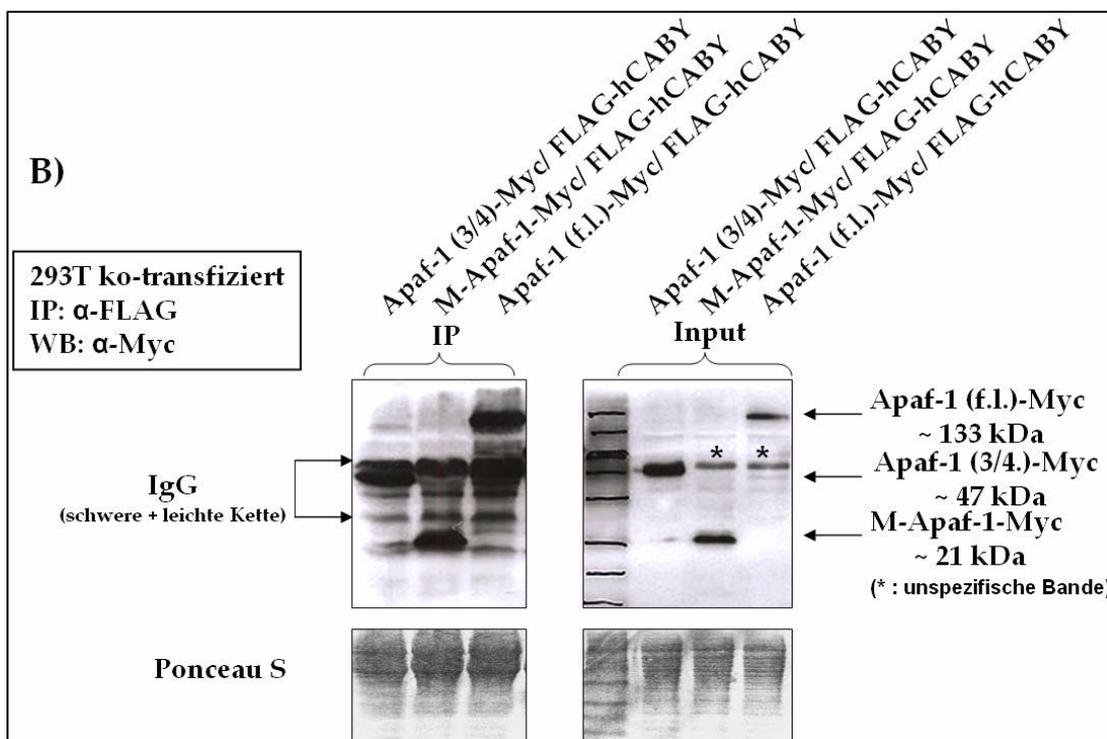
#### **3.6 Verifikation der CABY / APAF-1 Interaktion durch *in vivo* Ko-Immunpräzipitationsexperimente**

Um die *in vitro* beobachtete Interaktion zwischen APAF-1 und CABY auch *in vivo* nachzuweisen, wurden Ko-Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers ein Protein oder ein Proteinkomplex aus einem Zelllysate gebunden und durch Interaktion des Antikörpers mit Protein A- oder Protein G-Agarose vom restlichen Lysat getrennt werden kann. Verfahren wurde hierbei nach dem in Kapitel 2.9.8 beschriebenen Protokoll. Dabei wurden mit Lysaten aus 293T Zellen, die vorher mit N-terminal FLAG-getagtem CABY und N-terminal Myc-getagtem „full length“ APAF-1 oder APAF-1 Deletionsmutanten ko-transfiziert wurden, Immunpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern gegen FLAG oder alternativ gegen das Myc-Tag durchgeführt. Bei einer Interaktion von CABY und APAF-1 wird das jeweils an das immunpräzipitierte Protein gebundene Molekül im Western Blot durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen. In der Input-Spur wurde ein Aliquot (5-10%) des für die IP eingesetzten Zelllysates aufgetragen. Dessen Analyse im Western Blot sollte die Anwesenheit und die Menge der jeweiligen Bindungspartner im Zelllysate belegen und die Funktionalität der Antikörper nachweisen. Abbildung 20 A) und B) zeigen, daß CABY und APAF-1 *in vivo* miteinander interagieren. Dabei wurden 293T Zellen mit den jeweiligen Konstrukten transfiziert und nach 48h lysiert. Die Immunpräzipitation wie auch die Western Blot Analyse wurden mit Antikörpern gegen das FLAG- (für CABY) bzw. gegen das Myc-Tag (für APAF-1) durchgeführt. Wie zu erkennen ist, werden überexprimiertes

CABY und APAF-1 in 293T Zellen mit dem jeweils spezifischen anti-Tag Antikörper für den Bindungspartner ko-immunpräzipitiert.



**Abbildung 20 A):** Nach Immunpräzipitation mit dem anti-Myc Antikörper konnte in der Western Blot-Analyse mit dem anti-FLAG Antikörper eine spezifische Bindung von CABY an APAF-1 „full length“ sowie an APAF-1 Deletionsmutanten nachgewiesen werden.

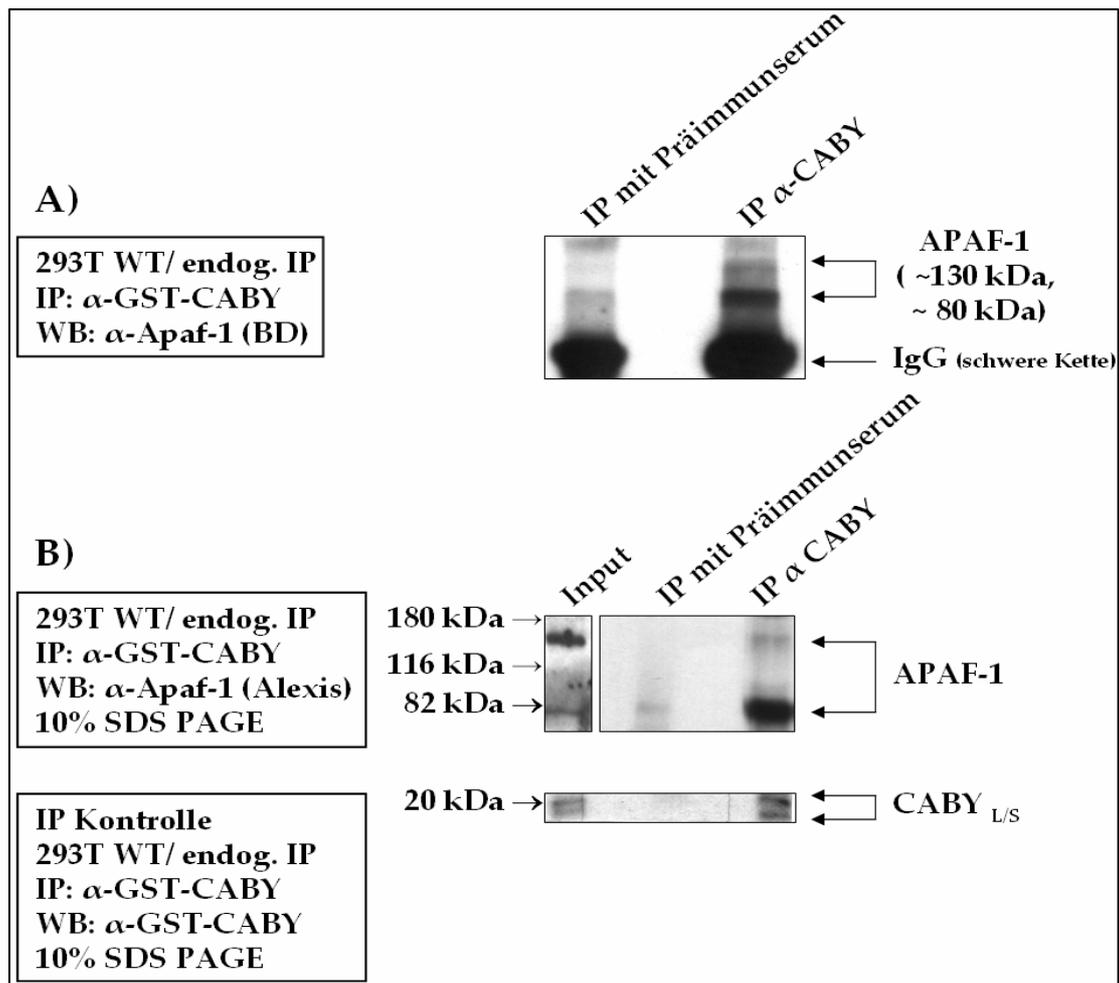


**Abbildung 20 B):** Nach Immunpräzipitation mit dem anti-FLAG Antikörper konnte in der Western Blot-Analyse mit dem anti-Myc Antikörper eine spezifische Bindung von CABY an APAF-1 „full length“ sowie an APAF-1 Deletionsmutanten nachgewiesen werden.



### 3.7 *In vivo* Nachweis der Interaktion endogener CABY und APAF-1 Proteinmengen

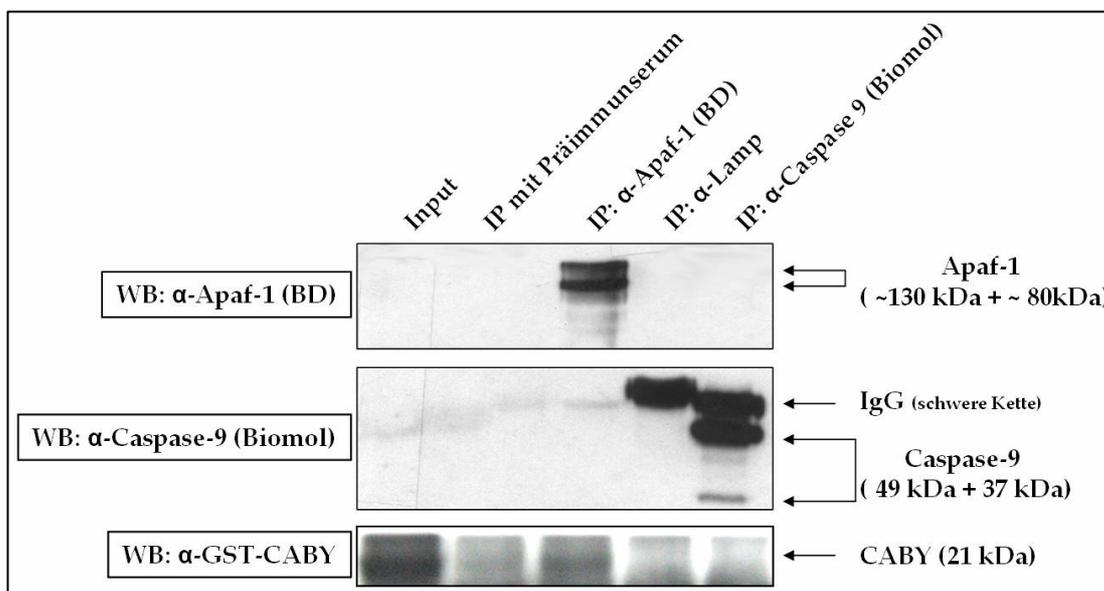
Um die Bindung zwischen CABY und APAF-1 auch mit endogenen Proteinen nachweisen zu können, wurden Ko-Immünpräzipitationsexperimente mit Lysaten nicht transfizierter 293T Wildtyp Zellen durchgeführt. Abbildungen 21 A) und B) zeigen, daß auch unter nicht-apoptotischen Bedingungen in unbehandelten Zellen CABY und APAF-1 miteinander interagieren. Bei beiden Experimenten wurde das polyklonale anti-CABY spezifische Antiserum als präzipitierendes Agens benutzt. Anschließend wurden zwei verschiedene anti-APAF-1 Antikörper zur Detektion bei der Western Blot Analyse verwendet. Das parallel dazu durchgeführte Negativkontrollexperiment mit Prä-Immunsereum aus dem immunisierten Kaninchen zeigt, daß sich eine spezifische CABY-APAF-1-Interaktion nachweisen ließ.



**Abbildung 21 A)-B):** Ko-Immünpräzipitationsexperimente mit unbehandelten 293T Wildtyp Zelllysaten: Die Bindung von endogenem CABY an endogenes APAF-1 findet auch unter nicht-apoptotischen Bedingungen statt.

Wie Abbildung 21 B) nahe legt, liegen beide CABY Isoformen in einem Komplex mit APAF-1 vor. Jedoch scheint die „full length“ Isoform von APAF-1 (ca. 130 kDa) an der Bindung von CABY nicht hauptsächlich beteiligt zu sein. Wie im Western Blot erkennbar wird, dominiert das Signal einer verkürzten ca. 84 kDa großen APAF-1 Variante. Lauber und Kollegen beschreiben dieses APAF-1 Fragment als Resultat Caspase-abhängiger Prozessierung nach apoptotischer Stimulierung der Zellen, die zur Freisetzung von aktiver Caspase-9 aus dem Apoptosomkomplex führt (Lauber et al., 2001). Ob und inwiefern CABY auch unter nicht apoptotischen Bedingungen an der Regulation dieses Mechanismus beteiligt ist, wird in zukünftigen Experimenten zu klären sein.

Da CABY *in vitro* auch mit Caspase-9 interagiert hatte, sollte anschließend untersucht werden, ob sich die Bildung eines ternären Komplexes (bestehend aus CABY, APAF-1 und Caspase-9) durch *in vivo* Ko-Immünpräzipitationsexperimente endogener Proteinmengen bestätigen lässt. Das Ergebnis wird in Abbildung 22 dargestellt.



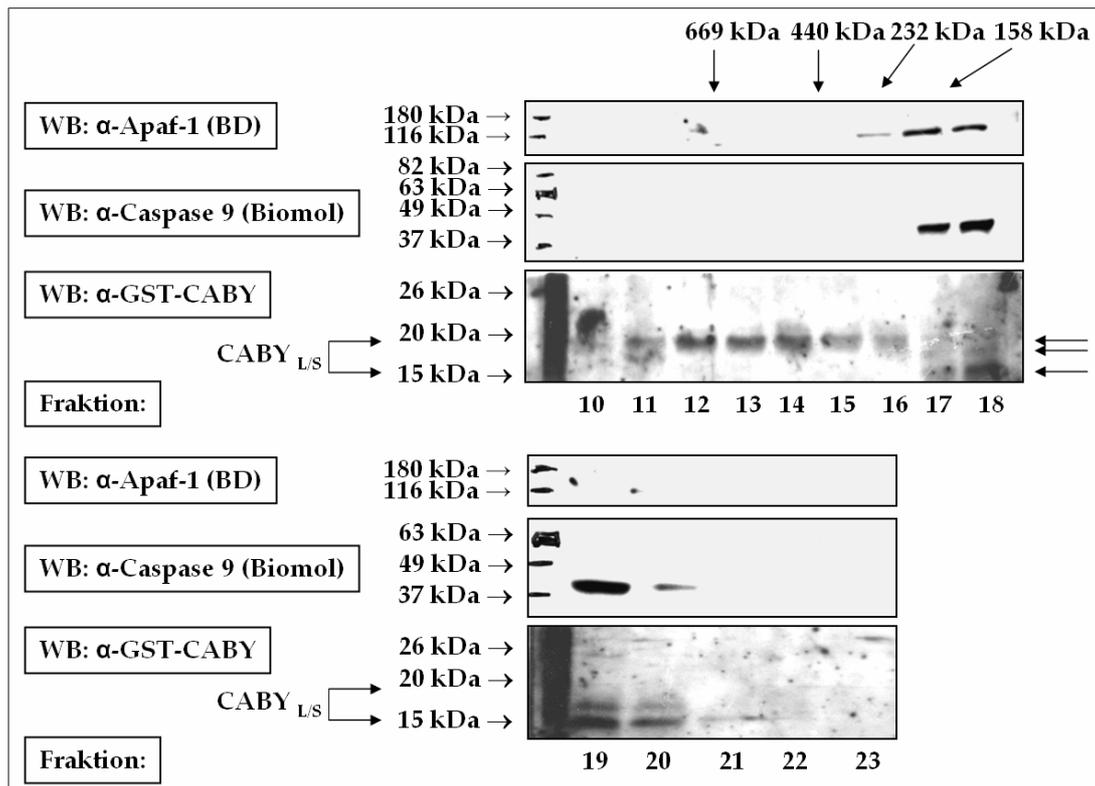
**Abbildung 22:** Eine Interaktion von CABY mit Caspase-9 lässt sich durch Ko-Immünpräzipitationsexperimenten mit endogenen Proteinmengen nicht nachweisen. Die Immünpräzipitation mit einem Antikörper gegen das lysosomale Protein LAMP („Lysosome associated membrane protein“) diente hierbei als Negativkontrolle.

Wie in den Experimenten zuvor lässt sich eine spezifische Interaktion *in vivo* zwischen APAF-1 und CABY nachweisen, jedoch nicht zwischen CABY und Caspase-9 bzw. Caspase-9 und APAF-1. Dieses kann mehrere Gründe haben: Zum einem wurden die Experimente mit nicht behandelten Zelllysaten durchgeführt.

Es ist bekannt, daß die Bindung von Cyt c und dATP an APAF-1 eine Voraussetzung für die Rekrutierung von Caspase-9 in den Apoptosomkomplex (und damit für die Bindung an APAF-1) darstellt (Kim et al., 2005). Möglich wäre auch, daß die kleinere CABY-bindende APAF-1 Isoform - als potentiell dominierender Bindungspartner für CABY unter nicht apoptotischen Bedingungen - wegen der fehlenden N-terminalen CARD Domäne Caspase-9 nicht rekrutieren kann (Lauber et al., 2001). CABY selbst jedoch vermag mit der in dieser APAF-1-Isoform vorhandenen Linkerdomäne zu interagieren. Endogene Caspase-9 lässt sich *in vivo* nicht mit CABY ko-immunpräzipitieren. Der Grund dafür könnte sein, daß der eingesetzte monoklonale anti-Caspase-9 Antikörper an die N-terminale CARD Domäne von Caspase-9 bindet, die für die beobachtete Interaktion mit CABY verantwortlich sein könnte.

#### **3.8 Gelfiltrationschromatographie – Untersuchungen zur Bildung eines ternären Proteinkomplexes bestehend aus APAF-1, Caspase-9 und CABY**

Die Gelfiltrationschromatographie mit unbehandelten 293T Wildtyp-Zelllysaten diente der Analyse der Zusammensetzung nativer Proteinkomplexe. Insbesondere sollte hierbei untersucht werden, ob CABY generell ein Bestandteil größerer Proteinkomplexe ist. Das Ergebnis wird in Abbildung 23 dargestellt. Es zeigt zum einem, daß endogene CABY Proteinmengen in bis zu ca. 700 kDa großen Komplexen nachgewiesen werden können. Es fällt auf, daß dies speziell für die CABY<sub>L</sub> Isoform zutrifft, die möglicherweise aus selbst-assoziierten Multimeren gebildet werden. Kleinere Proteinkomplexe bis zu einer Größe von ca. 200 kDa enthalten auch die kleinere CABY<sub>S</sub> Isoform. Es scheint also, daß - abhängig von der Größe - die verschiedenen Isoformen des CABY Proteins in unterschiedlichen Proteinkomplexen vorliegen. Zusätzlich dazu werden in dem anti-CABY Western Blot in den Fraktionen 17 und 18 beide CABY-Isoformen detektiert. Möglicherweise sind beide im gleichen Proteinkomplex vorhanden. Interessanterweise lassen sich gleichzeitig in diesen Fraktionen auch endogene Mengen an APAF-1 und Caspase-9 detektieren.



**Abbildung 23:** Western Blot Analyse der einzelnen Gelfiltrationschromatographie-Fractionen: In nicht stimulierten 293T Zellysaten liegen APAF-1, Caspase-9 und CABY in 150-300 kDa großen Proteinkomplexen vor.

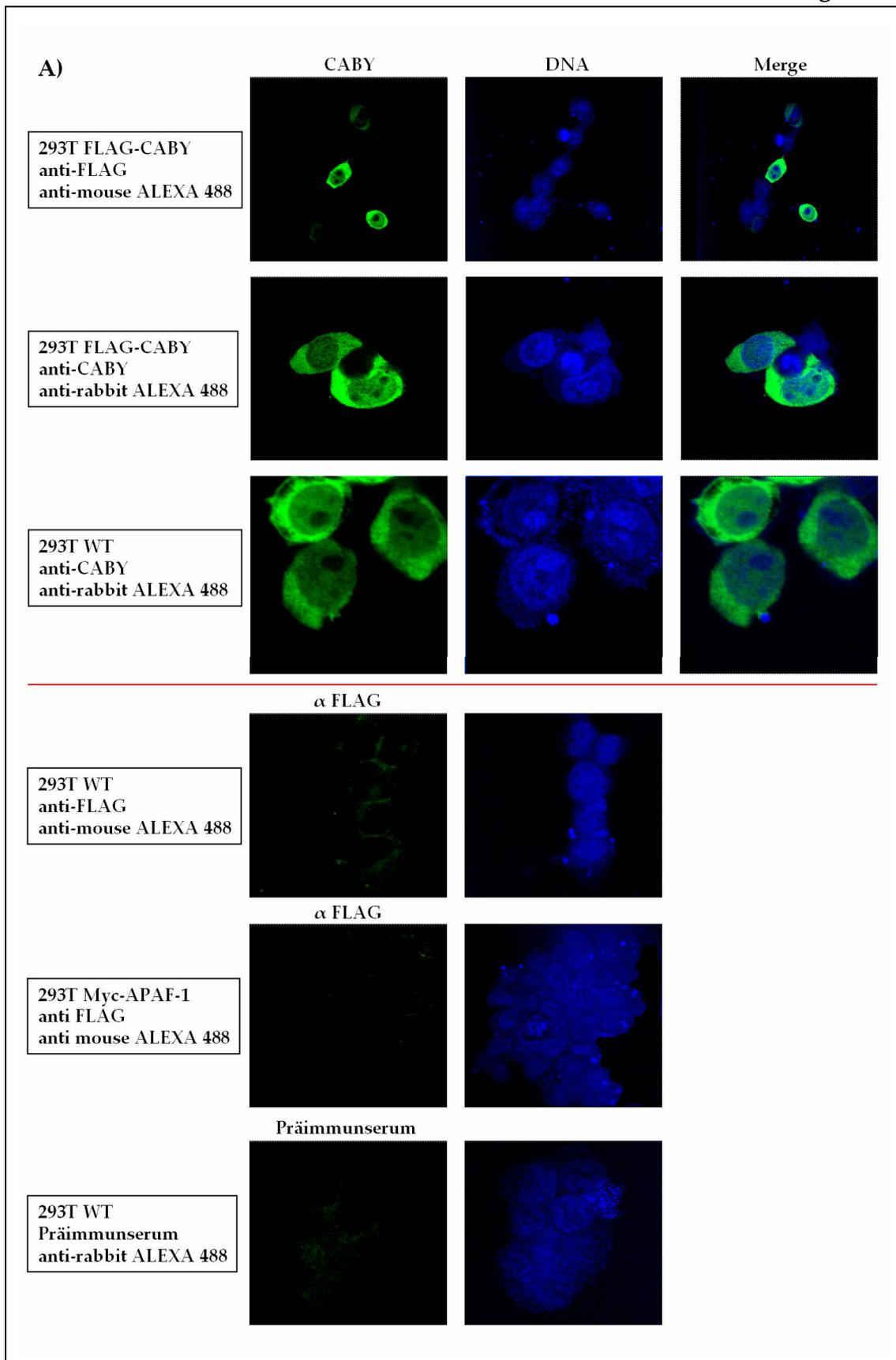
Um jedoch analysieren zu können, ob alle Proteine sich in dem gleichen Proteinkomplex befinden, sollten in Zukunft separate APAF-1-, Caspase-9- und CABY- Immunpräzipitationsexperimente mit den einzelnen Fraktionen durchgeführt werden. Bei der sich anschließenden Western Blot-Analyse mit anti-APAF-1, anti-Caspase-9 und anti-CABY spezifischen Antikörpern könnte dann untersucht werden, ob sich auch in Lysaten von nicht behandelten 293T Wildtyp Zellen ein ternärer Komplex, bestehend aus diesen drei Proteinen ausbilden kann. Die Gelfiltrationschromatographie kann auch dazu verwendet werden, um die Frage zu beantworten, ob CABY nur vor Apoptoseinduktion an APAF-1 bindet, oder ob sich CABY auch im aktivierten, Caspase-Aktivität generierenden Apoptosomkomplex befindet. Die Induktion der APAF-1-Oligomerisierung mit anschließender Apoptosomkomplexbildung *in vitro* wird durch Zugabe exogener Mengen an rekombinantem Cyt c und dATP zu den Zellysaten erreicht (Li et al., 1997). Interessant wäre auch zu untersuchen, inwiefern CABY an der Regulation der Aktivierung der ins Apoptosom rekrutierten Caspase-9 beteiligt ist. Die Caspase-9 Aktivität innerhalb einzelner Fraktionen könnten mittels fluoreszierender Caspase-

Substrate gemessen werden. Dabei könnten Zellysate miteinander verglichen werden, denen vorher entweder rekombinant exprimiertes CABY-Protein zugegeben wurde, oder bei denen mittels einer CABY-Immundepletion endogene CABY-Proteinmengen entfernt wurden.

### 3.9 Konfokale Immunfloreszenzmikroskopie – CABY- und APAF-1- Lokalisationstudien in 293T Zellen

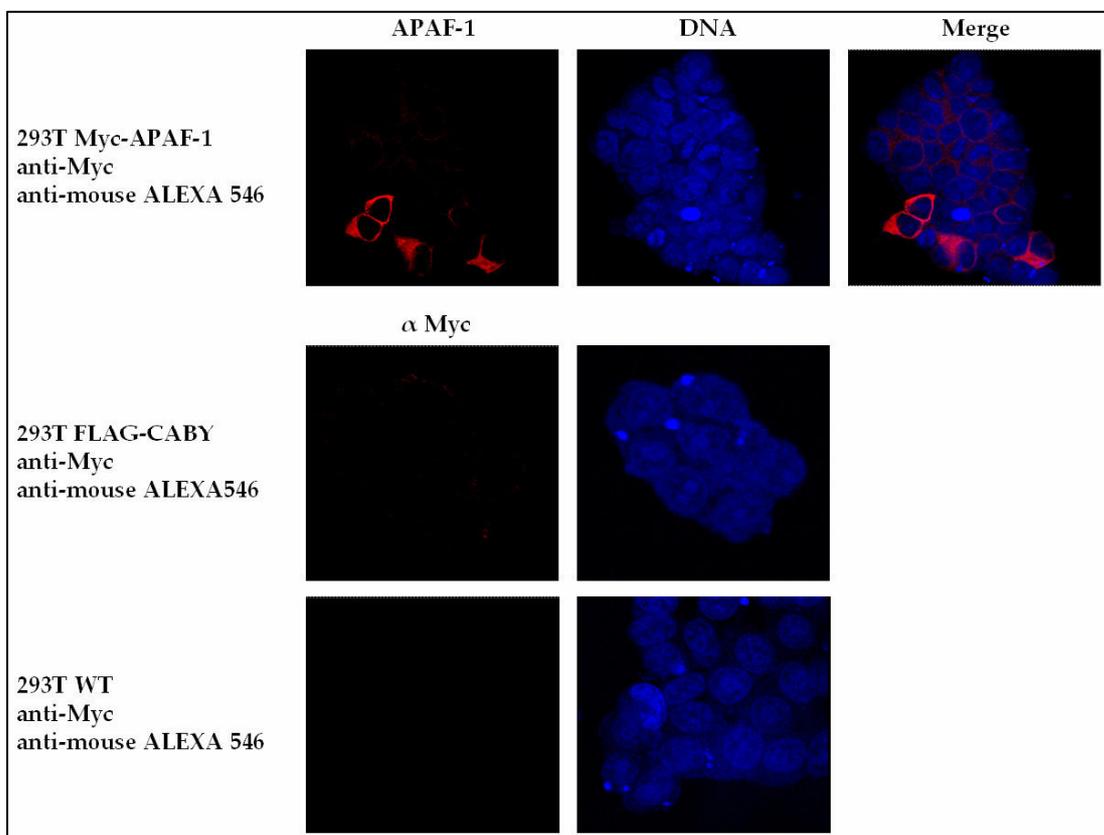
Für einen weiteren Hinweis auf eine Interaktion zwischen CABY und APAF-1 *in vivo* dienten Immunfluoreszenzfärbungen und Lokalisationsstudien, die mit Hilfe des konfokalen Laserscanning Mikroskops (CLSM) durchgeführt wurden. Das Prinzip des CLSMs beruht darauf, dass durch die Fokussierung des monochromatischen Laserlichtes einzelne horizontale Schichten der Zelle mit hoher Auflösung ohne Streulicht abgebildet werden können (Miyashita, 2004). Zunächst sollte überprüft werden, wo sich innerhalb der Zelle überexprimierte wie auch endogene Mengen an CABY-Protein lokalisieren lassen. Dazu wurden sowohl transfizierte als auch Wildtyp 293T-HEK („human embryonic kidney“) Zellen benutzt, die nach Fixierung, Permeabilisierung und Abblocken unspezifischer Bindestellen (Protokoll Kapitel 2.12.10) mit dem anti-FLAG Antikörper oder mit dem affinitätsaufgereinigten polyklonalen anti-CABY Antiserum inkubiert wurden.

Bei dem in Abbildung 24 gezeigten Experiment wurden ein grün-fluoreszierender Alexa488 anti-Maus Sekundärantikörper für den Maus anti-FLAG Antikörper gegen FLAG-CABY, ein grün fluoreszierender Alexa488 anti-Kaninchen Sekundärantikörper für das anti-CABY-Antiserum und der zellpermeable fluoreszierende TOPRO-3 Farbstoff für die DNA-Färbung eingesetzt. Es fällt auf, daß alle Immunfluoreszenzfärbungen die gleiche Verteilung des CABY-Proteins innerhalb der Zellen zeigen. CABY lässt sich sowohl im Zytoplasma wie auch zu einem geringeren Anteil im Zellkern nachweisen. Wie schon im Kapitel 3.3 erwähnt wurde, erkennt das polyklonale anti-CABY Antiserum beide durch alternative Translations-Initiation generierte CABY Proteinisoformen.



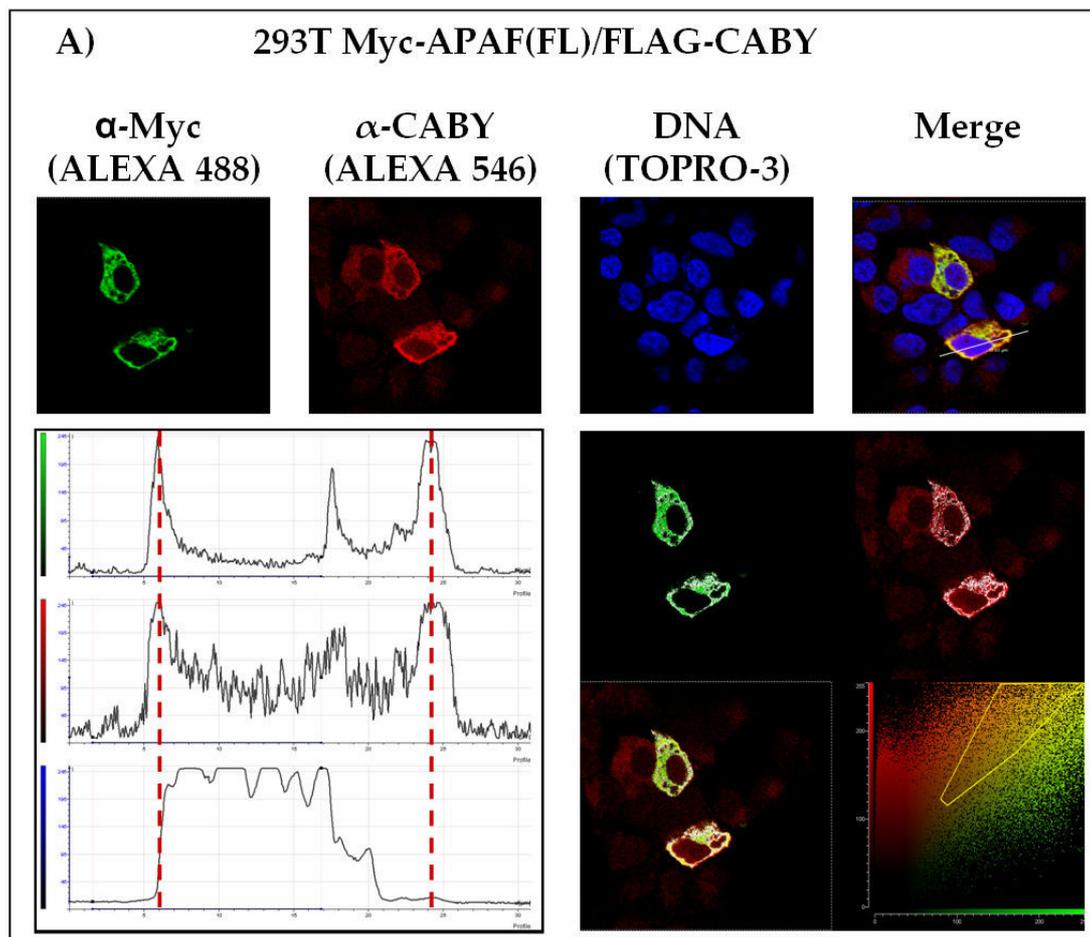
**Abbildung 24:** Lokalisation von überexprimiertem und endogenem CABY in 293T Zellen. CABY ist sowohl im Zytoplasma wie auch zu einem geringeren Anteil im Zellkern nachzuweisen. 293T Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und entweder mit *pcDNA3.1* ( $\approx$ 293T WT) bzw. mit *pcDNA3.1-FLAG-CABY* transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und einer Immunfluoreszenzfärbung mit anti-FLAG/ anti-Maus Alexa 488 oder anti-CABY/anti-Kaninchen Alexa 488- Antikörpern unterzogen. Als Negativkontrollen dienten sowohl mit *pcDNA3.1* als auch mit *pcDNA3.1-Myc-APAF-1* transfizierte 293T Zellen, die mit Präimmunserum bzw. mit anti-FLAG Antikörper behandelt wurden. Die Analyse erfolgte am konfokalen Mikroskop unter Benutzung identischer Detektoreinstellungen.

Interessanterweise lassen sich im Vergleich zur anti-FLAG Färbung (die nur die CABY<sub>L</sub>-Isoform detektiert) keine Unterschiede bei der CABY-Anfärbung nachweisen. Somit scheint die lokale Verteilung beider CABY-Isoformen innerhalb der Zelle die Gleiche zu sein. Die Möglichkeit der homophilen Interaktion könnte dafür eine Erklärung liefern. Auch kann man bei der Anfärbung im Zellkern einzelne Bereiche erkennen, in denen CABY nicht detektiert wird. Da CABY ein relativ kleines Protein darstellt, könnte eine passive Diffusion der Grund für die Lokalisation im Zellkern sein. Jedoch ist die CABY-Anfärbung im Zytoplasma deutlich stärker als im Zellkern, so daß angenommen werden kann, daß CABY aktiv aus dem Zellkern heraus transportiert wird. Es konnten aber mit *in silico* Analysen keine so genannten NES Sequenzen („nuclear export sequence“) innerhalb der CABY-Proteinsequenz vorausgesagt werden. Die ebenfalls gezeigten Negativkontrollen belegen, daß es sich um eine CABY-spezifische Detektion handelt, da sowohl das Prä-Immunsereum wie auch der anti-FLAG Antikörper in 293T Wildtyp Zellen keine unspezifischen Bindungen aufweisen.



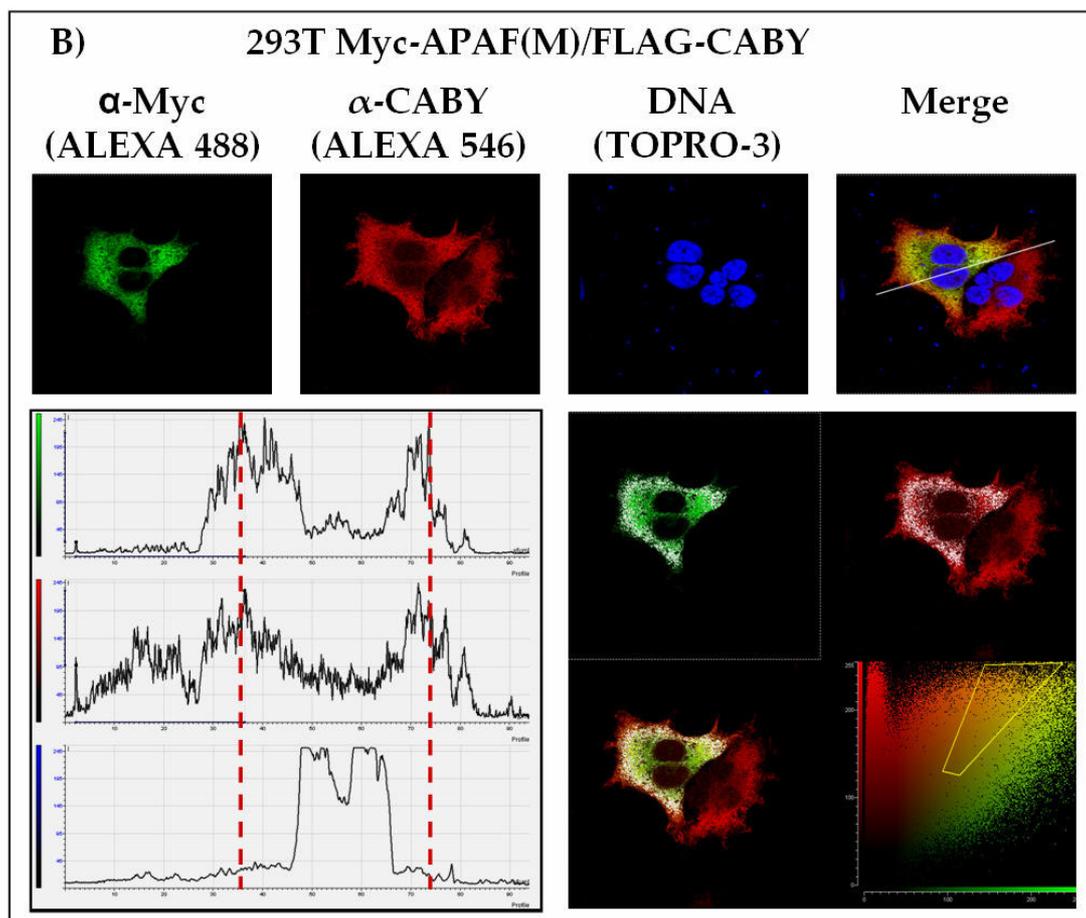
**Abbildung 25:** Lokalisation von überexprimiertem APAF-1 in 293T Zellen. APAF-1 ist nur im Zytoplasma detektiert. 293T Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und mit *pcDNA3.1* ( $\approx$ 293T WT, Negativkontrolle), *pcDNA3.1FLAG-CABY* (Negativkontrolle) bzw. mit *pcDNA3.1-Myc-APAF-1* transfiziert. Alle Proben wurden einer Immunfluoreszenzfärbung mit anti-Myc/ anti-Maus Alexa 546 Antikörpern unterzogen.

Die Lokalisationsstudien für APAF-1 wurden in 293T Zellen durchgeführt, die mit *Myc-APAF-1*-Plasmid DNA transient transfiziert worden waren und die mit einem rot-fluoreszierender Alexa546 anti-Maus Sekundärantikörper für den Maus anti-Myc Antikörper (gegen *Myc-APAF-1*) behandelt wurden. Im Gegensatz zu CABY lässt sich überexprimiertes APAF-1 ausschließlich im Zytoplasma detektieren (siehe Abbildung 25). In den Negativkontrolllexperimenten mit Wildtyp 293T-Zellen zeigt der anti Myc-Antikörper keine unspezifischen Signale. Bei dem in Abbildung 26 A)/ B) gezeigten Experiment wurden ein grün-fluoreszierender Alexa488 anti-Maus Sekundärantikörper für den Maus anti-Myc Antikörper gegen *Myc-APAF-1* bzw. *Myc-M-APAF* (aa 412-602), sowie ein rot fluoreszierender Alexa546 anti-Kaninchen Sekundärantikörper für das anti-CABY-Antiserum eingesetzt.



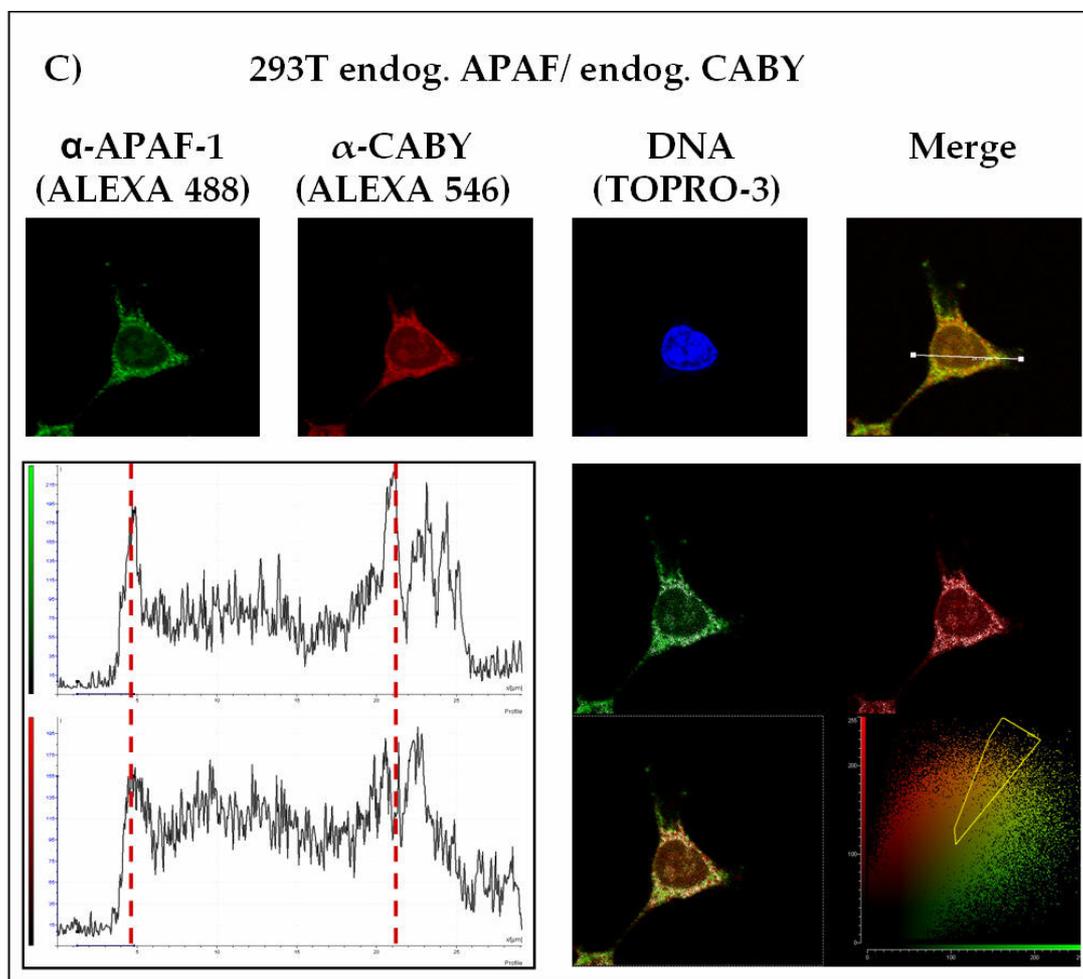
**Abbildung 26 A):** Überexprimiertes CABY und APAF-1 ko-lokalisieren im Zytoplasma von 293T Zellen. 293T Zellen, die FLAG-CABY und *Myc-APAF-1* überexprimieren, wurden mit anti-Myc/ anti-Maus Alexa 488 und anti-CABY/ anti-Kaninchen Alexa 546 Antikörpern inkubiert. Beim Zusammenfügen beider Einzelsichten erkennt man gelb erscheinende Bereiche, in denen beide Proteine ko-lokalisieren. Die Überlagerung der Intensitätsprofile der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe, die entlang einer virtuellen Strecke innerhalb der gewählten Zellebene aufgenommen wurden, und die anschließende Analyse mit Hilfe des zweidimensionalen Korrelationsdiagrammes dienten der weiteren Verifikation der Ko-Lokalisation.

Zur Detektion wurden die Laserlinien bei 488nm und 543nm verwendet, und durch sequenzielles Scannen wurde verhindert, dass emittiertes Licht des ersten Fluorochroms im zweiten Detektionskanal detektiert und fälschlicherweise als Signal des zweiten Fluorochroms interpretiert wird. Die Stellen, an denen beide Proteine ko-lokalisieren, erkennt man an der gelben Färbung in der Überlagerungsansicht beider Bilder (Merge). Wie den Abbildungen zu entnehmen ist, befinden sich die Bereiche der Ko-Lokalisation von CABY und APAF-1 bzw. M-APAF im Zytoplasma. Um dieses genau darstellen zu können, wurden die Intensitätsprofile der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe entlang einer virtuellen Strecke innerhalb einer gewählten Zellebene aufgenommen und in einem Histogramm übereinander gelegt.



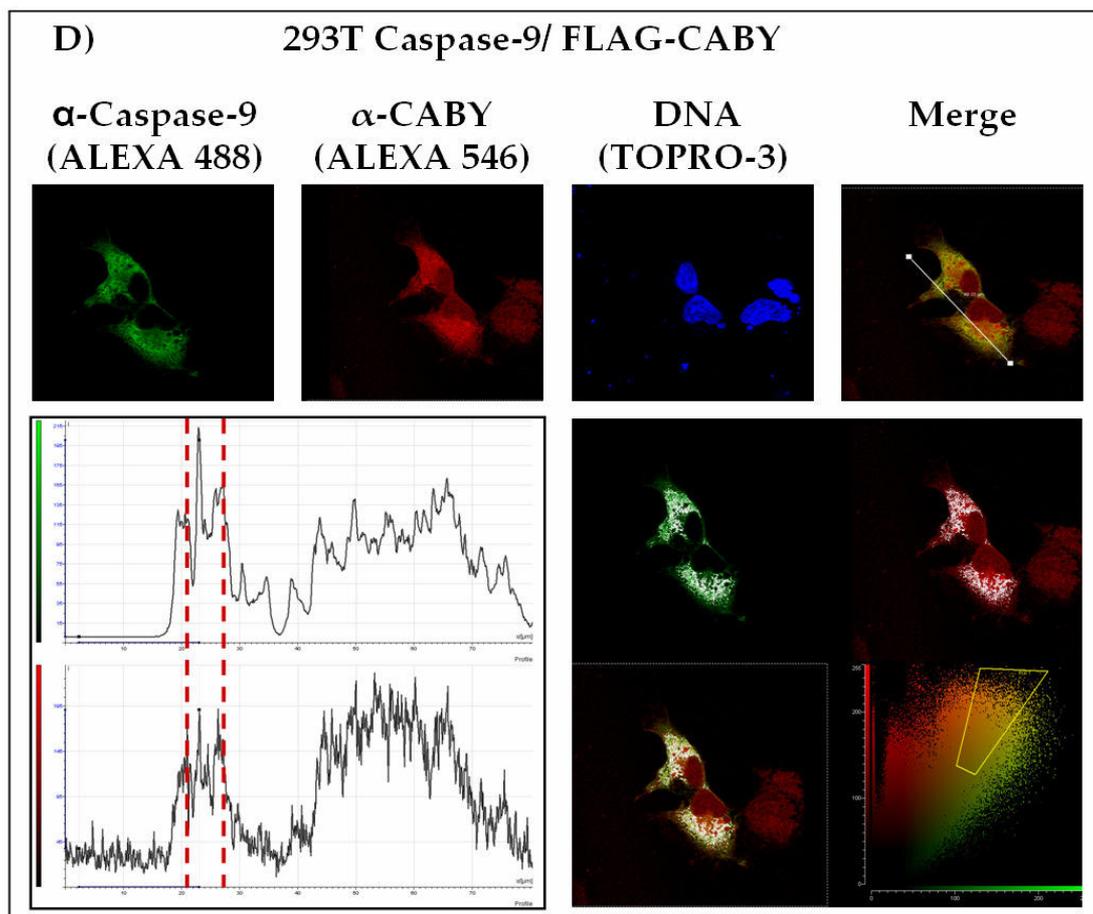
**Abbildung 26 B):** Im Zytoplasma von 293T Zellen ko-lokalisieren überexprimiertes CABY und M-APAF ebenfalls. 293T Zellen, die FLAG-CABY und Myc-APAF-M (aa 412-602) überexprimieren, wurden mit anti-Myc/ anti-Maus Alexa 488 und anti-CABY/ anti-Kaninchen Alexa 546 Antikörpern inkubiert. Wie in der Überlagerung beider Einzelansichten als auch der Intensitätsprofile der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe zu erkennen ist, ko-lokalisieren beide Proteine im Zytoplasma der Zellen. Die anschließende Analyse mit Hilfe des zweidimensionalen Korrelationsdiagrammes diente der weiteren Verifikation der Ko-Lokalisation.

Befinden sich dabei - wie in den Abbildungen 26 A)/ B) deutlich zu erkennen ist - die Maxima der einzelnen Signale an dem gleichen Punkt entlang dieser Strecke (rot gestrichelte Linien), so wird dieses als Ko-Lokalisation interpretiert. Das zweidimensionale Korrelationsdiagramm dient dazu, alle in dieser gewählten Zellebene befindlichen Orte der Ko-Lokalisation zwischen CABY und APAF-1 zu identifizieren. Dabei wurden innerhalb des gelben Bereiches (Überlagerung) ein Auswertungsbereich definiert und die gewählten Pixel anschließend in weißer Farbe in den Zellen angezeigt. Offensichtlich ko-lokalisieren überexprimiertes CABY und APAF-1 bzw. M-APAF nicht vollständig, aber exklusiv im Zytoplasma der 293T Zellen.



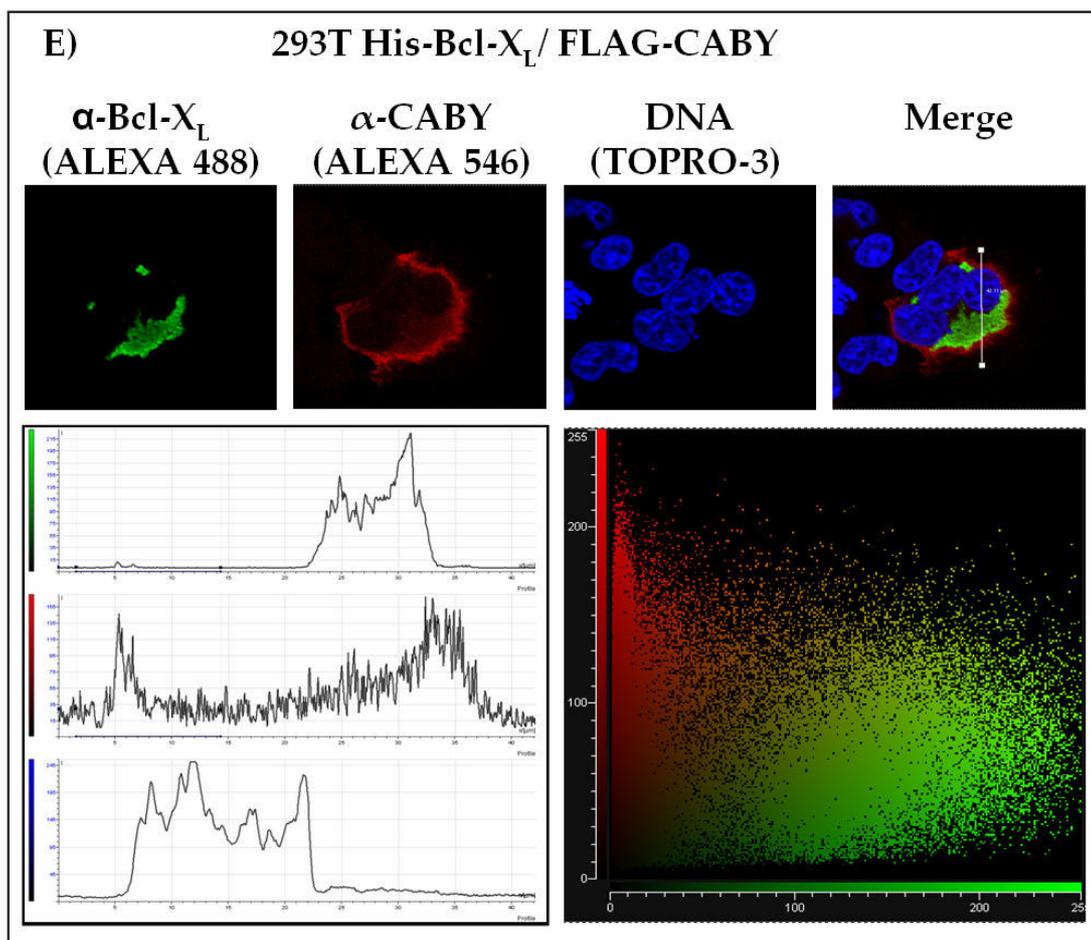
**Abbildung 26 C):** Auch endogenes CABY und APAF-1 ko-lokalisieren im Zytoplasma von 293T-Zellen. 293T Wildtyp-Zellen wurden mit anti-APAF-1 (Alexis, 18H2)/ anti-Ratte Alexa 488 und anti-CABY/ anti-Kaninchen Alexa 546 Antikörpern inkubiert. Beim Zusammenfügen beider Einzelansichten erkennt man gelb erscheinende Bereiche, in denen beide Proteine ko-lokalisieren. Die Überlagerung der Intensitätsprofile der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe und die anschließende Analyse mit Hilfe des zweidimensionalen Korrelationsdiagrammes verifizieren die Ko-Lokalisation beider Proteine.

Eine weitere Bestätigung der Ko-Lokalisation lieferten Immunfluoreszenzfärbungen und konfokale Analysen von 293T Wildtyp Zellen (Abbildung 26 C)). Hierbei wurden die endogenen CABY- und APAF-1- Proteine mit Hilfe der Antikörperkombinationen anti-CABY (polyklonal) / anti Kaninchen ALEXA 546 und anti-APAF-1 (monoklonal, ALEXIS)/ anti Ratte ALEXA 488 detektiert. In der Überlagerungsansicht erkennt man auch hier gelb markierte Bereiche im Zytoplasma und Nukleus, in denen beide Proteine ko-lokalisieren. Die Darstellung der Intensitätsprofile (Histogramme) wie auch das zweidimensionale Korrelationsdiagramm unterstützen zusätzlich diese Deutung. Wie Abbildung 26 D) zeigt, ko-lokalisieren interessanterweise auch überexprimierte Mengen von CABY und Caspase-9 im Zytoplasma von 293T Zellen. Zum einen wird diese übereinstimmende Lokalisation durch die in *in vitro* GST Pulldown Experimenten beobachtete Interaktion von CABY und Caspase-9 unterstützt (Abbildung 18 B)).



**Abbildung 26 D):** Ko-Lokalisation von überexprimiertem CABY und Caspase-9 im Zytoplasma von 293T-Zellen. 293T Zellen, die FLAG-CABY und Caspase-9 überexprimieren, wurden mit anti-Caspase-9 (Biomol, 96-2-22)/ anti-Maus Alexa 488 und anti-CABY/ anti-Kaninchen Alexa 546 Antikörpern inkubiert. Wie in der Überlagerung beider Einzelansichten als auch der Intensitätsprofile der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe zu erkennen ist, ko-lokalisieren beide Proteine im Zytoplasma der Zellen. Die anschließende Analyse mit Hilfe des zweidimensionalen Korrelationsdiagrammes diente der weiteren Verifikation der Ko-Lokalisation.

Jedoch konnte dieses durch *in vivo* Ko-Immünpräzipitationsexperimenten mit endogenen Proteinmengen nicht bestätigt werden (siehe Abbildung 22). Das kann möglicherweise an den zu geringen Expressionsmengen gelegen haben, und die Ko-Immünpräzipitationsexperimente müssten mit überexprimierten Mengen von CABY und Caspase-9 wiederholt werden. Ein Negativkontrolllexperiment für die Lokalisationsstudien wurde mit humanen Bcl-X<sub>L</sub>/ FLAG-CABY transient ko-transfizierten 293T Zellen durchgeführt, um eine unspezifische Ko-Lokalisation von überexprimiertem CABY mit anderen Proteinen innerhalb des Zytoplasmas ausschließen zu können. Abbildung 26 E) zeigt nach Inkubation der Zellen mit den Antikörperkombinationen anti CABY (polyklonal)/ anti Kaninchen ALEXA 546 und anti Bcl-X<sub>L</sub> (monoklonal)/ anti Maus ALEXA 488 in der Überlagerungsansicht keine gelben Bereiche. Sowohl die Histogramme der einzelnen Intensitätsprofile als auch das zweidimensionale Korrelationsdiagramm liefern keinen Hinweis auf eine Ko-Lokalisation von CABY mit Bcl-X<sub>L</sub>.



**Abbildung 26 E):** Bcl-X<sub>L</sub> ko-lokalisiert nicht mit überexprimiertem CABY in 293T-Zellen. 293T Zellen, die FLAG-CABY und His-Bcl-X<sub>L</sub> überexprimieren, wurden mit anti- Bcl-X<sub>L</sub> (Pharmingen, 2H12)/ anti-Maus Alexa 488 und anti-CABY/ anti-Kaninchen Alexa 546 Antikörpern inkubiert. Wie in der Überlagerung beider Einzelansichten als auch der Intensitätsprofile der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe zu erkennen ist ko-lokalisieren beide Proteine nicht.

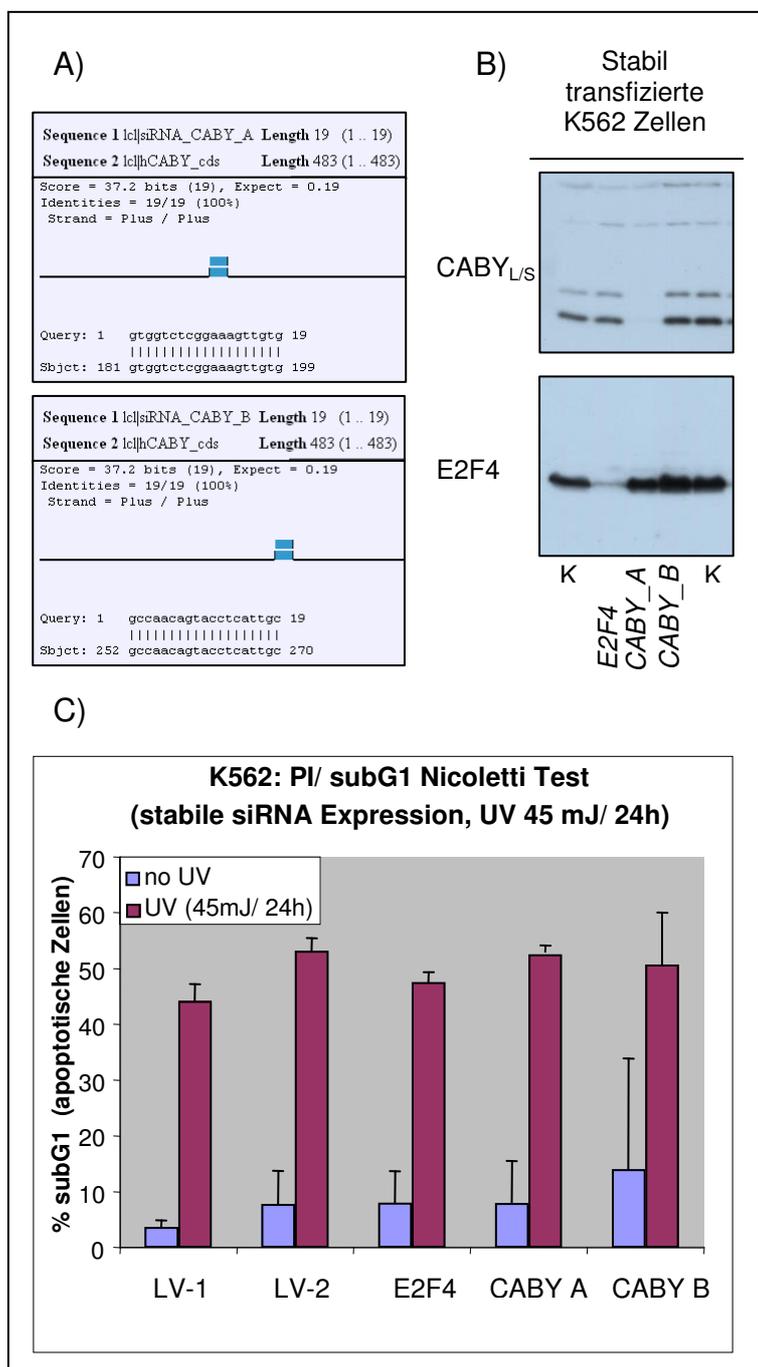
### 3.10 Durchflußzytometrische Untersuchungen zur Rolle von CABY während der Apoptose

Funktionelle Analysen, die eine Beteiligung von CABY an der Bildung bzw. Aktivierung des Apoptosomkomplexes und damit die Bedeutung von CABY für den intrinsischen mitochondrialen Apoptose-Signalübertragungsweg untersuchen sollten, wurden mittels durchflußzytometrischer Analysen durchgeführt. Die Quantifizierung der Apoptose erfolgte über die Bestimmung des Anteils an Zellen mit hypoploidem DNA-Gehalt im FACS. Die Zellen wurden mit Ethanol fixiert und anschließend mit Propidiumiodid, einem DNA-interkalierenden kationischen Farbstoff, gefärbt. Im Durchflußzytometer lassen sich Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus mit diploidem DNA-Gehalt von Zellen in der G2-Phase mit tetraploidem DNA-Gehalt und von den zwischen diesen beiden Populationen liegenden S-Phase-Zellen unterscheiden; zudem erkennt man deutlich apoptotische Zellen mit einem DNA-Gehalt kleiner als  $2n$  („subG1-Peak“) (Nicoletti et al., 1991).

RNA Interferenz (RNAi, (Fire et al., 1998)) hat sich zu einem wichtigen Werkzeug zum Studium von Genfunktionen entwickelt und ermöglicht den „Knock down“ von Genen - d.h die spezifische Unterdrückung der Expression einzelner Genprodukte auf posttranskriptioneller Ebene - in einer Vielzahl von Organismen und Zelllinien. Der Mechanismus beruht auf dem Prozessieren von doppelsträngigen RNA Molekülen, die als Oligonukleotide von außen zugeführt oder als „Stem Loop“-Konstrukte transfiziert werden, in 21-23 Nukleotide große so genannte siRNAs („small interfering RNA“, (Elbashir et al., 2001)). Die Prozessierung wird durch den DICER Enzymkomplex vermittelt. Anschließend kommt es zum Entwinden der siRNA Fragmente am so genannten RISC Komplex („RNA-induced silencing complex“). Nach Anlagern des Antisense Strangs an die Ziel mRNA kommt es zur Spaltung und damit zum gezielten Abbau der mRNA durch den RISC Komplex (Hammond et al., 2000). Die mRNA Degradation führt zu einem „gene silencing“ und erlaubt somit unter anderem, in Säugerzellkulturen Genfunktionen zu analysieren.

Um die Rolle von CABY während der Apoptose untersuchen zu können, wurden in Zusammenarbeit mit M. Truss (Charite, Berlin) Zelllinien etabliert, die *hCABY*-mRNA spezifische siRNA stabil exprimieren. Dafür wurden zwei verschiedene

Zelllinien verwendet: einmal die humane chronisch myeloide Leukämie (CML)-Zelllinie K562 sowie die humane Kolonkarzinom-Zelllinie RKO. Es sollte festgestellt werden, ob CABY (eventuell zelltypspezifisch) an der Regulation von mitochondrialer Apoptose beteiligt ist. Die Auswahl der zwei unterschiedlichen siRNA Sequenzen (*CABY A*, *CABY B*), die eingesetzt wurden, basieren auf der *CABY* cDNA Sequenz (siehe Abbildung 27 A)). Sowohl *CABY A* als auch *CABY B* sind 19 Nukleotide lang und binden an komplementäre Bereiche der *CABY* mRNA, die sich 180 bzw. 252 Nukleotide 3' vom ersten Startkodon innerhalb der *CABY* cDNA befinden.



**Abbildung 27 A):** Schematische Darstellung der Bindung der *CABY A* bzw. *CABY B* siRNA an die korrespondierenden Abschnitte innerhalb der CDS der *CABY* mRNA.

**Abbildung 27 B):** Die Western Blot Analyse detektiert eine effiziente Herunterregulation der *CABY* Expression in K562 Zellen, die mit *CABY A* siRNA stabil transfiziert wurden.

**Abbildung 27 C):** Die FACS Analyse zeigt, daß der *CABY* Knock-Down kein unterschiedliches Apoptoseverhalten in K562 Zellen nach UV Bestrahlung bewirkt. Drei voneinander unabhängige Versuchsreihen wurden durchgeführt, und als Negativkontrollen wurden Leervektor (LV-1/-2) und *E2F4* siRNA verwendet.

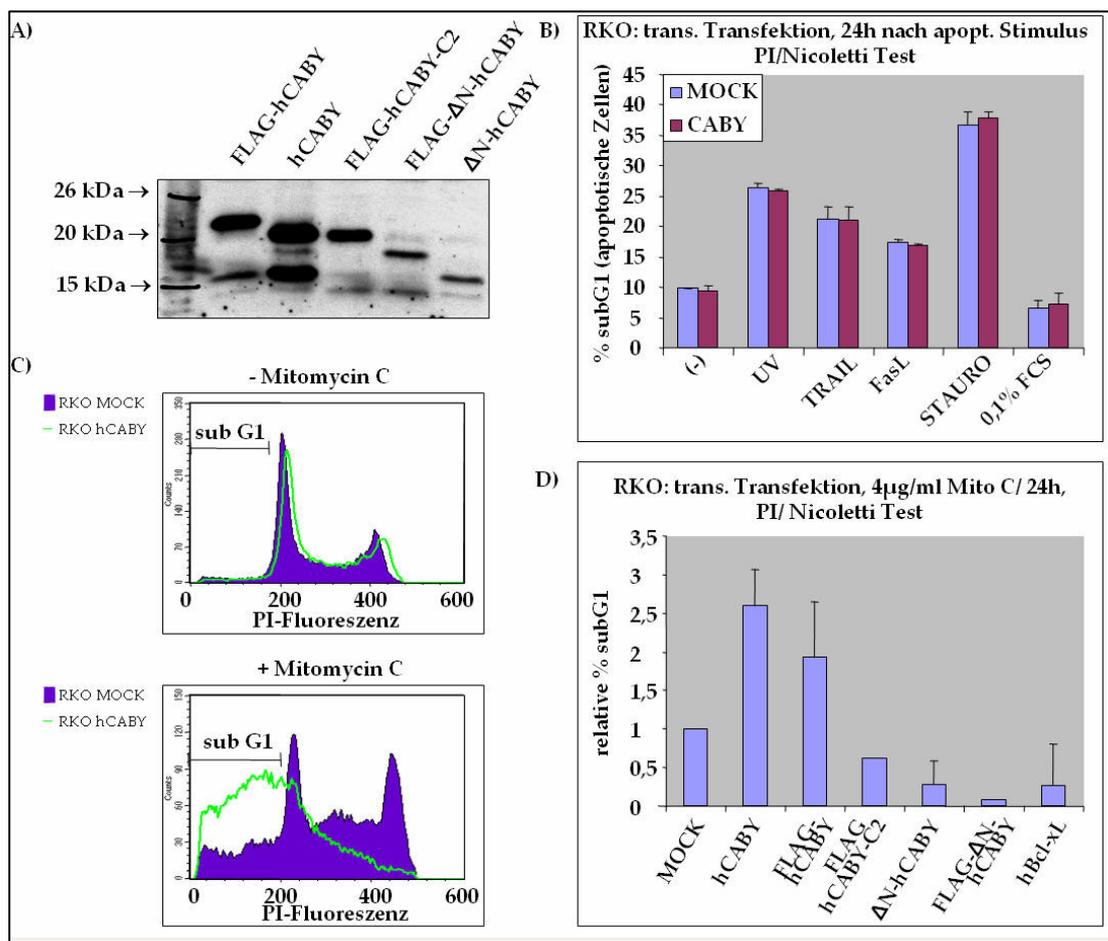
Wie der Western Blot in Abbildung 27 B) zeigt, findet im Falle der *CABY A* siRNA in K562-Zellen eine effiziente Anlagerung des siRNA/ Nukleasekomplexes an die *CABY* mRNA statt, die sich als eine deutlich erkenn-

bare Herunterregulation der endogenen CABY Expression beider Isoformen auf Proteinebene nachweisen lässt. Im Vergleich dazu zeigen die Lysate von Leervektor transfizierten K562 Zellen in diesem Western Blot Experiment keine Veränderung endogener CABY Protein-mengen. Mit *E2F4* siRNA stabil transfizierten K562 Zellen konnte nachgewiesen werden, daß die Herunterregulation von CABY nur mit CABY spezifischer siRNA erreicht wurde. Sie diene gleichzeitig als Kontrolle für die funktionellen Assays, um sicher zu stellen, daß bestimmte Effekte nur mit CABY-siRNA, aber nicht mit anderen siRNAs erreicht werden konnte. Abbildung 27 C) stellt das Ergebnis des mit siRNA stabil transfizierten K562 Zellen durchgeführten Nicoletti-Tests tabellarisch dar. Für die durch UV Bestrahlung induzierte Apoptose wurde eine Energiemenge (45 mJ) gewählt, bei der nach 24 Stunden ca. 50% der Kontrollzellen hypoploiden DNA Gehalt aufweisen.

Unter diesen Bedingungen sollte untersucht werden, ob die fehlende CABY Expression den apoptotischen Prozeß inhibiert. Dieses Experiment wurde mit drei voneinander unabhängigen Ansätzen durchgeführt, jedoch lässt sich in der vergleichenden Analyse kein signifikanter Unterschied im Apoptoseverhalten zwischen den Kontrollzellen und den mit CABY-spezifischer siRNA stabil transfizierten K562 Zellen erkennen. Alle Zellpopulationen (sowohl unbehandelt als auch nach UV Bestrahlung) besitzen nach 24 Stunden den gleichen prozentualen Anteil an Zellen mit hypoploiden DNA Gehalt. Mögliche Gründe hierfür wären - neben der Annahme, daß CABY unter diesen spezifischen Bedingungen keine Rolle während der Apoptose spielt - zu einem, daß andere Proteine den Verlust der CABY Expression ausgleichen können und funktionell redundant wirken. Ein potentieller Kandidat hierfür ist das in Kapitel 3.1 beschriebene - zur CABY DUF59 Domäne zu über 90 % identische - homologe ribosomale Protein S28e. In der Western Blot-Analyse (Abbildung 27 B)) lassen sich zusätzlich Proteine mit höherem Molekulargewicht detektieren, so daß die Existenz weiterer Proteine mit CABY homologer Sequenz nicht ausgeschlossen werden kann. Um den Einfluss CABY-homologer Proteine auf das Apoptoseverhalten nachweisen zu können, sollte das gleiche Experiment z.B. mit Ko-Transfektion *S28e* spezifischer siRNA wiederholt werden. Zusätzlich kann man bei diesem Experiment nicht ausschließen, daß CABY einen Einfluss auf die Kinetik des apoptotischen Prozesses ausübt. Dafür sollten

zeitabhängige durchflußzytometrische Untersuchungen (Apoptosekinetiken) durchgeführt werden.

Vergleichende Experimente mit der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie RKO wurden durchgeführt, um die Rolle von CABY während der Apoptose in einem anderen Zelltyp untersuchen zu können. RKO Zellen besitzen den Vorteil, daß sie im Unterschied zu den K562 Suspensionszellen leichter zu transfizieren sind und somit transiente Überexpressionsstudien mit CABY und CABY Deletionsmutanten durchgeführt werden konnten. Abbildung 28 B) stellt das Ergebnis der Nicoletti-Tests tabellarisch dar, die mit CABY transient transfizierten RKO Zellen durchgeführt wurden. Das Auslösen von Apoptose erfolgte mit den im Kapitel 2.4.6 aufgeführten diversen Stimuli. Dabei fällt auf, daß - unabhängig von der Behandlung - sowohl Wildtyp als auch CABY überexprimierende RKO Zellpopulationen nach 24 Stunden bei der durchflußzytometrischen Analyse den gleichen prozentualen Anteil an Zellen mit hypoploiden DNA Gehalt enthalten. Auch bei unbehandelten Zellen kann man einen relativ hohen Anteil an apoptotischen Zellen (10 %) erkennen. Dieses kann darauf zurückgeführt werden, daß die mittels Lipofectamin (Invitrogen) durchgeführte Transfektion per se leicht toxisch wirkt. Der Versuch, in RKO-Zellen durch Serumentzug (0,1% FCS) Apoptose auszulösen, hat nach 24 Stunden zu einem Zellzyklusarrest, aber nicht zu signifikantem Zelltod geführt. Offensichtlich war der Zeitraum dafür zu kurz gewählt worden. Zusammenfassend lässt sich sagen, daß CABY unter den gewählten Bedingungen in K562- und RKO-Zellen bei den verwendeten Apoptosestimuli keinen signifikanten Einfluss auf das Apoptoseausmaß nach 24 Stunden zu nehmen scheint. Anders verhält es sich mit dem in Abbildung 28 D) graphisch dargestellten Ergebnis. Hier wurden mit CABY und CABY-Deletionsmutanten transient transfizierte RKO Zellen dem Wirkstoff Mitomycin C ausgesetzt. Mitomycin C ist ein in der Klinik verwendetes Chemotherapeutikum, das mittels Alkylierung und Quervernetzung der genomischen DNA zur irreversiblen Schädigung führt und somit Apoptose auslöst (Tomasz et al., 1987). Durch die gewählte Darstellung relativer Prozentzahlen an Zellen mit hypoploidem DNA Gehalt kann man beim Vergleich der CABY überexprimierenden mit den Leervektor-transfizierten RKO Zellen einen deutlichen Sensitisierungseffekt gegenüber Mitomycin C-vermittelter Apoptose beobachten.



**Abbildung 28 A):** Kontrolle der Proteinexpression von CABY und CABY-Deletionsmutanten in transient transfizierten RKO Zellen.

**Abbildung 28 B):** Die Überexpression von CABY zeigt 24h nach Induktion mit diversen Stimuli keinen Einfluss auf die Apoptoserate von RKO Zellen. Verwendete Stimuli/ eingesetzte Konzentration: 20 ng/ml TRAIL + 0, 1µg/ml Cycloheximid, 20 ng/ml FLAG-FasL + 1 µg/ml anti-FLAG Antikörper + 0, 1µg/ml Cycloheximid, 500 ng/ml Staurosporin, UV: 80 mJ/cm<sup>2</sup> (Stratalinker, Stratagene)

**Abbildung 28 C):** Propidiumiodid-Zellzyklusprofile von Wildtyp und CABY-überexprimierenden Zellen, unbehandelt oder mit Mitomycin C (4µg/ml, 24 h) inkubiert. Die Quantifizierung von Apoptose erfolgte über den Nicoletti Test und der Ermittlung der relativen Zellzahl innerhalb des subG1 Peaks.

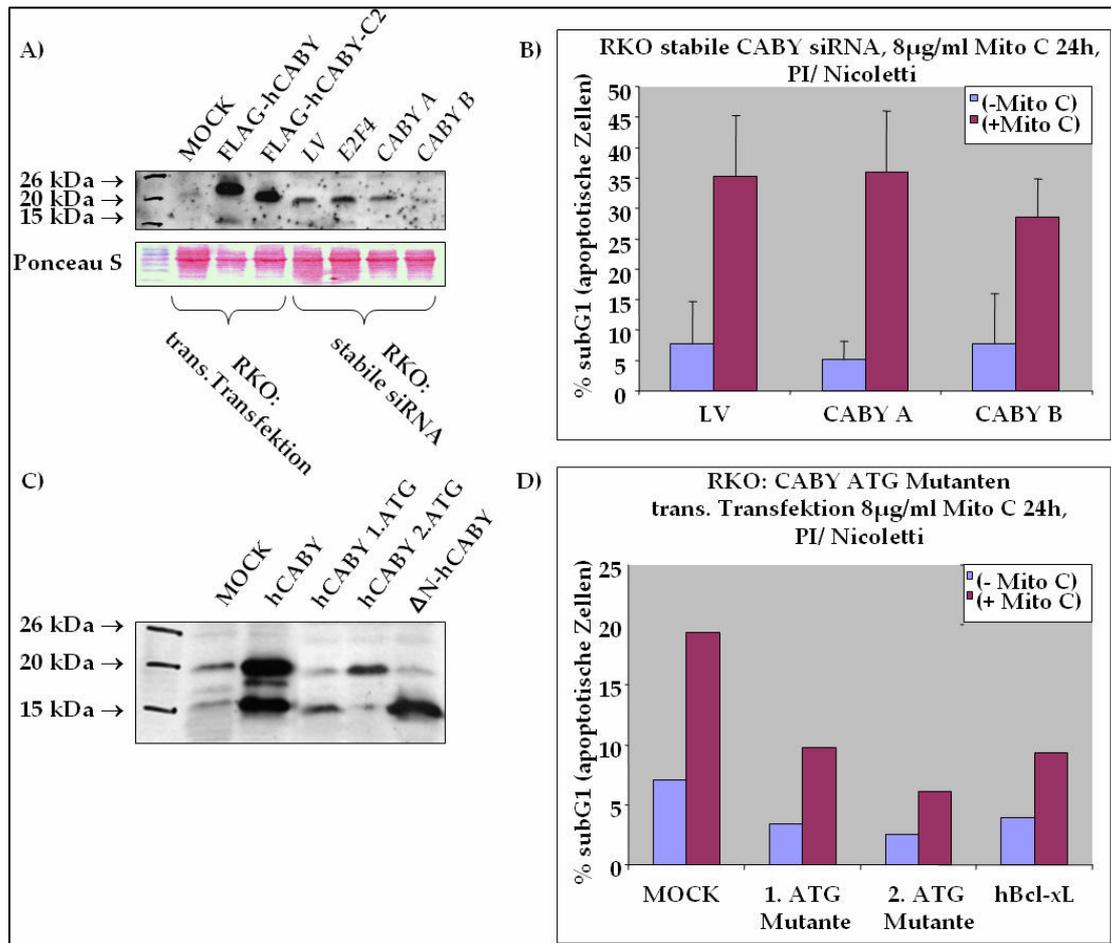
**Abbildung 28 D):** Die Überexpression von CABY bewirkt bei Mitomycin C-induzierter Apoptose einen deutlichen Sensitisierungseffekt in RKO Zellen. Die N- wie auch C-terminalen CABY Deletionsmutanten (ΔN-CABY und CABY-C2) führen zur Inhibition der Mitomycin C-vermittelten Apoptose. Die relative Quantifizierung der prozentualen Menge an apoptotischen Zellen (subG1) nach Mitomycin C Behandlung (4µg/ml, 24h) wird folgendermaßen berechnet: Zunächst wird der Anteil an subdiploiden Zellen innerhalb der verschiedenen Proben getrennt gemessen. Der bei Mock transfizierten Zellen erfasste Wert wird dabei standardmäßig gleich eins gesetzt. Anhand dessen werden anschließend die Werte der anderen Proben umgerechnet und somit vergleichbar.

Die in Abbildung 28 C) gezeigten Zellzyklus-Profile belegen exemplarisch diesen signifikanten Unterschied. Interessanterweise kann man bei Überexpression der C-terminal deletierten CABY Mutante (CABY-C2) eine Inhibition der Mitomycin C-vermittelten Apoptose beobachten, so daß angenommen werden kann, daß die letzten 21 Aminosäuren für die pro-apoptotische Effektorfunktion von CABY unter diesen Bedingungen eine große Rolle spielen. Auch die Überexpression des N-

terminal um 32 Aminosäuren kürzeren CABY Proteins ( $\Delta N$ -CABY) bewirkt eine deutliche Reduktion des Anteils an Zellen mit subdiploiden DNA Gehalt. Diese Mutante entspricht der CABYs Isoform, da hier bei der Klonierung nur das in der CABY cDNA Sequenz *in silico* identifizierte potentielle zweite Startkodon verwendet wurde (siehe Kapitel 3.1). Die Kontrolle mit überexprimiertem anti-apoptotischen Bcl-X<sub>L</sub> Protein zeigt erwartungsgemäß eine deutliche Inhibition der Apoptose.

Western Blot Analysen mit anti CABY polyklonalem Antiserum (Abbildung 28 A)) dienten der Kontrolle der Proteinexpression und lassen sowohl bei der mit CABY als auch bei der mit  $\Delta N$ -CABY transient transfizierten RKO Zellen ein gleiches Signal im Bereich von 15 kDa erkennen. Dies ist ein weiterer Beleg für die Existenz der alternativ translatierten CABYs Isoform. Da CABY-Proteine eine homophile Interaktion eingehen können (siehe Kapitel 3.5), lässt sich aus diesen Experimenten annehmen, daß die hier verwendeten CABY-Mutanten bei Überexpression bei Mitomycin C-induzierter Apoptose dominant negativ agieren.

Wie oben schon erwähnt wurde, sind auch CABY siRNA stabil exprimierende RKO Zellen generiert worden. Hierbei sollte untersucht werden, ob die fehlende CABY Expression bei Mitomycin C Behandlung - analog zur Überexpression der Dominant Negativen CABY Mutanten - zur Inhibition von Apoptose führt. Die in Abbildung 29 A) dargestellte Western Blot-Analyse diente der Kontrolle der CABY-Proteinexpression in Zelllysaten von entweder Wildtyp, CABY überexprimierenden oder CABY Knock-down RKO Zellen. Dabei fällt auf, daß im Unterschied zu den mit den gleichen siRNA Sequenzen stabil transfizierten K562 Zellen, CABY B siRNA effizienteres Abschalten der Expression endogener CABY Proteinmengen in RKO Zellen bewirkt als die CABY A-Sequenz. Mit Hilfe der PonceauS-Anfärbung der Membran wurde sichergestellt, daß überall die gleichen Gesamtproteinmengen aufgetragen wurden und somit die Proben untereinander vergleichbar waren. Abbildung 29 B) stellt das Ergebnis der Nicoletti Tests tabellarisch dar, die mit CABY siRNA stabil transfizierten RKO Zellen durchgeführt wurden. Das Auslösen von Apoptose erfolgte wie in den Experimenten zuvor durch Zugabe von Mitomycin C, allerdings wurden die Zellen 24 Stunden vor Fixierung mit einer doppelt so hohen Konzentration (8µg/ml) behandelt.

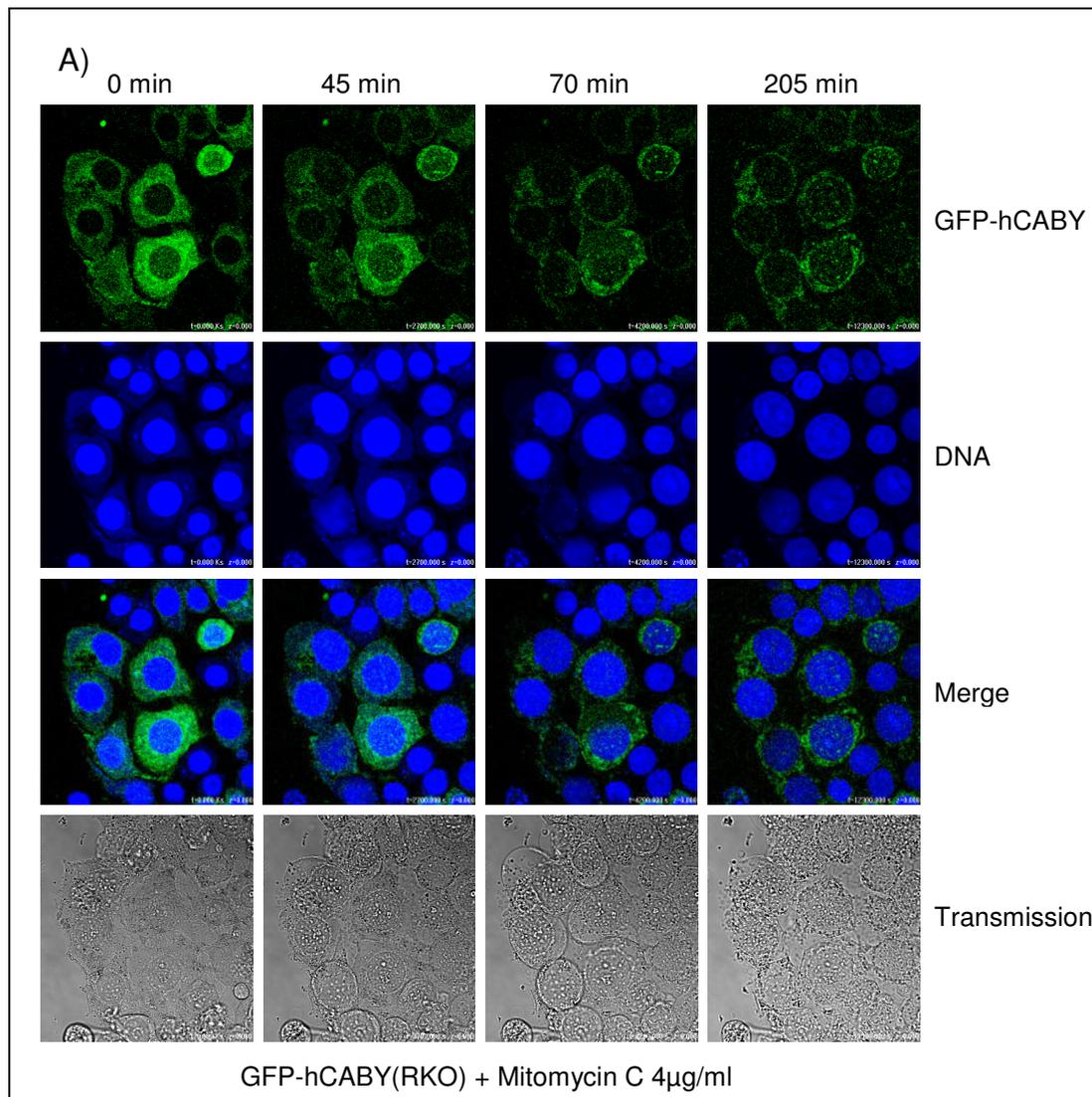


Wie bei den K562 Zellen scheint auch hier der Verlust von endogener CABY Expression einen nur geringen Einfluss auf das Apoptoseverhalten der RKO Zellen nach Mitomycin C Behandlung auszuüben. Sowohl bei Mitomycin C-behandelten wie auch bei unbehandelten Zellen lässt sich zwischen den mit Leervektor (oder mit der in RKO-Zellen nicht funktionalen CABY A siRNA Sequenz) transfizierten Zellpopulationen im Vergleich zum CABY Knock Down (CABY B) ein kleiner, aber statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Menge an apoptotischen Zellen erkennen. Dieses Experiment liefert somit einen weiteren Hinweis dafür, daß in humanen Zellen andere Proteine den Verlust der CABY Expression ausgleichen und funktionell redundant wirken können.

Um untersuchen zu können, welche CABY Isoformen bei der Sensitisierung gegenüber Mitomycin C-vermittelter Apoptose eine Rolle spielen, wurden in die beiden alternativen Translations-Initiationsregionen innerhalb der CABY cDNA Punktmutationen eingeführt, die jeweils durch einen Met→Ala-Aminosäureaustausch ein ATG zerstören (siehe Kapitel 2.3.2). Die Western Blot Analyse von CABY Punkt- und Deletionsmutanten (Abbildung 29 C) belegt, daß die beiden alternativen Translations-Initiationsregionen innerhalb der CABY cDNA die Expression der beiden detektierbaren CABY Isoformen bewirken. Wie zu erwarten gewesen wäre, führt die Mutation innerhalb der zweiten Startkodons - nach transienter Transfektion der RKO Zellen - nur noch zur Überexpression der CABY<sub>L</sub> Isoform. Das Inaktivieren des ersten ATG innerhalb der CABY cDNA resultiert - analog zum N-terminal deletierten ΔN-CABY Konstrukt - ausschließlich zur Expression der verkürzten CABY<sub>s</sub> Isoform. Abbildung 29 D) stellt das Ergebnis der durchgeführten Nicoletti Tests graphisch dar, die mit CABY Mutanten transient transfizierten RKO Zellen erhalten wurden. Zusammenfassend lässt sich sagen, daß unabhängig davon, welche Translations-Initiationsregionen innerhalb der CABY cDNA inaktivierend mutiert wurden, die Expression von nur einer CABY Isoform zur verstärkten Reduktion der Apoptoserate Mitomycin C-behandelter RKO Zellen führt. Das Experiment mit der 1. ATG CABY Mutante bestätigt die Beobachtung aus den Versuchen zuvor mit der ΔN-CABY Mutante. Beide Konstrukte (1.ATG Mutante und ΔN-CABY) führen zur Überexpression der CABY<sub>s</sub> Isoform, die Mitomycin C induzierte Apoptose inhibiert. Jedoch ist erstaunlich, daß derselbe Effekt auch bei Überexpression der CABY<sub>L</sub> Isoform (2. ATG Mutante) zu beobachten ist. Anzumerken hierbei wäre, daß dieses Experiment nur einmal durchgeführt wurde. Es ist wahrscheinlich, daß die eingeführte Punktmutation, die eine Met→Ala-Aminosäureaustausch zur Folge hat, die Proteinstruktur der CABY<sub>L</sub> Isoform und somit ihre Funktionalität beeinträchtigen und letztlich zur Expression einer dominant negativen Mutante führen.

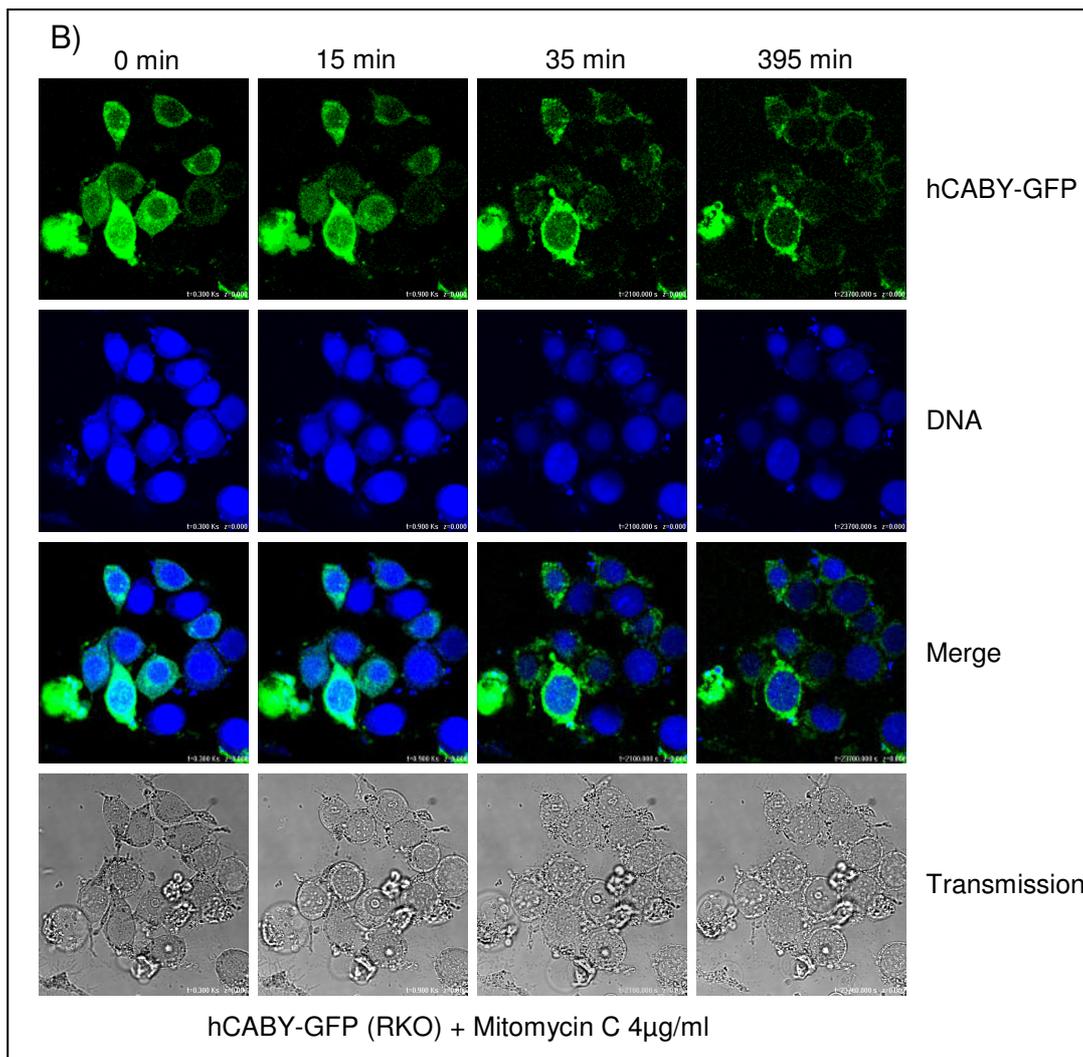
### 3.11 Analyse der CABY-Lokalisation während Mitomycin C-vermittelter Apoptose

CABY stellt mit 160 Aminosäuren ein relativ kleines Protein dar, das passiv in den Zellkern diffundieren könnte. Jedoch zeigen die im Kapitel 3.9 beschriebenen Lokalisationsstudien mit fixierten Zellen, daß CABY sich hauptsächlich im Zytoplasma nachweisen lässt. Unter Umständen wird CABY aktiv aus dem Zellkern gesunder Zellen heraustransportiert. Untersucht werden sollte nun, ob der bei Mitomycin C-Behandlung beobachtete Sensitisierungseffekt durch CABY mit einer Veränderung der Lokalisation des CABY Proteins innerhalb der Zelle einhergeht. Insbesondere sollte auch untersucht werden, ob das *in silico* vorausgesagte N-terminale Signalpeptid einen Einfluss auf die CABY-Lokalisation während der Apoptose ausübt. N-terminale Signalpeptide ermöglichen einem Protein während seines Translationsprozesses das Eindringen in das rauhe Endoplasmatische Reticulum, in dem die Signalsequenz dann abgetrennt wird; Proteine mit Signalpeptid sind in der Regel membranständig oder zur Sezernierung bestimmt. RKO Zellen wurden mit GFP („green fluorescent protein“)-fusionierten CABY Konstrukten transient transfiziert und mit Mitomycin C behandelt. Anschließend wurden mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskopes Lebendaufnahmen gespeichert (Kapitel 2.12.11). Um aufgrund der alternativen Translationsinitiation der CABY cDNA potentiell isoformspezifische Translokationen unterscheiden zu können, wurden die Zellen in separaten Ansätzen einmal mit N-terminal fusioniertem CABY - um spezifisch das Lokalisationsverhalten der CABY<sub>L</sub> Isoform untersuchen zu können - und ein zweitesmal mit C-terminal fusioniertem CABY - was die gleichzeitige Detektion beider Isoformen erlaubt - transfiziert.



**Abbildung 30 A):** Lebendaufnahmen von transient transfizierten RKO Zellen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop zur Analyse der Lokalisation von N-terminal mit GFP fusioniertem CABY nach Mitomycin C-Zugabe (4µg/ml; 0 min = 0 Minuten nach Mitomycin C-Zugabe).

Die Abbildungen 30 A) und B) zeigen jeweils vier Momentaufnahmen vor und nach der Mitomycin C-Zugabe zu RKO Zellen, die CABY-GFP-Fusionsproteine exprimieren. Beim Vergleich der subzellulären Lokalisation beider CABY Isoformen lässt sich jedoch kein Unterschied erkennen. Während der Apoptose sieht man im Durchlichtbild, daß sich die Zellen abrunden, der zytoplasmatische Raum stark einengt wird und daß die Granularität der Zellkörper zunimmt. Aufgrund von Fluoreszenzausbleicheffekten konnte die Analyse der subzellulären Lokalisation der CABY-GFP Fusionsproteine nicht über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden.



**Abbildung 30 B):** Analyse der Lokalisation von C-terminal mit GFP fusioniertem CABY in RKO Zellen nach Mitomycin C-Zugabe (4µg/ml; 0 min = 0 Minuten nach Mitomycin C-Zugabe).

Da sich der Einfluss des fusionierten GFP-Anteils auf das Verhalten von CABY nicht abschätzen lässt, sollten zur Kontrolle der Funktionalität Nicolettitest-Analysen mit GFP-CABY/ CABY-GFP transient transfizierten RKO Zellen durchgeführt werden, um überprüfen zu können, ob der gleiche Sensitisierungseffekt bei Mitomycin C Behandlung zu beobachten ist. Für Lokalisationsstudien für die CABYs Isoform sollten dieselben Experimente mit Zellen wiederholt werden, die ein  $\Delta$ N-CABY-GFP Fusionsprotein überexprimieren.

## **IV. Diskussion**

Apoptose oder programmierter Zelltod ist ein wichtiger physiologischer Prozeß, der der Beseitigung unerwünschter und gefährlicher Zellen dient. Die zentrale Schaltstelle vieler verschiedener apoptotischer Signale sind die Mitochondrien. Sie integrieren zelluläre Stresssignale, die z.B. durch Zytostatika, Hitzeschock, Bestrahlung oder durch den Entzug von Wachstumsfaktoren hervorgerufene Schädigungen der Zelle ausgelöst werden. Es kommt zu einer Freisetzung einer Vielzahl von Protein aus dem mitochondrialen Intermembranraum, die in das Zytoplasma translozieren und für die Induktion der intrinsischen Apoptose-Signalkaskade wichtig sind. Cytochrom-c (Cyt-c), ein wichtiger Bestandteil der mitochondrialen Elektronentransportkette, initiiert nach Verlassen der Mitochondrien die Formierung des so genannten Apoptosomkomplexes. Cyt-c interagiert mit dem Adapterprotein APAF-1 („apoptotic protease activating factor 1“) und induziert durch Bindung an die C-terminalen WD-40 Domänen des inaktiven APAF-1 Monomers eine Konformationsänderung (Liu et al., 1996). Unter ATP Hydrolyse oligomerisieren Caspase-9 und APAF-1 zu dem ca. 700 kDa großen Apoptosomkomplex. Dabei wird die Rekrutierung von Pro-Caspase-9 durch die Bindung der N-terminalen CARD Domänen („caspase recruiting domain“) von APAF-1 und Caspase-9 vermittelt. Im Apoptosom kommt es anschließend zur Autoaktivierung der Initiator-Caspase-9 und zur proteolytischen Aktivierung der Effektor-Caspase-3, welche dann durch die Spaltung vieler zellulärer Substrate zur Exekution von Apoptose führt [ (Zou et al., 1997), (Li et al., 1997)]. Dieser Signalübertragungsweg kann jedoch auch durch die Rekrutierung von XIAP in das Apoptosom negativ reguliert werden, da sowohl die Initiatorcaspase-9 nach vorangegangener proteolytischer Aktivierung wie auch das aktive Zentrum der Effektorcaspase-3 durch Bindung von XIAP inhibiert werden (Srinivasula et al., 2001).

Die zentrale Bedeutung der Apoptosom-induzierten Caspase-Aktivierung lässt sich an Mäusen ohne funktionellem APAF-1 (*APAF-1* Knock-Out Mäuse) demonstrieren. Diese Tiere sterben am Tag 16 der Embryonalentwicklung und zeigen – genauso wie *caspase-9*<sup>-/-</sup> defiziente Mäusen – schwere Defekte bei der Gehirn- und

Schädelentwicklung [ (Kuida et al., 1998), (Cecconi et al., 1998)]. Bis vor kurzem wurden die meisten Untersuchungen zum Apoptosom-Aufbau und -Funktion *in vitro* mit rekombinanten oder aufgereinigten Proteinen durchgeführt, die jedoch nur zu einem Teil den Aufbau des nativen Apoptosom *in vivo* widerspiegeln. Neue Bemühungen haben zur Identifikation einiger regulatorischer Faktoren geführt, die die Anordnung und Aktivität des Apoptosoms modulieren (siehe Kapitel 1.7). Aufgrund dessen haben wir mit Hilfe von Hefe-Two-Hybrid Screenings nach neuen APAF-1 Interaktionspartnern gesucht. Dabei wurde ein neues, bisher noch nicht charakterisiertes Protein entdeckt, das von uns CABY („CED-4 and APAF-1 binding protein found in yeast“) genannt wird.

Ziel dieser Arbeit war neben den Untersuchungen zur Interaktion von CABY und APAF-1 auch die Durchführung funktioneller Analysen, um eine Beteiligung von CABY an der Bildung bzw. Aktivierung des Apoptosomkomplexes und damit die Bedeutung von CABY für den intrinsischen mitochondrialen Apoptose-Signalübertragungsweg ermitteln zu können. Ein weiterer Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit war die Analyse endogener CABY Expressionsmengen in humanen Tumoren. Änderungen in Expressionsmengen und/oder in der Funktion können zu Störungen der normalen Apoptosom-Bildung und -Funktion führen, die zur Tumorentwicklung und zur Resistenz der Tumorzellen gegenüber Chemo- und Strahlentherapie beitragen (siehe Kapitel 1.9).

### 4.1 CABY Isoformen

Die genaue Analyse der humanen cDNA Datenbank führte zur Identifikation von vier verschiedenen alternativ gesplitten CABY mRNA Isoformen, die aus unterschiedlichen Geweben kloniert wurden, was auf eine gewebstypsspezifische Expression und Funktion hinweisen könnte (Abbildung 8 A/B). Die Sekundärstrukturanalyse der Isoformen A und B ergab, daß beide Isoformen am N-Terminus ein potentiell Signalpeptid enthalten, gefolgt von der so genannten DUF59 Domäne („domain of unknown function“), der bisher noch keine Funktion zugewiesen werden konnte (Abbildung 7 C). Um auf eine mögliche Funktionsweise

von CABY schließen zu können, wurde in einer zusätzlichen Datenbankrecherche nach anderen funktionell charakterisierten Proteinen gesucht, die auch diese DUF59 Domäne enthalten. Mit Hilfe der SYSTERS Datenbank (Abbildung 31) konnten diese Proteine in funktionelle Gruppen eingeteilt werden. Dabei fällt auf, daß alle die DUF59 Domäne enthaltenden Proteinfamilien enzymatische Aktivitäten aufweisen, die an unterschiedlichen Stoffwechselwegen wie z.B. dem Phenylacetat Katabolismus oder der Schwefel-Kluster Biosynthese beteiligt sind. Die meisten Familienmitglieder jedoch sind in der Gruppe der ATP-bindenden Proteine zu finden. Dieses erscheint im Hinblick auf die durch Bindungsstudien gewonnenen Erkenntnisse für die Funktion von CABY ein wichtiger Hinweis zu sein, da CABY in der Nähe der NOD („nucleotide binding and oligomerisation domain“) an Apaf-1 bindet (siehe Kapitel 3.5). Eine mögliche Funktion von CABY könnte sein, als Nukleotid Austausch Faktor für die Apoptosom Bildung zu fungieren. Neueste *in vitro* Ergebnisse von Wang und Kollegen unterstreichen die Bedeutung dieses Prozesses, da die NOD Domäne von APAF-1 eine ATPase Aktivität besitzt und der Nukleotid-Austausch zusammen mit der Bindung von Cyt-c für die Apoptosomkomplex-Bildung und -Stabilisierung essentiell sind (Kim et al., 2005).

### 5 SYSTERS Protein Families Found for Pfam Domain DUF59.

- (SF 112028) 141 ATP binding protein - like (ATP binding protein-like) Hypothetical P-loop containing nucleotide triphosphate hydrolases structure containing protein Nucleotide-binding protein 20
- (SF 118374 ) 10 YITW protein (RING-oxidation complex protein 3 in the phenylacetic acid catabolism pathway) Putative phenylacetic acid degradation protein PaaD
- (SF 116263) 117 Probable serine acetyltransferase Serine acetyltransferase, plasmid (SAT)
- (SF 92060) 1 Predicted metal-sulfur cluster biosynthetic enzyme (MinD N-terminal domain family)
- (SF 130213) 31 Hypothetical protein

**Abbildung 31:** Funktionelle Gruppierung von Proteinfamilien, deren Mitglieder DUF59 Domänen enthalten (SYSTERS).

Interessanterweise enthalten zwei CABY mRNA Varianten keine DUF59 Domäne, da sie nur für sehr kurze CABY Peptid-Fragmente (69 aa bzw. 39 aa) kodieren. Bei der C-terminal verkürzten CABY Isoform B wird sie nur partiell exprimiert. Neben dem alternativen Splicing Mechanismus der CABY mRNA ließen sich innerhalb der CABY cDNA zwei Translations-Initiationsregionen - so genannte KOZAK-

Sequenzen - voraussagen, so daß gleichzeitig neben dem 160 aa langen „full length“ CABY<sub>L</sub> (long) Protein eine weitere 128 aa große CABY Isoform (CABY<sub>s</sub> (short)) exprimiert wird (Abbildung 9). Mit einem spezifischen anti CABY Antiserum konnte in Western Blot Experimenten festgestellt werden, daß unterschiedliche endogene Expressionsmengen an CABY in diversen Maus- und humanen Zelllinien vorhanden sind. In den meisten Fällen lassen sich die oben genannten CABY<sub>L/S</sub> Isoformen detektieren, wobei sich in einigen Zelllinien eine dritte CABY Isoform nachweisen lässt, deren Länge zwischen der von CABY<sub>L</sub> und CABY<sub>s</sub> liegt (Abbildung 12 A/B). Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um eine der in den cDNA Datenbanken hinterlegten alternativen Splice-Varianten der CABY mRNA. Infolgedessen ist zu erwarten, daß die resultierenden CABY-Proteinisoformen unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Möglicherweise kann die Funktion von CABY durch eine Wechselwirkung vieler unterschiedlicher Versionen des Proteins reguliert werden. Einige von ihnen dienen vielleicht als dominant negative Proteine, die die Funktion der APAF-1 bindenden CABY Isoformen behindern. Jedoch ist bis jetzt noch unklar, ob alle alternativ gesplittenen Varianten, die in den Datenbanken zu finden sind, tatsächlich als mRNA existieren, oder ob es sich hierbei um potentielle Klonierungsartefakte handelt. Außerdem ist zurzeit nicht bekannt, ob alle CABY-Transkripte in Protein translatiert werden und unter welchen Bedingungen diese exprimiert werden. Weiterhin fällt auf, daß sämtliche CABY-Isoformen bei der Western Blot- Analyse ein größeres Molekulargewicht aufweisen als rechnerisch vorauszusagen wäre. Dieses könnte entweder durch post-translationale Modifikation oder durch nur partiell denaturiertes CABY Protein während der SDS-PAGE erklärt werden.

### 4.2 Analyse der CABY-Bindung unter nicht apoptotischen Bedingungen

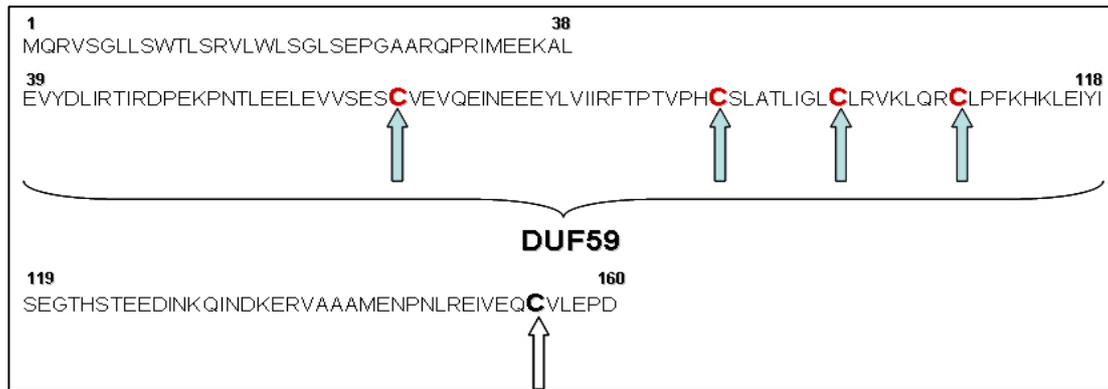
Die im Hefe-Two-Hybrid Screen identifizierte Bindung von APAF-1 an CABY konnte auch *in vitro* und *in vivo* in Lysaten nachgewiesen werden, die von nicht apoptotischen Zellen gewonnen wurden. Beim Kartieren der Interaktionsdomäne für CABY konnten die Aminosäuren 412-420 des zentralen APAF-1 Linkerbereiches als verantwortliches Bindungsmotiv identifiziert werden. Erstaunlicherweise ist *in vitro*

mit der CARD-Domäne eine zweite Interaktionsregion für CABY im APAF-1 Molekül nachzuweisen. CABY bindet *in vitro* auch an Caspase-9 (Abbildung 18 A/B). Höchst wahrscheinlich ist auch hier die CARD Domäne innerhalb der N-terminalen Prodomäne von Caspase-9 für die Interaktion mit CABY verantwortlich. Dieses erscheint jedoch kein generelles Bindungsmotiv für CABY zu sein, da in vorherigen CABY-Bindungsstudien andere CARD-Domänen-enthaltende Proteine (u.a. Pycard, Kirsten Völp, unveröffentlichte Daten) negativ getestet wurden. Um jedoch die Spezifität der Interaktion von CABY mit Caspase-9 weiter zu klären, sollten in Zukunft Bindungsstudien mit anderen Caspasen (z.B. Caspase-2) durchgeführt werden. Auch sollte erstmal die Interaktion von CABY mit Caspase-9 *in vivo* durch Ko-Immünpräzipitationsexperimente bestätigt werden (Abbildung 20 A-C). Da CABY sowohl an APAF-1 als auch an Caspase-9 in *in vitro* Experimenten bindet, lag die Vermutung sehr nahe, daß CABY - auch unter nicht apoptotischen Bedingungen - als Adapterprotein fungiert und die Bildung eines ternären Komplexes moduliert. Erstaunlicherweise jedoch stellte sich heraus, daß sogar die C-terminale APAF-1 Mutante (C-APAF) *in vitro* an einer Komplexbildung mit CABY und Caspase-9 beteiligt zu sein scheint. Diese wird durch Caspase-9 vermittelt, da CABY selbst nicht mit der WD-40 Domäne von APAF-1 *in vitro* interagiert (Abbildung 19). Zwar ist bekannt, daß Caspase-9 und APAF-1 über ihre N-terminalen CARD Domänen aneinander binden können (Qin et al., 1999), jedoch wurde die Beobachtung, daß auch der C-Terminus von APAF-1 Caspase-9 rekrutieren kann, ist bisher nicht in der Literatur beschrieben. Mehrere Gründe sind dafür möglich: Zum einen sind diese Experimente im Gegensatz zu den bereits publizierten Versuchen unter nicht zur Apoptosombildung stimulierenden Bedingungen, d.h. ohne Zugabe von Cyt-c und dATP, durchgeführt worden. Zum anderen können Bedingungen in diesem *in vitro* Experiment vorgelegen haben, die zu einer artifiziellen Bindung führten. Generell kann aber auch ein zweites Caspase-9 Interaktionsmotiv im APAF-1 Protein nicht ausgeschlossen werden.

*In vivo* Ko-Immünpräzipitationsexperimente zeigen, daß nicht nur die „full length“ Isoform von APAF-1 (ca. 130 kDa) an der Bindung von CABY beteiligt ist. In der anschließenden Western Blot-Analyse wird auch das Signal einer verkürzten ca. 84 kDa großen APAF-1 Variante erkennbar (Abbildung 21 A/B). Lauber und Kollegen

beschreiben dieses APAF-1 Fragment als ein Resultat Caspase-abhängiger Prozessierung nach apoptotischer Stimulierung der Zellen, die zur Freisetzung von Caspase-9 aus dem Apoptosomkomplex führt (Lauber et al., 2001). Inwiefern jedoch diese APAF-1 Isoform auch unter nicht apoptotischen Bedingungen generiert wird und welche Rolle CABY bei der Caspase-9-vermittelten Spaltung von APAF-1 unabhängig von der Apoptosombildung spielt, wird in zukünftigen Experimenten zu klären sein.

Im Gegensatz zu den gezeigten *in vitro* Experimenten lässt sich eine spezifische Interaktion *in vivo* nur zwischen APAF-1 und CABY nachweisen, jedoch nicht zwischen CABY und Caspase-9 bzw. Caspase-9 und APAF-1 (Abbildung 22). Dieses kann mehrere Gründe haben: Zum einem wurden die Experimente mit Zelllysaten durchgeführt, die von nicht apoptotischen Zellen stammten. So ist bekannt, daß die Bindung von Cyt-c und dATP an APAF-1 eine Voraussetzung für die Rekrutierung von Caspase-9 in den Apoptosomkomplex darstellt (Kim et al., 2005). Möglich wäre auch, daß die kleinere CABY-bindende APAF-1 Isoform - als potentiell dominierender Bindungspartner für CABY unter nicht apoptotischen Bedingungen - wegen der fehlenden N-terminalen CARD Domäne Caspase-9 nicht rekrutieren kann (Lauber et al., 2001). CABY selbst jedoch könnte mit der in dieser APAF-1 Isoform vorhandenen Linkerdomäne interagieren und seinerseits Caspase-9 rekrutieren. Endogene Caspase-9 lässt sich *in vivo* nicht mit CABY ko-immunpräzipitieren. Grund dafür könnte sein, daß der eingesetzte monoklonale anti-Caspase-9 Antikörper an die N-terminale CARD Domäne von Caspase-9 bindet und somit eine Interaktion mit CABY verhindert. Ein weiterer Grund könnte in der die geringen endogenen Proteinmengen bestehen, denn überexprimierte Caspase-9 und CABY koloalisieren im Zytoplasma der Zelle, was darauf hinweist, daß beide Proteine intrazellulär auch unter nicht apoptotischen Bedingungen in einem gemeinsamen Komplex vorliegen könnten.



**Abbildung 32:** Intermolekulare Cystein-Disulfidbrückenbindungen vermitteln möglicherweise die Ausbildung von CABY-Dimeren. Die vier potentiell verantwortlichen Cysteine sind rot dargestellt und befinden sich innerhalb der DUF59 Domäne. Das Cystein auf Position 155 (schwarz) wird dafür nicht benötigt, da die C-terminal deletierte CABY-C2 Mutante (aa 1-139) unter reduzierenden Bedingungen weiterhin Homodimere ausbilden kann (Abb.12 C).

Unter reduzierenden Bedingungen entstehen in den Zelllysaten CABY Homodimere und zwar auch dann, wenn die C-terminalen 21 aa im CABY-Protein fehlen (Abbildung 12 C). Die Vermutung liegt nahe, daß die in der CABY Proteinsequenz innerhalb der DUF59 Domäne befindlichen Cysteine in der Lage sind, intermolekulare Disulfidbrücken-Bindungen auszubilden. Um dieses bestätigen zu können, müssten die Cysteine im CABY Protein durch Punktmutationen innerhalb der CABY cDNA Sequenz ausgetauscht werden. Die Cysteine könnten zusätzlich bei intramolekularen Wechselwirkungen an der räumlichen Faltung und Stabilität des CABY Proteins beteiligt sein.

### 4.3 Die Rolle von CABY bei der Bildung des Apoptosoms

Endogene CABY Proteinmengen können in Lysaten nicht-apoptotischer Zellen mittels Gelfiltrationschromatographie in bis zu ca. 700 kDa großen Komplexen nachgewiesen werden (Abbildung 23). Abhängig von der Größe der Proteinkomplexe liegen die verschiedenen Isoformen des CABY Proteins getrennt vor. Kleinere Proteinkomplexe bis zu einer Größe von ca. 200 kDa enthalten die kleinere CABYs Isoform, während die 230 kDa bis zu 700 kDa großen Komplexe ausschließlich die größere CABY<sub>L</sub> Isoform aufweisen. Bei Proteinkomplexen identischen Molekulargewichtes (100 - 200 kDa) ist ein so genanntes „Laddering“ erkennbar, daß auf eine Koexistenz aller CABY Isoformen hindeutet.

Interessanterweise lassen sich gleichzeitig in diesen Fraktionen auch endogene Mengen an APAF-1 und Caspase-9 detektieren. Um jedoch analysieren zu können, ob alle Proteine sich in dem gleichen Proteinkomplex befinden, sollten in Zukunft separate APAF-1, Caspase-9 und CABY Immunpräzipitationsexperimente mit den einzelnen Fraktionen durchgeführt werden. Bei der sich anschließenden Western Blot Analyse mit anti-APAF-1, anti-Caspase-9 und zusätzlich anti-CABY spezifischen Antikörpern könnte dann untersucht werden, ob auch in Lysaten von nicht apoptotischen 293T Wildtyp Zellen sich ein ternärer Komplex zwischen diesen drei Proteinen ausbilden kann. Die Gelfiltrationschromatographie mit anschließender Apoptosom-Immunpräzipitation können auch dazu verwendet werden, die Frage zu beantworten, ob sich CABY auch im ausgebildeten Apoptosomkomplex befindet. Die Induktion der APAF-1-Oligomerisierung mit anschließender Apoptosomkomplexbildung *in vitro* wird durch Zugabe exogener Mengen an rekombinantem Cyt-c und dATP zu den Zelllysaten erreicht (Li et al., 1997). Interessant zu untersuchen wäre auch, inwiefern CABY an der Regulation der in das Apoptosom rekrutierten Caspase-9 beteiligt ist. Die Caspase-9-Aktivität innerhalb einzelner Fraktionen könnten mittels fluoreszierender Caspase Substrate gemessen werden. Dabei könnten Zelllysate miteinander verglichen werden, denen vorher entweder rekombinant exprimiertes CABY Protein zugegeben oder bei denen mittels einer CABY Immundepletion endogene CABY Proteinmengen entfernt wurden.

### **4.4 CABY interagiert mit APAF-1 im Zytoplasma / CABY-Lokalisation während der Apoptose**

CABY lässt sich sowohl im Zytoplasma als auch in geringen Mengen im Zellkern nachweisen (Abbildung 24). Auch scheint die Verteilung der Lokalisation beider durch alternative Translation-Initiation generierte CABY Proteinisoformen innerhalb der Zelle die gleiche zu sein. Die Möglichkeit der homophilen Interaktion könnte dafür eine Erklärung liefern. Auch kann man bei der Anfärbung im Zellkern einzelne Punkte erkennen, in denen CABY nicht detektiert wird. Da CABY ein relativ kleines Protein darstellt, könnte eine passive Diffusion der Grund für die Lokalisation im Zellkern sein. Jedoch ist die CABY-Anfärbung im Zytoplasma deutlich stärker, so

daß angenommen werden kann, daß CABY aktiv aus dem Zellkern heraustransportiert wird. Jedoch konnten nach *in silico* Analysen keine so genannten NES Sequenzen („nuclear export sequence“) innerhalb der CABY-Proteinsequenz vorausgesagt werden. Die Bereiche der Ko-Lokalisation von CABY und APAF-1 befinden sich ausschließlich im Zytoplasma der Zelle (Abbildung 26 A-C). Beim Vergleich der subzellulären Lokalisation beider CABY Isoformen lässt sich beobachten, daß bei Apoptoseinduktion nach Mitomycin C Zugabe - ähnlich wie bei APAF-1 (Hausmann et al., 2000) - keine Translokation von CABY stattfindet (Abbildung 30 A/B). Daher kann man vermuten, daß der beobachtete Sensitisierungseffekt von CABY gegenüber Apoptose nicht auf einer Veränderung der Lokalisation des CABY Proteins innerhalb der Zelle beruht. Auch das *in silico* vorausgesagte N-terminale Signalpeptid übt keinen Einfluss auf die Lokalisation von CABY während der Apoptose aus. N-terminale Signalpeptide ermöglichen einem Protein während seines Translationsprozesses das Eindringen in das rauhe Endoplasmatische Reticulum, in dem die Leadersequenz abgetrennt wird. Proteine mit diesem Signal werden in der Regel in den sekretorischen Pathway eingeschleust und sind membranständig oder werden sezerniert. Dieses trifft auf CABY nicht zu, so daß daraus geschlossen werden kann, daß CABY entweder für die Apoptoseregulation kein funktionales N-terminales Signalpeptid enthält oder dieses keine Rolle spielt.

#### 4.5 CABY-vermittelte Sensitisierung der Zellen gegenüber Mitomycin C-induzierter Apoptose

Es konnte festgestellt werden, daß bei Überexpression von CABY die Zellen für Mitomycin C-induzierte Apoptose sensitisiert werden (Abbildung 28 D). Interessanterweise lässt sich bei anderen apoptotischen Stimuli - wie die Zugabe von Death Rezeptor Liganden (TRAIL, FasL), Behandlung mit dem Proteinkinaseinhibitor Staurosporin oder UV Bestrahlung - kein Einfluss von CABY auf das Apoptoseverhalten der Zellen erkennen (Abbildung 28 B). Die Überexpression der C-terminal deletierten CABY-Mutante (CABY-C2) wie auch der CABYs Isoform inhibiert jedoch Mitomycin C-induzierte Apoptose. Daraus lässt sich

schließen, daß sowohl der 32 Aminosäure lange N-terminale Bereich der CABY<sub>L</sub> Isoform wie auch die letzten 21 Aminosäuren beider Isoformen für die proapoptotische Effektorfunktion von CABY eine wichtige Rolle spielen. Da CABY-Proteine eine homophile Interaktion eingehen können (siehe Kapitel 3.5), lässt sich aus diesen Experimenten schlussfolgern, daß die hier verwendeten CABY-Mutanten bzw. die CABY<sub>S</sub> Isoform bei Überexpression bei Mitomycin C-induzierter Apoptose einen dominant negativen Einfluss ausüben. Erstaunlicherweise führt auch die Überexpression von jeweils nur einer CABY Isoform alleine zur verstärkten Reduktion der Apoptoserate Mitomycin C behandelter Zellen (Abbildung 29 D). Jedoch kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß die eingeführten Punktmutationen die Proteinstruktur der CABY<sub>L</sub> Isoform und somit ihre Funktionalität deutlich beeinträchtigen.

Die Ergebnisse aus CABY Knock-Down Experimenten lassen vermuten, daß in den verwendeten humanen Zellsystemen Proteine existieren, die zu CABY eine funktionelle Redundanz aufweisen. Anhand unterschiedlicher Zelllinien, die CABY-siRNA stabil exprimieren, konnte festgestellt werden, daß der Verlust endogener CABY-Expression einen geringen Einfluss auf das Apoptoseverhalten nach Mitomycin C-Behandlung ausübt (Abbildung 29 B). Dieser Effekt wird sowohl unabhängig von der Art des eingesetzten apoptotischen Stimulus als auch unabhängig vom Zelltyp beobachtet. Mögliche Gründe hierfür wären zu einem, daß andere Proteine den Verlust der CABY Expression ausgleichen und funktionell redundant wirken können. Möglicherweise übt das putative ribosomale Protein S28e einen kompensatorischen Einfluss aus, da die DUF59 Domänen beider Proteine zu über 90% identisch sind. In Western Blot-Analysen mit CABY spezifischem Antiserum lassen sich zusätzlich Proteine mit höherem Molekulargewicht detektieren, was auf die Existenz von Proteinen mit CABY-homologer Sequenz hinweist (Abbildung 29 A). Um den Einfluss auf das Apoptoseverhalten durch CABY-homologe Proteine nachzuweisen, sollten die gleichen Experimente nach Ko-Transfektion mit S28e spezifischer siRNA wiederholt werden. Zudem kann man nicht ausschließen, daß CABY nur in einem bestimmten Zeitfenster einen Einfluss auf die Kinetik des apoptotischen Prozesses ausübt. Vielleicht spielt CABY zu Beginn bei der Induktion von Apoptose eine Rolle, und eventuell übernehmen andere

homologe Proteine diese Funktion innerhalb eines längeren Zeitraumes (wie 24 Stunden) und kompensieren somit den Verlust von CABY Expression. Dafür sollten zeitabhängige Apoptosequantifizierungen durchgeführt werden.

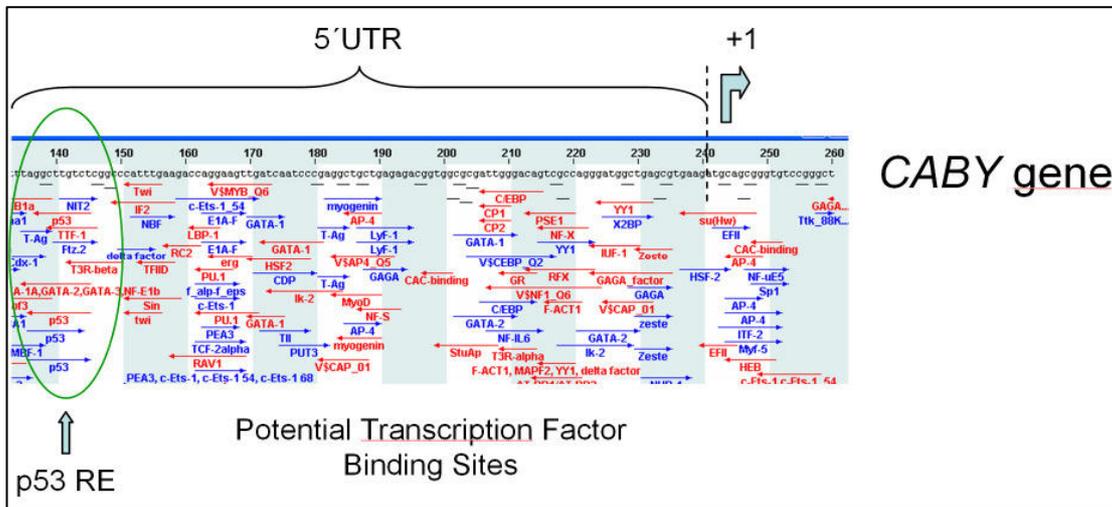


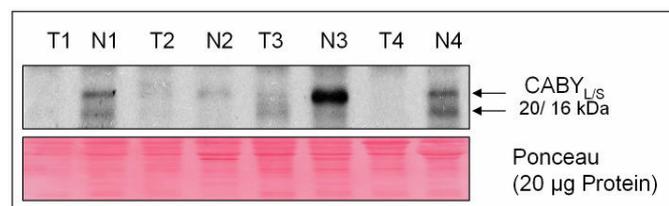
Abbildung 33: Potentielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im 5' untranslatierten Bereich des CABY Gens (TRANSFAC).

Eine mögliche Erklärung dafür, warum CABY nur bei bestimmten Stimuli eine pro-apoptotische Funktion ausübt, wäre, daß CABY durch DNA Schädigungen (z.B. nach Mitomycin C-Behandlung) induziert wird. Einen Hinweis hierfür liefern die mit Hilfe der TRANSFAC Datenbank *in silico* vorausgesagten p53 REs („response element“) im 5' untranslatierten Bereich des CABY Gens (siehe Abbildung 33). Es ist bekannt, daß das Tumorsuppressorprotein p53 nach genotoxischem Stress die Transkription und Expression einiger pro-apoptotischer Gene reguliert (*bax*, *pidd*; (Lin et al., 2000), (Miyashita and Reed, 1995)). Eventuell stellt CABY ein neues p53 Targetgen dar. Denkbar wäre auch, daß es während der Mitomycin C-Behandlung zu aktivierenden posttranslationalen Modifikationen innerhalb des CABY Proteins kommt.

#### 4.6 CABY Expressionslevel in humanen Tumoren / CABY als potentielles Tumorsuppressorprotein

CABY stellt ein potentielles Tumorsuppressorprotein dar, da es unter bestimmten Bedingungen eine pro-apoptotische Funktion in der Zelle ausübt. In Zusammenarbeit mit S. Joos (DKFZ) wurden in einer CGH Datenbank („comparative

genomic hybridization“; die Datenbank enthält CGH-Daten von ungefähr 1800 verschiedenen humanen Tumoren, (Berrar et al., 2001); (Volp et al., 2006)) mit gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) ein Tumortyp identifiziert, bei dem der genomische *CABY* Locus in 44% der Fälle deletiert vorliegt. Mit Hilfe von GIST Tumor Patientenmaterial (K. Zatlökal, Universität Graz) konnten in 30 verschiedenen Proben mittels Real Time PCR Analyse eine im Vergleich zum Normalgewebe siebenfache Herunterregulation der *CABY* mRNA detektiert werden.

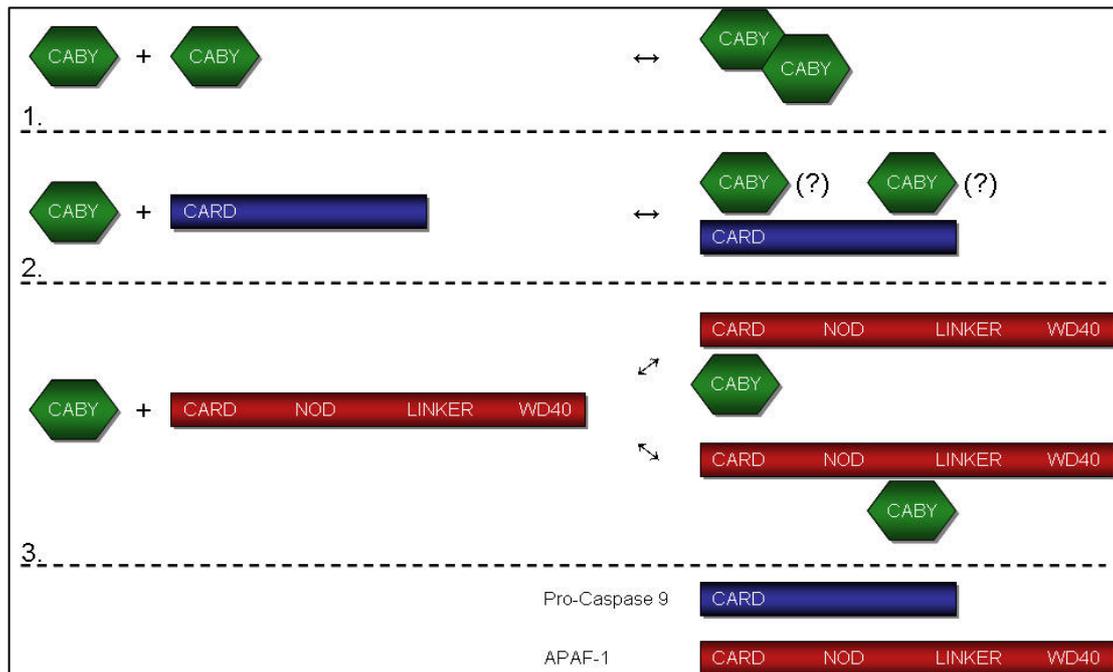


**Abbildung 34:** In humanen GIST Tumoren ist die Expression von *CABY* im Gegensatz zu normalem Gewebe derselben Patienten nicht mehr detektierbar.

Der in Abbildung 34 gezeigte Western Blot mit Gewebeproben von vier verschiedenen Patienten (U. Penzel, Universität Heidelberg) macht zusätzlich deutlich, daß auch auf Proteinebene die endogene Expression von *CABY* in humanen GIST Tumoren im Gegensatz zu normalem Vergleichsgewebe von demselben Patienten nicht mehr nachweisbar ist. Mit den Aussagen dieser Experimente kann nur eine Korrelation, aber kein kausaler Zusammenhang zwischen Tumorentstehung bzw. Progression und Verlust von *CABY* festgestellt werden. Um untersuchen zu können, ob eine verminderte *CABY*-Expression ursächlich an der Tumorentstehung beteiligt ist, müssen *CABY* Knock-Out Mausmodelle etabliert werden. Interessant wäre auch, das Expressionsprofil dominant negativer *CABY*-Isoformen im Normal- bzw. Tumorgewebe zu analysieren. In den zuvor dargestellten Experimenten hat sich zeigen können, daß genau wie das N-terminal verkürzte *CABY*s auch C-terminal deletiertes *CABY* (*CABY*-C2) bei Überexpression anti-apoptotisch wirkt. Eine in der cDNA Datenbank hinterlegte *CABY* mRNA Splice-Variante weist dieselbe Struktur auf (siehe Kapitel 3.1). Entsprechende cDNA Klone dieser *CABY* Isoform wurden aus dem Gebärmutterhals bzw. der Bauchspeicheldrüse kloniert. Möglich wäre, daß Tumoren aus diesem Gewebe eine höhere Expression dieser *CABY*-Variante als selektiven Vorteil nutzen.

## 4.7 Modelmechanismen

Im Folgenden werden die Erkenntnisse aus den *in vitro* und *in vivo* Bindungsstudien mit CABY, die unter nicht-apoptotischen Bedingungen durchgeführt wurden, zusammengefaßt. Abbildung 35 zeigt drei mögliche Szenarien der CABY-Interaktionen:

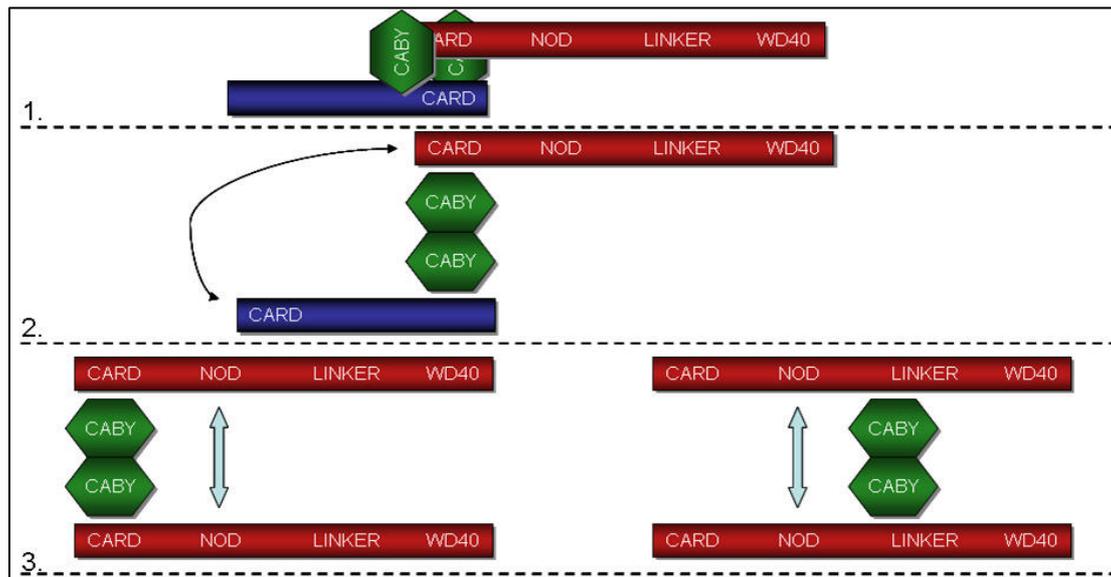


**Abbildung 35:** Schematische Zusammenfassung der beobachteten CABY-Interaktionen.

1. Zunächst können CABY Proteine homophile Interaktionen eingehen, die zur Bildung homodimerer Komplexe führen. Potentiell wird dieses mit Hilfe der in der DUF59 Domäne befindlichen Cysteine vermittelt. Jedoch können höhere Formen der Homo-Oligomerisierung prinzipiell nicht ausgeschlossen werden. Dabei wäre allerdings noch zu klären, unter welchen Bedingungen die CABY Isoformen miteinander interagieren und welche unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften die verschiedenen CABY-Oligomere aufweisen. Die Ergebnisse aus Gelfiltrationsanalysen ergeben, daß die beiden durch alternatives Translatieren der CABY mRNA generierten CABY Isoformen sich getrennt in unterschiedlich großen Proteinkomplexen befinden können.

2. Obwohl bei *in vivo* Ko-Immünpräzipitationsexperimenten keine Interaktion zwischen endogenen Mengen an CABY und Caspase-9 beobachtet wurde, konnten *in vitro* Bindungsstudien eine potentielle Bindung aufzeigen, die durch Immunfluoreszenzanalysen zusätzlich unterstützt wird, da beide Proteine im Zytoplasma der Zelle ko-lokalisieren. Allerdings sind die für die Interaktion mit CABY verantwortlichen Epitope innerhalb von Caspase-9 noch nicht bekannt bzw. kann es natürlich sein, daß im postuliertem Prä-Apoptosomkomplex, sowohl CABY als auch Caspase-9 unabhängig voneinander an APAF-1 binden und deshalb ko-lokalisieren.
3. Im Unterschied dazu konnten zwei Bindungsregionen im APAF-1 Molekül identifiziert werden. Während die Aminosäuren 412-420 in der zentralen Linkerdomäne von APAF-1 als verantwortlicher Interaktionsbereich für CABY genauer eingeschränkt werden konnte, ließ sich auch für die N-terminale APAF-1-CARD-Domäne eine Bindung an CABY aufzeigen. Auch hier sollten die zuständigen Bindungsepitope genauer kartiert und eingeschränkt werden. Außerdem ist zurzeit nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt bzw. unter welchen Bedingungen CABY an beiden Bereichen von APAF-1 bindet. Die Frage, ob dieses gleichzeitig oder alternativ passiert, sowie die genaue Stöchiometrie der Interaktionen bleiben momentan noch ungeklärt.

Aus der Zusammenfassung der beobachteten Interaktionen lässt sich für CABY eine Funktion als Adapterprotein postulieren. Einige verschiedene Variationen der möglichen Zusammensetzung von CABY, APAF-1 und Caspase-9 zu einem ternären Komplex werden in Abbildung 36 dargestellt. In allen Modellen wird vorausgesetzt, daß CABY als dimerer Komplex seine Funktion ausübt.



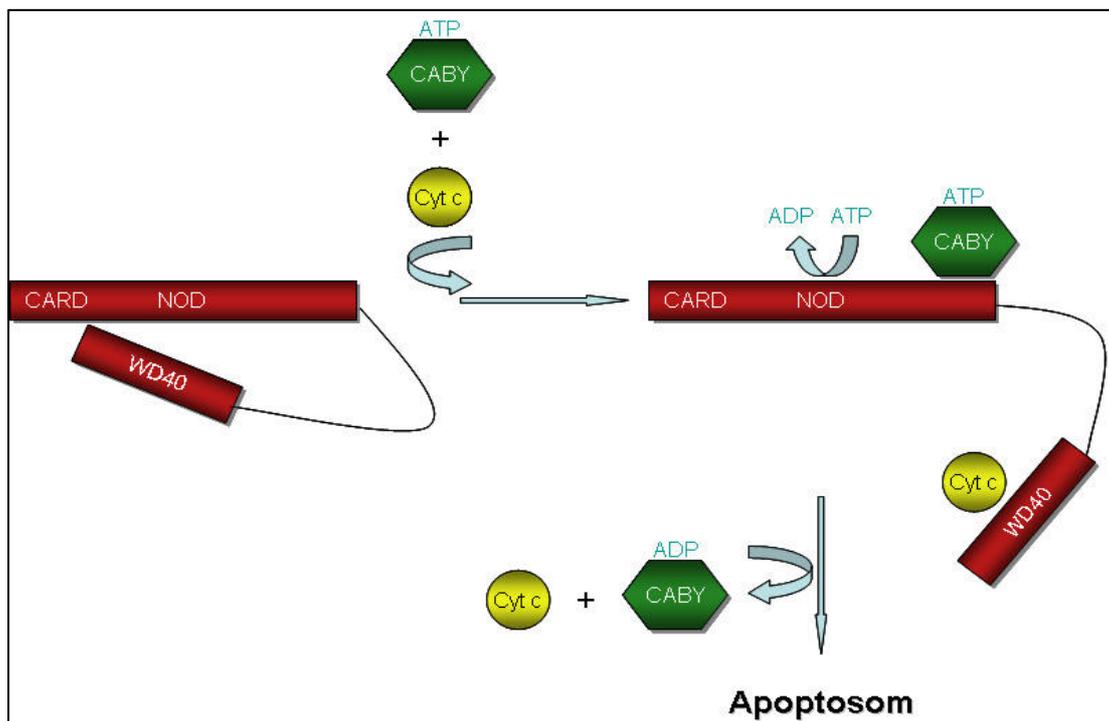
**Abbildung 36:** Verschiedene Variationen der Zusammensetzung eines möglichen Prä-Apoptosom-Komplexes: Unter nicht apoptotischen Bedingungen fungiert CABY potentiell als Adapterprotein für die Multimerisierung von APAF-1 und/ oder dient der Rekrutierung von Caspase-9 an APAF-1.

1. Die Interaktion zwischen den CARD Domänen von Caspase-9 und APAF-1 ist seit längerem schon bekannt (Shiozaki et al., 2002). Vorstellbar wäre, daß CABY in dieser Konstellation als Adapterprotein diesen Komplex durch gleichzeitige Bindung an die CARD Domänen beider Proteine stabilisiert.
2. Da das CABY-Bindungsmotiv innerhalb des Caspase-9-Proteins noch nicht identifiziert wurde, erscheint es auch möglich, daß CABY außerhalb der CARD Domäne mit Caspase-9 interagiert und das Protein so zu APAF-1 Molekülen rekrutiert. Durch die induzierte Nähe beider CARD Domänen kann es dann anschließend zur direkten Wechselwirkung zwischen Caspase-9 und APAF-1 kommen.

Da in beiden Modellen nicht apoptotische Bedingungen vorausgesetzt werden, muß die Existenz eines so genannten Prä-Apoptosom Komplexes postuliert werden, der allerdings - wie schon vorher erwähnt wurde - auch ohne Cyt-c Freisetzung aus den Mitochondrien gebildet werden kann.

3. Es könnte sein, daß CABY ausschließlich für die Dimerisierung von APAF-1-Proteinen zuständig ist. Diese Form der prä-apoptotischen APAF-1 Oligomerisierung ist schon in der Literatur beschrieben worden (Lauber et al., 2001). Vermittelt wird die Selbstassoziation anhand der NOD Domäne im APAF-1 Molekül. Inwiefern jedoch CABY-Dimere mechanistisch zu einer erleichterten APAF-1-Dimerisierung beitragen ist momentan nicht bekannt.

Bisher wurde beobachtet, daß CABY an APAF-1 bindet und die Zellen gegenüber Apoptose sensibilisiert werden. Über den genauen Mechanismus jedoch, ob und wie CABY an der Bildung und Aktivierung des Apoptosomkomplexes beteiligt ist, lässt sich momentan nur spekulieren. Bisher konnte beobachtet werden, daß in denjenigen Zellsysaten eine deutliche erhöhte Caspase-3 Aktivität gemessen werden kann, in denen neben Cyt c/ dATP auch rekombinantes CABY Protein zugegeben wird (Sara Mateus, unveröffentlichte Daten).



**Abbildung 37:** CABY als möglicher Nucleotid Austausch Faktor während der Bildung und Stabilisierung des Apoptosom-Komplexes.

Eine weitere mögliche Funktion von CABY könnte sein, als Nucleotid Austausch Faktor für die Apoptosom Bildung zu fungieren (siehe Abbildung 37), da die meisten der eine DUF59 Domäne enthaltenden Proteine ATP binden können und CABY mit APAF-1 in der Nähe der NOD Domäne interagiert, die ihrerseits ATPase Aktivität aufweist. Die Bedeutung dieses Prozesses wird durch neueste *in vitro* Ergebnisse von Wang und Kollegen unterstrichen, da der Nucleotid Austausch nach ATP Hydrolyse zusammen mit der Bindung von Cyt-c für die Apoptosomkomplex-Bildung und dessen Stabilisierung essentiell ist (Kim et al., 2005).

#### **4.8 CABY ist ein evolutionär stark konserviertes Gen, das neben seiner Rolle für die Apoptoseregulation eine wichtige Vitalfunktion besitzt**

Essentielle Gene mit vitalen Funktionen werden aufgrund des hohen Selektionsdruckes evolutionär konserviert. Der Druck zur Konservierung entsteht durch die Notwendigkeit, wichtige Interaktionen mit anderen Molekülen zu erhalten. Bei der Analyse orthologer Sequenzen konnten in allen Modelorganismen CABY-homologe Sequenzen gefunden werden, die auf Proteinebene eine Identität von über 50% aufweisen (Abbildung 10 A/B). Bei der Aminosäuresequenzvergleichsanalyse fällt auch auf, daß die meisten CABY-Proteinsequenzen ähnlich lang sind und alle die DUF59 Domäne besitzen. Aufgrund dessen wurden u.a. Experimente in Maus- und Zebrafisch-Tiermodellen durchgeführt, um die Rolle von CABY für die Apoptose während der Embryogenese zu untersuchen. Diese Ergebnisse werden hier kurz zusammengefaßt dargestellt:

In Zusammenarbeit mit M. Hammerschmidt am MPI für Immunologie (Freiburg) wurden Zebrafischembryonen mit CABY-Morpholinos injiziert und mit UV bestrahlt. Anschließend wurde die Anzahl der apoptotischen Zellen mit Hilfe einer Tunnel-Färbung ermittelt. Es stellte sich heraus, daß der durch Morpholinos vermittelte Knock-Down der CABY mRNA Expression zu einer signifikanten Reduktion der UV induzierten Apoptoserate führt. Der beobachtete Einfluss des Expressionsniveaus von Zebrafisch-CABY auf die Sensitivität der Zellen gegenüber UV-induziertem Zelltod lässt vermuten, daß im Unterschied zu humanen Zellen im Zebrafisch-Organismus keine Proteine exprimiert werden, die die Funktion von CABY redundant übernehmen können. Die entsprechende Datenbanksuche nach weiteren CABY-Homologen im Zebrafischgenom verlief entsprechend erfolglos.

Die Injektion der Zebrafisch-CABY-Morpholinos führt zur embryonalen Lethalität, wodurch gezeigt werden konnte, daß CABY für die Embryonalentwicklung von Zebrafisch wichtig ist. Ob allerdings für die Lethalität eine Apoptosederegulation während der Embryonalentwicklung verantwortlich ist, wird in zukünftigen Experimenten zu klären sein. Die physiologische Bedeutung von CABY während der Embryonalentwicklung lässt sich auch in anderen Modelorganismen nachweisen. So wirkt sich auch der CABY siRNA Knock-Down in *Drosophila* embryonal lethal aus.

#### *IV. Diskussion*

Der CABY Knock-Out in *Saccharomyces cerevisiae* wirkt ebenfalls lethal, wobei fehlende Hefe-CABY-Aktivität durch Expression von humanem CABY aufgrund der hohen evolutionären Konservierung kompensiert und somit der Knock-Out Phänotyp aufgehoben werden kann. All diese Befunde weisen auf eine wichtige ursprüngliche und konservierte Vitalfunktion von CABY hin. Vermutlich hat diese nichts mit Apoptose zu tun, CABY könnte jedoch später während der Evolution - analog zu Cyt-c - in das Apoptoseprogramm eingebunden worden sein.

## V. Literaturverzeichnis

- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., and Akey, C. W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9, 423-432.
- Adrain, C., and Martin, S. J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 26, 390-397.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
- Altomare, D. A., Wang, H. Q., Skele, K. L., De Rienzo, A., Klein-Szanto, A. J., Godwin, A. K., and Testa, J. R. (2004). AKT and mTOR phosphorylation is frequently detected in ovarian cancer and can be targeted to disrupt ovarian tumor cell growth. *Oncogene* 23, 5853-5857.
- Antonsson, B. (2001). Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res* 306, 347-361.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
- Bai, J., Sui, J., Demirjian, A., Vollmer, C. M., Jr., Marasco, W., and Callery, M. P. (2005). Predominant Bcl-XL knockdown disables antiapoptotic mechanisms: tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-based triple chemotherapy overcomes chemoresistance in pancreatic cancer cells in vitro. *Cancer Res* 65, 2344-2352.
- Beere, H. M., Wolf, B. B., Cain, K., Mosser, D. D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Tailor, P., Morimoto, R. I., Cohen, G. M., and Green, D. R. (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2, 469-475.
- Berrar, D., Dubitzky, W., Solinas-Toldo, S., Bulashevskaya, S., Granzow, M., Conrad, C., Kalla, J., Lichter, P., and Eils, R. (2001). A database system for comparative genomic hybridization analysis. *IEEE Eng Med Biol Mag* 20, 75-83
- Berube, C., Boucher, L. M., Ma, W., Wakeham, A., Salmena, L., Hakem, R., Yeh, W. C., Mak, T. W., and Benchimol, S. (2005). Apoptosis caused by p53-induced protein with death domain (PIDD) depends on the death adapter protein RAIDD. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Birnboim, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 100, 243-255
- Blink, E., Maianski, N. A., Alnemri, E. S., Zervos, A. S., Roos, D., and Kuijpers, T. W. (2004). Intramitochondrial serine protease activity of Omi/HtrA2 is required for caspase-independent cell death of human neutrophils. *Cell Death Differ* 11, 937-939.
- Bossy-Wetzell, E., Newmeyer, D. D., and Green, D. R. (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J* 17, 37-49.

- Brown, J. M., and Attardi, L. D. (2005). The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* 5, 231-237.
- Bruey, J. M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S. A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A. P., Kroemer, G., Solary, E., and Garrido, C. (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2, 645-652.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., and Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
- Byrne, G. I., and Ojcius, D. M. (2004). Chlamydia and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2, 802-808.
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J. C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.
- Cecconi, F., Alvarez-Bolado, G., Meyer, B. I., Roth, K. A., and Gruss, P. (1998). Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 94, 727-737.
- Chai, J., Du, C., Wu, J. W., Kyin, S., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406, 855-862.
- Chao, D. T., and Korsmeyer, S. J. (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 16, 395-419.
- Chen, P., Nordstrom, W., Gish, B., and Abrams, J. M. (1996). grim, a novel cell death gene in *Drosophila*. *Genes Dev* 10, 1773-1782.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., and Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2172-2175.
- Ciocca, D. R., Clark, G. M., Tandon, A. K., Fuqua, S. A., Welch, W. J., and McGuire, W. L. (1993). Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst* 85, 570-574.
- Cory, S., Huang, D. C., and Adams, J. M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590-8607.
- Cote, J., and Ruiz-Carrillo, A. (1993). Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science* 261, 765-769.
- Crook, N. E., Clem, R. J., and Miller, L. K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 67, 2168-2174.
- Czerski, L., and Nunez, G. (2004). Apoptosome formation and caspase activation: is it different in the heart? *J Mol Cell Cardiol* 37, 643-652.
- Daniel, P. T., Schulze-Osthoff, K., Belka, C., and Guner, D. (2003). Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins. *Essays Biochem* 39, 73-88.

- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* *91*, 231-241.
- Datta, S. R., Ranger, A. M., Lin, M. Z., Sturgill, J. F., Ma, Y. C., Cowan, C. W., Dikkes, P., Korsmeyer, S. J., and Greenberg, M. E. (2002). Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. *Dev Cell* *3*, 631-643.
- Davis, J. M., Pennington, J. E., Kubler, A. M., and Conscience, J. F. (1982). A simple, single-step technique for selecting and cloning hybridomas for the production of monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* *50*, 161-171.
- Dorstyn, L., Colussi, P. A., Quinn, L. M., Richardson, H., and Kumar, S. (1999). DRONC, an ecdysone-inducible *Drosophila* caspase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 4307-4312.
- Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* *16*, 6127-6145.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* *102*, 33-42.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* *411*, 494-498.
- Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* *44*, 817-829.
- Espana, L., Fernandez, Y., Rubio, N., Torregrosa, A., Blanco, J., and Sierra, A. (2004). Overexpression of Bcl-xL in human breast cancer cells enhances organ-selective lymph node metastasis. *Breast Cancer Res Treat* *87*, 33-44.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *391*, 806-811.
- Fischer, U., Janicke, R. U., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* *10*, 76-100.
- Franke, T. F., and Cantley, L. C. (1997). Apoptosis. A Bad kinase makes good. *Nature* *390*, 116-117.
- Fraser, A. G., and Evan, G. I. (1997). Identification of a *Drosophila melanogaster* ICE/CED-3-related protease, drICE. *Embo J* *16*, 2805-2813.
- Freemont, P. S., Hanson, I. M., and Trowsdale, J. (1991). A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell* *64*, 483-484.

- Fulda, S., Kufer, M. U., Meyer, E., van Valen, F., Dockhorn-Dworniczak, B., and Debatin, K. M. (2001). Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 20, 5865-5877.
- Fulda, S., Wick, W., Weller, M., and Debatin, K. M. (2002). Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat Med* 8, 808-815.
- Garrido, C., Fromentin, A., Bonnotte, B., Favre, N., Moutet, M., Arrigo, A. P., Mehlen, P., and Solary, E. (1998). Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones. *Cancer Res* 58, 5495-5499.
- Giodini, A., Kallio, M. J., Wall, N. R., Gorbsky, G. J., Tognin, S., Marchisio, P. C., Symons, M., and Altieri, D. C. (2002). Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res* 62, 2462-2467.
- Good, L., and Nazar, R. N. (1997). Plasmid mini-preparations from culture streaks. *Biotechniques* 22, 404-406.
- Gottlieb, R. A. (2000). Mitochondria: execution central. *FEBS Lett* 482, 6-12.
- Gray, C. W., Ward, R. V., Karran, E., Turconi, S., Rowles, A., Viglienghi, D., Southan, C., Barton, A., Fantom, K. G., West, A., *et al.* (2000). Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur J Biochem* 267, 5699-5710.
- Green, D. R. (2005). Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 121, 671-674.
- Green, D. R., and Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Grether, M. E., Abrams, J. M., Agapite, J., White, K., and Steller, H. (1995). The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. *Genes Dev* 9, 1694-1708.
- Gross, A., Yin, X. M., Wang, K., Wei, M. C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Korsmeyer, S. J. (1999). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 274, 1156-1163.
- Guo, F., Nimmanapalli, R., Paranawithana, S., Wittman, S., Griffin, D., Bali, P., O'Bryan, E., Fumero, C., Wang, H. G., and Bhalla, K. (2002). Ectopic overexpression of second mitochondria-derived activator of caspases (Smac/DIABLO) or cotreatment with N-terminus of Smac/DIABLO peptide potentiates epothilone B derivative-(BMS 247550) and Apo-2L/TRAIL-induced apoptosis. *Blood* 99, 3419-3426.
- Gupta, S. (2005). Molecular mechanisms of apoptosis in the cells of the immune system in human aging. *Immunol Rev* 205, 114-129.
- Hajra, K. M., and Liu, J. R. (2004). Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis* 9, 691-704.

- Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G. S., Henderson, J. T., Woo, M., Soengas, M. S., Elia, A., de la Pompa, J. L., Kagi, D., Khoo, W., *et al.* (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94, 339-352.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- Han, Z., Bhalla, K., Pantazis, P., Hendrickson, E. A., and Wyche, J. H. (1999). Cif (Cytochrome c efflux-inducing factor) activity is regulated by Bcl-2 and caspases and correlates with the activation of Bid. *Mol Cell Biol* 19, 1381-1389.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hansen, T. M., and Nagley, P. (2003). AIF: a multifunctional cog in the life and death machine. *Sci STKE* 2003, PE31.
- Hao, Z., Duncan, G. S., Chang, C. C., Elia, A., Fang, M., Wakeham, A., Okada, H., Calzascia, T., Jang, Y., You-Ten, A., *et al.* (2005). Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome C reveals a differential requirement for cytochrome C and Apaf-1 in apoptosis. *Cell* 121, 579-591.
- Harlin, H., Reffey, S. B., Duckett, C. S., Lindsten, T., and Thompson, C. B. (2001). Characterization of XIAP-deficient mice. *Mol Cell Biol* 21, 3604-3608.
- Hausmann, G., O'Reilly, L. A., van Driel, R., Beaumont, J. G., Strasser, A., Adams, J. M., and Huang, D. C. (2000). Pro-apoptotic apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-x(L). *J Cell Biol* 149, 623-634.
- Heibein, J. A., Goping, I. S., Barry, M., Pinkoski, M. J., Shore, G. C., Green, D. R., and Bleackley, R. C. (2000). Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *J Exp Med* 192, 1391-1402.
- Helling, R. B., Goodman, H. M., and Boyer, H. W. (1974). Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* 14, 1235-1244.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Hengartner, M. O., and Horvitz, H. R. (1994). *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76, 665-676.
- Hirsch, T., Marzo, I., and Kroemer, G. (1997). Role of the mitochondrial permeability transition pore in apoptosis. *Biosci Rep* 17, 67-76.
- Holcik, M., and Korneluk, R. G. (2001). XIAP, the guardian angel. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 550-556.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J. L., Schneider, P., Seed, B., and Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 1, 489-495.

- Huang, D. C., and Strasser, A. (2000). BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103, 839-842.
- Huang, D. C., Tschopp, J., and Strasser, A. (2000). Bcl-2 does not inhibit cell death induced by the physiological Fas ligand: implications for the existence of type I and type II cells. *Cell Death Differ* 7, 754-755.
- Ikemoto, H., Tani, E., Ozaki, I., Kitagawa, H., and Arita, N. (2000). Calphostin C-mediated translocation and integration of Bax into mitochondria induces cytochrome c release before mitochondrial dysfunction. *Cell Death Differ* 7, 511-520.
- Ionov, Y., Yamamoto, H., Krajewski, S., Reed, J. C., and Perucho, M. (2000). Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10872-10877.
- Jackson, R. J., Campbell, E. A., Herbert, P., and Hunt, T. (1983). The preparation and properties of gel-filtered rabbit-reticulocyte lysate protein-synthesis systems. *Eur J Biochem* 131, 289-301.
- Jesenberger, V., and Jentsch, S. (2002). Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 112-121.
- Jia, L., Srinivasula, S. M., Liu, F. T., Newland, A. C., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E. S., and Kelsey, S. M. (2001). Apaf-1 protein deficiency confers resistance to cytochrome c-dependent apoptosis in human leukemic cells. *Blood* 98, 414-421.
- Jolly, C., and Morimoto, R. I. (2000). Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* 92, 1564-1572.
- Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H. Y., Ravagnan, L., *et al.* (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549-554.
- Kaufmann, S. H., and Vaux, D. L. (2003). Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. *Oncogene* 22, 7414-7430.
- Kelekar, A., and Thompson, C. B. (1998). Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* 8, 324-330.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kim, H. E., Du, F., Fang, M., and Wang, X. (2005). Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Kirkin, V., Joos, S., and Zornig, M. (2004). The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1644, 229-249.

- Klein, J. A., Longo-Guess, C. M., Rossmann, M. P., Seburn, K. L., Hurd, R. E., Frankel, W. N., Bronson, R. T., and Ackerman, S. L. (2002). The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419, 367-374.
- Knudson, C. M., Tung, K. S., Tourtellotte, W. G., Brown, G. A., and Korsmeyer, S. J. (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 270, 96-99.
- Kohler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Korsmeyer, S. J., Wei, M. C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K. J., and Schlesinger, P. H. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7, 1166-1173.
- Kroemer, G., and Martin, S. J. (2005). Caspase-independent cell death. *Nat Med* 11, 725-730.
- Kroemer, G., and Reed, J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6, 513-519.
- Kroemer, G., Zamzami, N., and Susin, S. A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 18, 44-51.
- Kuida, K., Haydar, T. F., Kuan, C. Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M. S., Rakic, P., and Flavell, R. A. (1998). Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94, 325-337.
- Kuida, K., Zheng, T. S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., and Flavell, R. A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384, 368-372.
- Lahm, A., Paradisi, A., Green, D. R., and Melino, G. (2003). Death fold domain interaction in apoptosis. *Cell Death Differ* 10, 10-12.
- Lauber, K., Appel, H. A., Schlosser, S. F., Gregor, M., Schulze-Osthoff, K., and Wesselborg, S. (2001). The adapter protein apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1) is proteolytically processed during apoptosis. *J Biol Chem* 276, 29772-29781.
- Lee, S. H., Lee, J. W., Kim, H. S., Kim, S. Y., Park, W. S., Kim, S. H., Lee, J. Y., and Yoo, N. J. (2003). Immunohistochemical analysis of Omi/HtrA2 expression in stomach cancer. *Apmis* 111, 586-590.
- Li, F., Ambrosini, G., Chu, E. Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P. C., and Altieri, D. C. (1998a). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396, 580-584.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J. (1998b). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Li, L. Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.

- Lin, Y., Ma, W., and Benchimol, S. (2000). Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nat Genet* 26, 122-127.
- Lindsten, T., Ross, A. J., King, A., Zong, W. X., Rathmell, J. C., Shiels, H. A., Ulrich, E., Waymire, K. G., Mahar, P., Frauwirth, K., *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, 1389-1399.
- Linsinger, G., Wilhelm, S., Wagner, H., and Hacker, G. (1999). Uncouplers of oxidative phosphorylation can enhance a Fas death signal. *Mol Cell Biol* 19, 3299-3311.
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.
- Magdalena, C., Dominguez, F., Loidi, L., and Puente, J. L. (2000). Tumour prothymosin alpha content, a potential prognostic marker for primary breast cancer. *Br J Cancer* 82, 584-590.
- Martins, L. M., Morrison, A., Klupsch, K., Fedele, V., Moiso, N., Teismann, P., Abuin, A., Grau, E., Geppert, M., Livi, G. P., *et al.* (2004). Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice. *Mol Cell Biol* 24, 9848-9862.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S. A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z. H., Reed, J. C., and Kroemer, G. (1998a). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 187, 1261-1271.
- Marzo, I., Susin, S. A., Petit, P. X., Ravagnan, L., Brenner, C., Larochette, N., Zamzami, N., and Kroemer, G. (1998b). Caspases disrupt mitochondrial membrane barrier function. *FEBS Lett* 427, 198-202.
- Mate, M. J., Ortiz-Lombardia, M., Boitel, B., Haouz, A., Tello, D., Susin, S. A., Penninger, J., Kroemer, G., and Alzari, P. M. (2002). The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. *Nat Struct Biol* 9, 442-446.
- Meier, P., Silke, J., Leever, S. J., and Evan, G. I. (2000). The Drosophila caspase DRONC is regulated by DIAP1. *Embo J* 19, 598-611.
- Menendez, P., Vargas, A., Bueno, C., Barrena, S., Almeida, J., De Santiago, M., Lopez, A., Roa, S., San Miguel, J. F., and Orfao, A. (2004). Quantitative analysis of bcl-2 expression in normal and leukemic human B-cell differentiation. *Leukemia* 18, 491-498.
- Miramar, M. D., Costantini, P., Ravagnan, L., Saraiva, L. M., Haouzi, D., Brothers, G., Penninger, J. M., Peleato, M. L., Kroemer, G., and Susin, S. A. (2001). NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem* 276, 16391-16398.
- Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299.

- Miyashita, T. (2004). Confocal microscopy for intracellular co-localization of proteins. *Methods Mol Biol* 261, 399-410.
- Motoyama, N., Wang, F., Roth, K. A., Sawa, H., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., Fujii, S., and et al. (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* 267, 1506-1510.
- Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettlesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., et al. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335-341.
- Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N., and Fukuyama, H. (2003). Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* 10, 108-116.
- Nakayama, K., Negishi, I., Kuida, K., Shinkai, Y., Louie, M. C., Fields, L. E., Lucas, P. J., Stewart, V., Alt, F. W., and et al. (1993). Disappearance of the lymphoid system in Bcl-2 homozygous mutant chimeric mice. *Science* 261, 1584-1588.
- Newmeyer, D. D., Farschon, D. M., and Reed, J. C. (1994). Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell* 79, 353-364.
- Nicholson, D. W., and Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22, 299-306.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., and Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139, 271-279.
- O'Driscoll, L., Linehan, R., and Clynes, M. (2003). Survivin: role in normal cells and in pathological conditions. *Curr Cancer Drug Targets* 3, 131-152.
- Okada, H., Suh, W. K., Jin, J., Woo, M., Du, C., Elia, A., Duncan, G. S., Wakeham, A., Itie, A., Lowe, S. W., et al. (2002). Generation and characterization of Smac/DIABLO-deficient mice. *Mol Cell Biol* 22, 3509-3517.
- Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S. M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E. S., Kufe, D., and Kharbanda, S. (2000). Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *Embo J* 19, 4310-4322.
- Park, H. J., Seong, Y. M., Choi, J. Y., Kang, S., and Rhim, H. (2004). Alzheimer's disease-associated amyloid beta interacts with the human serine protease HtrA2/Omi. *Neurosci Lett* 357, 63-67.
- Pelham, H. R., and Jackson, R. J. (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem* 67, 247-256.
- Petit, P. X., Lecoeur, H., Zorn, E., Dauguet, C., Mignotte, B., and Gougeon, M. L. (1995). Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol* 130, 157-167.

- Qin, H., Srinivasula, S. M., Wu, G., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E. S., and Shi, Y. (1999). Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature* 399, 549-557.
- Ranger, A. M., Zha, J., Harada, H., Datta, S. R., Danial, N. N., Gilmore, A. P., Kutok, J. L., Le Beau, M. M., Greenberg, M. E., and Korsmeyer, S. J. (2003). Bad-deficient mice develop diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9324-9329.
- Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S. A., Maise, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jaattela, M., Penninger, J. M., Garrido, C., and Kroemer, G. (2001). Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* 3, 839-843.
- Reed, J. C., and Bischoff, J. R. (2000). BIRing chromosomes through cell division--and survivin' the experience. *Cell* 102, 545-548.
- Rehemtulla, A., Hamilton, C. A., Chinnaiyan, A. M., and Dixit, V. M. (1997). Ultraviolet radiation-induced apoptosis is mediated by activation of CD-95 (Fas/APO-1). *J Biol Chem* 272, 25783-25786.
- Richter, B. W., and Duckett, C. S. (2000). The IAP proteins: caspase inhibitors and beyond. *Sci STKE* 2000, PE1.
- Riedl, S. J., and Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 897-907.
- Roberts, R. J., and Macelis, D. (1996). REBASE--restriction enzymes and methylases. *Nucleic Acids Res* 24, 223-235.
- Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis [see comments]. *Nature* 391, 96-99.
- Saleh, A., Srinivasula, S. M., Balkir, L., Robbins, P. D., and Alnemri, E. S. (2000). Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2, 476-483.
- Salvesen, G. S., and Duckett, C. S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 401-410.
- Sattler, M., Liang, H., Nettessheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., *et al.* (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275, 983-986.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17, 1675-1687.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S. J., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1999). Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* 274, 22532-22538.
- Schlieman, M. G., Fahy, B. N., Ramsamooj, R., Beckett, L., and Bold, R. J. (2003). Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Br J Cancer* 89, 2110-2115.

- Seth, R., Yang, C., Kaushal, V., Shah, S. V., and Kaushal, G. P. (2005). p53-dependent caspase-2 activation in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and its role in renal tubular epithelial cell injury. *J Biol Chem* 280, 31230-31239.
- Shapiro, D. J. (1981). Quantitative ethanol precipitation of nanogram quantities of DNA and RNA. *Anal Biochem* 110, 229-231.
- Shi, Y. (2004). Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell* 117, 855-858.
- Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483-487.
- Shiokawa, D., and Tanuma, S. (2004). Differential DNases are selectively used in neuronal apoptosis depending on the differentiation state. *Cell Death Differ* 11, 1112-1120.
- Shiozaki, E. N., Chai, J., and Shi, Y. (2002). Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4197-4202.
- Soengas, M. S., Capodiceci, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J. G., Gerald, W. L., Lazebnik, Y. A., *et al.* (2001). Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409, 207-211.
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1, 949-957.
- Srinivasula, S. M., Datta, P., Kobayashi, M., Wu, J. W., Fujioka, M., Hegde, R., Zhang, Z., Mukattash, R., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., *et al.* (2002). sickle, a novel Drosophila death gene in the reaper/hid/grim region, encodes an IAP-inhibitory protein. *Curr Biol* 12, 125-130.
- Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R. A., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., and Alnemri, E. S. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410, 112-116.
- Sun, M., Wang, G., Paciga, J. E., Feldman, R. I., Yuan, Z. Q., Ma, X. L., Shelley, S. A., Jove, R., Tsihchlis, P. N., Nicosia, S. V., and Cheng, J. Q. (2001). AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol* 159, 431-437.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., *et al.* (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. (2001a). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8, 613-621.
- Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., and Takahashi, R. (2001b). Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8662-8667.

- Tamm, I., Kornblau, S. M., Segall, H., Krajewski, S., Welsh, K., Kitada, S., Scudiero, D. A., Tudor, G., Qui, Y. H., Monks, A., *et al.* (2000). Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* 6, 1796-1803.
- Teitz, T., Wei, T., Valentine, M. B., Vanin, E. F., Grenet, J., Valentine, V. A., Behm, F. G., Look, A. T., Lahti, J. M., and Kidd, V. J. (2000). Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 6, 529-535.
- Thakkar, H., Chen, X., Tyan, F., Gim, S., Robinson, H., Lee, C., Pandey, S. K., Nwokorie, C., Onwudiwe, N., and Srivastava, R. K. (2001). Pro-survival function of Akt/protein kinase B in prostate cancer cells. Relationship with TRAIL resistance. *J Biol Chem* 276, 38361-38369.
- Thornberry, N. A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- Tinel, A., and Tschopp, J. (2004). The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304, 843-846.
- Tomasz, M., Lipman, R., Chowdary, D., Pawlak, J., Verdine, G. L., and Nakanishi, K. (1987). Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. *Science* 235, 1204-1208.
- Tran, J., Rak, J., Sheehan, C., Saibil, S. D., LaCasse, E., Korneluk, R. G., and Kerbel, R. S. (1999). Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 781-788.
- Twomey, C., and McCarthy, J. V. (2005). Pathways of apoptosis and importance in development. *J Cell Mol Med* 9, 345-359.
- van Gurp, M., Festjens, N., van Loo, G., Saelens, X., and Vandenabeele, P. (2003). Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 487-497.
- Vanhaesebroeck, B., and Alessi, D. R. (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346 Pt 3, 561-576.
- Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., Brodianski, V. M., Kemper, O. C., Kollet, O., *et al.* (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9, 267-276.
- Vargas-Roig, L. M., Gago, F. E., Tello, O., Aznar, J. C., and Ciocca, D. R. (1998). Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int J Cancer* 79, 468-475.
- Vaux, D. L., and Silke, J. (2003). Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 499-504.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., and Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43-53.

- Verhagen, A. M., Silke, J., Ekert, P. G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L. M., Day, C. L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., *et al.* (2002). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 277, 445-454.
- Vivanco, I., and Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489-501.
- Volp, K., Brezniceanu, M. L., Bosser, S., Brabletz, T., Kirchner, T., Götzel, D., Joos, S., and Zornig, M. (2006). Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) is associated with an elevated level of the antiapoptotic c-IAP2 protein in human colon carcinomas. *Gut* 55, 234-242.
- Walker, N. I., Harmon, B. V., Gobe, G. C., and Kerr, J. F. (1988). Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol* 13, 18-54.
- Wang, J., Zheng, L., Lobito, A., Chan, F. K., Dale, J., Sneller, M., Yao, X., Puck, J. M., Straus, S. E., and Lenardo, M. J. (1999). Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 98, 47-58.
- Wang, X., Yang, C., Chai, J., Shi, Y., and Xue, D. (2002). Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 298, 1587-1592.
- Wani, K. M., Huilgol, N. G., Hongyo, T., Shah, K., Chatterjee, N., Nair, C. K., and Nomura, T. (2003). Genetic alterations in the coding region of the bak gene in uterine cervical carcinoma. *Br J Cancer* 88, 1584-1586.
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-730.
- Wei, Y. Q., Zhao, X., Kariya, Y., Teshigawara, K., and Uchida, A. (1995). Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat-shock protein (HSP) 70 expression in tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* 40, 73-78.
- Wesselborg, S., Engels, I. H., Rossmann, E., Los, M., and Schulze-Osthoff, K. (1999). Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction. *Blood* 93, 3053-3063.
- White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K., and Steller, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* 264, 677-683.
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., and Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 22, 474-476, 478-481.
- Willis, S. N., and Adams, J. M. (2005). Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 17, 617-625.
- Yang, Q. H., Church-Hajduk, R., Ren, J., Newton, M. L., and Du, C. (2003). Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev* 17, 1487-1496.

- Yang, Y. L., and Li, X. M. (2000). The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res* 10, 169-177.
- Yin, X. M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K. A., and Korsmeyer, S. J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400, 886-891.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-652.
- Zaffaroni, N., Pennati, M., and Daidone, M. G. (2005). Survivin as a target for new anticancer interventions. *J Cell Mol Med* 9, 360-372.
- Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S. A., and Kroemer, G. (1998). Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* 16, 2265-2282.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S. A., Mase, B., and Kroemer, G. (1996). Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett* 384, 53-57.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J. L., Petit, P. X., and Kroemer, G. (1995). Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp Med* 181, 1661-1672.
- Zhang, X., Chen, J., Graham, S. H., Du, L., Kochanek, P. M., Draviam, R., Guo, F., Nathaniel, P. D., Szabo, C., Watkins, S. C., and Clark, R. S. (2002). Intranuclear localization of apoptosis-inducing factor (AIF) and large scale DNA fragmentation after traumatic brain injury in rats and in neuronal cultures exposed to peroxynitrite. *J Neurochem* 82, 181-191.
- Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Brustugun, O. T., and Doskeland, S. O. (1998). Injected cytochrome c induces apoptosis. *Nature* 391, 449-450.
- Zhu, C., Qiu, L., Wang, X., Hallin, U., Cande, C., Kroemer, G., Hagberg, H., and Blomgren, K. (2003). Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J Neurochem* 86, 306-317.
- Zinkel, S. S., Ong, C. C., Ferguson, D. O., Iwasaki, H., Akashi, K., Bronson, R. T., Kutok, J. L., Alt, F. W., and Korsmeyer, S. J. (2003). Proapoptotic BID is required for myeloid homeostasis and tumor suppression. *Genes Dev* 17, 229-239.
- Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.
- Zou, H., Yang, R., Hao, J., Wang, J., Sun, C., Fesik, S. W., Wu, J. C., Tomaselli, K. J., and Armstrong, R. C. (2003). Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP. *J Biol Chem* 278, 8091-8098.

## VI. Anhang - Lebenslauf

ROBERT PICK



### PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

---

- Familienstand: Ledig
- Nationalität: Deutsch
- Geburtsort: Gronau (Westfalen)
- Geburtsdatum: 02.06.1975

### WISSENSCHAFTLICHE ARBEIT

---

- [01.06.2001 - 2005]      Wissenschaftlicher Mitarbeiter / Doktorand  
am Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg Speyer  
Haus in der Arbeitsgruppe von Dr. Martin Zörnig
- **Thema der Doktorarbeit:**  
*„Analyse molekularer Apoptose Mechanismen“*

### STUDIUM

---

- [03.09.1995 - 30.03.2001]      Studium der Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe  
Universität Frankfurt am Main
- [07.10.1998]      Diplomvorprüfung
- **Gesamtnote:** „sehr gut“
- [30.9.2000]      Zulassung zur Diplomhauptprüfung,
- **Beginn der Diplomarbeit mit dem Thema:**  
*„Identifizierung FADD-interagierender Proteine  
im Yeast-Two-Hybrid System“*
- [30.09.2000 - 30.03.2001]      Durchführung der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von  
Dr. Martin Zörnig am Chemotherapeutischen  
Forschungsinstitut Georg Speyer Haus, Frankfurt am Main  
*Betreuung durch Prof. Dr. Winfried Wels (Georg Speyer Haus) und  
Prof. Dr. Bernd Ludwig (Fachbereich Biochemie, Universität  
Frankfurt)*
- [30.03.2001]      Diplom Biochemiker Hauptprüfung
- **Gesamtnote:** „sehr gut“
  - **Prädikat:** „mit Auszeichnung“

## ZIVILDIENTST

---

- [03.07.1995 - 31.07.1996] Rettungsdienst, Johanniter Unfall Hilfe e.V. Düsseldorf  
▪ *Ausbildung zum Rettungssanitäter*

## SCHULBILDUNG

---

- |               |  |         |
|---------------|--|---------|
| [1981 - 1985] | Montessori Grundschule                 | Erkrath |
| [1985 - 1995] | Städtisches Gymnasium Hochdahl         | Erkrath |
| [1991 - 1992] | Milford High School                    | MI, USA |
|               | ▪ <i>Abschluß mit Honorary Diploma</i> |         |
| [14.06.1995]  | Abitur, Städtisches Gymnasium Hochdahl | Erkrath |

## WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN

---

- Publiziert:  
Baum W, Kirkin V, **Pick R**, Fernandez SB, Lettau M, Janssen O, Zornig M.  
*„Binding of the intracellular Fas ligand (FasL) domain to the adaptor protein PSTPIP results in a cytoplasmic localization of FasL“*  
(J Biol Chem. 2005 Dec 2;280(48):40012-24. Epub 2005 Oct 4)
- Eingereicht:  
**Robert Pick**, Susanne Badura, Susanne Bösser, and Martin Zörnig  
*„Upon intracellular processing, the C-terminal Death Domain-containing fragment of the p53-inducible PIDD/LRDD protein translocates to the nucleoli and interacts with Nucleolin“*
- In Vorbereitung:  
Kirsten Völp(\*), **Robert Pick**(\*), Sara Mateus Fernández, Susanne Bösser, Susanne Badura, Matthias Hammerschmidt, Matthias Nowak, Roland Penzel, Gunhild Mechtersheimer, Silke Deckert, Inka Seil, Roland Stauber, Kurt Zatloukal, Matthias Truss, Christian Hagemeyer, Gerhard Przemeczek, Geert Michel, Stefan Joos, and Martin Zörnig; (\*):these authors contributed equally to the work  
*„CABY, a novel pro-apoptotic Apaf-1 binding protein which is required for Caspase-9 activation“*

## KONGRESSE/ VORTRÄGE/ POSTERPRÄSENTATION

---

- [13.10.2001 - 16.10.2001] 9th ECDO Euroconference on Apoptosis  
Wien, Österreich
- [01.06.2004 - 3.06.2004] Apoptose Kongress der Mildred Scheel Stiftung /  
Deutsche Krebsforschung  
▪ *Vortrag mit dem Titel:*  
*„CABY - a new Apaf-1 binding protein involved in apoptosome formation“*
- [03.03.2005 - 09.03.2005] Bonn  
Keystone Conference „Cellular Senescence and Cell Death“  
▪ *Posterpräsentation:*  
*„Identification and characterization of CABY, a novel pro-apoptotic Apaf-1 binding protein“*  
Keystone, Colorado, USA

## VII. Anhang - Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-azino-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AICD	Activation Induced Cell Death
AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrome
AIF	Apoptosis Inducing Factor
Ak	Antikörper
ALPS	Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome
APAF-1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
ATCC	American Type Cell Culture Collection
AS (aa)	Aminosäure (aminoacid)
Bcl-2	B-Cell-Lymphoma 2
BH	Bcl-2 Homology Domain
BIR	Baculovirus IAP Repeat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAD	Caspase Activated DNase
CARD	Caspase Recruitment Domain
CD95L	CD95 Ligand
cDNA	komplementäre DNA
CED	Cell Death Abnormal
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CHX	Cycloheximid
Cm	Chloramphenicol
CMV	Cytomegalievirus
cpm	Ereignisse pro Minute (counts per minute)
Cyt c	Cytochrome c
d	Tag
d.h.	das heißt
DAG	1,2-Diacylglycerol
DABCO	1,4 Diazabicyclo(2.2.2)octan
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DD	Todesdomäne (death domain)
DED	Todeseffektordomäne (death effector domain)
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
<i>D. melongaster</i>	<i>Drosophila melongaster</i>
<i>D. rerio</i>	<i>Danio rerio</i>
DMEM	Dulbecco's modified eagles medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E.coli	<i>Escherichia coli</i>

ECL	Enhanced Chemiluminescence
EndoG	Endonuclease G
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELM	Eucaryotic Linear Motif Resource
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EXPASY	Expert Protein Analysis System
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell Sortierer
FADD	Fas Associated Protein with a Death Domain
FCA	Freund/s Complete Adjuvance
FCS	Fetales Kälber Serum
FIA	Freund/s Incomplete Adjuvance
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLIP	FLICE-like Inhibitory Protein
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GFP	Green Fluorescent Protein
GST	Gluthation-S-Transferase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GEF	Guaninnucleotide Exchange Factor
h	Stunde
h	human
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HRP	Merretichperoxidase (horse raddish peroxidase)
HtrA	high temperature requirement A endoprotease
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
ICAD	Inhibitor of Caspase Activated DNase
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-1-thio--D-galactosid
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
LB	Luria Broth
m	murin
mg	Milligramm
ml	Milliliter
M	Molar
mM	Millimolar
min	Minute
mRNA	messenger RNA
<i>M. musculus</i>	<i>mus musculus</i>
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NLS	Kernlokalisierungssignal (nuclear localisation signal)
NP-40	Nonidet P-40
OD <sub>260</sub>	optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge
Omi	serine protease mammalian homologue of HtrA

ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PARP	Poly-ADP-Ribose Polymerase
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PI	Propidiumiodid
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sek	Sekunde
SD	<i>synthetic minimal medium</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SMART	Simple Modular Architecture Research Tool
Smac	Second Mitochondrial Activator of Caspases
SYSTEMS	Systematic Re-Searching
Tab.	Tabelle
tBID	truncated BID
TE	Tris-EDTA
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	TNF Rezeptor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAIL-R	TRAIL Receptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Micromolar
v/v	Volumen/ Volumen
w/v	Masse/Volumen
WT	Wildtyp
V	Volt
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
z.B.	zum Beispiel