

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Technischen Universität München

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Hermann Wagner, Ph.D. (Melbourne)

**Intrazelluläre Lokalisation, Komplexbildung,
Nukleotidbindung und Interaktion mit Histonen
von *Caenorhabditis elegans* CED-4
und
Identifikation eines potentiellen humanen P35-Homologs**

Barbara Maria Seiffert

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauff

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner
2. Univ.-Prof. Dr. Georg A. Häcker

Die Dissertation wurde am 24.09.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 19.01.2004 angenommen.

Isopropilprophemilparbitussaueresphenildimenthildimentiminophirazon

So einfach – und man kann es sich doch nicht merken.

KARL VALENTIN

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	9
1 EINLEITUNG	9
1.1 Was ist Apoptose?	9
1.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> : Modellorganismus der Apoptoseforschung	12
1.3 Molekulare Grundlagen der Apoptose bei <i>C. elegans</i>	15
1.4 Apoptose-Signaltransduktionswege bei Säugetieren	16
1.4.1 Der zweigeteilte exekutive Signalweg	16
1.4.2 Caspasen: Initiator- und Effektorcaspasen	17
1.4.3 Aktivierungskomplexe: DISC und Apoptosom	20
1.4.4 Regulatoren der Bcl-2-Familie	21
1.4.5 Andere Regulatoren: c-FLIP, IAP, Smac/DIABLO, AIF	24
1.5 Homologien und Unterschiede zwischen CED-4 und Apaf-1	26
1.5.1 Die Domänenstruktur von CED-4 und Apaf-1	26
1.5.2 Nukleotidbindung und -hydrolyse	27
1.5.3 Oligomerisierung, Komplexbildung und intrazelluläre Lokalisation	29
1.6 Virale Apoptoseinhibitoren	31
1.6.1 Apoptose und Viren	31
1.6.2 Baculoviren: IAP und P35	32
1.7 Zielsetzungen der Arbeit	33
1.7.1 Funktionelle Analyse von rekombinantem CED-4	33
1.7.2 Identifikation eines mit CED-4 interagierenden Proteins	34
1.7.3 Identifikation eines möglichen zellulären P35-Homologs	34
2 MATERIAL UND METHODEN	35
2.1 Material	35
2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien	35
2.1.2 Kreuzvernetzende Chemikalien („Cross-linker“)	37

2.1.3	Radiochemikalien	37
2.1.4	Nukleotide für proteinbiochemische Anwendungen	37
2.1.5	Enzyme	38
2.1.6	Molekulargewichtsmarker	38
2.1.7	Western Blot	38
2.1.8	Isoelektrische Fokussierung	39
2.1.9	Systeme	39
2.1.10	Säulenmaterialien	39
2.1.11	Antikörper	40
2.1.12	Plasmide und Baculoviren	40
2.1.13	Synthetische Oligonukleotide (Metabion, Martinsried)	42
2.1.14	Sonstiges	42
2.1.15	Geräte	42
2.2	Zelllinien	43
2.2.1	Säuger-Zelllinien	43
2.2.2	Insektenzellen	44
2.3	Hefen	45
2.3.1	Hefestamm	45
2.3.2	Hefemedien	45
2.4	Bakterien	46
2.4.1	Bakterienstämme	46
2.4.2	Bakterienmedium	47
2.4.3	Bakterien-Selektivmedien	47
2.5	Methoden	47
2.5.1	Allgemeine molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden	47
2.5.2	Baculovirus Expressionssystem	56
2.5.3	Spezielle Methoden Teil 1: Molekulare Eigenschaften von CED-4	61
2.5.4	Spezielle Methoden Teil 2: CED-4 und Histone	64
2.5.5	Spezielle Methoden Teil 3: Identifikation eines kreuzreagierenden Proteins: RBPP34	72
2.5.6	„Fast Performance Liquid Chromatography“ (FPLC)	74
3	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>77</u>
3.1	Molekulare Funktionen und Eigenschaften von CED-4	77
3.1.1	Produktion und Aufreinigung von rekombinantem CED-4-Protein	77

3.1.2	Intrazelluläre Lokalisation von CED-4 während der Expression in <i>Sf9</i> -Insektenzellen	79
3.1.3	Komplexbildung durch rekombinantes CED-4	80
3.1.4	Bindung von Nukleotiden durch CED-4	83
3.1.5	Interaktion von GST-FLAG-CED-4 mit CED-3	85
3.2	Interaktion von CED-4 mit den Histonen H2B, H3, H4	86
3.2.1	Vorkommen und Extraktion der interagierenden Proteine	86
3.2.2	Cytoskelett-beeinflussende Wirkstoffe und Puffer	88
3.2.3	2-D-Gelelektrophorese	89
3.2.4	Präparative SDS-PAGE und Sequenzierung	89
3.2.5	Bestätigung der Interaktion von CED-4 und Histonen	90
3.2.6	Kopräzipitation von CED-4 und Histonen	93
3.2.7	Yeast-Two-Hybrid-System mit CED-4 und Histon H4b	94
3.3	Identifikation eines zelluläres Proteins, das mit Anti-P35-Antiserum kreuzreagiert	97
3.3.1	Extraktion und Komplexierung des gesuchten Proteins	97
3.3.2	2-D-Gelelektrophorese mit Mitochondrienextrakten	98
3.3.3	FPLC: HIC, Anionenaustausch und Größenchromatographie	98
3.3.4	Präparative SDS-PAGE mit Glycin/Tricin und Sequenzierung	103
3.3.5	Identifikation, Klonierung und Expression von RBP34	104
3.3.6	Theoretische Analysen	108
4	<u>DISKUSSION</u>	<u>111</u>
4.1	Molekulare Funktionen und Eigenschaften von CED-4	111
4.1.1	Subzelluläre Lokalisation	112
4.1.2	Komplexbildung	114
4.1.3	ATP-Hydrolyse	115
4.1.4	Weitere Kofaktoren	117
4.1.5	Nukleotidbindung und Bindung von CED-3	118
4.2	Interaktion von CED-4 mit den Histonen H2B, H3, H4	119
4.2.1	Histone	119
4.2.2	Yeast-Two-Hybrid-System und Affinitätspräzipitation	120
4.2.3	Eine mögliche physiologische Bedeutung der Interaktion	121
4.3	Identifikation eines zelluläres Proteins, das mit Anti-P35-Antiserum kreuzreagiert: RBP34	122
4.3.1	Homologie zwischen <i>AcP35</i> und RBP34	123
4.3.2	Weitere Ergebnisse aus Vorarbeiten	124

4.3.3	„Ribosomen-bindendes Protein RBP34“ in der Literatur	125
4.3.4	Lokalisation und Komplexierung von RBP34	128
4.3.5	Welche Schlüsse lassen sich aus den Diskrepanzen ziehen?	129
<u>5</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>132</u>
<u>6</u>	<u>LITERATUR</u>	<u>134</u>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>AcNPV</i>	<i>Autographa californica</i> Nucleopolyhedrovirus
<i>AcP35</i>	Protein P35 aus <i>AcNPV</i>
ADP	Adenosin 5'-diphosphat
ADPCP	β,γ -Methylenadenosin 5'-triphosphat
AMP	Adenosin 5'-monophosphat
AMP-PNP	Adenosin 5'-(β,γ -imido)triphosphat
Amp	Ampicillin
Apaf-1	“apoptotic protease activating factor 1”
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
ATP- γ -S	Adenosin 5'-[γ -thio]triphosphat
B42	Transaktivierungsdomäne
BH	Bcl-2-Homologie-Domäne
<i>bmNPV</i>	<i>Bombyx mori</i> Nucleopolyhedrovirus
<i>BmP35</i>	Protein P35 aus <i>BmNPV</i>
Bq	Becquerel, Einheit für radioaktiven Zerfall (1Bq = 1 Zerfall/s)
BSA	Rinderserumalbumin (“bovine serum albumin“)
CARD	Caspasenrekrutierungsdomäne
CC	“coiled coil”-Domäne
cDNA	komplementäre DNA (“complementary DNA“)
<i>ced</i> , CED	“cell death abnormal“
Ci	Ci = Einheit für Radioaktivität (1 Ci = 3.7×10^{10} Bq)
Cy3	wasserlöslicher Cyanin-Farbstoff
Da, (kDa, MDa)	Dalton (Kilodalton, Megadalton)
DD	Todesdomäne (“death domain“)
DED	Todeseffektordomäne (“death effector domain“)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DISC	“death inducing signalling complex“
(D)LC	(Dynein) leichte Kette “(Dynein) light chain“
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Deoxynucleosidtriphosphat(e)

DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>egl</i> , EGL	“egg laying defective”
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FACS	“fluorescence-activated cell sorter“
FCS	fetales Kälberserum („fetal calf serum“)
FPLC	“fast performance liquid chromatography“
FSBA	5'-(4-Fluorosulfonylbenzoyl)adenosinhydrochlorid
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin 5'-triphosphat
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIC	hydrophobe Interaktionschromatographie
5xHis, 6xHis	fünf- bzw. sechsfacher Histidin-Fusionsanhang
HP	Hypotonischer Puffer
HRP	Meerrettich-Peroxidase (“horse radish peroxidase”)
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IAA	Iodoacetamid
<i>iap</i> , IAP	“inhibitor of apoptosis”
IEF	isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropylthiogalactosid
Kana	Kanamycin
KOH	Kaliumhydroxid
kb	Kilobasenpaare
LexA	DNA-Bindungsdomäne
LiAc	Lithiumacetat
LLR	Leucin-reiche Wiederholungsdomäne (“leucin rich repeat”)
M	Molar, [Mol/l]
mA	Milliampère,
µF	Mikrofarad, Einheit für elektrische Kapazität
MeOH	Methanol

min.	Minute(n)
Mio.	Million(en)
mol	1 Mol enthält 6.022×10^{23} Moleküle
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NEM	N-Ethylmaleimid
NOGP	n-Octyl-β-D-glucopyranosid
O.D.	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCD	programmierter Zelltod (“programmed cell death“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (“polymerase chain reaction“)
PEG	Polyethylenglycol
pH	Maß für den Säuregrad („pondus hydrogenii“)
pI	isoelektrischer Punkt (pH-Wert, bei dem Proteine keine Nettoladung aufweisen)
RBP34	Ribosomen-bindendes Protein P34
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>SINPV</i>	<i>Spodoptera littoralis</i> Nucleopolyhedrovirus
<i>SIP49</i>	Protein P49 aus <i>SINPV</i>
<i>Sf9, Sf21</i>	Zelllinien aus <i>Spodoptera frugiperda</i>
s	Sekunden
tBid	trunkiertes Bid
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung “tris-buffered saline”
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin
TNM-FH	“ <i>Trichoplusia ni</i> Medium-Formulation Hink”
Tris	Tris(hydroxy-methyl)-aminomethan
u, U	Einheiten (“units“)
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (“volume per volume”)
w/v	Gewicht pro Volumen (“weight per volume”)
WD40	Wiederholungsmotiv
wt	Wildtyp
x g	-fache Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/sec}^2$)

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schematische Darstellung des Ablauf der Apoptose.	11
Abb. 2: Apoptose bei <i>C. elegans</i> .	16
Abb. 3: Übersicht über die Familie der Caspasen.	18
Abb. 4: Die zwei verschiedenen Apoptosewege des Säugetieres.	19
Abb. 5: Rezeptorvermittelte Apoptose: Der Signalweg über CD95.	20
Abb. 6: Die Bcl-2-Proteinfamilie.	23
Abb. 7: Homologievergleich zwischen Procaspase-8, zellulärem FLIP und viralem FLIP.	25
Abb. 8: Schematischer Vergleich von Apaf-1 und CED-4.	27
Abb. 9: Das Apaf-1-Apoptosom und die Aktivierung von Caspase-9.	30
Abb. 10: Extraktion und Aufreinigung von rekombinantem CED-4 aus <i>Sf9</i> -Insektenzellen.	78
Abb. 11: Expression und subzelluläre Lokalisation von CED-4 in <i>Sf9</i> -Zellen.	80
Abb. 12: Chemische Kreuzvernetzung von FLAG-CED-4.	81
Abb. 13: Größenchromatographie mit rekombinantem CED-4.	82
Abb. 14: Nukleotidbindungseigenschaften von CED-4.	84
Abb. 15: Affinitätspräzipitation von [³⁵ S] Methionin-markiertem CED-3 mit GST-FLAG-CED-4.	85
Abb. 16: Nachweis der gesuchten Proteine im Far Western Blot.	87
Abb. 17: Verschiedene Methoden der Histonfraktionierung.	91
Abb. 18: Histon H4b-Expression in <i>E. coli</i> AD494(DE3).	93
Abb. 19: Schema des Yeast-Two-Hybrid-Systems.	94
Abb. 20: LexA-CED-4-Expressionskontrolle im Hefestamm <i>S. cerevisiae</i> EGY48/pSH18-34.	95
Abb. 21: Reporteragentest in <i>S. cerevisiae</i> mit CED-4 und Histon H4b.	96
Abb. 22: Isoelektrische Fokussierung von Mitochondrienextrakten.	99
Abb. 23: Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) mit Mitochondrienextrakt.	100
Abb. 24: Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose) mit Mitochondrienextrakt.	101
Abb. 25: Anionenaustausch mit anschließender Größenchromatographie.	102
Abb. 26: Coomassie-Färbung der zu sequenzierenden Banden.	103
Abb. 27: Sequenzvergleich von hRBP34 mit den P35-Homologen <i>AcP35</i> , <i>BmP35</i> , <i>SlP49</i> .	106
Abb. 28: Extrakte von mit humanem RBP34 und Kontrolle transfizierten 293T-Zellen.	107
Abb. 29: Multimerisierungswahrscheinlichkeit von RBP34.	109
Abb. 30: Struktur von <i>AcP35</i> .	124
Abb. 31: Elektronenmikroskopie eines mit Anti-P35-Antiserum gefärbten Mitochondrions.	125
Abb. 32: Schematische Darstellung von RBP34.	126

1 EINLEITUNG

Diese Arbeit untersucht verschiedene Aspekte der Apoptose, einer Form des physiologischen Zelltods. Sie ist in drei Teile gegliedert. In den ersten beiden Teilen wurden zunächst mit Komplexbildung, Nukleotidbindung und subzellulärer Lokalisation molekulare Eigenschaften des Proteins CED-4 aus dem Apoptose-Signalweg des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* untersucht, sowie mit den Histonen H2B, H3 und H4 zelluläre Interaktionspartner von CED-4 identifiziert. Der letzte Teil begann mit der Kreuzreaktion eines gegen den baculoviralen Apoptoseinhibitor *AcP35* gerichteten Antiserums mit einem menschlichen Protein. Bei der Identifizierung dieses Proteins wurde das als „Ribosomen-bindend“ beschriebene Protein RBP34 gefunden.

1.1 Was ist Apoptose?

Apoptose ist eine physiologische Form des Zelltods, bei der nicht mehr benötigte Zellen durch ein nahezu invariantes Programm, das in jeder kernhaltigen Zelle vorhanden ist, beseitigt werden. Apoptose kommt in allen mehrzelligen tierischen Organismen (= Metazoa) vor (Thornberry *et al.*, 1998), möglicherweise auch im Pflanzenreich. Sie wurde in so entfernt verwandten Spezies wie *Hydra vulgaris* (Stamm: Cnidaria (Nesseltiere) Klasse: Hydrozoa; Cikala *et al.*, 1999), *Caenorhabditis elegans* (Stamm: Aschelminthes, Klasse: Nematoda [Fadenwürmer]), *Drosophila melanogaster* (Insekten; Übersichtsartikel: Richardson *et al.*, 2002) und höheren Organismen (Mensch, Maus...) nachgewiesen.

Apoptose dient der Beseitigung nicht mehr benötigter oder gefährlicher, z.B. mikrobiell infizierter Zellen, entweder während der Ontogenese (dann als „programmierter Zelltod“ (PCD) bezeichnet; der Begriff wurde von Lockshin & Williams (1965) geprägt), zur Gewebshomöostase beim erwachsenen Organismus oder zur Abwehr von Krankheitserregern. Während der Individualentwicklung entstehen bedeutend mehr Zellen und Gewebe als letztlich benötigt werden, wie zum Beispiel das Interdigitalgewebe, das bei der Entwicklung der Hand des Embryos als sogenannte „Schwimmhäute“ zwischen den Fingern entsteht und erst in einem späteren Entwicklungsschritt durch Apoptose beseitigt wird. Die Bezeichnung „programmierter

Zelltod“ rührt daher, daß während der Individualentwicklung genetische Programme für den Zelltod verantwortlich sind, durch die festgelegt ist, welche Zellen sterben (Hacker, 2000).

Im erwachsenen Organismus werden ständig neue Zellen gebildet, für die andere, meist ältere Zellen beseitigt werden müssen, um die physiologische Form des Organs bzw. des Organismus aufrechterhalten zu können. Auch wenn dieser Aspekt noch nicht bis ins Detail erforscht ist, erscheint es plausibel, daß viele der ausgedienten, überflüssigen Zellen durch Apoptose entfernt werden. Als Beispiele seien die Haut genannt, für die bereits gezeigt werden konnte, daß alte Zellen durch Apoptose beseitigt werden (Übersicht in Haake *et al.*, 1993), und das Darmepithel, bei dem es inzwischen erste Hinweise gibt, daß Apoptose eine größere Rolle spielt (Morin *et al.*, 1996).

Ebenso kommt der Apoptose bei der Krankheitsabwehr eine große Bedeutung zu, wie im Fall der sogenannten zytotoxischen T-Zellen, die nach spezifischer Erkennung in infizierten Zellen Apoptose auslösen können. Sterben virusinfizierte Zellen durch Apoptose, kann dadurch eine Freisetzung des Erregers in den Organismus verhindert werden, und dem Erreger wird mit dem Zellapparat die Grundlage seiner Vermehrung entzogen. Auch bei der Funktion des adaptiven Immunsystems spielt Apoptose eine gewichtige Rolle, z.B. bei der Reduktion expandierter T-Zell-Klone nach der Bekämpfung eines Erregers auf ein normales Maß („Aktivierungs-induzierter Zelltod“). Hierzu ist ebenfalls Apoptose notwendig (Übersicht über den aktivierungs-induzierten Zelltod bei Budd, 2001).

Eine Dysfunktion der Apoptose kann zu Erkrankungen wie Krebs, Neurodegeneration oder Autoimmunerkrankungen, z.B. durch das Überleben selbstreaktiver T-Zellen, führen, da Apoptose als (fehlgeleitete) „Abwehr“ gegen schädliche oder veränderte Zellen stattfindet (Thompson, 1995).

Der erste Bericht über eine natürliche Form des Zelltods ist bereits vor mehr als 150 Jahren, im Jahr 1842, erschienen. Er beruht auf den Beobachtungen von Carl Vogt an Knorpelzellen der Geburtshelferkröte und beschreibt, daß Zellen während der Individualentwicklung verschwinden. Daraus schloß er, daß sie auf eine natürliche Art und Weise sterben müssen (Vogt, 1842, Clarke *et al.*, 1995). Der Begriff „Apoptose“ wurde jedoch erst 1972 von Kerr, Wyllie, Currie und Cormack geprägt. Dabei handelt es sich um ein Kunstwort aus dem Altgriechischen, welches das „Abfallen“ von Blütenblättern oder Blättern vom Baum beschreibt (Kerr *et al.*, 1972). Die Autoren prägten diesen Begriff, nachdem ihnen aufgefallen war, daß das Absterben verschiedener Zellen und Geweben in unterschiedlichen Situationen – diese Ergebnisse waren zuvor von verschiedenen anderen Autoren in ihren Veröffentlichungen beschrieben worden –

immer die gleichen morphologischen Erscheinungen hervorruft. Sie schlossen daraus, daß es sich um einen einzigen Signalweg handeln muß. Denn obwohl die auslösenden Stimuli sehr unterschiedlicher Natur sein können – Rezeptorsignale, intrazelluläre Virusinfektionen, Zellstreß, Wachstumsfaktormangel, falsch gefaltete Proteine, Hitze, Oxidation und vieles mehr – führt Apoptose immer zum gleichen morphologischen Resultat, der sogenannten klassischen Apoptose-Morphologie. Dazu zählen die Separation der Zelle vom Zellverband, das Schrumpfen mit Blasenbildung, die Zellfragmentierung durch Bildung von membranumschlossenen Vesikeln, den sogenannten apoptotischen Körperchen („apoptotic bodies“), sowie die Chromatin-Kondensierung an der Kernmembran (Kerr *et al.*, 1972). Im Zellverband folgt die schnelle Phagozytose der apoptotischen Körperchen, entweder durch Nachbarzellen oder durch professionelle Phagozyten wie Makrophagen (Abb. 1). Apoptose führt dazu, daß die sterbende Zelle aufgeteilt und in Vesikel verpackt wird, so daß sie problemlos phagozytiert und dadurch „sauber“ beseitigt werden kann (Übersicht in Savill *et al.*, 2000). Dieser Prozeß wird meistens durch eine DNA-Fragmentierung begleitet (Wyllie, 1980, Übersicht über die Morphologie in Hacker, 2000).

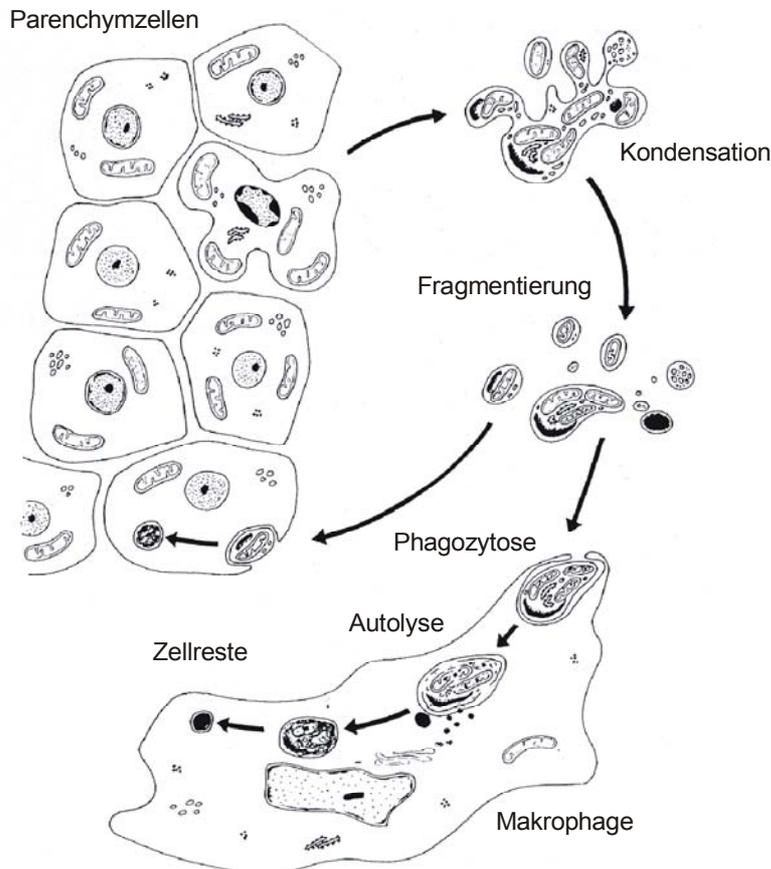


Abb. 1: Schematische Darstellung des Ablaufs der Apoptose.

Eine Parenchymzelle separiert sich aus dem Zellverband, die Zelle beginnt zu „kochen“, das Chromatin kondensiert, es werden membranumschlossene Vesikel (auch „apoptotische Körperchen“ genannt) abgeschnürt. Die fragmentierte Zelle wird von ihren Nachbarzellen oder professionellen Phagozyten (z.B. Makrophagen) phagozytiert (nach Kerr *et al.*, 1972).

Neben der Apoptose gibt es eine weitere Form des Zelltods, die Nekrose. Hierbei sterben die Zellen nicht aktiv aufgrund eines physiologischen Signalwegs, der induziert wird oder vorprogrammiert ist, sondern passiv z.B. in Folge einer starken Verletzung der Zelle oder des Gewebes. Im Gegensatz zur Apoptose führt die Nekrose nur zu einem sehr langsamen Abbau der Zelle ohne die typischen Anzeichen von Apoptose (Hacker, 2000). Eine praxisorientierte Definition der Nekrose läßt sich folgendermaßen fassen: Nekrose ist gekennzeichnet durch einen Verlust der Zellmembran-Integrität, ohne daß die charakteristische Apoptose-Morphologie auftritt.

1.2 *Caenorhabditis elegans*: Modellorganismus der Apoptoseforschung

Die ersten Hinweise auf eine genetische Grundlage der Apoptose kamen von *C. elegans*, in dem die Kernelemente der „Zelltodmaschinerie“ identifiziert wurden (Metzstein *et al.*, 1998). Dieser Fadenwurm zeichnet sich durch seine invariante Entwicklung aus, d.h. seine Ontogenese verläuft immer nach demselben Entwicklungsplan. Bei *C. elegans* gibt es zwei verschiedene Geschlechter, Männchen und Hermaphroditen, die sich in der Zellzahl unterscheiden: Bei der Entwicklung eines Hermaphroditen entstehen 1090 Zellen, von denen exakt 131 während der weiteren Entwicklung sterben, während in männlichen Tieren von 1178 entstandenen Zellen genau 147 sterben. Die Entwicklung jeder entstandenen Zelle – wozu sie sich entwickelt und ob sie stirbt – ist dabei präzise vorhersagbar. Dadurch verfestigte sich die Idee vom „programmierten Zelltod“, der sehr genau „geplant“ (genetisch verankert) und reguliert und demnach physiologisch vorgesehen ist (Übersichtsartikel: Gumienny *et al.*, 2001, Meier *et al.*, 2000).

Systematische Genmutationsanalysen führten zur Entdeckung einer Reihe von Genen, die den Ablauf des programmierten Zelltods beeinflussen, und die mit der Bezeichnung *ced* für „cell death abnormal“ versehen wurden (Ellis *et al.*, 1986). Diese Gene kodieren für Proteine, die neben dem Apoptose-Signalweg auch weitere Vorgänge im Zusammenhang mit dem Zelltod regulieren, wie die Phagozytose der apoptotischen Zellen. Die ersten Gene, deren Funktion direkt mit dem Zelltod in Verbindung gebracht werden konnten, waren *ced-3* und *ced-4* (Conradt *et al.*, 1998). Ein weiteres Gen wird für den Ablauf des somatischen PCD benötigt: *egl-1* („egg laying defective“, Conradt & Horvitz, 1998). Neben diesen drei proapoptotischen Genen, die notwendig sind, damit somatischer PCD stattfindet, gibt es ein Gen, das den PCD unterdrückt: *ced-9* (Hengartner *et al.*, 1992). Die Erforschung dieser Gene führte zur Identifizierung ihrer Funktionen und zur Konstruktion des Apoptose-Signaltransduktionswegs bei *C. elegans*. Im folgenden zeigte sich, daß homologe Gene in anderen Organismen innerhalb der Metazoa existieren (u.a. in Säugetieren) und daß sie dort ebenfalls – wenn auch nicht ausschließlich – dem

Zelltod dienen (Metzstein *et al.*, 1998). Die starke Konservierung der beteiligten Gene zwischen den verschiedenen Arten weist dabei auf deren große Bedeutung hin.

Der Weg von der Identifikation der am Zelltod beteiligten Gene bis zur Aufklärung der biochemischen Funktion ihrer Genprodukte war weit. Unser heutiges Wissen erlaubt eine Unterteilung der Apoptose in zwei Abschnitte: Zum einen in den sogenannten exekutiven Signaltransduktionsweg, der immer gleich verläuft, und zum anderen in die unterschiedlichen Aktivierungswege, die durch verschiedene Auslöser induziert werden. Im Gegensatz zum exekutiven Signalweg sind letztere noch überwiegend ungeklärt. Auf sie soll im Kapitel über Apoptose bei Säugetieren eingegangen werden. Die am exekutiven Apoptose-Signalweg beteiligten Proteine lassen sich speziesübergreifend in drei übergeordnete Gruppen einteilen:

- a) Caspasen sind eine evolutionär hoch konservierte Klasse von Cystein-Proteasen. Sie schneiden ihr Substrat nach einem Aspartatrest¹. Dieser Aspartatrest sitzt an der letzten Position der spezifischen Erkennungssequenz, die vier Aminosäuren umfaßt. Hinter der Erkennungssequenz erfolgt die Substratspaltung. Sie sind als proteolytisch inaktive Vorläufermoleküle (Procaspasen) vorhanden und werden im Verlauf des Apoptose-Signalwegs gespalten und aktiviert. Einmal aktiviert, schneiden sie entweder weitere Procaspasen (s.u.) oder verschiedene zelluläre Substrate, wie Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), DNA-Fragmentierungsfaktor 45 (DFF45/ICAD), Gelsolin, Fodrin, die Lamine A und B und weitere Proteine (aktuelle Übersicht in Fischer *et al.*, 2003). Dadurch wird der eigentliche „Abbau“ der Zelle eingeleitet, der das typische morphologische Erscheinungsbild zur Folge hat.
- b) Adapterproteine binden an Procaspasen und führen durch ihre Oligomerisierungsfähigkeit zur Bildung großer Komplexe aus Adapter, Procaspase und z.T. weiteren Proteinen. In diesen Komplexen findet die Prozessierung der Caspasen statt. Nach der Hypothese der „induzierten Nähe“ haben manche Zymogene bereits eine geringe katalytische Aktivität, so daß sie sich durch die hohe Konzentration der Procaspasen-Moleküle im Komplex gegenseitig prozessieren und dadurch aktivieren können (Übersicht über induzierte Nähe bei Salvesen *et al.*, 1999). Die Interaktion zwischen Adapter und Procaspase findet über zwei strukturell ähnliche Bindungsdomänen statt: entweder über sogenannte Caspasenrekrutierungsdomänen (CARD) oder über Todeseffektordomänen („death effector domains“, DED). Die CARD dient der Heterodimerisierung von Proteinen. Dabei können jeweils zwei CARD miteinander interagieren. Proteine mit CARD,

¹ Daher leitet sich auch der Name „Caspasen“ ab: „Cystein Aspartat-spezifische Proteasen“

die Heterodimere bilden können, sind beispielsweise CED-4 und Pro-CED-3 sowie beim Säugetier Apaf-1 und Procaspase-9. Eine vergleichbare Funktion hat die sogenannte DED. Proteine, die über ihre DED miteinander interagieren können, sind z.B. der Adapter FADD und Procaspase-8 bzw. -10 beim Säuger.

- c) Regulatorische Proteine gehören häufig zur Bcl-2-Familie. Anhand ihrer Funktion können sie zunächst in zwei Klassen geteilt werden: pro- oder antiapoptotisch. Die Mitglieder der Bcl-2-Familie zeichnen sich durch konservierte sogenannte Bcl-2-Homologie-(„BH“)-Domänen aus. Über diese Domänen sind die Proteine in der Lage, mit anderen Bcl-2-Familien-Proteinen zu interagieren. Alle antiapoptotischen Bcl-2-Proteine besitzen immer die Domänen BH1 und BH2, manche auch BH3 und BH4. Die proapoptotischen Bcl-2-Proteine lassen sich in zwei Untergruppen unterteilen. Im Gegensatz zur ersten Gruppe proapoptotischer Proteine, der sogenannten Bax/Bak-Gruppe, welche die BH-Domänen 1-3 besitzen, zeichnen sich die sogenannten BH3-Proteine („BH3-only“) dadurch aus, daß sie nur die BH3-Domäne besitzen (Übersicht in Kaufmann *et al.*, 2001).

Von höheren Tieren unterscheidet sich der Fadenwurm *C. elegans* dadurch, daß bei ihm, soweit bekannt, nur wenige Proteine, die zudem einen linearen Exekutionsweg bilden, an der Apoptose beteiligt sind. Bei höheren Tieren tritt eine deutlich gesteigerte Komplexität und funktionelle Aufspaltung ein. Bei *Drosophila* wurden sieben Caspasen identifiziert (Richardson & Kumar, 2002). Bei Säugern wurden bis jetzt allein 14 Caspasen benannt, von denen sieben Caspasen (Caspase-2, -3, -6 bis -10) der Apoptose zugerechnet werden. Drei Caspasen (Caspase-1, -4, -5) dienen wahrscheinlich der Aktivierung proinflammatorischer Cytokine (Denault *et al.*, 2002); die Bedeutung der restlichen Caspasen (Caspase-11, -12, -13, -14) wird diskutiert. Die Gesamtzahl der Caspasen bei den untersuchten Säugetieren schwankt. Zur humanen Caspasenfamilie gehören derzeit elf Mitglieder (Denault & Salvesen, 2002). Eventuell handelt es sich bei den humanen Caspase-4 und -5 um Orthologe der murinen Caspase-11 und/oder -12 (Denault & Salvesen, 2002), wohingegen die Maus Caspase-4 und -5 nicht besitzt, ebenso wenig Caspase-10 (Thornberry & Lazebnik, 1998). Das Caspase-12-Gen ist beim Menschen vorhanden, es enthält jedoch mit einer Leserahmenverschiebung und einem vorzeitigen Stoppcodon mehrere Mutationen, die eine Proteinexpression vorzeitig abbrechen lassen (Fischer *et al.*, 2002). Auch Caspase-13 scheint beim Menschen nicht zu existieren. Caspase-14 ist möglicherweise in die Differenzierung von Keratinozyten involviert (Denault & Salvesen, 2002; Abb. 3).

Besonders groß ist die Vielfalt bei höheren Tieren auch unter den regulatorischen Proteine der Bcl-2-Familie, wodurch sich die starke evolutionäre Auffächerung zur Anpassung an verschiedene Auslöser und Funktionen bei Säugetiere ablesen läßt. Aufgrund der geringeren Komplexität wurden die ersten Modelle des Zelltod-Signalwegs deshalb durch Forschung an *C. elegans* ermittelt.

1.3 Molekulare Grundlagen der Apoptose bei *C. elegans*

CED-3 ist die einzige am PCD beteiligte Caspase in *C. elegans*. Ihr Verlust führt dazu, daß fast alle Zellen, die normalerweise während der Ontogenese sterben, überleben. (Conradt & Horvitz, 1998). Drei weitere Caspasen wurden beschrieben, CSP-1, CSP-2 und CSP-3, aber ihre Bedeutung für den Zelltod ist ungeklärt (Shaham, 1998). CED-3 war die erste Caspase überhaupt, die mit dem Zelltod in Verbindung gebracht werden konnte (Yuan *et al.*, 1993). Wie andere Caspasen liegt sie als inaktive Procaspase im Cytoplasma vor. Das antiapoptotisch wirkende Regulatorprotein CED-9 gehört zur Bcl-2-Familie. Es weist einen hydrophoben C-Terminus auf, der für eine Verankerung an Mitochondrien und anderen intrazellulären Membranen sorgt (Wu *et al.*, 1997a). In einer Reihe von Studien wurde erarbeitet, daß CED-4 als Bindeglied (= Adapterprotein) zwischen CED-3 und CED-9 fungiert (Chinnaiyan *et al.*, 1997a + b, Seshagiri *et al.*, 1997, Wu *et al.*, 1997b). In Abwesenheit eines Apoptosestimulus bindet CED-4 an CED-9 und wird dadurch an Membranen sequestriert (Wu *et al.*, 1997b). Da CED-4 neben CED-9 gleichzeitig CED-3 binden kann, ist davon auszugehen, daß vor Auslösen der Apoptose bereits CED-3-Moleküle an CED-4 gebunden haben (Liu *et al.*, 1999).

EGL-1 wirkt proapoptotisch und zählt zu den BH3-Proteinen der Bcl-2-Familie (Conradt & Horvitz, 1998). EGL-1 wird nach einem Stimulus zur Apoptose neu synthetisiert (Conradt *et al.*, 1999) und verdrängt CED-4 aus seiner Bindung an CED-9 (del Peso *et al.*, 1998). Einmal ins Cytoplasma freigesetzt, kann CED-4 mit anderen CED-4-Molekülen oligomerisieren und dadurch Komplexe bilden, in denen Pro-CED-3 prozessiert und aktiviert wird (Yang *et al.*, 1998; Abb. 2). Dabei wird für den Prozeß der CED-3-Aktivierung durch CED-4 ATP benötigt (Chinnaiyan *et al.*, 1997a; Übersichtsartikel: Meier *et al.*, 2000).

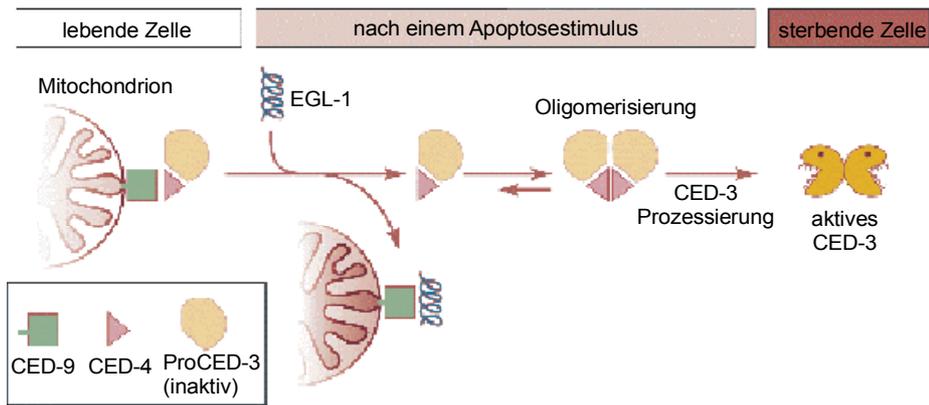


Abb. 2: Apoptose bei *C. elegans*.

In lebenden Zellen wird CED-4 (wahrscheinlich zusammen mit der Proform von CED-3) durch CED-9 an Membranen (z.B. von Mitochondrien) sequestriert. Nach einem Apoptosestimulus wird EGL-1 neu translatiert und verdrängt den Komplex aus CED-4 und CED-3 von CED-9. Einmal freigesetzt, kann CED-4 oligomerisieren; es kommt zur Bildung eines Aktivierungskomplexes. Nach der Theorie der „induzierten Nähe“ wird Pro-CED-3 autokatalytisch aktiviert; dabei entsteht die aktive Caspase CED-3 (nach Hengartner, 1998).

1.4 Apoptose-Signaltransduktionswege bei Säugetieren

Abgesehen von den Unterschieden, die in der Komplexität der Apoptosewege zwischen *C. elegans* und den Säugern bestehen, gibt es auch Unterschiede in ihrer Aktivierbarkeit. Ist bei *C. elegans* nur eine Rolle des physiologischen Zelltod in Form des PCD während der Ontogenese beschrieben worden, existiert bei höheren Tieren ein sehr weites Spektrum an Apoptoseauslösenden Stimuli. Dies steht in einem engen Zusammenhang mit bereits erwähnten erhöhten Komplexität, da nur eine große Komplexität eine adäquate Reaktion auf unterschiedlichste Stimuli erlaubt, die aus den verschiedenen Zellkompartimenten und von außerhalb der Zelle kommen.

1.4.1 Der zweigeteilte exekutive Signalweg

Wie bereits beschrieben, umfaßt der nahezu invariante exekutive Signaltransduktionsweg die Aktivierung von Caspasen, ihre Adapterproteine sowie die Regulation durch pro- und antiapoptotische Proteine. Dennoch läßt sich bei Säugetieren in Abhängigkeit des auslösenden Stimulus und der Zellart die Beteiligung unterschiedlicher Moleküle am exekutiven Signalweg feststellen. Deshalb wird die Apoptose häufig in zwei distinkte Signalwege unterteilt, den

extrinsischen und den intrinsischen Weg, die jedoch in ein gemeinsames Ende münden. Beim extrinsischen, rezeptorvermittelten Weg wird der Apoptosestimulus von außen über sogenannte Todesrezeptoren vermittelt und verläuft unter Beteiligung von Caspase-8. Im Gegensatz dazu dienen beim intrinsischen, mitochondrialen Weg verschiedene relativ schlecht definierte Faktoren, die als Zellstreß verursachend gelten, als Auslöser. Dabei kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und einer Aktivierung von Caspase-9. Sowohl Caspase-8 als auch Caspase-9 aktivieren Caspase-3, so daß der weitere Verlauf identisch ist. Es gibt eine Querverbindung zwischen beiden Wegen, die über das BH3-Protein Bid verläuft; sie wird im Abschnitt über Bcl-2-Proteine näher erläutert (Abb. 4). Da die Geschehnisse oberhalb des mitochondrialen Wegs noch nicht endgültig verstanden sind, bleibt offen, ob es sich bei ihm tatsächlich um einen eigenständigen Weg handelt, oder ob er nicht eine Verstärkungsschleife für den rezeptorvermittelten Weg darstellt. Es ist denkbar, daß dies in verschiedene Zelltypen und abhängig vom Stimulus unterschiedlich reguliert wird.

1.4.2 Caspasen: Initiator- und Effektorcaspasen

Wie CED-3 bei *C. elegans* liegen bei Säugetieren die sieben mit Apoptose im Verbindung gebrachten Caspasen (Caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9, beim Menschen auch Caspase-10) als inaktive Zymogene im Cytoplasma vor. Sie sind 30 kDa bis 50 kDa groß und bestehen aus einer regulatorischen Prodomäne am N-Terminus und einer katalytischen Domäne am C-Terminus, die eine große (ca. 20 kDa), und eine kleine Untereinheit (ca. 10 kDa) umfaßt. Die Prodomäne wird bei der Prozessierung zur reifen Caspase abgespalten. Ebenso erfolgt eine Spaltung zwischen den katalytischen Untereinheiten, die zusammen als Heterodimer ein katalytisches Zentrum bilden. Die Zusammenlagerung von zwei solchen Heterodimeren ergibt die aktive Caspase. Wie bereits erwähnt, erfolgt die Spaltung an konservierten Caspasen-Konsensussequenzen. Diese sind durch eine aus einem Tetrapeptid bestehende Erkennungssequenz gekennzeichnet, die N-terminal vor der Schnittstelle liegt. (Thornberry & Lazebnik, 1998). Dabei erfolgt die Spaltung immer hinter einem Aspartatrest (P₁), der zusammen mit den drei davor liegenden Aminosäuren (P₂-P₄) das Erkennungstetrapeptid bildet (Übersicht über die Caspasenaktivierung in Cain *et al.*, 2002).

Bei Vertebraten lassen sich Caspasen in zwei Gruppen unterteilen: Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen. Zu den Initiatorcaspasen gehören Caspase-8, -9 und -10, zu den Effektorcaspasen Caspase-3, -6 und -7. Die genaue Eingliederung von Caspase-2 in den Apoptoseweg wird noch diskutiert. Initiatorcaspasen stehen am Anfang der Signalkaskade. Sie werden in großen Akti-

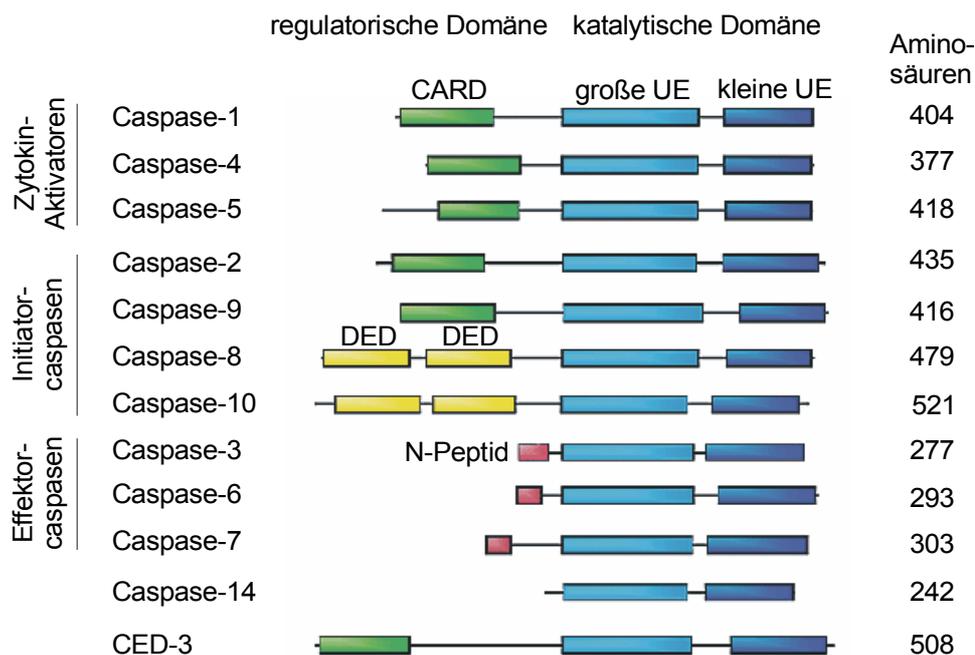


Abb. 3: Übersicht über die Familie der Caspasen.

Die Caspasenfamilie umfasst beim Menschen derzeit elf Mitglieder. Es gibt Cytokin-aktivierende Caspasen und dem Zelltod zugerechnete Caspasen, die in Initiator- und Effektorcaspasen unterschieden werden. Die Stellung von Caspase-14 ist noch nicht geklärt. Als Zymogene besitzen Caspasen eine regulatorische Prodomäne und eine katalytische Domäne, die eine große und eine kleine Untereinheit umfaßt. Diese lagern sich nach der Prozessierung zum Heterodimer zusammen und bilden ein katalytisches Zentrum. Die Prodomäne wird bei der Prozessierung abgespalten. Es lassen sich lange und kurze Prodomänen unterscheiden: Lange Prodomänen umfassen entweder eine Caspasenrekrutierungsdomäne (CARD) oder zwei Todeseffektor-domänen (DED). Die Funktion des sogenannten N-Peptids der Effektorcaspasen ist bislang ungeklärt. Die einzige am programmierten Zelltod bei *C. elegans* beteiligte Caspase, CED-3, kann aufgrund ihrer langen regulatorischen Prodomäne ebenfalls in die Gruppe der Initiatorcaspasen gestellt werden. Im Signalweg erfüllt sie jedoch die Funktion sowohl einer Effektor- als auch einer Initiatorcaspase (nach Denault *et al.*, 2002).

vierungskomplexen mit Hilfe ihrer Adapterproteine aktiviert. Die Aktivierung verläuft wahrscheinlich durch die oben beschriebene „induzierte Nähe“, also dadurch, daß die hohe Konzentration an Procaspasen-Molekülen in den Aktivierungskomplexen zu einer Autoaktivierung führt. Initiator-Procaspasen zeichnen sich durch ihre lange Prodomäne aus. Sie dient als Interaktionsdomäne für die Zusammenlagerung der Apoptosom-Komplexe und umfaßt entweder eine CARD (Caspase-9) oder zwei DED (Caspase-8, -10), über die sie mit ihren Adapterproteinen (Apaf-1, FADD) interagieren können (Abb.3 und 4; Übersicht über Caspasen in Denault & Salvesen, 2002).

Neuere Untersuchungen deuten an, daß für die Aktivierung von Initiatorcaspasen nicht die Spaltung der wichtigste Schritt ist, sondern die Dimerisierung zweier p10/p20-Heterodimere (Boatright *et al.*, 2003). Die Autoren zeigen, daß monomere Caspasen inaktiv und nur dimerisierte Caspasen aktiv sind. Dabei können auch ungeschnittene Caspasen Aktivität zeigen, wenn sie dimerisiert oder ins Holoenzym (Apoptosom) gebunden sind. Die Spaltung dient möglicherweise nur der Stabilisierung der Dimere (Acehan *et al.*, 2002).

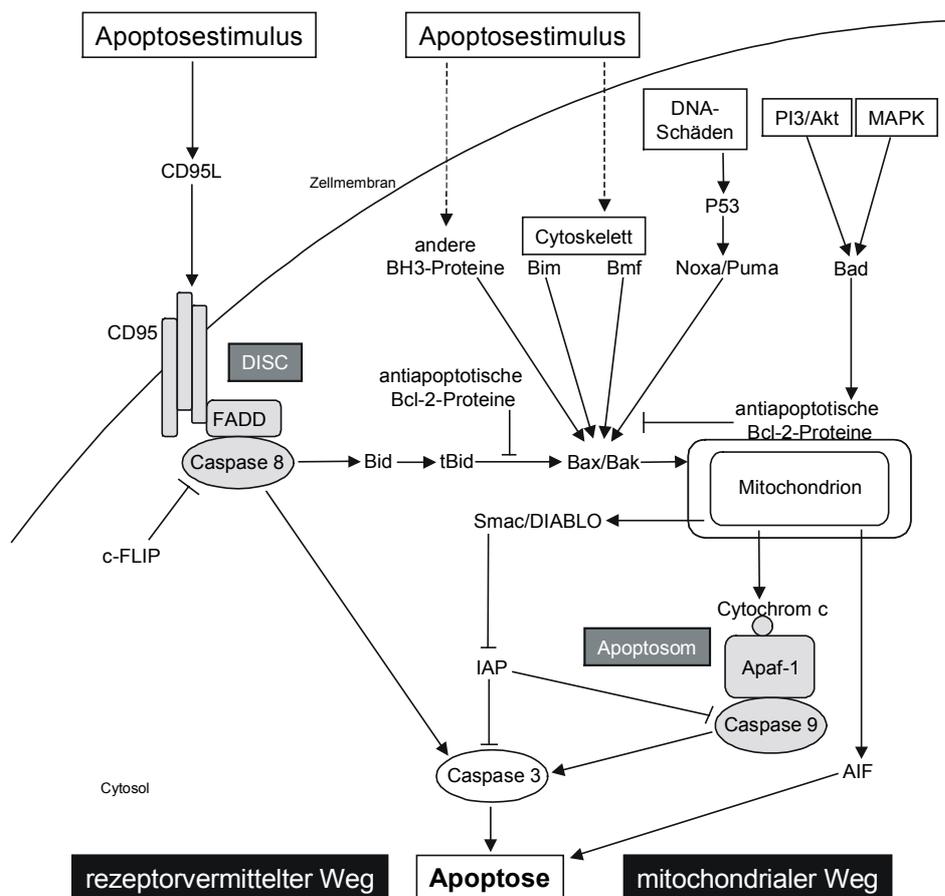


Abb. 4: Die zwei verschiedenen Apoptosewege des Säugetieres.

Es kann ein rezeptorvermittelter Signalweg (über CD95, FADD und Caspase-8) und ein mitochondrialer Signalweg (über die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, Apaf-1 und Caspase-9) unterschieden werden, die jedoch beide mit der Aktivierung von Caspase-3 enden und über das BH3-Protein Bid verbunden sind. Während der Weg über CD95 gut untersucht ist, sind im mitochondrialen Weg vor allem oberhalb der Mitochondrien (Regulation durch die Bcl-2-Proteinfamilie) viele Details ungeklärt. Genauere Information über die dargestellten Proteine und Abfolgen sind im Text zu finden.

PI3/Akt = Signalweg über Phosphinositid-3-kinase/Akt, MAPK = Signalweg über Ras/Mitogen-aktivierte Proteinkinasen.

1.4.3 Aktivierungskomplexe: DISC und Apoptosom

Sowohl der mitochondriale als auch der rezeptorvermittelte Weg bedienen sich eines eigenen Aktivierungskomplexes, um Initiatorcaspasen zu aktivieren. Der rezeptorvermittelte, extrinsische Weg wird ausgelöst durch Stimuli von außerhalb der Zelle. Zu diesen Stimuli gehören verschiedene Liganden, deren Signal über Todesrezeptoren an die Zelle vermittelt wird. Die am besten charakterisierten Todesrezeptoren sind CD95 (Fas/Apo-1) und TNF-Rezeptor 1, außerdem zählen der TRAIL-Rezeptor und die Todesrezeptoren 3 bis 5 (DR3, DR4, DR5) zur Todesrezeptorenfamilie. Sie alle zeichnen sich durch eine extrazelluläre Domäne, eine Transmembranregion und einen cytoplasmatischen C-Terminus aus. Über die extrazelluläre Domäne können sie mit ihren spezifischen Liganden interagieren; der intrazelluläre Teil enthält eine sogenannte Todesdomäne („death domain“, DD), die eine Interaktion der Rezeptoren mit den Adapterproteinen ermöglicht.

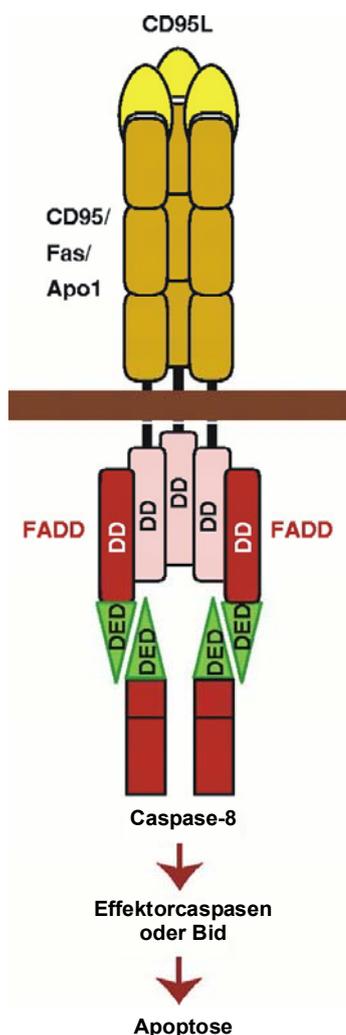


Abb. 5: Rezeptorvermittelte Apoptose: Der Signalweg über CD95.

Ein trimeres CD95L-Molekül bindet an CD95 und führt eine Rezeptortrimerisierung herbei. Dies löst die Bildung eines DISC („death inducing signalling complex“) genannten Aktivierungskomplexes aus. Dabei kommt zu einer DD-vermittelten Interaktion von CD95 mit dem Adaptermolekül FADD. FADD interagiert weiterhin über die DED mit Procaspase-8. Die Prozessierung von Procaspase-8 findet nach der Theorie der „induzierten Nähe“ autokatalytisch (über die hohe Konzentration der Procaspasenmoleküle im Komplex vermittelt) statt. Aktive Caspase-8 kann Effektorcaspasen (Procaspase-3) oder Bid zu tBidprozessieren und dadurch Apoptose vermitteln (aus Ashkenazi *et al.*, 1998).

DD = Todesdomäne („death domain“)

DED = Todeseffektordomäne („death effektor domain“)

CD95-vermittelte Apoptose wird durch den physiologischen Liganden CD95-Ligand (CD95L) ausgelöst. Die Bindung eines (trimeren) CD95L-Moleküls verursacht eine Rezeptortrimerisierung, welche die Bildung eines Aktivierungskomplexes initiiert. Dazu kann CD95 über seine DD mit dem Adapterprotein FADD interagieren, das (neben einer N-terminalen DED) am C-Terminus ebenfalls eine DD enthält. Beide Proteine bilden einen Komplex, in den auch Procaspase-8 rekrutiert wird, die über ihre DED mit FADD interagiert. Dieser Caspasenaktivierende Komplex wird als DISC („death inducing signalling complex“) bezeichnet. Nach ihrer Aktivierung im DISC kann Caspase-8 entweder direkt die Haupteffektorcaspase, Caspase-3, oder das BH3-Protein Bid zu tBid („trunkiertes Bid“) prozessieren, das über den mitochondrialen Weg ebenfalls zu einer Caspase-3-Aktivierung führt (Abb. 4 und 5). (Übersicht in Krueger *et al.*, 2001, Ashkenazi *et al.*, 1998)

Der intrinsische Weg verläuft unter Einbeziehung der Mitochondrien und ist durch ein breites Spektrum an Stimuli aktivierbar, die häufig unter dem Begriff „Zellstreß“ zusammengefaßt werden. Beispielsweise können UV-Strahlung oder Wachstumsfaktorentzug den mitochondrialen Weg aktivieren, aber auch toxische Stoffe, wie der Kinasehemmer Staurosporin und die meisten chemischen Wirkstoffe, die bereits in subletalen Dosen Apoptose auslösen können, ohne direkt auf Bestandteile des Apoptosewegs wie Caspasen oder Mitochondrien einzuwirken (Vaux, 2002). Durch einen Apoptosestimulus wird die Freisetzung von Cytochrom c, einem Protein der mitochondrialen Elektronentransferkette, aus den Mitochondrien ins Cytoplasma ausgelöst. Dort kann es mit dem Adapter Apaf-1 und Procaspase-9 einen „Apoptosom“ genannten Aktivierungskomplex bilden, in dem die Aktivierung von Caspase-9 initiiert wird, die ihrerseits Caspase-3 proteolytisch aktivieren kann (Abb. 4 und 9; Übersicht über das Apoptosom in Cain *et al.*, 2002).

1.4.4 Regulatoren der Bcl-2-Familie

Anders als bei *C. elegans* interagieren bei Säugetieren die regulatorischen Proteine der Bcl-2-Familie nicht direkt mit den Caspasen-Adapterproteinen. Sie sind stattdessen im Signalweg oberhalb der Mitochondrien angesiedelt und regulieren die Freisetzung von Cytochrom c. Verfügt *C. elegans* mit CED-9 über nur einen antiapoptotischen Regulator und mit EGL-1 über einen einzigen proapoptotischen Regulator, der zur BH3-Gruppe zählt, so existiert bei Säugern in allen drei Bcl-2-Untergruppen – antiapoptotische Proteine, proapoptotische der Bax/Bak-Gruppe und proapoptotische der BH3-Gruppe – eine ganze Reihe verschiedener Vertreter, deren Homologie sich jedoch häufig auf die BH-Domänen (s. 1.2c) beschränkt (Strasser *et al.*, 2000).

a) Antiapoptotische Bcl-2-Proteine

Zur Gruppe antiapoptotischer Regulatoren zählen Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl1, Boo/Diva und NR-13, sowie eine Reihe weiterer weniger gut untersuchter Proteine. Sie weisen immer die Domänen BH1 und BH2, häufig auch BH3 und BH4 auf (Adams *et al.*, 1998; Abb. 6). Die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine sind meist integrale Membranproteine und auf Mitochondrien, endoplasmatischem Retikulum (ER) und der Kernmembran zu finden (Gross *et al.*, 1999). Es wurde gezeigt, daß antiapoptotische Bcl-2-Proteine wie Bcl-2 und Bcl-X_L die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien verhindern können (Kaufmann & Hengartner, 2001, Desagher *et al.*, 1999) und somit eine regulierende Wirkung auf die Freisetzung von Cytochrom c und weiteren Proteinen aus dem Intermembranspalt der Mitochondrien haben. Diese kann nach einem Apoptosestimulus durch eine Interaktion mit proapoptotischen BH3-Proteinen aufgehoben werden, die dadurch die Funktion der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine „neutralisieren“ können. Damit es jedoch zur überhaupt Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien kommen kann, sind bei Säugern die Proteine der Bax/Bak-Gruppe notwendig (Strasser *et al.*, 2000).

b) Proapoptotische Proteine der Bax/Bak Gruppe

Bax und Bak bilden eine nach ihnen benannte Gruppe innerhalb der Bcl-2-Familie, der auch Bok/Mtd angehört. Die Bax/Bak-Gruppe zeichnet sich durch die Domänen BH1 bis BH3 aus (Abb. 6). Bax und Bak zeigen eine weitgehende funktionelle Redundanz, so daß sich erst in Bax^{-/-}Bak^{-/-}-Zellen zeigt, daß beide Moleküle für den mitochondrialen Weg unverzichtbar sind (Wei *et al.*, 2001). So sind diese Zellen unempfindlich gegenüber einer Reihe von typischen Apoptoseauslösern des mitochondrialen Weges, wie UV-Bestrahlung, Wachstumsfaktorentzug und Behandlung mit einer Reihe von Arzneistoffen (z.B. Staurosporin oder dem Topoisomerase II-Inhibitor Etoposid). Auch gegenüber tBid-vermittelter Apoptose, die unter c) erläutert wird, sind sie vollständig unempfindlich.

Für Bax wurde gezeigt, daß verschiedene BH3-Proteine wie tBid und Bim entweder durch direkte Bindung oder auf indirektem Weg eine Konformationsänderung von Bax auslösen können, die dazu führt, daß Bax an die Mitochondrienmembran transloziert, dort inseriert und mit weiteren Bax-Molekülen komplexiert (Desagher *et al.*, 1999). Dies führt über einen bislang kontrovers diskutierten Mechanismus zur Freisetzung von Cytochrom c und damit zur Apoptose (Übersicht bei Newmeyer *et al.*, 2003).

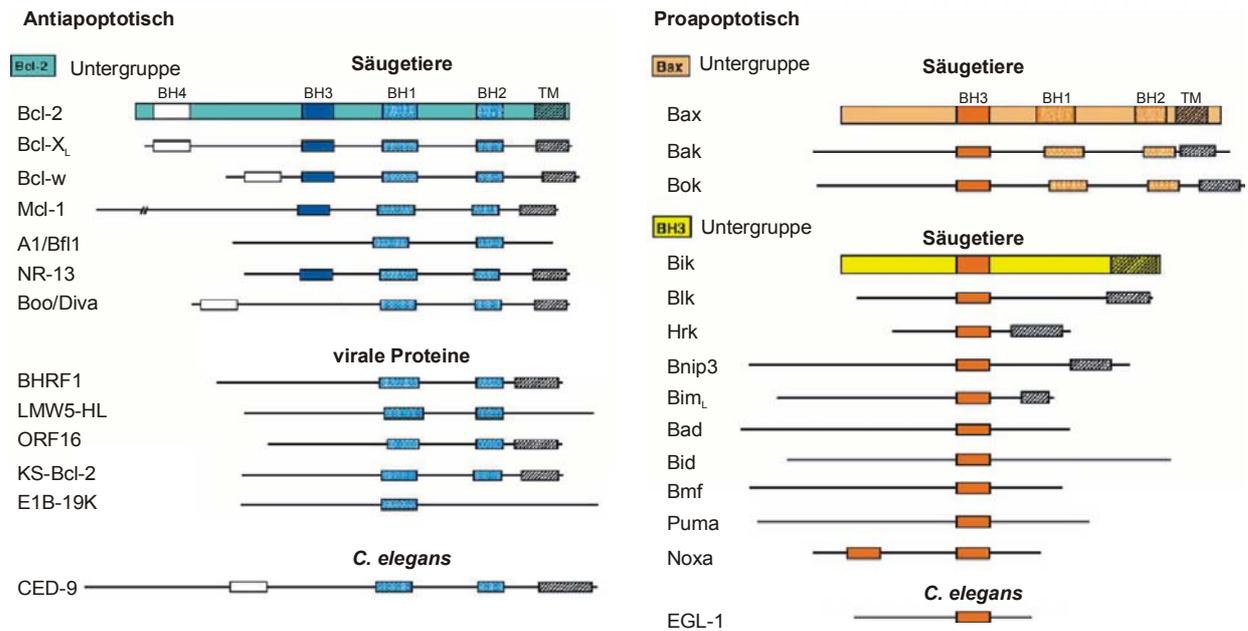


Abb. 6: Die Bcl-2-Proteinfamilie.

Die Bcl-2-Familie läßt sich nach Funktion (anti- und proapoptotisch) und Aufbau (BH-Domänen 1-4) in drei Untergruppen gliedern. Die Bcl-2-Gruppe weist immer die Domänen BH1 und BH2 auf, häufig auch BH3 und BH4. Die proapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder hingegen besitzen nie eine BH4-Domäne. Die Bax/Bak-Gruppe weist die Domänen BH1-BH3 auf, die dritte Gruppe, die BH3-Proteine, weist nur die BH3-Domäne auf. Die Funktionen der Gruppen und einzelner Proteine sind im Text beschrieben (verändert nach Adams *et al.*, 1998).

BH1-4 = "Bcl-2-Homologie" Domänen
 TM = Transmembrandomäne

c) Proapoptotische BH3-Proteine

In der BH3-Gruppe zeigt sich eine besonders auffällige Vielfalt: Neben den am besten charakterisierten Mitgliedern Bim, Bid, Bad, Bmf, Noxa und Puma sind mit Bik, Blk, Hrk, Bnip3 und Nix weitere Proteine beschrieben worden (Kaufmann & Hengartner, 2001). Sie weisen ausschließlich die Domäne BH3 auf (Abb. 6). Die proapoptotisch wirkenden BH3-Proteine sind als „Wachposten“ gegen Zellschäden anzusehen, die auf spezifische Apoptosestimuli hin aktiviert werden und das Signal an die Proteine der Bax/Bak-Gruppe weiterleiten. Alle bisher untersuchten BH3-Proteine führen entweder direkt zur Aktivierung von Bax/Bak, die dann die Freisetzung von Cytochrom c (und anderen Proteinen) aus den Mitochondrien bewirken, oder zur Bindung und „Neutralisierung“ der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine.

Es existiert eine Reihe verschiedener Mechanismen zur Aktivierung oder Inaktivierung von BH3-Proteinen. Wie bereits erwähnt, stellt Bid eine Querverbindung zwischen rezeptorver-

mitteltem und mitochondrialen Weg dar: Bid wird durch Caspase-8 zu tBid prozessiert, dieses bindet an Bax und induziert dessen Konformationsänderung, die zur Insertion von Bax in die Mitochondrienmembran und Oligomerisierung mit weiteren Bax-Molekülen führt (Eskes *et al.*, 2000; Abb. 4).

Bim und Bmf sind an unterschiedliche Bestandteile des Cytoskeletts sequestriert und werden auf spezifische Stimuli freigesetzt. So ist Bim an die leichte Kette LC8 des mit den Mikrotubuli assoziierten Dynein-Motorkomplexes gebunden (Puthalakath *et al.*, 1999) und wird bei Cytokinmangel, durch Ca^{2+} -Flux und vor allem Cytoskelett-schädigende Substanzen wie Taxol ins Cytoplasma freigesetzt und dadurch aktiviert (Bouillet *et al.*, 1999). Auch eine UV-Bestrahlung führt zur Freisetzung von Bim (Puthalakath *et al.*, 2002). Bmf wird ebenfalls durch UV-Bestrahlung aktiviert (Lei *et al.*, 2003). Zusätzlich kann Bmf durch Anoikis, dem Zelltod durch Ablösung aus dem Zellverband, aktiviert werden. Im inaktiven Zustand ist Bmf an die Dynein leichte Kette DLC2 („dynein light chain“) sequestriert, einer Komponente des Myosin V-Motorkomplexes (Puthalakath *et al.*, 2001). Bmf und Bim können durch Jun N-terminale Kinase (JNK), die durch UV-Bestrahlung aktiviert wird, innerhalb ihrer konservierten DLC-Bindungsmotive phosphoryliert werden. Dies legt die Annahme nahe, daß es sich hierbei um eine molekulare Ursache für die Freisetzung vom Cytoskelett ins Cytosol handeln könnte (Lei & Davis, 2003). Gegen diese Annahme sprechen jedoch Ergebnisse von Puthalakath *et al.* (1999), die gezeigt haben, daß Bim zusammen mit der Dyneinkomponente LC8 freigesetzt wird.

Auch Bad kann durch Phosphorylierung reguliert werden. Dabei können Signale der Signaltransduktionswege über Phosphoinositid-3-kinase/Akt und über Ras/Mitogen-aktivierte Proteinkinasen durch Phosphorylierung unterschiedlicher Serinreste an Bad weitergegeben werden. Sie führen dazu, daß Bad die Fähigkeit zur Heterodimerisierung mit antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen verliert und somit inhibiert wird. Andererseits kann Bad durch Calcineurin aktiv dephosphoryliert werden (Wang *et al.*, 1999).

Puma und Noxa werden wie EGL-1 (*C. elegans*) transkriptionell reguliert. Bei irreparablen DNA-Schäden wird – zumindest in Thymocyten und Fibroblasten – die Expression von Noxa und Puma über den Signalweg des zunächst als Tumorsuppressor beschriebenen Transkriptionsfaktors p53, der Apoptose einleiten kann, aktiviert (Puthalakath & Strasser, 2002; Abb. 4).

1.4.5 Andere Regulatoren: c-FLIP, IAP, Smac/DIABLO, AIF

Bei Säugern gibt es weitere Apoptose-regulierende Proteine, die nicht zur Bcl-2-Familie gehören. Die Aktivierung des DISC wird über ein Molekül namens c-FLIP („cellular FLICE

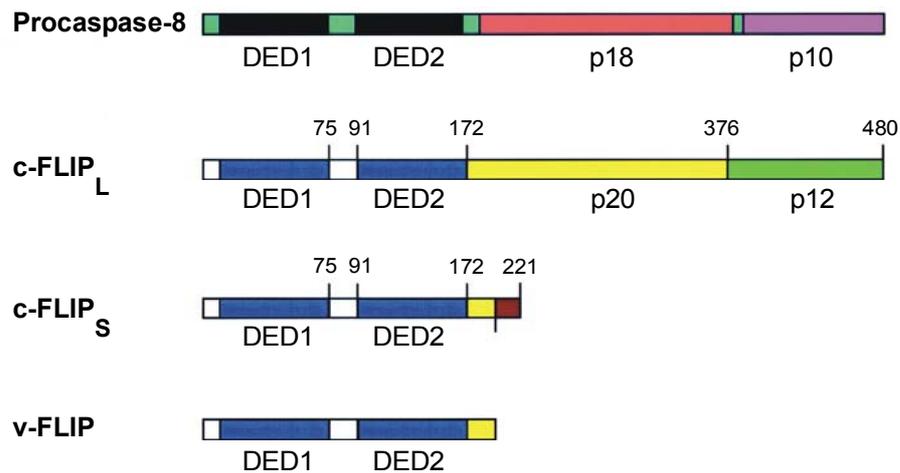


Abb. 7: Homologievergleich zwischen Procaspase-8, zellulärem FLIP und viralem FLIP.

Procaspase-8 und c-FLIP_L sind in Sequenz und Aufbau fast identisch. Beide Proteine haben in ihrer Prodomäne zwei Todeseffektordomänen (DED) und weisen die typischen katalytischen Untereinheiten einer Caspase auf (P18/p10 bzw. p20/p12). Im Gegensatz zu Procaspase-8 sind bei c-FLIP_L wichtige Aminosäurereste des katalytischen Zentrums mutiert, so daß c-FLIP_L als kompetitiver Inhibitor von Caspase 8 wirkt. c-FLIP_S und die viralen Formen v-FLIP bestehen hingegen nur aus den beiden DED. Auch sie können mit Procaspase-8 um die Bindung konkurrieren und dadurch Apoptose hemmen (nach Krueger *et al.*, 2001).

inhibitory protein“; FLICE = Caspase-8) reguliert. Es gibt zwei Spleißvarianten, c-FLIP_S, das zwei DED enthält und dem Adapter FADD ähnelt, und c-FLIP_L, das homolog zu Caspase-8 ist, ohne deren katalytische Funktion zu besitzen, da ihm einige der im aktiven Zentrum kritischen Aminosäurereste fehlen (Abb. 7; Übersicht in Krueger *et al.*, 2001) Sowohl c-FLIP_S als auch c-FLIP_L können wahrscheinlich analog zu Caspase-8 durch Interaktion ihrer DED mit FADD in den DISC rekrutiert werden, wo sie Procaspase-8 verdrängen und so die Aktivierung verhindern (Scaffidi *et al.*, 1999).

Die Wirkung von c-FLIP_L wurde zunächst kontrovers diskutiert, da es in bestimmten Situationen, wie der Überexpression in manchen Säugerzellen, proapoptotisch wirken kann (Goltsev *et al.*, 1997, Shu *et al.*, 1997, Inohara *et al.*, 1997, Han *et al.*, 1997). Die Untersuchungen von Siegel *et al.* (1998) legen jedoch die Vermutung nahe, daß die Überexpression von DED-haltigen Proteinen zu einer nicht-physiologischen Komplexierung führen kann, die eine Aktivierung von Caspasen zur Folge hat.

Mit den IAP-Proteinen („inhibitors of apoptosis“) gibt es eine weitere Gruppe regulatorischer Proteine. Sie sind konstitutiv im Cytoplasma vorhanden und können dort an aktive Caspasen binden und sie dadurch hemmen (Vaux *et al.*, 2003). Dies konnte bisher jedoch *in vitro* nur mit einem sehr hohen Überschuß an IAP erreicht werden (Roy *et al.*, 1997, Deveraux *et al.*, 1997).

Neben Cytochrom c werden während der Apoptose weitere Proteine aus dem Intermembranspalt der Mitochondrien freigesetzt, die eine regulatorische Wirkung haben können. Hierzu zählen Smac/DIABLO (Verhagen *et al.*, 2000, Du *et al.*, 2000) und AIF („apoptosis-inducing factor“, Susin *et al.*, 1996). AIF soll eine Caspasen-unabhängige Form der Apoptose hervorrufen, wohingegen Smac/DIABLO durch die Bindung und Hemmung von IAP Apoptose fördern kann. Die physiologische Relevanz von Smac/DIABLO ist jedoch noch nicht bewiesen. So zeigt eine Smac/DIABLO-defiziente Mausmutante keine Auffälligkeiten (Okada *et al.*, 2002). Auch die Funktion von AIF ist noch nicht endgültig geklärt, da Arnoult *et al.* (2003) kürzlich zeigen konnten, daß zur Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien Caspasenaktivität notwendig ist (Übersicht über AIF in Verhagen *et al.*, 2001, Daugas *et al.*, 2000; Übersicht über Smac/DIABLO bei Verhagen *et al.*, 2002).

1.5 Homologien und Unterschiede zwischen CED-4 und Apaf-1

1.5.1 Die Domänenstruktur von CED-4 und Apaf-1

Apaf-1 ist das einzige bisher bekannte direkte humane Homolog von CED-4. Genau wie dieses dient es als Aktivierungsplattform einer Caspase (Caspase-9), weist aber einige Unterschiede zu CED-4 auf. Apaf-1 hat eine Größe von 1248 AS und ist damit etwa doppelt so groß wie CED-4 mit 549 AS. Die Homologie zwischen beiden Proteinen beschränkt sich auf die N-terminale Hälfte von Apaf-1. Dort besitzen beide Proteine eine CARD (Caspasenrekrutierungsdomäne), die der Interaktion mit anderen CARD-Proteinen (Pro-CED-3 bzw. Procaspase-9) dient, und eine Homooligomerisierungsdomäne, die auch eine Nukleotidbindungsstelle aufweist (mit einem sogenannten Walker A-Motiv („Walker A box“), das die P-Schleife („P-loop“) bildet, und einem Walker B-Motiv [„Walker B box“]) (Lauber *et al.*, 2001). Die C-terminale Hälfte von Apaf-1 hingegen besteht aus bis zu 14 WD40-Domänen, einer Struktur, die Protein-Protein-Interaktionen vermittelt (Abb. 8).

Von beiden Proteinen gibt es mehrere Spleißvarianten, die sich geringfügig unterscheiden. Neben der „normalen“ Form von CED-4, auch CED-4S genannten, ist eine weitere bekannt, CED-4L, die einen Einschub in der Nukleotidbindungsstelle besitzt und antiapoptotisch wirkt (Shaham *et al.*, 1996). Die physiologische Relevanz dieser Isoform ist als eher gering einzuschätzen.

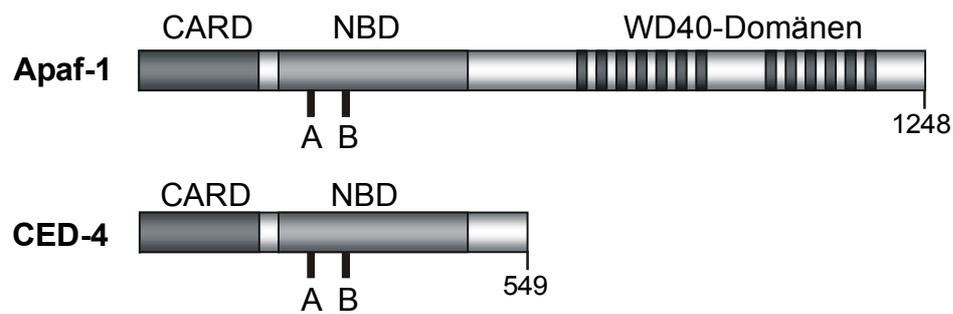


Abb. 8: Schematischer Vergleich von Apaf-1 und CED-4.

In der Abbildung ist die mit 1248 AS längste Isoform Apaf-1XL dargestellt. Die anderen Isoformen unterscheiden sich nur geringfügig. N-terminal weisen sowohl CED-4 als auch Apaf-1 eine Caspasenrekrutierungsdomäne (CARD) und eine Nukleotidbindungsdomäne auf (NBD). Diese enthalten mit einem Walker A- (A) und einem Walker B-Motiv (B) typische Nukleotidbindungs-motive auf. Die C-terminale WD40-Region von Apaf-1 dient der Interaktion mit Cytochrom c. Die Zeichnung zeigt den schematischen, nicht maßstabsgerechten Aufbau beider Proteine.

Von Apaf-1 existieren mindestens vier verschiedene Isoformen – Apaf-1S (1194 AS), Apaf-1LN (1205 AS), Apaf-1LC (1237 AS), Apaf-1XL (1248 AS) – und eine trunke Form, Apaf-1-ALT. Die Nomenklatur der Isoformen ist uneinheitlich und teilweise widersprüchlich (so wurden zwei verschiedene Isoformen als Apaf-1L bezeichnet); die obengenannten Bezeichnungen richten sich nach Benedict *et al.* (2000). Die verschiedenen Isoformen unterscheiden sich in der Länge, aber die funktionalen Domänen – CARD, Nukleotidbindungsstelle und der größte Teil der WD40-Wiederholungsmotive – sind bei allen vorhanden (Hahn *et al.*, 1999). Einzige Ausnahme ist Apaf-1-ALT, das kürzlich von Ogawa *et al.* (2003) entdeckt wurde und eine stark trunke Form von Apaf-1 darstellt. Nur die drei längsten Formen von Apaf-1 können Caspasen aktivieren; sie weisen im Vergleich zu Apaf-1S eine zusätzliche WD40-Domäne auf (Cain *et al.*, 2002). Die physiologische Rolle der einzelnen Isoformen konnte bisher noch nicht gezeigt werden.

1.5.2 Nukleotidbindung und -hydrolyse

Apaf-1 wurde von Zou *et al.* (1997) als einer der drei Faktoren entdeckt, die das humane Apoptosom bilden. Die anderen beiden waren Caspase-9 (Li *et al.*, 1997) und Cytochrom c (Liu *et al.*, 1996). Weiterhin wurde festgestellt, daß *in vitro* nur dann eine Caspasenaktivierung stattfindet, wenn außerdem ATP oder dATP vorhanden ist. Dazu wurde ein zellfreies System etabliert, in dem in isolierten Cytosolen gesunder Zellen durch Zugabe von ATP oder dATP eine Aktivierung von Caspase-3 ausgelöst werden konnte (Liu *et al.*, 1996). Ungewöhnlicherweise

erwies sich die Affinität von Apaf-1 für dATP als wesentlich höher als für ATP. Auch die Funktionalität verschiedener anderer Nukleotide (CTP, dCTP, GTP, dGTP, UTP, dTTP, ADP, AMP, dAMP, cAMP, Adenosin und Deoxyadenosin) wurde getestet, mit dem Ergebnis, daß keines dATP ersetzen konnte (Liu *et al.*, 1996).

Ob bei der Apoptosombildung eine Hydrolyse von dATP bzw. ATP stattfindet oder nicht, wird kontrovers diskutiert. Nachdem zunächst eine Hydrolyse als nachgewiesen galt (Li *et al.*, 1997, Zou *et al.*, 1999, Hu *et al.*, 1998b + 1999, Saleh *et al.*, 1999), wurde dies in einer späteren Veröffentlichung widerrufen (Jiang *et al.*, 2000). Wird dATP/ATP durch nicht-spaltbare ATP-Analoga ersetzt, ergibt sich ebenfalls kein eindeutiges Bild: Nach Zugabe von AMP-PNP (Adenosin 5'-(β,γ -imido)triphosphat) oder ATP- γ -S (Adenosin 5'-[γ -thio]triphosphat) kann keine Caspasenaktivierung festgestellt werden, woraus sich die Schlußfolgerung ergibt, daß Hydrolyse notwendig ist (Li *et al.*, 1997, Zou *et al.*, 1999, Jiang & Wang, 2000). Die Verwendung von ADPCP (β,γ -Methylenadenosin 5'-triphosphat), einem weiteren ATP-Analog, führt hingegen zu einer Caspasenaktivierung (Jiang & Wang, 2000).

Aus der Sequenz von CED-4 ist ersichtlich, daß es wie Apaf-1 eine Nukleotidbindungsstelle besitzt, wobei die starke Konservierung zwischen beiden Proteinen auf die grundlegende funktionelle Bedeutung dieser Domäne hinweist. Chinnaiyan *et al.* (1997a) konnten bereits zeigen, daß zumindest einer der Schritte bei der Aktivierung von CED-3 durch CED-4 – Apoptosombildung oder Caspasenprozessierung – ATP benötigen muß: Wird ATP durch das nicht-spaltbare Analog FSBA (5'-(4-Fluorosulfonylbenzoyl) adenosinhydrochlorid), einem Inhibitor von ATPasen mit P-Schleife, ersetzt, erfolgt keine CED-3-Aktivierung (Chinnaiyan *et al.*, 1997a). Bei welchem Schritt ATP gespalten wird, ist dabei nicht geklärt. Ebenso wenig wurde untersucht, ob CED-4 statt ATP ebenso dATP oder ein anderes Nukleotid binden kann, und welche Affinität es für die unterschiedlichen Nukleotide aufweist.

Die Interaktion von Apaf-1 mit Cytochrom c erfolgt wahrscheinlich über die WD40-Domänen. So führt eine Deletion der WD40-Region in Apaf-1 zu einem konstitutiv aktiven Protein, d.h. das Protein kann spontan oligomerisieren und die Prozessierung von Caspase-9 unabhängig von Cytochrom c und dATP induzieren (Saleh *et al.*, 1999). Da CED-4 diese Domäne nicht besitzt, ist zu vermuten, daß eine Komplexbildung auch ohne Cytochrom c oder andere Proteine von-statten gehen kann.

1.5.3 Oligomerisierung, Komplexbildung und intrazelluläre Lokalisation

Sowohl die CARD als auch die Oligomerisierungsdomäne mit der Nukleotidbindungsstelle von Apaf-1 werden im inaktiven Zustand durch die WD40-Domänen maskiert. Zur Oligomerisierung wird ATP/dATP benötigt, welches sich erst an Apaf-1 anlagert, wenn dieses Cytochrom c gebunden hat (Jiang & Wang, 2000). Möglicherweise wird durch die Cytochrom c-Bindung eine Konformationsänderung bewirkt, die die Nukleotidbindungsstelle freilegt. Bei der Bildung des Apoptosoms findet eine Oligomerisierung von mehreren Apaf-1 Molekülen statt, die Cytochrom c und ATP/dATP gebunden haben (Übersicht über das Apaf-1-Apoptosom bei Cain *et al.*, 2002).

Mittels Größenfiltrationschromatographie kann das Apaf-1-Apoptosom in apoptotischen Zell-extrakten in zwei Formen nachgewiesen werden, einem inaktiven – wahrscheinlich unphysiologischen – Komplex bei 1,4 MDa und einem aktiven – wahrscheinlich dem physiologischen entsprechenden – bei 700 kDa (Cain *et al.*, 2000), der neben Apaf-1 auch prozessierte Caspase-9, -3 und -7 enthält (Cain *et al.*, 1999). Inzwischen konnten Acehan *et al.* (2002b) die dreidimensionale Struktur des Apaf-1/Cytochrom c-Komplexes klären und dabei zeigen, daß das Apoptosom aus sieben Apaf-1 Molekülen besteht, die wie die Speichen eines Rades angeordnet sind (Abb. 9A, C).

Hinsichtlich der Komplexbildung von CED-4 war zu Beginn dieser Arbeit nur bekannt, daß es oligomerisieren und zumindest Homodimere bilden kann (Yang *et al.*, 1998, Tao *et al.*, 1999). Anhand von mathematischen Modellen ermittelten Jaroszewski *et al.* (2000), daß CED-4 mit hoher Wahrscheinlichkeit Komplexe in Form von Hexamere bilden könne.

Apaf-1 ist ein cytoplasmatisches Protein, dessen Lokalisation sich auch nach einem Apoptosestimulus nicht ändert (Hausmann *et al.*, 2000, Zhivotovsky *et al.*, 1999). Anders als CED-4 wird es nicht durch Bcl-2-Proteine an Membranen sequestriert. Nach einem Apoptosestimulus wird CED-4 von der Membran ins Cytoplasma freigesetzt. Chen *et al.* (2000) konnten zeigen, daß es dabei in *C. elegans* eine perinukleäre Lokalisation einnimmt, deren Bedeutung bis heute ungeklärt ist.

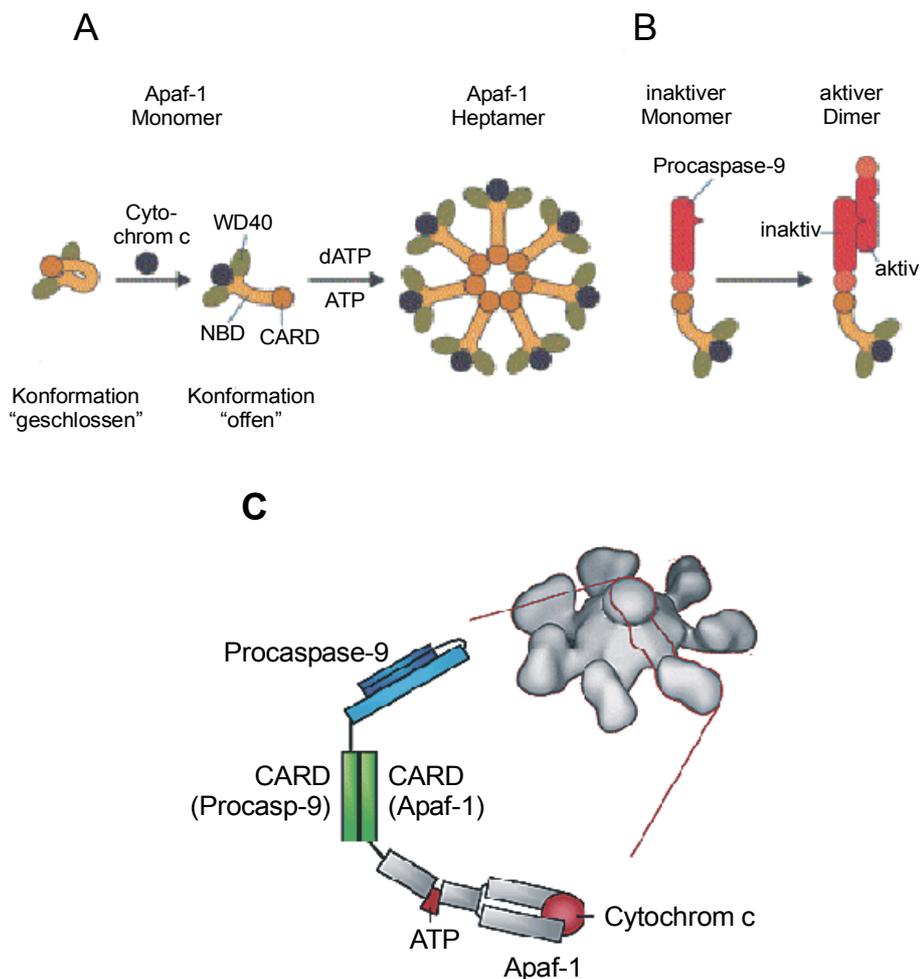


Abb. 9: Das Apaf-1-Apoptosom und die Aktivierung von Caspase-9.

A: In inaktiven Zustand weist Apaf-1 eine „geschlossene“ Konformation auf, d.h. der C-Terminus mit der WD40-Region maskiert den N-Terminus. Die Bindung von Cytochrom c induziert eine Konformationsänderung; dadurch werden die Nukleotidbindungsdomänen (NBD) und die CARD zugänglich. In Gegenwart von dATP/ATP (auch Cytochrom c ist noch gebunden) bildet sich ein Apaf-1-Heptamer aus, das sogenannte Apoptosom.

B: Inaktive Procaspase-9 bindet an die CARD von Apaf-1. Monomere Caspase-9 ist inaktiv, erst durch die Bildung eines Dimers entsteht ein aktiver Caspasenkomplex. Dabei spielt die Prozessierung nur eine untergeordnete Rolle (A und B nach Adams *et al.*, 2002).

C: Darstellung des Apoptosoms (Oberflächenmodell der Kristallstruktur) nach Aufnahmen von Acehan, *et al.* (2002b) und Zuordnung der beteiligten Moleküle. Procaspase-9 und Apaf-1 interagieren über ihre CARD-Domänen miteinander. Im Apoptosom sind auch Cytochrom c und dATP/ATP noch an Apaf-1 gebunden. Die „Speichen“ des heptameren Apoptosoms werden von der Apaf-1 WD40-Region und Cytochrom c gebildet, während Procaspase-9 die „Nabe“ bildet. (C nach Denault & Salvesen, 2002).

1.6 Virale Apoptoseinhibitoren

1.6.1 Apoptose und Viren

Möglicherweise entwickelte sich Apoptose ursprünglich als Maßnahme gegen Virusinfektionen, während alle weiteren Funktionen erst später hinzukamen (Martin *et al.*, 1995, Vaux *et al.*, 1996). Viren sind für ihre Vermehrung auf die DNA-Replikations- und Proteinexpressionsmaschinerie der Wirtszelle angewiesen. Eine effektive Strategie seitens der Wirtszelle scheint daher durch Apoptose dem Virus seine Vermehrungsmöglichkeit zu nehmen. Es erscheint plausibel, daß sich im Laufe der Evolution ein Gleichgewicht zwischen Virus und Zelle gebildet hat: Ein Virusbefall löst Apoptose aus, da die Zelle das Virus als Erreger erkennt. Für ein Virus ist es von Vorteil, diese Apoptose zu hemmen, und dementsprechend weisen viele Viren Gene für antiapoptotisch wirksame Proteine auf. Von einer Reihe dieser Apoptose-inhibierenden viralen Gene wurden zelluläre Homologe bei Invertebraten und Vertebraten entdeckt. Höchstwahrscheinlich kommt es zu dieser Homologie, weil Viren während ihres Replikationszyklus DNA aus ihren Wirtszellen „mitnehmen“ können. Zu diesen Homologen zählen auch die bereits oben erwähnten Proteine c-FLIP, IAP und Bcl-2-Proteine (Übersicht in Teodoro *et al.*, 1997).

Von den antiapoptotischen FLIP-Proteinen gibt es neben der oben beschriebenen zellulären Form c-FLIP auch virale Formen, v-FLIP genannt, die aufgrund ihrer Domänenstruktur mit den c-FLIP einer Familie zugerechnet werden. v-FLIP zeigen eine hohe Homologie zur kurzen Spleißvariante c-FLIP_s. Wie ihre zellulären Homologe binden die viralen FLIP an CD95 oder andere Todesrezeptoren und inhibieren die Aktivierung von Caspase-8 (Krueger *et al.*, 2001; Abb. 7).

Auch Bcl-2-Homologe kommen bei Viren vor, wie das antiapoptotisch wirkende E1B-19K aus dem humanen Adenovirus Ad12, das eine Ähnlichkeit zur Bcl-2-Unterfamilie aufweist. Abgesehen von der BH-1 Domäne ist die Sequenzähnlichkeit mit Bcl-2 jedoch nur sehr limitiert (Teodoro & Branton, 1997). Alle bisher sequenzierten Gamma-Herpesviren kodieren für ein Bcl-2-Homolog, wie die Proteine BHRF1 des Epstein Barr Virus, KSBcl-2 des Kaposi Sarkom-assoziierten Herpesvirus (Bellows *et al.*, 2002) und ORF16 des Saimiri Herpesvirus, wobei sie die Domänen BH1 und BH2 aufweisen, jedoch nur eine geringe Homologie im Bereich der BH3-Domäne zeigen (Nava *et al.*, 1997, Cheng *et al.*, 1997). Ein weiteres Bcl-2-tragendes Virus ist das die Afrikanische Schweinepest (ASP) auslösende ASP-Virus, ein nicht klassifiziertes

DNA-Virus, von dessen Bcl-2-Homolog LMW5-HL gezeigt werden konnte, daß es Apoptose inhibieren kann (Afonso *et al.*, 1996; Abb. 6).

Es existiert eine weitere Klasse viraler Caspaseninhibitoren, die Serin-Proteaseinhibitoren, auch Serpine genannt. Als Beispiel sei CrmA aus dem Kuhpockenvirus genannt, das relativ spezifisch Caspase-1 und -8 hemmen kann (Zhou *et al.*, 1997). CrmA leitet sich von „cytokine response modifier A“ ab (Cytokinantwort-modifizierendes Protein), da Caspase-1 an der Prozessierung von Interleukin 1 β beteiligt ist (Haecker *et al.*, 1994). Serpine sind auch als zelluläre Proteine bekannt; sie spielen eine Rolle bei der Regulierung der Proteolyse (proteolytischen Homöostase) durch Serin-Proteasen (Fell *et al.*, 2002).

1.6.2 Baculoviren: IAP und P35

Baculoviren, die zur Familie der Baculoviridae gehören, sind große Doppelstrang-DNA-Viren. Für ihre Wirte, die allesamt zu den Arthropoden zählen, sind sie hochspezifisch. Ihr Genom (80–200 kb) ist in stäbchenförmige Nucleocapside verpackt. Um sich replizieren zu können, sind sie auf die DNA-Maschinerie ihrer Wirtszellen angewiesen. Da sie während der frühen Phase der Infektion die Wirtszellapoptose unterdrücken müssen (Hershberger *et al.*, 1994), finden sich bei den verschiedenen Baculoviren zwei Familien von antiapoptotischen Genen, *iap* und *p35* (Clem, 2001).

IAP-Proteine („inhibitors of apoptosis“) sind Apoptoseinhibitoren, die zuerst bei verschiedenen Baculoviren entdeckt wurden. Sie enthalten eine oder mehrere sogenannte BIR Domänen („baculovirus *iap* repeat“), die für ihre Funktion maßgeblich sind, und hemmen Apoptose, indem sie an aktivierte Caspasen binden (Vaux & Silke, 2003). Auch bei Vertebraten und Invertebraten (*Drosophila*) wurden Homologe mit BIR-Domänen entdeckt. Dazu zählen die humanen XIAP, cIAP1 und cIAP2, von denen gezeigt werden konnte, daß sie eine antiapoptotische Wirkung haben (Roy *et al.*, 1997, Deveraux *et al.*, 1997).

Das antiapoptotische P35 wurde beim Baculovirus *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus (*AcNPV*) entdeckt (Miller, 1999). Die Funktion des *p35*-Gens konnte an einer Zelllinie aus *Spodoptera frugiperda*, *Sf21*, ermittelt werden: Mit Wildtyp-*AcNPV* befallene Insektenzellen werden nicht apoptotisch; ein *p35*-defizienter *AcNPV*-Stamm („Annihilator“-Mutante) hingegen löst Apoptose in den befallenen Zellen aus. Dabei ist eine deutlich verringerte Virusreplikation festzustellen (Clem *et al.*, 1991). Außer in Insektenzellen von *Spodoptera frugiperda* und *Drosophila* kann P35 auch in Nematoden- und Säugetierzellen Apoptose inhibieren oder deutlich

abschwächen (Miller, 1997). P35 ist ein wirksamer Caspaseninhibitor mit weit gefächertem Spektrum. Beim Menschen kann P35 Caspase-1, -2, -3, -4, -7, -8, -10 inhibieren, nicht jedoch Caspase-9 (Vier *et al.*, 2000). Funktionell ist P35 ein Substratinhibitor, der an das aktive Zentrum der Zielcaspase bindet und wie ein Substrat prozessiert wird. Die resultierenden P35-Fragmente verbleiben am aktiven Zentrum und bilden einen irreversiblen Caspase-P35-Komplex (Fisher *et al.*, 1999b; Abb. 30).

Es gibt mehrere P35-Homologe bei anderen Baculoviren (z.B. *BmP35* bei *Bombyx mori* NPV, Kamita *et al.*, 1993b; *SIP49* bei *Spodoptera littoralis* NPV, Du *et al.*, 1999), die untereinander eine meist große Homologie aufweisen. Anders als bei den zuvor besprochenen Gruppen antiapoptotischer viraler Proteine, von denen auch zelluläre Homologe existieren, sind außerhalb der Baculovirusgruppe derzeit keine homologen Proteine bekannt (Übersicht über IAP und P35 bei Clem, 2001, Miller, 1999).

1.7 Zielsetzungen der Arbeit

1.7.1 Funktionelle Analyse von rekombinantem CED-4

Zwar wurde Apaf-1 mittlerweile sehr eingehend untersucht; sein Homolog aus dem Nematoden jedoch steht in dieser Hinsicht im Hintergrund. Bisherige Untersuchungen konnten zeigen, daß Apaf-1 und CED-4 viele Gemeinsamkeiten aufweisen, sich andererseits auch unterscheiden. Die WD40-Region von Apaf-1 bewirkt, daß es ohne seinen Auslöser Cytochrom c im monomeren, inaktiven Zustand verharrt. Fehlt diese Region, wird Apaf-1 konstitutiv aktiv. CED-4 weist keine WD40-Region auf; sein Verhalten hinsichtlich der Komplexbildung ist nicht genauer untersucht. Eine Beteiligung von Cytochrom c oder den Mitochondrien bei der Apoptose konnte in *C. elegans* nicht beobachtet werden. Ob ein anderer Faktor zur Aktivierung notwendig ist oder ob die Oligomerisierung spontan ablaufen kann, ist unbekannt. Möglicherweise findet die Oligomerisierung – analog zur Apaf-1-Mutante – spontan statt. Ebenso wenig ist bekannt, ob CED-4 wie Apaf-1 die eher ungewöhnliche Präferenz für dATP gegenüber ATP aufweist. Versuche zur Oligomerisierung wurden in Zellextrakten transient transfizierter Zellen durchgeführt (Yang *et al.*, 1998), so daß nicht auszuschließen ist, daß weitere cytosolische Proteine die beobachteten Vorgänge beeinflussen haben.

Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Aufklärung von molekularen Funktionen von CED-4 wie Komplex- und Nukleotidbindung.

1.7.2 Identifikation eines mit CED-4 interagierenden Proteins

Bereits vor der Entdeckung von Apaf-1 wurde das Vorhandensein eines humanen CED-4-Homologs vermutet, das möglicherweise direkt mit seinem humanen Homolog oder einem gemeinsamen Bindeprotein von CED-4 und „hCED-4“ interagieren konnte. Daher wurde mit dem Far Western Blot ein System etabliert, mit dem nach zellulären Interaktionspartnern gesucht werden konnte, und das bereits der Entdeckung der Interaktion von c-Fos mit Jun² gedient hatte (Blanar & Rutter, 1992). Mittels des Far Western Blots gelang es, in humanen Zellextrakten ein Protein von etwa 20 kDa darzustellen, das mit CED-4 interagieren konnte. Die Aufreinigung und Identifikation dieses Proteins war das zweite Ziel der Arbeit.

1.7.3 Identifikation eines möglichen zellulären P35-Homologs

Es lag ein polyklonales Antiserum gegen virales P35 vor, mit dem in Extrakten aus P35-transfizierten humanen Zellen neben viralem P35 die Kreuzreaktion mit einem Protein bei ca. 40 kDa im Western Blot nachgewiesen wurde. Anders als bei anderen viralen Apoptoseinhibitoren ist von P35 bisher kein zelluläres Homolog bekannt. Da die Größe beider Proteine sehr ähnlich ist und Kreuzreaktionen zwischen homologen Proteinen verschiedener Spezies häufig sind, wurde in Erwägung gezogen, daß es sich um ein solches Homolog handeln könne, und weitere Versuche mit dem Antiserum zur näheren Charakterisierung des Proteins durchgeführt.

Die Herstellung von cytosolischen und mitochondrialen Zellextrakten mit anschließendem Western Blot und elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten eine mitochondriale Lokalisation des gesuchten Proteins. Im Gegensatz zum vollständigen Protein zeigte eine P35-Deletionsmutante ohne C-Terminus ebenfalls eine Lokalisation an oder in den Mitochondrien (unveröffentlichte Beobachtung). Im Yeast-Two-Hybrid-System konnte eine Interaktion von P35 mit sich selbst festgestellt werden (Takramah *et al.*, J Gen Virol, im Druck).

Das Ziel dieses Teils der Arbeit war der Versuch der Aufreinigung, Anreicherung und Sequenzierung des potentiellen zellulären P35-Homologs.

² Es gibt *fos* und *jun*-Genfamilien, deren Genprodukte zusammen mit ATF („aktivierende Transkriptionsfaktoren“) Untereinheiten des dimeren Transkriptionsfaktors AP-1 („Aktivierungsprotein“) bilden (Karin *et al.*, 1997).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29:1)	Bio-Rad, München
Agarose	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
CHAPS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cytochalasin B	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich, Steinheim
Deoxynucleotide (dATP, dCTP, cGTP, dTTP)	Boehringer/Roche, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka, Neu-Ulm
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Entellan Eindeckelmedium	Merck, Darmstadt
Eosin Rot	Merck, Darmstadt
Essigsäure (100 %)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (96 %)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung 1 % (10 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
FLAG-Peptid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehyd (37 %)	Roth, Karlsruhe
D-Galactose	Difco, Detroit, USA
D-Glucose	Difco, Detroit, USA
Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim

Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Harnstoff	Fluka, Neu-Ulm
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
HEPES	Biochrom, Berlin
Histon Typ II-A (Kalbsthymus)	Sigma-Aldrich, Steinheim
IPTG (Isopropylthiogalactosid)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kanamycin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lachssperma DNA ("salmon sperm DNA")	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lipofectin	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Lithiumacetat (Dihydrat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lysozym (aus Hühnereiweiß)	Sigma od. Roth
Magermilchpulver	Fluka, Neu-Ulm
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol 99 %	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumcarbonat (wasserfrei)	Fluka, Neu-Ulm
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	F. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
n-Octyl- β -D-glucopyranosid (NOGP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka, Neu-Ulm
Natriumthiosulfat (Pentahydrat)	Merck, Darmstadt
Neutralrot	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nonidet P-40 (NP-40) (= IGEPAL CA630)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS Dulbecco (ohne Ca^{2+} , Mg^{2+})	Biochrom, Berlin
PEG 3350, 4000 (Polyethylenglycol)	Merck, Darmstadt
Phenol Rotipuran	Roth, Karlsruhe
PMSF	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteaseinhibitoren Complete EDTA-frei	Boehringer/Roche, Mannheim
5x Reporter Lysepuffer	Promega, Madison, WI, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure 25 %	Roth, Karlsruhe
Saponin	Roth, Karlsruhe

Seaplaque-Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Taxol (Paclitaxel)	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Thrombin (Rind)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tricin (N-tris[Hydroxymethyl]methylglycin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Roth, Karlsruhe; Riedel de Haen, Seelze
Triton X-100	Bio-Rad, München
Tween 20 (Polyethylensorbitan Monolaureat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
X-Galaktopyranosid (X-Gal)	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Yeast Nitrogen Base w/o AS	Difco, Detroit, M, USA

2.1.2 Kreuzvernetzende Chemikalien („Cross-linker“)

<i>Name</i>	<i>chemische Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
DTSSP	Dithio-bis-(sulfosuccinimidylpropionat), Thiol-spaltbar	Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA
BS ³	bis-(sulfosuccinimidyl)suberat	Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA

2.1.3 Radiochemikalien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
[α - ³² P]-ATP (3.000 Ci/mmol)	Hartmann Analytics, Braunschweig
[α - ³² P]-dATP (3.000 Ci/mmol)	Hartmann Analytics, Braunschweig
[γ - ³² P]-ATP (>6.000 Ci/mmol)	Hartmann Analytics, Braunschweig
Redivue L-[³⁵ S] Methionin (>1.000 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

2.1.4 Nukleotide für proteinbiochemische Anwendungen

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
ADP	Sigma-Aldrich, Steinheim
AMP-PNP	Sigma-Aldrich, Steinheim
ATP	Sigma-Aldrich, Steinheim
ATP- γ -S	Sigma-Aldrich, Steinheim
dATP	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.5 Enzyme

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Alkalische Phosphatase	Boehringer/Roche, Mannheim
Protein Kinase, Katalytische Untereinheit aus dem Rinderherz (Herzmuskelkinase)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNase I, Grade II	Boehringer/Roche, Mannheim
RNase A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Klenow Fragment	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
<i>Pwo</i> DNA Polymerase	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Restriktionsenzyme	BioLabs, New England, USA, Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, MBI Fermentas, Wilna, Litauen
<i>Taq</i> Polymerase	Eigene Herstellung (<i>E. coli</i>)
T4 DNA Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.6 Molekulargewichtsmarker

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
<i>a) SDS-PAGE</i>	
Seebblue Pre-Stained Standard	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Mark 12 Unstained Standard	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<i>b) DNA</i>	
1 kB DNA Extension Ladder	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

2.1.7 Western Blot

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Protran BA 85 Nitrocellulose Transfer Membrane 0,45 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer, Boston, MA, USA
Hyperfilm ECL Chemiluminescence Film	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

2.1.8 Isoelektrische Fokussierung

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Immobiline DryStrip pH 3-10 L	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Immobiline DryStrip pH 6-11	
IPG Buffer pH 3,5-10	
IPG Buffer pH 6-11	

2.1.9 Systeme

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
TnT T3 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega, Madison, WI, USA
DNA Ligation Kit	Takara Bio, Berkeley, CA, USA
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAEX II Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
TOPO TA Cloning, Version I	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
pEF6/V5-His TOPO TA Expression Kit, V. E	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
HMW Calibration Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

2.1.10 Säulenmaterialien

<i>Säulenmatrix</i>	<i>Hersteller</i>
Glutathion Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Anti-FLAG M2 Affinity Gel	Sigma-Aldrich, Steinheim
PD10 Säule	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Superose 6 HR 10/30	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Q-Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Phenyl Sepharose 6 FF (low sub)	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

2.1.11 Antikörper

<i>Name</i>	<i>Herkunft</i>	<i>spezifisch für</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-FLAG M2	Maus, monoklonaler IgG ₁ -Antikörper	FLAG-Epitop	Western Blot, Immunpräzipitation, Zellfärbung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-GST	Maus, monoklonaler IgG ₁ -Antikörper	Glutathion-S-Transferase	Western Blot, Immunpräzipitation, Zellfärbung	Dr. Heinrich Flaswinkel, GSF, Neuherberg
Anti-5xHis	Maus, monoklonaler IgG ₁ -Antikörper	5xHis	Western Blot, Nachweis von 6xHis-Fusionsproteinen	QIAGEN, Hilden
Anti-LexA	Kaninchen, polyklonales Antiserum	LexA-Bindungsdomäne	Western Blot, Nachweis von LexA-Fusionsproteinen	Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA
Anti-P35	Kaninchen, polyklonales Antiserum	<i>AcP35</i>	Western Blot, Detektion von viralem und zellulärem P35	eigene Herstellung (Kaninchen mit rekombinantem P35 (<i>E. coli</i>) immunisiert)
Ziege-anti-Maus	Ziege	Maus IgG, Meerrettich-Peroxidasegekoppelt	Zweitantikörper im Western Blot	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen	Ziege	Maus IgG, Meerrettich-Peroxidasegekoppelt	Zweitantikörper im Western Blot	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cy3-konjugierter Ziege-anti-Maus IgG	Ziege	Cy3-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper	FACS-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie	Dianova, Hamburg

2.1.12 Plasmide und Baculoviren

<i>Bezeichnung</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Herkunft</i>
<i>Plasmide</i>		
Klon IRAK p961B2315Q2	PCR von <i>rbp34</i> (Klonierung in pEF6/V5-His)	RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Heidelberg
pAcG1-GST-FLAG- <i>ced-4</i>	Kotransfektion mit Baculogold DNA zur Erzeugung des GST-FLAG-CED-4-Virus	Dr. Georg Linsinger, Technische Universität München

pFLAG- <i>ced 4</i>	Herstellung von FLAG-CED-4 in <i>E. coli</i>	Dr. David Vaux, Melbourne, Australien
pGem7- <i>ced 4</i>	PCR von <i>ced-4</i> (Klonierung in pCRII)	Dr. David Vaux, Melbourne, Australien
pMelBac B-FLAG- <i>ced-4</i>	Kotransfektion mit Bac-N-Blue DNA zur Erzeugung des FLAG-CED-4-Virus	Dr. Georg Linsinger, Technische Universität München
pSK(-)- <i>ced 3</i>	Herstellung von [³⁵ S] Methionin-markiertem CED-3	Dr. Barbara Conradt, Max-Planck-Institut f. Biochemie, Martinsried
pUC19- <i>h4b</i>	PCR mit <i>h4b</i> (in pCRII)	Prof. Dr. Detlef Doenecke, Universität Göttingen
pYESTrp- <i>hrpb11</i>	Klonierung von pYES- <i>ced-4</i> und pYES- <i>h4b</i>	Dr. David Takramah, Technische Universität München
<i>Leervektoren</i>		
pCR II-TOPO	“Zwischenvektor”, Klonierung von pCR- <i>ced-4</i> und pCR- <i>h4b</i>	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
pEF6/V5-His TOPO	Klonierung von pEF- <i>rbp34</i>	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
pEFSem (Derivat von pEFBos mit Puromycin-Kassette)	Transfektionskontrolle für pEF- <i>rbp34</i>	Dr. Hans Häcker, Technische Universität München
pET3a	Klonierung von pET- <i>h4b</i>	Novagen, Madison, WI, USA
pLexA202	Klonierung von pLexA- <i>ced-4</i> und pLexA- <i>h4b</i>	Rietzler und Holzmann, TU München
<i>Baculoviren</i>		
Bac-N-Blue	Kotransfektion mit pMelBac B-FLAG- <i>ced-4</i> zur Erzeugung des FLAG-CED-4-Virus	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
BaculoGold	Kotransfektion mit pAcG1-GST-FLAG- <i>ced-4</i> zur Erzeugung des GST-FLAG-CED-4-Virus	Pharmingen/ Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
FLAG-CED-4-Virus	Herstellung von rekombinantem FLAG-CED-4	Dr. Georg Linsinger, TU München
GST-FLAG-CED-4-Virus	Herstellung von rekombinantem GST-FLAG-CED-4	eigene Herstellung

2.1.13 Synthetische Oligonukleotide (Metabion, Martinsried)

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>
h4b257-s h4b269-as	5'-CGG GAT CCA TGT CTG GCC GCG GTA AG-3' 5'-CGG GAT CCT CAG CCG CCG AAG CCA T-3'
Verwendung:	Klonierung von <i>h4b</i> in pCRII (s. 2.5.4.8)
ced4cardLex-s ced4Lex3-as	5'-CGG AGA ATT CCT CTG CGA AAT CGA ATG CCG-3' 5'-TTA ACA GCA TGC AAA ATT TT-3'
Verwendung	Klonierung von <i>ced-4</i> in pCRII (s. 2.5.4.11.1)
RBP34-s RBP34-as	5'-GGG GCC CGC TCA GCC GGC-3' 5'-CTG CTG AGA GTC GGT CTG GA-3'
Verwendung:	Klonierung von <i>rpb34</i> in pEF6/V5-His (s. 2.5.4.5)

2.1.14 Sonstiges

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Mikrokonzentratoren bzw. -filter: Microcon YM 10, YM 30, YM 50 Centrifugal Filter Devices	Amicon Bioseparations/Millipore, Schwalbach
Gene Pulser Elektroporationsküvetten, 0,4 cm Elektrodenabstand	Bio-Rad, München
Dounce Homogenisatoren: a) 1 ml, mit Glaskolben „eng“ b) 2 ml, mit Glaskolben „weit“	Wheaton, Millville, NJ, USA
Glasperlen 0,45 x 0,50 mm Durchmesser (zum Aufbrechen der Hefen)	B. Braun, Melsungen

2.1.15 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Blotkammer	- Mini Trans-Blot Cell - Criterion Blotter	Bio-Rad, München
Durchflußcytometer FACS	- FACSCalibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
FPLC-Anlage	- FPLC-System	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

IEF	IPGphor Isoelectric Focussing Unit	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Konfokales Mikroskop	- Axiovert 100 M Laser Scanning Microscope	Zeiss, Jena
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE-Gele:	- Mighty Small SE260 Mini-vertical Unit - SE 660	Hoefer, San Francisco, CA, USA Pharmacia
Elektroporationsapparat	- Gene Pulser	Bio-Rad, München
PCR-Geräte	- TRIO-Thermoblock	Biometra
Phosphoimager	- Storm 840	Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA
Vakuum-Membransauger	- Dot Blotter	Schleicher & Schuell, Dassel
Zentrifugen: Tischzentrifugen	- Centrifuge 5415C (RT) - Biofuge 15 R (4 °C) - Biofuge fresco (4 °C)	Eppendorf Heraeus, Hanau Heraeus, Hanau
Großzentrifugen	- Omnifuge 2.ORS (RT) - Megafuge 1.0 R (4 °C) - Sorvall RC 26 Plus (4 °C)	Heraeus, Hanau Heraeus, Hanau Du Pont, Newton, CT, USA

2.2 Zelllinien

2.2.1 Säuger-Zelllinien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Jurkat	humane periphere T-Zellen, akute lymphoblastische Leukämie	Dr. Henning Walczak (DKFZ Heidelberg)
HeLa	humanes Cervix-Karzinom, Plattenepithelkarzinomzellen	ATCC CCL 2
293T	Fibroblasten, humane embryonale Nierenepithelzellen	ATCC CRL 1573

Alle genannten Zelllinien wurden in Brutschränken bei 5 % CO₂, 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Als Kulturmedium wurde DMEM für adhärenente Zellen (HeLa, 293T) und Click-RPMI für Suspensionszellen (Jurkat) verwendet. Die Zellpassage bei adhärenenten

Zellen erfolgte, wenn die Zellkonfluenz 80-100 % betrug. Die Zellen wurden abtrypsiniert, in PBS gewaschen und auf neue Zellkulturplatten verteilt. Suspensionszellen wurden entweder gezählt und bei einer Dichte von 1 Mio./ml oder mehr auf 0,5 Mio./ml verdünnt, oder bei Verfärbung des pH-Indikators im Medium nach orange verdünnt.

2.2.1.1 Zellkulturmedien

DMEM	DMEM-Trockenmedium (Biochrom, Berlin), 1 Beutel auf 10 l 37 g NaHCO ₃ , pH 7,2 sterilfiltriert 2 mM L-Glutamin 10 % FCS 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin
Click-RPMI	Instamed Click-RPMI (Biochrom, Berlin), 1 Beutel auf 10 l 23,83 g HEPES, pH 7,2 11,75 g NaHCO ₃ sterilfiltriert 2 mM L-Glutamin 5 % oder 10 % FCS 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin

Zusatzstoffe/Antibiotika

Fetales Kälberserum (FCS), (Biochrom, Berlin): Komplement wurde 60 min. bei 56 °C inaktiviert.

L-Glutamin (Biochrom, Berlin)

Penicillin/Streptomycin (10.000 U/10000 µg/ml) (Biochrom, Berlin)

Trypsin/EDTA-Lösung (0,25 % / 0,02 % (w/v) in PBS ohne Ca²⁺, Mg²⁺) (Biochrom, Berlin)

2.2.2 Insektenzellen

Insektenzelllinie (Baculovirus Expressionssystem): *Sf9* (aus *Spodoptera frugiperda*)

Die Zelllinie *Sf9* wurde in einem Brutschrank ohne CO₂-Begasung bei 27 °C kultiviert. Die Pflege der Zellen erfolgte nach „Growth and Maintenance of Insect Cell Lines“, Version F, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. Da die Zellen in verschiedenen Zellkulturflaschen bzw. -schalen unterschiedlich gut adhärten, wurden sie nach mehreren Versuchen ausschließlich zum Anwachsen in 250 ml Gewebekulturflaschen von Greiner Labortechnik (Kremsmünster, Österreich) bzw. in Falcon 15 cm Zellkulturschalen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) kultiviert. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Schalen mit Parafilm M (Pechiney, Paris, Frankreich) verschlossen. Die Zellpassage erfolgte alle 3-4 Tage, sobald die Zellschicht an-

nähernd 100 % Konfluenz erreichte. Dazu wurden die Zellen einer Zellkulturschale mit einer 10 ml-Pipette abgespült und auf drei neue Schalen verteilt.

2.2.2.1 Insektenzellkulturmedium

TNM-FH Komplettmedium

Grace's Insect Medium (Gibco /Invitrogen, Carlsbad, CA, USA,) inklusive Zusätzen
Die Zusätze enthalten TC yeastolate, Lactalbumin-Hydrolysat, Glutamin; Zusätze in Pulverform wurden in Medium aufgelöst und sterilfiltriert.

10 % FCS

10 µg/ml Gentamicin

0,4 ml/100 ml Ciprobay (= 0,8 mg/ml Ciprofloxacin)

Antibiotika: Ciprobay 200 (Bayer, Leverkusen), Wirkstoff: Ciprofloxacin 2 mg/ml
Gentamicin 10 mg/ml, (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

2.3 Hefen

2.3.1 Hefestamm

EGY48/pSH18-34 (= Stamm EGY48 transformiert mit dem Vektor pSH18-34)

EGY48 Genotyp: MAT α *ura3 trp1 his3 6lexAop-LEU2*

EGY48/pSH18-34 Phänotyp: Trp⁻, His⁻, Leu⁻, Ura⁺

Referenz: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (Hybrid Hunter, Version D)

Der Hefestamm EGY48/pSH18-34 wurde auf einer U⁻ Platten ausgestrichen und bei 30 °C kultiviert. Dieser Vorgang wurde alle paar Tage auf einer neuen Platte wiederholt, sobald die Hefe deutlich gewachsen war. Für eine Flüssigkultur wurden die Zellen in flüssigem U⁻ Medium angesetzt und bei 30 °C unter Schütteln kultiviert. Nach einer Transformation wurde entsprechend der Resistenz- und Reportergene auf den Plasmiden in unterschiedlichen Selektivmedien kultiviert (s.u.).

2.3.2 Hefemedien

Grundmedium 0,67 % (w/v) Yeast Nitrogen Base w/o AS
5 % (v/v) Aminosäure-Dropout-Mix
autoklaviert (1 bar, 121 °C, 20 min.), auf unter 55 °C abgekühlt
10 % 1 M Glucose-/Galactoselösung

Für die Herstellung von Platten wurde vor dem Autoklavieren zusätzlich 2 % Agarose hinzugefügt.

Aminosäure-Dropout-Mix 0,083 % L-Adenin, 0,04 % L-Arginin, 0,2 % L-Aspartat, 0,2 % L-Glutamat, 0,06 % L-Lysin, 0,04 % L-Methionin, 0,1 % L-Phenylalanin, 0,75 % L-Serin, 0,4 % L-Threonin, 0,06 % L-Tyrosin, 0,3 % L-Valin, (alle AS w/v), sterilfiltriert

Alle Aminosäuren wurden von Sigma-Aldrich, Steinheim, bezogen.

Selektivmedien

Für die Herstellung der verschiedenen Selektivmedien wurden zu dem Grundmedium je 0,83 % (v/v) der Histidin-, Leucin-, Tryptophan-Stammlösungen in unterschiedlichen Kombinationen hinzugefügt

Medium	Leucin	Tryptophan	Histidin	Uracil	X-Gal	Glucose/Galactose
U ⁻	+	+	+	-	-	Gluc
UH ⁻	+	+	-	-	-	Gluc
UHW ⁻	+	-	-	-	-	Gluc
UHWL ⁻	-	-	-	-	-	Gal
UHWL ⁻ X-Gal	-	-	-	-	+	Gal

Histidin-Stammlösung	0,24 % (w/v) L-Histidin, sterilfiltriert
Leucin-Stammlösung	0,72 % (w/v) L-Leucin, sterilfiltriert
Tryptophan-Stammlösung	0,48 % (w/v) L-Tryptophan, sterilfiltriert
Galactose-Stammlösung	1 M D-Galactose, sterilfiltriert
Glucose-Stammlösung	1 M D-Glucose, sterilfiltriert
X-Gal-Stammlösung	4 % (w/v) X-Gal (in DMSF), sterilfiltriert

2.4 Bakterien

2.4.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
DH5 α	<i>E. coli</i> F ⁻ O- recA1 endA1 hsdR17 (rK ⁻ ,mK ⁺), Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169F80d <i>lacZ</i> D _{M15} <i>supE</i> 44 <i>thi</i> -1 <i>gyrA</i> 96 <i>relA</i> 1	Life Technologies
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B, F ⁻ , dcm, ompT, hsdS(_{r_B} ⁻ m _B ⁻), gal λ (DE3)	Stratagene, La Jolla, CA, USA
AD494(DE3)	Δ <i>ara leu</i> 7967 Δ <i>lacX</i> 74 Δ <i>phoA</i> PvuII <i>phoR</i> Δ <i>malF</i> 3 F' ⁺ [<i>lac</i> ⁺ (<i>lacI</i> ^q) <i>pro</i>] <i>trxB</i> ::kan (DE3)	Novagen, Madison, WI, USA

One Shot® TOP10 <i>E. coli</i>	λ F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str^R) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
-----------------------------------	---	----------------------------------

Die Bakterien wurden beim 37 °C entweder als Flüssigkultur unter ständigem Schütteln oder auf Platten kultiviert. Nach einer Transformation wurden die Medien mit dem entsprechenden Antibiotikum supplementiert (LB-Amp Flüssigmedium enthält 50 µg/ml Ampicillin).

2.4.2 Bakterienmedium

LB-Medium (Luria-Bertani) 1 % (w/v) Bacto-Trypton
 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
 1 % (w/v) NaCl
 pH 7,2
 autoklaviert (1 bar, 121 °C, 20 min.)

LB-Platten enthalten zusätzlich 2 % Agar.

2.4.3 Bakterien-Selektivmedien

LB-Amp-Platten: 100 µg/ml Ampicillin

LB-Kana-Platten: 100 µg/ml Kanamycin

2.5 Methoden

2.5.1 Allgemeine molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden

2.5.1.1 NP-40-Extrakt

Zellen wurden geerntet, gezählt, einmal in PBS gewaschen und anschließend in NP-40-Puffer resuspendiert, wobei 100 µl Puffer auf 1 Mio. Zellen verwendet wurden. Nach 10 min. Inkubation auf Eis mit anschließenden 10 sec Vortexen wurde für 10 min. bei 15.000 UpM in der Kühl-Tischzentrifuge bei 4 °C zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen.

NP-40-Puffer 50 mM Tris, pH 8,0
 150 mM NaCl
 1 % (v/v) Nonidet P-40 (IGEPAL CA630)

2.5.1.2 S100-Extrakt (cytosolischer Extrakt)

Zellen wurden geerntet, gezählt, einmal in PBS gewaschen und anschließend in S100 Puffer resuspendiert, so daß sich eine Konzentration von 10 Mio. Zellen pro 100 µl ergab. 15-30 min. Inkubation auf Eis führte zum Anschwellen der Zellen. Anschließend wurden die Zellen im Dounce Homogenisator lysiert: Bei Extraktmengen ab 1 ml wurde ein 1 ml Homogenisator verwendet. Bei geringeren Volumina wurden die Zellen durch eine Kanüle (G22–G27) gezogen. Die Effizienz der Zellyse wurde mikroskopisch nach Zugabe von Eosin beurteilt. Die Homogenisierung wurde so lange durchgeführt, bis 80-90 % der Zellen lysiert waren. Anschließend wurde mit 10.000 x g bei 4 °C zentrifugiert und das Sediment verworfen.

S100 Puffer 20 mM HEPES KOH, pH 7,5
 10 mM KCl
 1,5 mM MgCl₂
 1 mM N EDTA
 1 mM EGTA
 Proteaseinhibitor (nach Herstellerangaben)

2.5.1.3 Proteinbestimmung in Extrakten

Der Proteingehalt wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt. Die Berechnung erfolgte nach der Formel O.D. 280 x Verdünnungsfaktor x Faktor 1,4 = Proteinkonzentration [mg/ml].

2.5.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(modifiziert nach Laemmli, 1970)

Stammlösung	Trenngel			Sammelgel
	14 %	12,5 %	10 %	
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	14,1 ml	12,6 ml	9,9 ml	2,4 ml
Aqua dest.	8,0 ml	9,9 ml	12,6 ml	13,8 ml
LGB		7,5 ml		---
UGB		---		3,75 ml
10 % APS		180 µl		70 µl
TEMED		30 µl		30 µl

Die Mengenangaben beziehen sich auf 5 Minigele; für ein großes Gel (15 cm x 20 cm) wurde die doppelte Menge angesetzt.

Die Acrylamidkonzentration des Gels richtete sich nach der Größe der gesuchten Proteine. Als Standard wurden 12,5 %ige Gele verwendet, während für Histone 14 %ige Gele gewählt wurden. Für sehr große Proteine oder Komplexe wurden 8 %ige oder 10 %ige Gele eingesetzt.

Im Mighty Small SE260 (Hoefler) wurde die Gelelektrophorese mit 180 V und maximal 400 mA durchgeführt. SDS-PAGE mit großen Gelen (15 cm x 20 cm) im SE660 (Amersham) wurden mit 25 mA und maximal 400 V durchgeführt.

LGB („lower gel buffer“)	182 g/l Tris HCl, pH 8,8 4 g/l SDS
UGB („upper gel buffer“)	60 g/l Tris HCl, pH 6,8 4 g/l SDS
5x Laufpuffer	30 g/l Tris (ohne pH-Wert-Korrektur) 144 g/l Glycin 5 g/l SDS
4x Laemmli-Puffer	62,5 mM Tris HCl, pH 6,8 20 mg/ml SDS 50 % (v/v) Glycerin 2 mM EDTA 1 mg/ml Bromphenolblau

2.5.1.5 Proteintransfer auf Nitrocellulose und Western Blot

Der Transfer wurde mit 100 V und maximal 400 mA für 60-90 min. (Mini Trans-Blot Cell) oder mit 100 V und maximal 1000 mA für 30-45 min. (Criterion Blotter) bei 4 °C in Transferpuffer durchgeführt.

10x Tris/Glycin	250 mM Tris (30,3 g/l), pH-Wert nicht einstellen 1,92 M Glycin (144 g/l)
Transferpuffer	1x Tris/Glycin 20 % (v/v) MeOH

Nach dem Transfer wurde die Membran mindestens 30 min. in 5 % MMP blockiert. Anschließend wurde sie mit einer geeigneten Konzentration des Erstantikörpers in 5 % MMP mindestens 45 min. inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS/T (jeweils 5 min.) wurde der Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper in 5 % MMP für mindestens 45 min. appliziert. Es wurde erneut dreimal in TBS/T gewaschen. Anschließend wurde Membran 1 min. in Luminol inkubiert, in Haushaltsfolie gewickelt und in eine Röntgenfilmkassette plziert. Zur Belichtung wurde ein Film auf den Blot gelegt, der nach Ablauf der Belichtungszeit in der Entwicklungsmaschine Curix 60 (Agfa-Gevaert, Köln) entwickelt wurde.

10x TBS	200 mM Tris HCl, pH 7,6 (24,2 g/l) 1,37 M NaCl (80 g/l)
1x TBS/T	20 mM Tris HCl, pH 7,6 137 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween 20
5 % MMP	5 % (w/v) Magermilchpulver in 1x TBS/T

2.5.1.6 Entfernen gebundener Antikörper von Western Blots

Bereits mit Antikörpern behandelte Western Blots wurden 5 min. in Aqua dest. gewaschen, dann für 20 min. bis 1 h in 0,2 M NaOH inkubiert. Der Waschschrift wurde wiederholt, und anschließend wurde das Western Blot Protokoll ab dem Absättigungsschritt mit 5 % MMP durchgeführt.

2.5.1.7 Coomassie-Färbung

SDS-Polyacrylamidgele wurden mindestens 1 h in Färbelösung eingelegt. Anschließend wurden die Gele mit Entfärber so lange entfärbt, bis die Banden gut zu erkennen und der Hintergrund entfärbt waren. Zur Lagerung wurden die Gele in Aqua dest. überführt.

Färbelösung	0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue 50 % (v/v) MeOH 12 % (v/v) Essigsäure
Entfärber	50 % (v/v) MeOH 12 % (v/v) Essigsäure

2.5.1.8 Silberfärbung

SDS-PAGE-Gele wurden 15 min. in Fixierlösung fixiert, dreimal 10 min. in 50 % (v/v) EtOH gewaschen und für 1 min. mit Lösung 1 behandelt. Nach zwei bis dreimaligem kurzen Waschen mit Aqua dest. wurde das Gel 20 min. in Lösung 2 inkubiert. Der Waschschrift mit Aqua dest. wurde wiederholt und das Gel anschließend in Lösung 3 so lange entwickelt, bis die Banden in der gewünschten Stärke zu erkennen waren. Die Entwicklung wurde dann mit Fixierlösung gestoppt.

Fixierlösung:	50 % (v/v) MeOH 12 % (v/v) Essigsäure
Lösung 1:	0,2 mg/ml Natriumthiosulfat
Lösung 2:	2 mg/ml Silbernitrat
Lösung 3:	60 mg/ml Natriumcarbonat (wasserfrei) 4 mg/l Natriumthiosulfat 25 µl auf 50 ml 37 % (v/v) Formaldehyd

2.5.1.9 Trocknen von Gelen

Zur Archivierung wurden gefärbte Polyacrylamidgele getrocknet. Dazu wurden die Gele in Lösung 1 eingeweicht und zwischen zwei ebenfalls in Lösung 1 eingeweichte Cellophanblätter in den Trocknungsrahmen gespannt und 2-3 Tage luftgetrocknet.

Lösung 1: 5 % (v/v) Glycerin
 10 % (v/v) EtOH (techn.)

2.5.1.10 Trichloressigsäure-Fällung (TCA)

Zu einer proteinhaltigen Lösung wurde 100 % TCA bis zu einer Endkonzentration von 20 % TCA (bei sehr kleinen Proteinen 25 %) hinzupipettiert. Nach 15 min. Inkubation auf Eis wurde mit 15.000 UpM in einer Kühl-Tischzentrifuge zentrifugiert, das Sediment zunächst 5 min. mit 100 µl 100 % (v/v) EtOH, dann 5 min. mit 100 µl 75 % (v/v) EtOH gewaschen. Anschließend wurde das Sediment in geeigneter Weise resuspendiert (z.B. in Laemmli-Puffer, s. 2.5.1.4 SDS-PAGE).

2.5.1.11 Acetonfällung

Zu einer zu fällenden Lösung wurde das 6–8 fache Volumen Aceton gegeben und mindestens 1 h bis über Nacht bei –20 °C inkubiert. Danach wurde mit 3000 x g bei 4 °C zentrifugiert, das Sediment getrocknet und in geeignetem Puffer resuspendiert.

2.5.1.12 2-D-Gelelektrophorese

Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

(nach: 2-D-Electrophoresis using immobilized pH gradients, principles & methods, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden (10-98))

Für die Fokussierung wurden je nach aufzutrennendem Bereich entweder Streifen mit pH 3-10 oder pH 6-11 verwendet. Die Proben wurden in RHS-Puffer aufgenommen, so daß sich ein Endvolumen von 400 µl pro Streifen ergab; dem RHS wurden zunächst 0,5 % bis 2 % IPG zugegeben. Die IPG-Konzentration richtete sich dabei nach dem Protein und der Qualität der vorangegangenen Fokussierung. Die Fokussierung ist bei einer niedrigen Konzentration besser, die Löslichkeit vieler Proteine verbessert sich jedoch bei einer Erhöhung der Pufferkonzentration. Der Ansatz wurde 45 min. inkubiert und danach 10 min. bei 13.000 UpM zentrifugiert. Vom Überstand wurde ein Aliquot für den Western Blot entnommen, der Rest wurde auf den Streifen gegeben. Die Fokussierung erfolgte in 18 cm-Schiffchen im IPGphor lt. 2-D-Electrophoresis using immobilized pH gradients, principles & methods (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden).

RHS („Rehydration Stock Solution“)

8 M Harnstoff
2 % CHAPS
1 Spatelspitze Bromphenolblau
100 mM DTT (vor Gebrauch hinzufügen)

Vorbereitung der Proben:

Einige zellkernhaltige Proben wurden vor der Aufbereitung mit DNase I oder RNase A vorbehandelt. Andere Proben wurden mit Aceton gefällt und das Präzipitat direkt in RHS-Puffer aufgenommen, um den Proteingehalt zu erhöhen. Eine weitere Methode zur Konzentrierung war die Verwendung von Microcon-Filtern.

Um eine Komplexierung der Proteine zu unterdrücken, wurden der RHS-Puffer für Mitochondrienextrakte zum Teil mit 20 mM Iodoacetamid (IAA) und 20 mM N-Ethylmaleimid (NEM) versetzt.

DNase I Stammlösung	1 mg/ml DNase I 17 mM Tris HCl, pH 7,6 50 mM NaCl 50 mM MgCl ₂
---------------------	--

RNase A	10 µg/ml (Stammlösung 0,25 mg/ml)
---------	-----------------------------------

Zweite Dimension: SDS-PAGE

Die zweite Dimension wurde mit SDS-Gelen ohne Taschen durchgeführt. Für den Größenstandard wurden ein oder zwei Taschen mit Hilfe von Filterpapierstreifen und geschmolzener Agarose zum Abdichten konstruiert. Der fokussierte Streifen wurde in SDS-Equilibrierungspuffer eingeweicht und oben auf das Sammelgel gelegt. Die Gelelektrophorese wurde nach dem Standardprotokoll durchgeführt.

SDS Equilibrierungspuffer	50 mM Tris HCl, pH 8,8 6 M Harnstoff 30 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS 1 Spatelspitze Bromphenolblau 100 mM DTT (vor Gebrauch hinzufügen)
---------------------------	--

2.5.1.13 Herstellung kompetenter Bakterien

Bakterien-Zellen wurden auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Kolonie wurde gepickt, in 5 ml LB-Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde auf 500 ml LB-Flüssigmedium gegeben und bis zu einer optischen Dichte von O.D.600 = 0,3-0,4 wachsen gelassen. Danach wurden die Bakterien bei für 10-15 min. bei 1000 x g und 4 °C sedimentiert und in 50 ml kaltem 1 x TSS resuspendiert und aliquotiert.

1 x TSS	LB-Medium 50 mM MgCl ₂ 10 % (w/v) PEG 4000 5 % (v/v) DMSO
---------	---

2.5.1.14 Transformation von *E. coli*

Kompetente Bakterien eines geeigneten Stammes wurden auf Eis aufgetaut. Währenddessen wurden 100 µl einer Lösung mit 1 x KCM und 1-5 µl DNA hergestellt. Nach dem Auftauen wurden vorsichtig 100 µl Bakteriensuspension zum Puffer-DNA-Gemisch pipettiert und 20 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Mischung 2 min. auf 42 °C erwärmt und auf Eis kurz abgekühlt. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurde 45 min. bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 50-500 µl der Bakteriensuspension auf LB-Amp- bzw. LB-Kana-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5x KCM:	0,5 M KCl 0,15 M CaCl ₂ 0,25 M MgCl ₂
---------	---

2.5.1.15 Kryokonservierung von Bakterien

700 µl einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden mit 300 µl 50 % Glycerin versetzt und bei -80 °C eingefroren und gelagert.

2.5.1.16 Proteinexpression in *E. coli* (IPTG-Induktion)

Zur Proteinexpression wurde ein geeigneter Bakterienstamm – z.B. BL21(DE3) – mit der entsprechenden Plasmid-DNA transformiert und ausplattiert. Zur Anlage einer Vorkultur wurde eine Kolonie gepickt und in 10-20 ml LB-Amp (oder einem anderen geeigneten Antibiotikum) über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Vorkultur mit 500 ml LB-Amp aufgefüllt und so lange weiterkultiviert, bis eine O.D.600 von 0,6 bis 0,7 erreicht war. Dann wurden 500 µl einer 1 M IPTG Lösung zur Induktion hinzugefügt. Nach weiteren 4 h wurden die Bakterien bei 5.000 x g sedimentiert, einmal mit PBS gewaschen und bei -80 °C bis zur Aufreinigung gelagert.

2.5.1.17 Plasmid-Isolierung:

1) Plasmid-Isolierung im analytischen Maßstab

Mit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden), nach Herstellerangaben.

2) Plasmid-Isolierung im präparativen Maßstab

Mit QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Hilden), nach Herstellerangaben.

2.5.1.18 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Proben wurden in einem 1-2 %igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Dazu wurde die Agarose in 1 x TAE in der Mikrowelle aufgelöst und auf 50-60 °C abgekühlt. Es wurde 0,8 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben und die Agaroselösung in die vorbereitete Gießkammer gefüllt.

50 x TAE	242 g Tris HCl, pH 8,0 57,1 ml Essigsäure 50 mM EDTA ad 1 l Aqua dest.
6 x Ladepuffer	40 % (w/v) Saccharose 0,25 % (w/v) Bromphenolblau

2.5.1.19 DNA-Elution aus Agarose

Die gesuchten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht lokalisiert und aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben mit QIAex II Agarose Gel Extraction Kit oder QIAquick Spin Purification Kit (beide QIAGEN, HILDEN).

2.5.1.20 DNA-Aufreinigung aus Lösungen

Die DNA-Aufreinigung wurde mit dem QIAquick Spin Purification Kit (QIAGEN, HILDEN) lt. Protokoll durchgeführt.

2.5.1.21 Bestimmung des DNA-Gehalts

Der DNA-Gehalt wurde photometrisch bei 260 nm gemessen. Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{O.D.260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Faktor 50}$$
 (Faktor 50 gilt für doppelsträngige DNA)

2.5.1.22 PCR („Polymerase Chain Reaction“)

Die PCR wurde mit *Pwo*-Polymerase, die eine Korrekturlesefunktion besitzt, durchgeführt.

typischer PCR-Ansatz	5 µl 10x PCR-Puffer 1 µl DNA-Matrize 0,5 µl Oligonukleotid, 100 µM (5' nach 3') 0,5 µl Oligonukleotid, 100 µM (3' nach 5') 10 µl dNTP-Mix 32 µl Aqua dest. 3 Tropfen Mineralöl
----------------------	--

10x PCR-Puffer	100 mM Tris HCl, pH 8,3 500 mM KCl 20 mM MgCl ₂ 0,1 % (v/v) BSA
----------------	---

dNTP-Mix	je 1 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
----------	--------------------------------

Schritt 1	94 °C	4 min.	
2	80 °C	Pause	+ 0,5 µl <i>Pwo</i> -Polymerase
Denaturierung:3	94 °C	30 sec	
Anlagerung:4	58 °C	1 min.	
Synthese: 5	72 °C	2 min.	Wiederholung ab Schritt 3: 35 Zyklen
6	20 °C	Pause	

Die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide (Schritt 4) wurde in Abhängigkeit der Oligonukleotidsequenz und -länge gewählt und variierte von 58 °C bis 68 °C.

Für Topoisomerase-basierte Klonierungen wird ein 5'-A-Überhang benötigt. Hierfür wurde das PCR-Programm wie folgt verlängert:

Schritt 7	80 °C	Pause	+ 1 µl <i>Taq</i> -Polymerase
8	94 °C	30 sec	
9	60 °C	1 min.	
10	72 °C	30 sec	
11	20 °C	Pause	

2.5.1.23 Restriktionsverdau von Plasmiden

- 1 µg DNA
- 1 µl Restriktionsenzym (oder Doppelverdau mit 2 x 1 µl Enzym)
- 4 µl 10 x Puffer
- 2 h bis über Nacht bei 37 °C (abhängig vom gewählten Restriktionsenzym)

2.5.1.24 Auffüllen und Abdauen von DNA-Überhängen zu glatten Enden

Um 5'-Überhänge aufzufüllen, wurde Klenow-Fragment verwendet, zum Abdauen von 3'-Überhängen wurde T4-Polymerase verwendet.

- 40 µl Restriktionsansatz
- 5 µl dNTP
- 1 µl T4-Polymerase bzw. Klenow-Fragment
- 5 µl 10x Puffer
- Klenow: 15 min. bei 30 °C
- T4-Pol.: 5 min. bei RT, anschließend 10 min. Inaktivierung bei 70 °C

2.5.1.25 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um die Religationsrate des restringierten Vektors zu verringern, wurden dessen 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

- 17 µl Vektor-DNA (restringiert, nach Aufreinigung)
- 1 µl alkalische Phosphatase
- 2 µl 10x Puffer
- 1 h bei 37 °C

2.5.1.26 Ligation

Zur Ligation wurde das DNA Ligation Kit (Takara Bio, Berkeley, CA, USA) verwendet. Es wurden Vektor- und Gen-DNA in 5 µl zusammenpipettiert, so daß das DNA-Verhältnis etwa 1:3 bis 1:10 entsprach, abgeschätzt anhand eines Kontroll-Agarosegels mit 2-3 µl der beiden DNA-Lösungen. Außerdem wurde eine Kontroll-Ligation angesetzt, die statt der Gen-DNA Aqua dest. oder Puffer EB (aus QIAex II Agarose Gel Extraction Kit) enthielt. Zu den Proben wurden 5 µl Takara Lösung I gegeben und diese 30 min. bei 16 °C inkubiert. Danach wurden kompetente *E. coli* mit je 5 µl der Ligationsproben transformiert (s. 2.5.1.14 Transformation von *E. coli*).

2.5.1.27 Kontrollverdau

Nach erfolgreicher Ligation und Transformation wurden von der Transformationsplatte von Kolonien eine 2 ml LB-Amp Übernachtskultur angesetzt. Die DNA wurde wie beschrieben aufgereinigt (s. 2.5.1.17 Plasmid-Präparation im kleinen Maßstab) und 10-15 µl für einen Test-Restriktionsverdau eingesetzt. Dafür wurden zwei Restriktionsenzyme gewählt, von denen eines im Vektor nahe dem klonierten Gen, das andere so im Gen selbst schneidet, daß das Gen in zwei ungleich große Teile geschnitten wird. Nach einer Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.5.1.18) kann die Identität des Gens und bei einer Klonierung mit glatten Enden seine Orientierung festgestellt werden.

2.5.2 Baculovirus Expressionssystem

Das Baculovirus Expressionssystem dient der heterologen Proteinexpression in Insektenzellen aus *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH; Lepidoptera: Noctuidae), einer Nachtfalterart (Eulenfaller) aus den tropischen Regionen der westlichen Hemisphäre, auch als Heerwurm oder „fall armyworm“ bezeichnet. Als Vektor zur Einschleusung des Zielgens in die Zellen wird das Virus AcNPV (*Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus) verwendet (Baculovirus Expression Vector System, Instruction Manual, 4th Edition, July 1997).

2.5.2.1 Herstellung des GST-FLAG-CED-4-Virus: Kotransfektion (Lipofektion)

Als Plasmid wurde pAcG1-GST-FLAG-*ced-4* verwendet. 2×10^6 Sf9-Zellen wurden in einer 60 mm Petrischale ausgesät und stehengelassen, bis sie sich abgesetzt hatten. In der Zwischenzeit wurden 1 µg lineare virale DNA Baculogold (Pharmingen/ Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) und 3-5 µg Plasmid-DNA (pAcG1-GST-FLAG-*ced-4*) in 50-µl sterilem

Wasser in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt. In ein weiteres Reaktionsgefäß wurden 25 µl Lipofectin (1 mg/ml) und 25 µl steriles Wasser gegeben. Anschließend wurde der Inhalt des ersten Reaktionsgefäßes in das zweite überführt und die Reaktion 15 min. bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der Sf9-Zellen erst durch 4 ml Grace's Medium ohne Zusätze ersetzt, dann durch 3 ml (1 min. vor Ablauf der Inkubationszeit). Der Lipofectin-DNA-Ansatz wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben und sofort vorsichtig mit dem Medium verwirbelt. Nach einer Inkubationszeit von 4h bei 27 °C wurde das Medium abgesaugt und durch 4 ml TNM-FH Komplettmedium ersetzt. Die Zellen wurden 3–5 Tage bei 27 °C inkubiert, bevor der Überstand abgenommen wurde. Dieser enthielt Viren mit einem sehr geringen Titer und wurde im Plaque Versuch eingesetzt.

2.5.2.2 Plaque Versuch

$2,5 \times 10^6$ Sf9-Zellen wurden pro 60 mm Zellkulturplatte ausgesät. Für jede Verdünnungsstufe wurde eine Platte angelegt. Während die Zellen zum Absetzen stehengelassen wurden, wurde mit dem Virus-Überstand der Kotransfektion eine Verdünnungsreihe in je 2 ml TNM-FH mit den Stufen 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} angesetzt. Das Medium wurde durch die Virus-Verdünnungen ersetzt und die Zellen 2 h bei 27 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wurde 1 Teil Seaplaque-Agarose mit 2 x Grace's Medium gemischt. Dazu wurde 3 %ige Seaplaque-Agarose in der Mikrowelle geschmolzen und maximal 20 ml Seaplaque-Agarose pro 50 ml Röhrrchen angesetzt. Diese wurden 15-30 min. im Wasserbad bei 40 °C inkubiert. Analog wurden maximal 20 ml 2 x Grace's Medium plus 20 % FCS pro 50 ml-Röhrrchen abgefüllt und ebenfalls im Wasserbad equilibriert. Anschließend wurden je ein Röhrrchen 3 % Seaplaque-Agarose und 2 x Grace's Medium im Verhältnis 1:1 gemischt, so daß sich eine 1,5 %ige Seaplaque/Medium-Lösung ergab. Diese wurde in ein Wasserbad mit 35 °C überführt und 10-20 min. equilibriert (bei längerer Inkubation bei 35 °C wird die Agarose fest). Nachdem die Zellen 2 h bei 27 °C inkubiert worden waren, wurde das Medium so vollständig wie möglich abgesaugt und durch 4 ml 1,5 %ige Seaplaque-Agarose ersetzt. Hierbei wurden 10 ml-Plastikpipetten verwendet und die Agarose vom Rand aus pipettiert. Es ist zu beachten, daß die Agarose nicht wärmer als 35 °C ist, da sonst die Zellen sterben. Die fertigen Platten wurden unter der Sterilbank abgekühlt (nicht stapeln) und anschließend für 4-5 Tage in einer mit feuchten Papiertüchern ausgelegten Kammer bei 27 °C inkubiert.

2 x Grace's Medium für Plaque Assay (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 20 % FCS
3 % Seaplaque-Agarose, autoklaviert

2.5.2.3 Anfärben des Plaque Versuchs und Picken von Plaques

10 ml 3 % Seaplaque-Agarose wurden nach dem Schmelzen in der Mikrowelle in ein 50 ml-Röhrchen überführt und bei 40 °C im Wasserbad equilibriert. Zusätzlich wurden 30 ml TNM-FH in einem 50 ml-Röhrchen im Wasserbad inkubiert. Nach 15-20 min. wurden beide Lösungen gemischt, so daß sich eine 0,75 %ige Endkonzentration ergab. Zu 40 ml Agarose/Medium-Gemisch wurden 400 µl Neutralrot (Stammlösung: 10 mg/ml) hinzugegeben. Je 2 ml dieser Mischung wurden über die Agarose jeder 60 mm-Zellkulturplatte gegeben und abkühlen gelassen. Nach 6 h bis über Nacht Inkubation bei 27 °C färben sich die Virusplaques an. Unter dem Mikroskop konnten Einzelplaques markiert und mit einer Pipettenspitze ausgestochen werden. Jeder Plaque wurde über Nacht bei RT in 1 ml TNM-FH stehengelassen. Diese klonalen Virusstammlösungen dienten als Ausgangsmaterial für einen zweiten Plaque Versuch. Je 125 µl Viruslösung wurden in 2 ml TNM-FH gegeben, auf eine 60 mm-Zellkulturplatte mit $2,5 \times 10^6$ Sf9-Zellen gegeben (s. 2.5.2.2 Plaque Versuch). Die weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben. Nach dem Anfärben der Plaques wurden jeweils 4 Plaques gepickt und in 2-4 ml TNM-FH in eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte gegeben [s. 2.5.2.4 Titererhöhung a)].

2.5.2.4 Titererhöhung

a) 6-Loch-Platte

Pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte wurden $1-2 \times 10^5$ Sf9-Zellen ausgesät und sitzen gelassen. Es wurden je 4 Plaques eines Klons vom zweiten Plaque Versuch gepickt und zusammen in ein Loch gegeben. Als Kontrolle wurden die Zellen einer Vertiefung nicht infiziert. Die Platte wurde 5 Tage bei 27 °C inkubiert.

b) 100 mm Zellkulturplatte

Zur weiteren Titererhöhung wurden 5×10^6 Sf9-Zellen in eine 100 mm-Zellkulturschale ausgesät und nach dem Absetzen der Zellen 2 ml Virus-Überstand aus einer Vertiefung der 6-Loch-Platte hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 48 h bei 27 °C wurden die Zellen 5 min. bei 800 UpM zentrifugiert, der Überstand als Hochtiter-Virusstammlösung verwahrt und die Zellen bei -80 °C bis zur Expressions-Analyse im Western Blot gelagert.

2.5.2.5 Endpunkt-Verdünnungsversuch

Nach: Baculovirus Expression Vector System, (5/97), Pharmingen/ Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA. Der Endpunkt-Verdünnungsversuch wurde zur Abschätzung des Titers eines Virusüberstandes eingesetzt. Dazu wurden 3×10^5 Sf9-Zellen in 2 ml Medium pro Vertiefung einer 12-Loch-Platte (24-Loch: 1×10^5 Zellen in 500 µl) ausgesät. Nachdem sich die Zellen ab-

gesetzt hatten, wurden sie mit 100 µl, 10 µl, 1 µl und 0 µl des zu testenden Virus-Überstands und der *AcNPV* Wildtyp Virusstammlösung infiziert. Nach drei Tagen Inkubation wurde die Infektionsrate unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Eine Hochtiter-Virusstammlösung enthält mindestens 2×10^5 Viren/µl und führt im Endpunkt-Verdünnungsversuch zu einer gleichmäßigen Infektion in allen infizierten Löchern. Ist der Virustiter geringer, werden nicht alle Zellen infiziert.

2.5.2.6 Herstellung von rekombinantem CED-4

Es wurden 13 Mio. *Sf9*-Zellen pro 15 cm Platte ausgesät. Nach dem Absetzen wurden sie mit zuvor sterilfiltrierter Virus-Stammlösung infiziert (FLAG-CED-4 oder GST-FLAG-CED-4, mit einer MOI zwischen 1 und 10) und 66 h bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5 min. bei 800 UpM geerntet, gewaschen und bis zur Aufreinigung bei -80 °C gelagert.

MOI bedeutet die „multiplicity of infection“, d.h. das Verhältnis zwischen infektiösen Viren zu Zellen.

2.5.2.7 Aufreinigung von rekombinantem FLAG-CED-4 (baculoviral)

Um einen Teil der überflüssigen Proteine zu entfernen, wurden die Zellen zunächst mit S100 Puffer extrahiert (s. 2.5.1.2). Anschließend wurde das resultierende Präzipitat mit 1 % Triton/TBS (100 µl Puffer pro 1 Mio. Zellen) 15 min. auf Eis inkubiert. Es wurde 10 min. bei 13.000 x g in der Kühlischzentrifuge sedimentiert und der Überstand als Triton-Extrakt zur weiteren Aufreinigung verwendet. Konnte die Aufreinigung nicht direkt im Anschluß durchgeführt werden, wurde der Extrakt bei -80 °C gelagert.

1 % Triton/TBS	20 mM Tris HCl, pH 7,6
	137 mM NaCl
	1 % (v/v) Triton X-100

Der Triton-Extrakt wurde mit einer Anti-FLAG M2-Säule aufgereinigt. Dazu wurde 1 ml M2-Matrix in einen Säulenhohlkörper (Bio-Rad, München) gegeben und 3 x mit PBS gewaschen, bevor der Extrakt auf die Säule gegeben wurde. Anschließend wurde erneut 3 x mit PBS gewaschen. Zur Elution wurden 5 ml 0,1 M Glycin, pH 3,5 verwendet. Zur pH-Neutralisation wurden im Auffangbehälter 100 µl 1 M Tris, pH 8,0 vorgelegt. Das Eluat wurde gegen 2 x 1 l 20 mM HEPES KOH, pH 7,5 dialysiert, anschließend im Rundkolben bei -80 °C eingefroren und nach mindestens 16 h lyophilisiert und in 200-500 µl Aqua dest. resuspendiert. Anschließend wurde erneut gegen 2 x 1 l 20 mM HEPES KOH dialysiert.

2.5.2.8 Aufreinigung von GST-FLAG-CED-4

Die GST-FLAG-CED-4-exprimierenden Zellen wurden mit S100 (1 ml S100 auf 26 Mio. Zellen, Kanüle mit 22G, 1 x durchgezogen) extrahiert (s. 2.5.1.2). Der S100-Extrakt wurde anschließend mit Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Dazu wurden 2-3 ml Glutathion-Sepharose 3 x mit HNTG gewaschen, der S100-Extrakt hinzugegeben und mit HNTG auf 50 ml aufgefüllt (Drehrad, mindestens 2 h bei 4 °C). Danach wurde die Sepharose in einen Säulenhohlkörper gefüllt, 3 x mit PBS gewaschen und mit 10 ml Elutionspuffer eluiert, wobei 1 ml Fraktionen gesammelt wurden, von denen je 10 µl mittels Anti-FLAG-Western Blot und Coomassie-Färbung getestet wurden. Die positiven Fraktionen wurden vereinigt und gegen 2 x 1 l 20 mM HEPES KOH, pH 7,5 dialysiert.

HNTG	20 mM HEPES KOH, pH 7,5 150 mM NaCl 0,1 % Triton X-100 10 % Glycerin
Glutathion-Elutionspuffer	50 mM Tris, pH 8,0 100 mM reduziertes Glutathion

2.5.2.9 Thrombinverdau von GST-FLAG-CED-4

Für einen Thrombin-Testverdau wurden 20 µl GST-FLAG-CED-4-exprimierende *Sf9*-Zellen (nach einer Ultraschallbehandlung) mit 4 µl Thrombin, 10 µl Glutathion-Sepharose und 20 µl TCB angesetzt und 30 min., 1 h und 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Glutathion-Sepharose abzentrifugiert, mit Laemmli-Puffer versetzt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Auch nach mehrmaligen Versuchen konnte keine Abtrennung des GST-Fusionsanteils beobachtet werden, weshalb auf diesen Schritt verzichtet wurde.

Stammlösung: 1 u/µl Thrombin

Thrombin cleavage buffer (TCB): 50 mM Tris HCl, pH 8,0
150 mM NaCl
2,5 mM CaCl₂
0,5 mM DTT

2.5.3 Spezielle Methoden Teil 1: Molekulare Eigenschaften von CED-4

2.5.3.1 Herstellung von bakteriellem FLAG-CED-4

Zur Expression von bakteriellem FLAG-CED-4 in *E. coli* BL21(DE3) wurde der Vektor pFLAG-*ced-4* verwendet. Transformation und Expression wurden nach Standardprotokoll (s. 2.5.1.14 und 2.5.16) durchgeführt.

2.5.3.2 Aufreinigung von bakteriellem FLAG-CED-4

Nach der FLAG-CED-4-Expression wurden die Bakterien in 10 ml PBS inkl. Proteaseinhibitor und einer Spatelspitze Lysozym resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien mit Ultraschall (mehrmals etwa 10 s lang) aufgebrochen und 20 min. mit 12.000 UpM in der Sorvall-Zentrifuge präzipitiert. Der Überstand wurde erst durch einen 0,45 µm Filter, dann durch einen 0,22 µm Filter sterilfiltriert und danach auf eine Anti-FLAG-M2-Säule gegeben (weitere Aufreinigung s. 2.5.2.7 Aufreinigung von rekombinantem FLAG-CED-4).

2.5.3.3 Intrazelluläre Färbung für Durchflußzytometrie und konfokale Mikroskopie

In einer 6-Loch-Platte wurden 580.000 *Sf9*-Zellen pro Vertiefung ausgesät und mit FLAG-CED-4- oder GST-FLAG-CED-4-Virus infiziert (Negativkontrolle: nicht infizierte Zellen). Die Zellen wurden zwei oder drei Tage bei 27 °C inkubiert. Für die Zellfärbung wurden die Zellen geerntet, gewaschen und jeweils 500.000 Zellen pro Ansatz verwendet. Die Zellen wurden entweder mit 2 % Formalin (4 % Stocklösung, 1:2 mit PBS, 20 min. bei RT), 100 % Aceton oder 100 % Methanol 20 min. bei -20 °C fixiert. Anschließend wurden sie zunächst mit PBS, dann mit PBS/BSA gewaschen und mit Erstantikörper (Anti-FLAG, 1:1000 in PBS/BSA/Saponin, 1,5 h) versetzt. Danach wurden die Zellen 3 x mit PBS/BSA/Saponin gewaschen und mit Zweitantikörper behandelt (Anti-Maus-Cy3, 1:500 in PBS/BSA/Saponin, 30 min.). Anschließend wurde einmal mit PBS/BSA/Saponin und zweimal mit PBS/BSA gewaschen, bevor die Zellen in 400 µl PBS/BSA aufgenommen wurden.

Zur Überprüfung der Proteinexpression wurde eine Durchflußzytometrie mittels „Fluorescence-activated Cell Sorter“ (FACS) im FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) durchgeführt. Die Zellen werden dabei einzeln an einem Laser vorbeigeführt. Das Laserlicht wird entsprechend der Zellgröße (sichtbar im Vorwärtsstreulicht) und der Granularität der Zellen (sichtbar im Seitwärtsstreulicht) gestreut. Das Gerät wurde mit Hilfe der entsprechenden

Negativkontrolle kalibriert. Vorwärtsstreuung („forward scatter“) und Seitwärtsstreuung („side scatter“) wurden in einem Diagramm als X- bzw. Y-Achse dargestellt. Die lebenden Zellen (hohe Vorwärtsstreuung, niedrige Seitwärtsstreuung) wurden selektiv betrachtet und ihre Fluoreszenzintensität im Kanal FL-2 bei 575 nm (Anregung bei 488 nm mit einem Argon-Laser) beurteilt. Es wurden 10.000 Zellen pro Probe gezählt. Die Darstellung und Auswertung erfolgte mit dem Computer-Programm CellQuest (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Zur konfokalen Mikroskopie wurden 40.000-50.000 Zellen im Cytospin 3 (Shandon, Pittsburgh, PA, USA) 5 min. bei 750 UpM (= 63,5 x g) auf einen Objektträger zentrifugiert. Danach wurden die Proben entweder mit Entellan betropft, und es wurde ein Deckglas aufgelegt, oder mit PBS betropft und nach dem Auflegen des Deckgläschens dieses am Rand mit Nagellack versiegelt. Nach dem Trocknen wurden die Proben im Axiovert 100 M Laser Scanning Mikroskop (Zeiss, Jena) mikroskopiert; die Darstellung erfolgte mit dem Programm LSM 5 Image Browser (Carl Zeiss, Göttingen)

PBS/BSA	0,5 % BSA in PBS
PBS/BSA/ Saponin	0,5 % (w/v) BSA, 0,5 % (w/v) Saponin in PBS

2.5.3.4 Chemische Kreuzvernetzung von Proteinen

Dieser Versuch dient der chemischen Kreuzvernetzung von Proteinen, die in Lösung eng benachbart vorliegen, d.h. in der Regel miteinander interagieren. Folgende wasserlösliche Chemikalien wurden verwendet: BS³ (nicht-spaltbar) und DTSSP (Thiol-spaltbar).

Es wurden 100–250 ng FLAG-CED-4 oder GST-FLAG-CED-4 pro Reaktion in S100 inkl. 100 µg/ml BSA eingesetzt. Die zu behandelnden Proben wurden zusammenpipettiert (Endvolumen 10-20 µl) und 30 min. bei RT inkubiert. Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit wurde die gewünschte kreuzvernetzende Chemikalie mit einer Konzentration von 20 mM in 5 mM Zitronensäure, pH 5,0, gelöst und bis zu einer Endkonzentration von 2 mM zur Probe gegeben. Nach 15 min. Inkubation wurde die Reaktion mit 1 µl 1,5 M Tris, pH 8,5, gestoppt und für einen Western Blot aufbereitet.

Bei Verwendung von DTSSP wurde das doppelte Probenvolumen angesetzt und die Probe nach dem Reaktionsstopp geteilt. Eine Hälfte wurde in normalem Laemmli-Puffer aufgenommen, die andere in Laemmli-Puffer ohne DTT und anschließend wie gewohnt aufgekocht.

S100	s. 2.5.1.2
S100 inkl. 100µg/ml BSA	= Reaktionspuffer bei Radioaktivitätsversuchen

2.5.3.5 Nukleotidbindungsversuch und Kompetitionsversuch

(nach Jiang & Wang, 2000)

Für den Nukleotidbindungsversuch wurden Reaktionen mit einem Endvolumen von 20 µl bis 40 µl angesetzt, die in unterschiedlichen Mengen FLAG-CED-4 oder GST-FLAG-CED-4 sowie radioaktive Nukleotide (7400–14800 Bq [α - 32 P]-ATP oder [α - 32 P]-dATP) enthielten. Beim Kompetitionsversuch wurden außerdem vor Zugabe der heißen Nukleotide unterschiedliche nicht-radioaktive Nukleotide hinzutitriert. Die Proben wurden 30 min. bei 30 °C inkubiert, bevor sie mit Hilfe eines „Dot Blotters“ durch eine Nitrocellulosemembran gesaugt wurden. Anschließend wurde 4 x mit 400 µl Waschpuffer gewaschen. Die Membran wurde getrocknet, in Haushaltsfolie eingeschlagen und über Nacht auf einem PhosphoImager-Schirm exponiert. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit ImageQuant 4.2a (Molecular Dynamics/Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden).

Reaktionspuffer	20 mM HEPES KOH, pH 7.5 10 mM KCl, 3,5 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 1 mM EGTA 100 mg/ml BSA
Waschpuffer	20 mM Tris, pH 8,0 100 mM NaCl 40 mM MgCl ₂

2.5.3.6 Herstellung von [35 S] Methionin-markiertem CED-3

Die Herstellung erfolgte mit dem TNT Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega, Madison, WI, USA). Als Konstrukt wurde pSK(-)-*ced-3* (von Dr. Barbara Conradt, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) verwendet.

Folgende Komponenten wurden auf Eis zusammenpipettiert:

- 25 µl TNT Kaninchen-Reticulozytenlysat
- 2 µl TNT Reaktionspuffer
- 1 µl RNasin (40u/µl)
- 1 µl Aminosäuremix, ohne Leucin, 1 mM
- 1 µg DNA Matrize
- 1 µl TNT T3 RNA Polymerase
- 2 µl [35 S] Methionin
- ad 50 µl DEPC-Wasser

Der Ansatz wurde 90 min. bei 30 °C inkubiert

Zur Analyse der Translationseffizienz wurden 1-2 µl der Reaktion in einer SDS-PAGE getestet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf Filterpapier getrocknet und auf einen Radioaktivitätsschirm aufgelegt. Nach Ablauf der Belichtungszeit wurde der Schirm in den

PhosphoImager eingelesen und mit ImageQuant 4.2a (Molecular Dynamics/Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) analysiert.

2.5.3.7 Präzipitation von [³⁵S] Methionin-markiertem CED-3

Für die Präzipitation von [³⁵S] Methionin-markiertem CED-3 mit GST-FLAG-CED-4 wurden Proben in Reaktionspuffer (20 µl Gesamtvolumen) angesetzt, die 600-900 ng GST-FLAG-CED-4, verschiedene Konzentrationen von ATP bzw. ATP-γ-S und 1-3 µl [³⁵S] Methionin enthielten. Nach 30 min. Inkubation bei 30 °C wurden 20 µl Glutathion Sepharose 4B und 500 µl HNTG hinzugefügt. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert, anschließend 3 x mit HNTG gewaschen und in 20 µl Laemmli Puffer resuspendiert. Nach der SDS-PAGE wurden die Gele auf dickem Filterpapier aufgespannt, getrocknet, auf einen PhosphoImager-Schirm aufgelegt und nach Ablauf der Belichtungszeit (mindestens 16 h) mit ImageQuant 4.2a (Molecular Dynamics/Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) ausgewertet.

Reaktionspuffer + HNTG s. 2.5.3.5 und 2.5.2.8

2.5.4 Spezielle Methoden Teil 2: CED-4 und Histone

2.5.4.1 Far Western Blot (nach Blanar & Rutter, 1992)

Der Far Western Blot dient dem Nachweis von Protein-Interaktionen. Es wird eine SDS-PAGE (s. 2.5.1.4) mit Proteinen oder Extrakten durchgeführt, die Interaktionspartner des gewünschten Proteins enthalten. Die Proteine werden wie üblich auf Nitrocellulose transferiert (s. 2.5.1.5). Anschließend wird das folgende Protokoll durchgeführt:

60 min.	Lösung 1
30 min.	Lösung 2
über Nacht (4 °C)	Lösung 3 + Protein, dessen Interaktionspartner gesucht wird: z. B. FLAG-CED-4 oder GST-FLAG-CED-4
3x 10 min.	Lösung 3

danach Membran trocknen, weiter wie im Western Blot (ab 5 % MMP)

Lösung 1	1x HBB; 1 mM DTT; 5 % (w/v) MMP; 0,05 % (v/v) NP-40
Lösung 2	1x HBB; 1 mM DTT; 1 % (w/v) MMP; 0,05 % (v/v) NP-40
Lösung 3	Hyb(75); 1 mM DTT; 1 % (w/v) MMP; 0,05 % (v/v) NP-40

10x HBB	250 mM HEPES KOH, pH 7,7 250 mM NaCl 50 mM MgCl ₂
Hyb(75)	HEPES KOH pH 7,7 75 mM KCl 0,1 mM EDTA 2,5 mM MgCl ₂

Es sind KCl-Konzentrationen zwischen 75 mM (Hyb 75) und 200 mM (Hyb 200) möglich.

2.5.4.2 Far Western Blot mit [γ -³²P]-FLAG-CED-4

(nach Blanar & Rutter, 1992)

Es wurden 10 μ l FLAG-CED-4 (*E. coli*, Herstellung s. 2.5.3.1) mit 5 μ l [γ -³²P]-ATP (>6.000 Ci/mmol) und 1 μ l Herzmuskelkinase (10 u/ μ l) in 1x HMK-Puffer für 60 min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde ein Pufferaustausch mit einer PD10-Säule nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Säule wurde mit 20 ml Puffer Z'' equilibriert. Der Reaktionsansatz wurde in 1 ml Puffer Z'' aufgenommen, auf die Säule gegeben und mit 0,5 ml Puffer Z'' in die Säule gewaschen. Die Elution erfolgte mit 3 x 0,5 ml Puffer Z''; die Fraktionen wurden anschließend vereinigt. 500 μ l wurden in 10 ml Hyb(75) aufgenommen und in Lösung 3 des Far Western Blots (s. 2.5.4.1) verwendet. Der Nachweis der Radioaktivität erfolgte im Phospho-Imager.

10x HMK-Puffer	200 mM Tris HCl, pH 7,5 10 mM DTT 1 M NaCl 120 mM MgCl ₂
Puffer Z''	25 mM HEPES KOH, pH 7,7 12,5 mM MgCl ₂ 20 % Glycerin 100 mM M KCl, 3 mg/ml BSA 1 mM DTT (Zugabe direkt vor Gebrauch) vor Gebrauch filtriert (0,2 μ m)

2.5.4.3 Zellextrakte mit hypotonischem Puffer (HP) und KCl-haltigem Puffer

(nach Spudich *et al.*, 1971)

Aus Jurkat-Zellen wurde ein NP-40-Extrakt hergestellt, dessen Präzipitat weiterverwendet wurde. Dieses wurde mit 10 μ l HP pro 1 Mio. Zellen versetzt, mit Ultraschall behandelt und 1,5 h bis über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 h bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird als HP-Extrakt bezeichnet. Zur Herstellung eines KCl-Extraktes wird genauso verfahren, mit dem Unterschied, daß der HP zusätzlich 0,6 M KCl versetzt wird.

Hypotonischer Puffer (HP)	2 mM Tris HCl, pH 8,0 0,2 mM ATP 0,5 mM DTT 0,2 mM CaCl ₂
---------------------------	---

HP mit KCl	Hypotonischer Puffer, pH 8,0 (s.o.) 0,6 M KCl
------------	--

Die Puffer dienen ursprünglich der Depolymerisierung des Aktin-Cytoskelets.

2.5.4.4 Kernextrakte (nach Sambrook *et al.*, 1989)

Es wurden 50 Mio. Jurkat-Zellen geerntet, einmal in 750 µl PBS und einmal in 750 µl hypotonischem Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 450 µl hypotonischem Puffer resuspendiert und 10 min. auf Eis schwellen gelassen. Nach dem Schwellen wurden die Zellen im Dounce-Homogenisator mit 10 Stößen lysiert. Die Kerne wurden 15 min. bei 3.300 x g sedimentiert. Anschließend wurden sie zunächst in 50 µl Niedrigsalzpuffer resuspendiert; dann wurden 50 µl Hochsalzpuffer hinzugefügt und die Kerne mit 3-4 Stößen homogenisiert. Sie wurden 30 min. bei 4 °C auf dem Drehrad extrahiert und 30 min. bei 25.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde 2 x 30 min. in 500 ml Dialyse-Puffer dialysiert und 20 min. bei 25.000 x g zentrifugiert. Der Überstand entspricht dem Kernextrakt und wurde bei -80 °C gelagert.

Hypotonischer Puffer	10 mM HEPES KOH, pH 7,9 1,5 mM MgCl ₂ 10 mM KCl 0,2 mM PMSF 0,5 mM DTT
Hochsalz-Puffer	20 mM HEPES KOH, pH 7,9 25 % Glycerin 1,5 mM MgCl ₂ 1,2 M KCl 0,2 mM EDTA 0,2 mM PMSF 0,5 mM DTT
Niedrigsalz-Puffer	wie Hochsalz-Puffer, aber mit 0,2 mM KCl
Dialyse-Puffer	20 mM HEPES KOH, pH 7,9 20 % Glycerin 100 mM KCl 0,2 mM EDTA 0,2 mM PMSF 0,2 mM DTT

2.5.4.5 Behandlung mit Taxol (Paclitaxel), Cytochalasin B und D

Von 3 x 5 Mio. Jurkat-Zellen wurden NP-40-Extrakte hergestellt. Zwei der verbleibenden Präzipitate wurden mit 10 µM Taxol in HP oder TBS inkubiert, das dritte wurde mit 10 µM Taxol und 0,6 M KCl versetzt. Die Proben wurden 4 h bei 4 °C inkubiert und anschließend ein Far Western Blot durchgeführt.

Alternativ wurde 1 Mio. Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät und direkt mit 10 μM Taxol für 2 h oder 4 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde ein NP-40-Extrakt hergestellt und sowohl Überstand als auch Präzipitat im Far Western Blot getestet.

20 μM Cytochalasin B wurden zu 1 Mio. Jurkat-Zellen gegeben, und diese wurden für 2 h oder 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde ein NP-40-Extrakt hergestellt und Sediment und Überstand im Far Western Blot getestet.

Cytochalasin D wurde in einer Konzentration von 20 μM und 40 μM zu 1 Mio. Jurkat-Zellen gegeben, und diese für 2 h oder 4 h inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte wie für Cytochalasin B.

HP s. 2.5.4.3 Hypotonischer Puffer

TBS s. 2.5.1.5

KCl-Puffer s. 2.5.4.3 HP mit KCl

2.5.4.6 Histonextraktion mit H_2SO_4

(nach Sambrook *et al.*, 1989)

Statt der im Originalprotokoll verwendeten isolierten Zellkerne wurden als Ausgangsmaterial je 100 μl HP- oder KCl-Extrakt eingesetzt, zu denen 11 μl DNase I Stammlösung und 12,3 μl 2 M H_2SO_4 addiert wurden, so daß die Endkonzentration 0,2 M H_2SO_4 betrug. Es wurde 1 h bei 4 °C inkubiert, anschließend wurden die Proben 10 min. bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde direkt in 25 μl 4 x Laemmli-Puffer aufgenommen. Der Überstand wurde mit 30,75 μl TCA gefällt (s. 2.5.1.10 TCA-Fällung) und das resultierende Sediment in 25 μl Laemmli-Puffer resuspendiert. Vor dem Aufkochen wurde beiden Proben 2 μl einer 1,5 M Tris, pH 8,0 Stammlösung hinzugefügt.

DNase I Stammlösung s. 2.5.1.12 2-D-Gelelektrophorese

2.5.4.7 Histonfraktionierung, Methode 2 nach Johns (1964)

Als Ausgangsmaterial wurde ein bei der Herstellung eines HP-Extraktes aus 50 Mio. Jurkat-Zellen anfallendes Sediment verwendet. Dieses wurde mit Ultraschall behandelt (mehrere kurze Stöße mit niedriger Energie), danach 800 μl EtOH und 200 μl 1,25 N HCl hinzuaddiert und über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Dann wurde 15 min. bei 1.100 x g sedimentiert. Anschließend wurden alle Arbeitsschritte nach der Ultraschallbehandlung mit halbierten Flüssig-

keitsmengen und auf 3 h verkürzter Inkubationszeit wiederholt, wobei die Überstände vereinigt wurden (Überstand 1).

Sediment 1 wurde mit 500 µl Aqua dest. und 150 µl 1,25 N HCl versetzt, mit Ultraschall behandelt und auf der Drehrad über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde 10 min. bei 1.100 x g sedimentiert. Der Schritt wurde zweimal mit 375 µl Aqua dest. und 75 µl HCl bei einer Inkubationszeit von 2 h wiederholt. Die Überstände wurden zu Überstand 2 vereinigt, Sediment 2 (Abfall) in 50 µl Laemmli aufgenommen. Zum Überstand 2 wurden bei RT 3 Volumen Aceton hinzugefügt. Das resultierende Präzipitat – Fraktion f1 – wurde einmal mit einem Gemisch (3:1) aus Aceton und 0,25 N HCl gewaschen, sedimentiert und getrocknet. Der Aceton-Überstand wurde zweimal mit Aceton gewaschen und getrocknet, er entspricht Fraktion f2(b).

Überstand 1 wurde über Nacht gegen 200 ml EtOH inkl. 103 µl HCl (25 %ig) dialysiert. Anschließend wurde 10 min. bei 1.100 x g sedimentiert, das Präzipitat einmal in EtOH und dreimal in Aceton gewaschen, dann getrocknet; es entspricht Fraktion f3. Der Dialyse-Überstand wurde mit 3 Volumen Aceton präzipitiert und getrocknet und ist Fraktion f2(a). Die getrockneten Präzipitate aller Fraktionen wurde in 50 µl Laemmli-Puffer resuspendiert.

Fraktion f3 wurde später für Präzipitationsversuche (s. 2.5.4.10) hergestellt und dabei in 100 µl Aqua dest. resuspendiert.

2.5.4.8 Herstellung der Plasmide pET 3A-*h4b+* und pET 3A-*h4b-*

Das Konstrukt pUC19-*h4b* wurde von Prof. Dr. Detlef Doenecke (Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt. *h4b* wurde mit PCR und den Oligonukleotiden h4b257-s und h4b269-as amplifiziert und mittels Topoisomerase-vermittelter Klonierung in den Vektor pCRII kloniert (lt. TOPO TA Cloning, Version I, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Anschließend wurden der Vektor pET3a und das Konstrukt pCRII-*h4b* mit *Bam*HI verdaut. *h4b* wurde aufgereinigt und ungerichtet in pET3a kloniert. Es wurden zwei Klone ausgewählt, einer mit *h4b* in der richtigen Orientierung (pET3a-*h4b+*, H4+), einer mit *h4b* in der entgegengesetzten Orientierung (pET3a-*h4b-*, H4-) als Negativkontrolle.

2.5.4.9 Expression von Histon H4b in *E. coli* AD494(DE3)

(nach Burnett & Springer, 1999)

Die Expression von humanem Histon H4b wurde im *E. coli*-Stamm AD494(DE3) vorgenommen, da dieser Stamm außergewöhnlich langsam wächst (Der Stamm besitzt keine Thio-redoxinreduktase, um die Faltung von Proteinen mit Disulfid-Bindungen zu verbessern). Die

Bakterien wurden mit pET3a-*h4b*⁺ und pET3a-*h4b*⁻ transformiert (s. 2.5.1.14). Mit den transformierten Bakterien wurden über Nacht-Kulturen (nur Ampicillin, ohne Kanamycin) angesetzt, die am Morgen 1:25 verdünnt wurden. Zusätzlich wurde Kanamycin hinzugegeben (500 µg/ml). Nach etwa 6 h hatten die Kulturen eine O.D.600 von ca. 0,5-0,6, und die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Anschließend wurden die Bakterien für 6 h bei 37 °C inkubiert. Von den Kulturen wurden für jede Geltasche 100 µl entnommen, die Bakterien abzentrifugiert und in 11 µl 1 x Laemmli resuspendiert (für Coomassie-Färbung und Far Western Blot).

2.5.4.10 Immun- und Affinitätspräzipitation (auch invers)

Es wurden jeweils 10–20 µl Sepharose verwendet, die zunächst 3 x mit HNTG gewaschen. Protein G Sepharose wurde anschließend in 500 µl HNTG mit 1 µl Anti-FLAG-Antikörper abgesättigt (1-2 h bei 4 °C, Drehrad); Glutathion-Sepharose wurde ausschließlich gewaschen. Entsprechenden Negativkontrollen mit jeweils nur einem der verwendeten Bestandteile wurden mitgeführt. Bei Verwendung von Zellextrakten, die das Kontrollprotein enthielten, wurde CED-4 mit gleichen Mengen an Extrakt aus pEF-Sem-transfizierten Zellen (Leervektor) versetzt. Die Sedimente wurden in 20 µl Laemmli resuspendiert. Nach der Inkubation wurden die Proben 3 x mit HNTG gewaschen, sedimentiert und in 20 µl Laemmli-Puffer aufgenommen.

A: Für die Präzipitationen wurden 10–20 µl GST-FLAG-CED-4 oder FLAG-CED-4 und 2-10 µl Histonfraktion f3 eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden 10 µl GST-IκBα, 15 µl FLAG-Caspase-3 und 100 µg FLAG-hRPB11 (Zellextrakt) anstelle von CED-4 verwendet. Die Proben wurden zusammenpipettiert, 15-30 min. bei RT oder 37 °C inkubiert, auf die gewaschene Sepharose gegeben und mit HNTG auf 500 µl aufgefüllt. Die Proben wurden auf dem Drehrad bei 4 °C über Nacht inkubiert.

B: Nachdem beobachtet worden war, daß Histone unspezifisch an die Sepharose adhäreren, wurde ein Versuch zur Verminderung der Interaktion zwischen Histonen und Sepharose durchgeführt. Hierzu wurden S100 und HNTG als Puffer verwendet, beide mit jeweils 0,1 mg/ml und 0,5 mg/ml BSA versetzt. wie viel Histonfraktion f3 wurden sowohl mit Glutathion-Sepharose als auch mit Anti-FLAG behandelte Protein G-Sepharose in den oben genannten Puffern über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert.

C: Da sich die unspezifischen Interaktionen zwischen Histonen und Sepharose nicht völlig vermeiden ließen, wurde stattdessen ein anderer Ansatz gewählt: Glutathion-Sepharose wurde 3 x mit HNTG und 1 x mit S100 gewaschen und 1 h auf dem Drehrad bei 4 °C mit 5 µl Histonfraktion f3 (s. 2.5.4.7) inkubiert. Anschließend wurde 3 x mit S100 gewaschen, 25 µl FLAG-CED-4 oder 100 µg FLAG-hRPB11 (S100-Zellextrakt) dazugegeben und über Nacht auf dem Drehrad inkubiert (4 °C).

HNTG s. 2.5.2.11 Aufreinigung von GST-FLAG-CED-4
S100 s. 2.5.1.2

2.5.4.11 Yeast-Two-Hybrid (CED-4 und Histon H4b)

2.5.4.11.1 Herstellung der Plasmide

1) *pLexA-ced-4* und *pYES-h4b*

A) *pLexA-ced-4*: Zunächst wurde die cDNA von *ced-4* mittels PCR mit den Oligonukleotiden *ced4cardLex-s* und *ced4Lex3-as* aus dem Konstrukt *pGem7-ced-4* amplifiziert. Anschließend erfolgte eine Topoisomerase-vermittelte Klonierung in den Vektor *pCRII* (TOPO TA Cloning, Version I, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Im zweiten Schritt wurde *pCRII-ced-4* mit *Spe I* und *Not I* verdaut, die DNA-Enden geglättet und *ced-4* in den Vektor *pLexA202* kloniert. Dieser war zuvor mit *Bam HI* geschnitten und ebenfalls geglättet worden.

B) *pYES-h4b*: Die Konstrukte *pYESTrp-hrpb11* und *pCRII-h4b* wurden mit *Eco RI* verdaut. Anschließend wurde *h4b* in *pYESTrp* kloniert.

2) *pLexA-h4b* und *pYES-ced-4*

A) *pLexA-h4b*: Die beiden Plasmide *pLexA202* und *pYES-h4b* wurden mit *Eco RI* verdaut und die Enden mit Klenow geglättet. Anschließend wurde *h4b* in *pLexA* kloniert.

B) *pYES-ced-4*: Das Konstrukt *pYES-h4b* wurde mit *Eco RI* geschnitten und mit Klenow geglättet. Der Vektor *pCRII-ced-4* wurde mit *Not I* und *Spe I* verdaut und ebenfalls mit Klenow geglättet. Danach wurde *h4b* in *pYESTrp* kloniert.

2.5.4.11.2 Hefe-Transformation im kleinen Maßstab

(nach: Hybrid Hunter Version D, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

10 ml U⁻ wurden mit einer Hefe-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Optische Dichte bei 600 nm bestimmt und die Kultur so verdünnt, daß

eine O.D.600 von 0,4 in 50 ml Medium eingestellt wurde. Nach 2–4 h Wachstum wurden die Zellen bei 2500 UpM sedimentiert, in 40 ml 1 x TE resuspendiert, erneut sedimentiert und in 2 ml 1 x LiAc/0,5 x TE resuspendiert. Die Zellen wurden 10 min. bei RT inkubiert. Anschließend wurden 1 µg Plasmid-DNA, 100 µg denaturierte Lachssperma-DNA und 100 µl der Hefesuspension gemischt, 700 µl 1 x LiAc/40 % PEG-3350/1 x TE hinzugefügt und gut gemischt. Diese Lösung wurde dann bei 30 °C 30 min. inkubiert. Anschließend wurden 88 µl DMSO hinzu pipettiert, gemischt und 7 min. auf 42 °C erwärmt. Die Suspension wurde 10 sec sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 1 x TE gewaschen, in 50–100 µl TE resuspendiert und auf einer selektiven Platte ausplattiert (UH⁻ bei einer Transformation mit dem ersten Plasmid, UHW⁻ bei einer Transformation mit dem zweiten Plasmid).

10 x TE	100 mM Tris, pH 7,5 10 mM EDTA
1 x TE	10 mM Tris, pH 7,5 1 mM EDTA
10 x LiAc	1 M Lithiumacetat, pH 7,5 (mit Essigsäure eingestellt)
1 x LiAc	100 mM Lithiumacetat, pH 7,5
1 x LiAc/0,5x TE	100 mM Lithiumacetat, pH 7,5 5 mM Tris HCl 0,5 mM EDTA
1 x LiAc/40 % PEG-3350/1 x TE	100 mM Lithiumacetat, pH 7,5 40 % (w/v) PEG-3350 10 mM Tris HCl, pH 7,5 0,5 mM EDTA

2.5.4.11.3 Hefe-Expressionstest

(nach: Hybrid Hunter Version D, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Um die Expression des LexA-Fusionsproteins in der Hefe zu überprüfen wurden 5 ml UMedium mit einer Einzelkolonie des „Bait“(Köder-)Stamms angeimpft und über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit EGY48/pSH18-34. Die Zellen wurden 5 min. bei 2.500 UpM sedimentiert und bei –80 °C für 10 min. eingefroren. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl auf 60 °C vorgewärmten Hefe-Lysepuffer aufgetaut und resuspendiert. Die Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, das 100 µl Glaskügelchen enthielt, überführt, für 10 min. bei 70 °C inkubiert und danach für 1 min. gevortext. Anschließend wurden die Zellen bei 14.000 UpM sedimentiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 30–50 µl Laemmli Puffer zugegeben, und die Proben im Anti-LexA-Western Blot analysiert.

Hefe-Lysepuffer	8 M Harnstoff
	5 % (w/v) SDS
	40 mM Tris HCl, pH 6,8
	0,1 mM EDTA
	1 % 2-Mercaptoethanol
	0,4 mg/ml Bromphenolblau

2.5.4.11.4 Reportergerüsttest (UHWL⁻ / UHWL⁻ X-Gal)

(nach: Hybrid Hunter Version D, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Im Reportergerüsttest werden zwei Proteine auf eine Interaktion miteinander untersucht. Die Proteine werden in einen Köder- (pLexA202) und einen Fisch-Vektor (pYESTrp) kloniert. *S. cerevisiae* EGY48/pSH18-34 wird mit beiden Konstrukte transformiert (s. 2.5.1.14) und auf UHW-Platten ausgestrichen. Anschließend werden sie auf UHWL⁻ und UHWL⁻ X-Gal-Platten ausgestrichen. Eine durch die Interaktion beider Proteine verursachte Genaktivierung erlaubt das Wachstum auf UHWL⁻ und führt zu einer Blaufärbung auf UHWL⁻ X-Gal.

2.5.5 Spezielle Methoden Teil 3: Identifikation eines kreuzreagierenden Proteins: RBPP34

2.5.5.1 Isolierung von Mitochondrien

Etwa 50-100 Mio. Jurkat-Zellen wurden mit 1.500 UpM zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen, in 1 ml S100 Puffer resuspendiert, 15 min. bei 4 °C schwellen gelassen und im 1 ml Dounce Homogenisator geöffnet (mit 10–20 Stößen, mikroskopische Kontrolle mit Eosin, bis ca. 80 % der Zellen lysiert waren). Es wurde zweimal mit 700 x g zentrifugiert, wobei die Präzipitate verworfen wurden. Anschließend wurden die Mitochondrien mit 10.000 x g sedimentiert und bei –80 °C gelagert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

2.5.5.2 Mitochondrienextrakt

Zu Mitochondrien aus ca. 100 Mio. Zellen wurden 150-300 µl Mitochondrien-Puffer gegeben. Nach dem Resuspendieren wurden die Mitochondrien 1-2 h bei 4 °C mit wiederholtem Vortexen inkubiert. Im Anschluß wurde 10 min. bei 15.000 UpM in der Tischzentrifuge bei 4 °C zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde abgenommen und bei –80 °C gelagert.

Mitochondrien-Puffer	20 mM Tris HCl, pH 8,5
	30 mM NOGP

2.5.5.3 Tris/Tricin-gepufferte Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(aus Sambrook *et al.*, 1989)

Stammlösung	Trenngel	Sammelgel
30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid	9,80 ml	1,62 ml
Tris/SDS, pH 8,45	10,00 ml	3,10 ml
Aqua dest.	7,03 ml	7,78 ml
Glycerin	3,17 ml	---
10 % (w/v) APS	150 µl	75 µl
TEMED	30 µl	15 µl

Anodenpuffer	0,2 M Tris HCl, pH 8,9
Kathodenpuffer	0,1 M Tris Base (ohne pH-Wert Korrektur) 0,1 M Tricin 0,1 % (w/v) SDS
Tris/SDS, pH 8,45	3 M Tris HCl 0,3 % (w/v) SDS
4x Tris/SDS, pH 6,8	0,5 M Tris HCl, pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
2x Tricin Probenpuffer	2 ml 4x Tris/SDS, pH 6,8 2,4 ml Glycerin (30 % (v/v)) 1 g SDS (10 % (w/v)) 0,93 g DTT (0.6 M) 1,2 mg Bromphenolblau (0,012 % (w/v)) ad 10 ml Aqua dest.

2.5.5.4 Präparative SDS-PAGE mit Mitochondrienextrakt

Die präparative Auftrennung von Mitochondrienextrakten zur Darstellung des gesuchten kreuz-reagierenden Proteins wurden mit zwei nacheinander durchgeführten SDS-Gelelektrophoresen durchgeführt. Zunächst wurde eine „normale“ Tris/Glycin-gepuffertem SDS-PAGE eingesetzt (s. 2.5.1.4), gefolgt von einer Tris/Tricin-gepufferten SDS-PAGE. Dies führte zu einer bessern Auftrennung im gewünschten Bandenbereich.

Es wurden 10 mg Gesamtprotein in 1,5 ml Mitochondrienextrakt über die gesamte Breite eines 10 %igen 15 cm x 20 cm Gels aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Tasche für den Proteinstandard konstruiert (vgl. 2.5.1.12, IEF, 2. Dimension). Das Gel wurde im SE660 (Amersham) mit Tris/Glycin-gepuffertem Laufpuffer aufgetrennt. Der gesuchte Bandenbereich zwischen 30 kDa und 50 kDa wurde ausgeschnitten und in fünf waagerechte Streifen unterteilt. Die äußeren Enden jedes Streifens wurden auf eine Nitrocellulosemembran gelegt, transferiert und im Anti-P35-Western Blot getestet. Die ungefärbten Teile der Anti-P35-positiven Gelstreifen wurden auf ein neues Gel (10 %ig, 15 cm x 20 cm, s. 2.5.5.3) gelegt, das erneut mit Taschen für

den Proteinstandard versehen wurde. Die Gelelektrophorese wurde mit Tris/Tricin-gepuffertem Laufpuffer durchgeführt. Sie wurde erst beendet, nachdem der Bereich bei 30 kDa fast das untere Ende des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde erneut im gewünschten Bandenbereich in fünf waagerechte Streifen geschnitten, die im Anti-P35-Western Blot und mit Coomassie-Färbung getestet wurden. Das restliche Gel wurde ebenfalls Coomassie-gefärbt und die Bande des gesuchten Proteins identifiziert und ausgeschnitten.

2.5.5.5 Klonierung von pEF-*rbp34*

Der Klon IRAK p961B2315Q2 wurde vom RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Heidelberg angefordert. Dabei handelt sich um den Klon, der zur DNA-Sequenzierung von Q96AG4/RBP34 verwendet worden war. Das Gen *rbp34* wurde mit PCR und den Oligonukleotiden RBP34-s und RBP34-as amplifiziert und mit Topoisomerase-vermittelter Klonierung im richtigen Leserahmen in den Vektor pEF6/V5-His eingebracht (pEF6/V5-His TOPO TA Expression Kit, Version E, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

2.5.5.6 Transfektion von 293T-Zellen (Elektroporation)

Es wurden 5 Mio. 293T-Zellen pro 10 cm Kulturschale ausgesät und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Trypsin abgedaut, gezählt und auf 5 Mio. Zellen in 400 µl Medium eingestellt. Je 400 µl Zellsuspension wurden mit 20 µg DNA (pEF-*rbp34* bzw. pEFSem) versetzt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wurde mit 260 V und 960 µF durchgeführt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in eine 10 cm Kulturschale überführt. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und entweder zu S100-Extrakten weiterverarbeitet, oder direkt in 50 µl Laemmli-Puffer aufgenommen.

2.5.6 „Fast Performance Liquid Chromatography“ (FPLC)

2.5.6.1 Größenchromatographie mit FLAG-CED-4 und GST-FLAG-CED-4

Um Proteinextrakte unter nativen Bedingungen nach Molekül- bzw. Komplexgröße aufzutrennen, wurde eine Superose 6 HR 10/30-Säule mit S100 Puffer (oder TBS) als Laufpuffer verwendet. Das Volumen der gesammelten Fraktionen betrug 1 ml. Für Western Blot Analysen wurden die Fraktionen mit Trichloressigsäure (TCA) oder Aceton gefällt und in 10 µl Laemmli resuspendiert. Für jeden Lauf wurden 1–2,5 µg FLAG-CED-4 oder GST-FLAG-CED-4 eingesetzt, entweder allein oder mit 2 mg cytosolischem Jurkat-Extrakt versetzt. Alternativ wurden

aus FLAG-CED-4- oder GST-FLAG-CED-4-exprimierenden *Sf9*-Zellen S100-Extrakte hergestellt, 50 µl Extrakt mit TBS auf 100 µl aufgefüllt und ein Säulenlauf mit TBS durchgeführt. Dabei wurden entweder 0,5 ml- oder 1 ml-Fractionen gesammelt, die wie oben beschrieben mit Aceton gefällt und für einen Western Blot vorbereitet wurden..

Die Größenkalibrierung erfolgte mit dem HMW Calibration Kit (Amersham), bestehend aus:

Blue Dextran 2000	Durchlauf (ca. 2000 kDa)
Thyroglobulin	670 kDa (692)
Ferritin	440 kDa
Catalase	232 kDa
Aldolase	158 kDa
BSA (zusätzlich, nicht enthalten)	66 kDa

TBS: 50 mM Tris, pH 7,6
150 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM DTT

S100 s. 2.5.1.2

Alle Puffer für die FPLC wurden vor Gebrauch filtriert (0,2 µm).

2.5.6.2 Aussalzungsversuch mit Mitochondrienextrakt (Vorbereitung zur HIC)

Der Aussalzungsversuch wurde durchgeführt, um die Löslichkeit des gesuchten Proteins im Mitochondrienextrakt bei hohen Salzkonzentrationen zu überprüfen. Dazu wurden 10 µl oder 50 µl Mitochondrienextrakt mit 1 M, 1,5 M und 2 M NaCl oder Ammoniumsulfat 5 min. auf Eis inkubiert und anschließend 10 min. bei 13.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit Aceton gefällt (s. 2.5.1.11). Die resultierenden Präzipitate wurden in 500 µl Aqua dest. aufgenommen, und in Microcon-10 Filtern ein Pufferaustausch gegen salzarmen Puffer durchgeführt, wobei das Volumen auf 10 µl eingengt wurde. Anschließend wurden die Proben für einen Western Blot aufbereitet.

NaCl-Puffer	20 mM Tris HCl, pH 8,5 1 M, 1,5 M oder 2 M NaCl
Ammoniumsulfat-Puffer	20 mM Tris HCl, pH 8,5 1 M, 1,5 M oder 2 M Ammoniumsulfat
Salzarmen Puffer	20 mM Tris HCl, pH 8,5 150 mM NaCl

2.5.6.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) mit Mitochondrienextrakt

Die HIC wurde an Phenyl-Sepharose 6 FF („low sub“) durchgeführt. Der Laufpuffer basierte auf 0,05 M Na-Phosphat, pH 7,0, mit einer Anfangskonzentration von 1,5 M Ammoniumsulfat, die linear bis auf Null gesenkt wurde (Gemisch aus Puffer 1 und 2). 2,5 mg bis 9 mg Mitochondrienextrakt wurden in einem Volumen von 500 µl oder 1 ml in einer 1,5 M Ammoniumsulfat-Konzentration aufgenommen und auf die Säule appliziert. Es wurden 1 ml-Fractionen gesammelt, von denen 500 µl einem Pufferaustausch gegen 30 mM Tris HCl, pH 8,5 mit 150 mM Ammoniumsulfat im Microcon-10 Filter unterzogen wurden.

Puffer 1: 0,05 M Na-Phosphat, pH 7,0
1,5 M Ammoniumsulfat

Puffer 2: 0,05 M Na-Phosphat, pH 7,0
Alle Puffer für die FPLC wurden vor Gebrauch filtriert (0,2 µm).

2.5.6.4 Anionenaustauschchromatographie mit Mitochondrienextrakt

Zum Anionenaustausch wurde Q-Sepharose Fast Flow eingesetzt. Die Anfangskonzentration wurde nach mehreren Versuchen auf 120 mM oder 150 mM NaCl gehalten und während des Säulenlaufs kontinuierlich bis auf 1 M gesteigert. Es wurden 3,5 mg bis 35 mg Mitochondrienextrakt in 500 µl, 1 ml oder 2 ml auf die Säule appliziert und 1 ml-Fractionen gesammelt. Die Fractionen wurden mit Aceton gefällt und in Laemmli-Puffer aufgenommen.

Puffer A: 20 mM Tris HCl, pH 8,0

Puffer B: 20 mM Tris HCl, pH 8,0
1 M NaCl

Alle Puffer für die FPLC wurden vor Gebrauch filtriert (0,2 µm).

2.5.6.5 Größenchromatographie mit Mitochondrienextrakt

Die Größenchromatographie wurde an einer Superose 6-Säule durchgeführt. 35 mg Mitochondrienextrakt wurden zunächst mittels Anionenaustausch aufgetrennt (s. 2.5.6.4), die im Anti-P35-Western Blot positiven Fractionen 34 bis 41 vereinigt, mit einem Microcon-10 Filter eingengt und auf die Superose 6-Säule appliziert. Als Laufpuffer diente 20 mM Tris HCl, pH 8,0 mit 300 mM NaCl.

Laufpuffer: 20 mM Tris HCl, pH 8,0
300 mM NaCl

Alle Puffer für die FPLC wurden vor Gebrauch filtriert (0,2 µm).

3 ERGEBNISSE

3.1 Molekulare Funktionen und Eigenschaften von CED-4

3.1.1 Produktion und Aufreinigung von rekombinantem CED-4-Protein

Ziel war es, rekombinantes CED-4 in *Sf9*-Insektenzellen zu exprimieren, um Untersuchungen mit dem aufgereinigten Protein machen zu können. Dabei wurde das Baculovirus-Expressionssystem gewählt, nachdem in Vorarbeiten ein Expressionsversuch in *E. coli* gezeigt hatte, daß rekombinantes CED-4 in zu geringen Mengen produziert wird und nach der Aufreinigung schnell degradiert. Außerdem werden in Insektenzellen eine korrekte Proteinfaltung und post-translationale Modifikationen gefördert, so daß biologisch aktive Proteine entstehen (Luckow *et al.*, 1988).

Bei der Expression von CED-4 in Insektenzellen stellte sich heraus, daß zwar große Mengen Protein gebildet wurden, dieses sich jedoch kaum aus den Zellen herauslösen ließ. Auch die Sekretion von FLAG-CED-4 ins Medium, die aufgrund der Melittin-Signalsequenz der Honigbiene im gewählte Konstrukt für FLAG-CED-4 vorgesehen war, konnte nicht beobachtet werden. Die Extraktion der Zellen mit einem hypotonischen Puffer (S100) brachte fast kein FLAG-CED-4-Protein in Lösung. GST-FLAG-CED-4 hingegen zeigte sich als besser aus den Zellen lösbar und konnte bereits mit hypotonischem Puffer zu einem gewissen Teil in Lösung gebracht werden. Erst durch die Zugabe von nicht-ionischen Detergenzien (n-Octyl- β -D-glucopyranosid (NOGP), NP-40, Triton X-100) waren nennenswerte Anteile beider Fusionsproteine aus den Zellen zu lösen. Ein großer Rest verblieb dennoch im Sediment. Die effektivsten Detergenzien waren Triton X-100 und NP-40, mit denen etwa gleich große Anteile in Lösung gebracht werden konnten. So ließ sich FLAG-CED-4 zu ca. 40 % herauslösen, GST-FLAG-CED-4 sogar bis zu 60 %, d.h. FLAG-CED-4 erwies sich erneut als schlechter herauslösbar als GST-FLAG-CED-4 (Abb. 10A).

Die Aufreinigung von CED-4 wurde mit 1 % Triton X-100-Extrakten und Anti-FLAG- bzw. Glutathion-gekoppelter Sepharose durchgeführt. Aufgrund der geringen Proteinkonzentration wurden die FLAG-CED-4-haltigen Fraktionen der Anti-FLAG-Aufreinigungssäule lyophilisiert,

gelöst und gegen 20 mM HEPES KOH, pH 7,5 dialysiert. Da die Konzentration von GST-FLAG-CED-4 ausreichend war, wurde es nicht lyophilisiert, sondern nur gegen 20 mM HEPES KOH dialysiert. Die vorgesehene Entfernung der Glutathion-S-Transferase (GST) mit Hilfe eines Thrombin-Verdau war nicht erfolgreich, so daß sie am Protein belassen wurde.

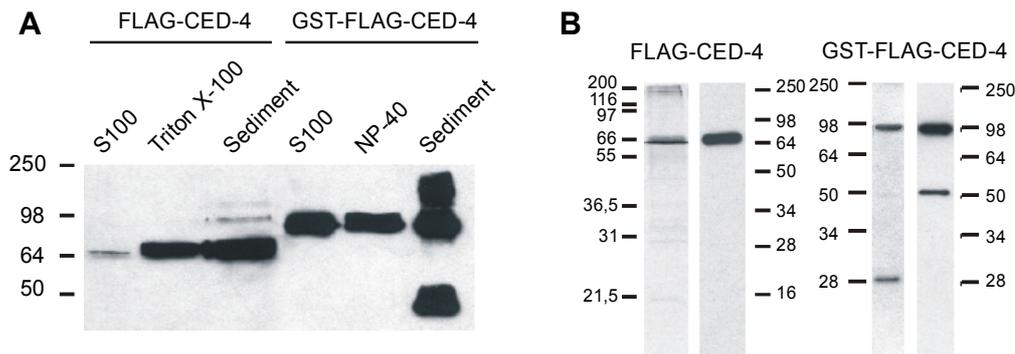


Abb. 10: Extraktion und Aufreinigung von rekombinantem CED-4 aus *Sf9*-Insektenzellen.

A: Von FLAG-CED-4- und GST-FLAG-CED-4-exprimierenden *Sf9*-Zellen wurde zunächst ein hypotonischer Extrakt (S100) hergestellt, und das resultierende Sediment wurde anschließend mit Triton X-100 oder NP-40 extrahiert. Beide Extrakte und das verbliebene Sediment wurden im Anti-FLAG-Western Blot aufgetrennt.

B: Aufgereinigtes rekombinantes FLAG-CED-4 und GST-FLAG-CED-4 wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und entweder eine Silberfärbung (linke Spur) oder ein Anti-FLAG-Western Blot (rechte Spur) durchgeführt.

Die Aufreinigung ergab insgesamt nur geringe Mengen an Protein (mit Konzentrationen zwischen 10 und 60 µg/ml Protein), die aber problemlos in Lösung gingen und auch nicht wieder ausfielen. Die Reinheit der Proteinlösungen wurde anhand einer SDS-PAGE mit Silberfärbung und Western Blot nachgewiesen (Abb. 10B). Bei FLAG-CED-4 ist in manchen Aufreinigungen eine geringfügig größere zweite Bande zu erkennen, die möglicherweise dadurch zustande kommt, daß die für eine Proteinsezernierung konzipierte Mellitin-Sequenz nicht vollständig abgespalten wurde. Im Western Blot von GST-FLAG-CED-4 ist eine Anti-FLAG-positive Bande bei 50 kDa zu erkennen, die wahrscheinlich ein Abbauprodukt von GST-FLAG-CED-4 darstellt. Die Bande im Silbergel bei 28 kDa ist eine Kontaminante, die für einige Versuche durch Größenchromatographie entfernt wurde (nicht gezeigt).

3.1.2 Intrazelluläre Lokalisation von CED-4 während der Expression in *Sf9*-Insektenzellen

Da sich das einmal herausgelöste und aufgereinigte Protein gut in reinem Wasser oder 20 mM HEPES KOH, pH 7,5 löste, wurde vermutet, daß die Unlöslichkeit nicht auf einer Proteineigenschaft beruht, sondern möglicherweise darauf, daß das Protein in der Zelle an eine Zellstruktur, z.B. das Cytoskelett, bindet. Daraufhin wurde die intrazelluläre Lokalisation von FLAG-CED-4 und GST-FLAG-CED-4 während der Expression in *Sf9*-Zellen mittels der konfokalen Mikroskopie untersucht. Die Zellen wurden zwei oder drei Tage nach der baculoviralen Infektion mit Anti-FLAG oder Anti-GST gefärbt, und die Expression wurde mittels Durchflußzytometrie gemessen; die Expression beider Proteine war leicht nachweisbar (Abb. 11A).

In der konfokalen Mikroskopie konnte festgestellt werden, daß sowohl FLAG-CED-4 als auch GST-FLAG-CED-4 eine Lokalisation um den Kern einnahmen, die meist sphärisch bis netzartig war, manchmal unvollständig, zum Teil auch mit Ausläufern ins Cytoplasma, so daß die Vermutung naheliegt, daß CED-4 an eine Zellstruktur gebunden vorliegt, entweder die Kernmembran oder eine kernnahe Struktur (Abb. 11B). Die genaue Position läßt sich anhand der Bilder nicht bestimmen. Der von GST-FLAG-CED-4 gebildete Ring ist deutlich diffuser ausgebildet als der von FLAG-CED-4, und die Trennung zwischen Cytoplasma und Ringstruktur ist weniger stark. Dies könnte einer der Gründe für die unterschiedlich stark ausgeprägte Löslichkeit der beiden Fusionsproteine sein. Zusammen mit den Ergebnissen von Chen *et al.* (2000) die in *C. elegans* ebenfalls eine Lokalisation von CED-4 um den Zellkern gesehen haben, legen die Bilder den Schluß nahe, daß es sich um eine intrinsische Eigenschaft von CED-4 handelt, eine derartige perinukleäre Anordnung aufzusuchen.

Trotz der starken Expression eines proapoptotischen Proteins zeigten die *Sf9*-Zellen keine Anzeichen von Apoptose. Dafür lassen sich zwei Gründe finden. Zum einen tragen die im Baculovirus-Expressionssystem verwendeten modifizierten Formen des *AcNPV* immer noch das Wildtyp-Gen für den Caspaseninhibitor *AcP35*, durch den die infizierten CED-4-exprimierenden Zellen vor Apoptose geschützt sind. Auf der anderen Seite führt auch in Säugetierzellen, die nicht durch P35 geschützt sind, eine Überexpression von CED-4 nur in manchen Fällen zu Apoptose (Chinnaiyan *et al.*, 1997b), meist jedoch nicht (Wu *et al.*, 1997a). Erst eine Koexpression mit CED-3 führt zur Apoptose (Wu *et al.*, 1997a).

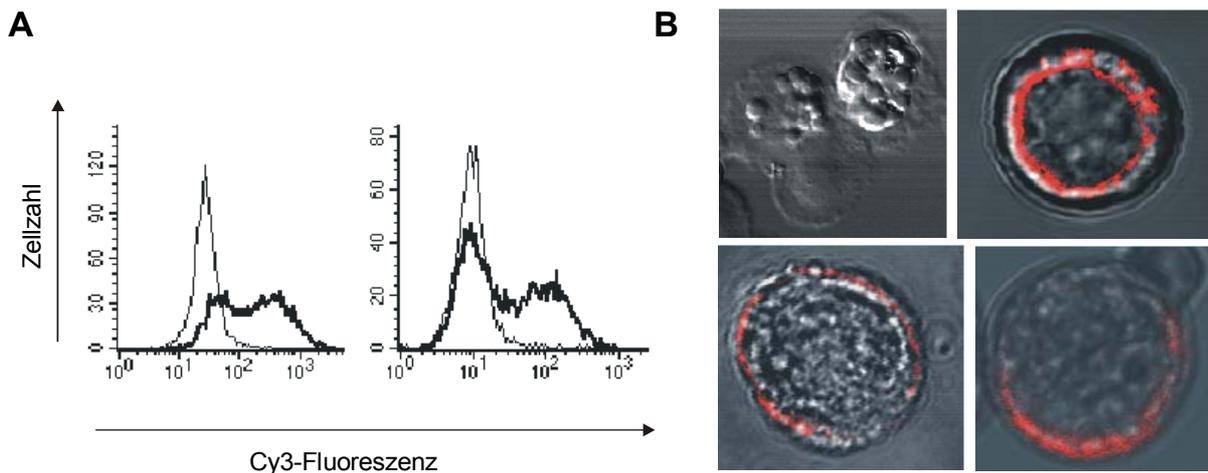


Abb. 11: Expression und subzelluläre Lokalisation von CED-4 in *Sf9*-Zellen.

A: Die Expression von CED-4 in *Sf9*-Zellen wurde im Durchflußzytometer kontrolliert. Links: FLAG-CED-4-exprimierende Zellen wurden am zweiten Tag nach der Infektion entweder mit Anti-GST (normale Linie; Isotypkontrolle) oder Anti-FLAG (fette Linie) gefärbt; als Zweitantikörper wurde ein Cy3-markierter Anti-Maus-Antikörper eingesetzt. Rechts: Mit Bac-N-Blue Wildtypvirus (normale Linie) oder FLAG-CED-4 (fette Linie) infizierte Zellen, Färbung mit Anti-FLAG und Cy3-Anti-Maus.

B: Die subzelluläre Lokalisation von CED-4 während der Expression in *Sf9*-Zellen wurde mittels konfokaler Mikroskopie dargestellt. Dazu wurden *Sf9*-Zellen virusinfiziert und 2 oder 3 Tage später mit Anti-FLAG und Cy3-gekoppeltem Anti-Maus-Antikörper gefärbt. Die Bilder zeigen eine Überlagerung von lichtmikroskopischer Aufnahme und konfokaler Anti-FLAG-Färbung (rot: Cy3-Fluoreszenz). Oben links: mit Bac-N-Blue Wildtyp-Virus infizierte Zellen, zwei Tage nach der Infektion. Die Ansammlungen im Zellkern der beiden oberen Zellen stellen eine Form von Einschlußkörperchen („occlusion bodies“) dar, virushaltige Partikel mit Polyhedrin, die eine Infektion mit wt *AcNPV* anzeigen. Da den rekombinanten Viren das Gen für Polyhedrin fehlt, können sie keine Einschüsse bilden. Oben rechts: mit FLAG-CED-4-Virus infizierte Zelle, zwei Tage nach der Infektion, Anti-FLAG-Antikörper. Unten: mit GST-FLAG-CED-4-Virus infizierte Zellen; links: Zwei Tage nach der Infektion, Detektion mit Anti-FLAG; rechts: Drei Tage nach der Infektion, Nachweis mit Anti-GST. In den Abbildungen sind drei mit wt *AcNPV* infizierte Zellen und je eine der mit den anderen Viren infizierten Zellen gezeigt.

3.1.3 Komplexbildung durch rekombinantes CED-4

Ein Unterschied zwischen CED-4 und seinem Säuger-Homolog Apaf-1 besteht darin, daß letzteres eine WD40-Domäne aufweist, CED-4 jedoch nicht. Im inaktiven Zustand scheint diese Domäne zu verhindern, daß Apaf-1 oligomerisieren kann. Erst die Bindung von Cytochrom c leitet möglicherweise eine Konformationsänderung von Apaf-1 ein, die zur Oligomerisierung führt (Cain *et al.*, 2002). Das Fehlen dieser Domäne bei CED-4 wirft die Frage auf, ob es möglicherweise spontan oligomerisieren kann oder ob ein anderer Regulationsmechanismus vorhanden ist. Aus diesem Grund sollte die Komplexbildung von aufgereinigtem CED-4 untersucht werden, zunächst mittels chemischer Kreuzvernetzung der Proteine, für die spaltbare und nicht-spaltbare Substanzen (DTSSP, BS³) verwendet wurden, später durch Größenchromatographie. Der Nachweis der kreuzvernetzten Proteine erfolgte im Anti-FLAG-Western Blot,

wobei sich herausstellte, daß die Komplexe so groß waren, daß sie nicht ins 8 %ige Trenngel einliefen. Daher wurden sowohl Trenn- als auch Sammelgel auf Nitrocellulose transferiert und mit Antikörper behandelt. Da die Ergebnisse der Kreuzvernetzungsversuche eine gewisse Variabilität zeigten, werden zwei voneinander unabhängige Experimente gezeigt (Abb. 12).

Es zeigte sich, daß sowohl GST-FLAG-CED-4 als auch FLAG-CED-4 in Lösung als große Komplexe vorliegen, die im Western Blot jedoch nicht immer als distinkte Banden, sondern häufig als „Schmier“ auftraten und teilweise nicht ins Gel einliefen (Abb. 12). Bei Verwendung des Thiol-spaltbaren DTSSP zeigten sich unter oxidierten Bedingungen dieselben Komplexe, während der Einsatz eines reduzierenden Agens (DTT) dazu führte, daß die monomeren Formen der CED-4-Proteine wieder sichtbar wurden (nicht gezeigt).

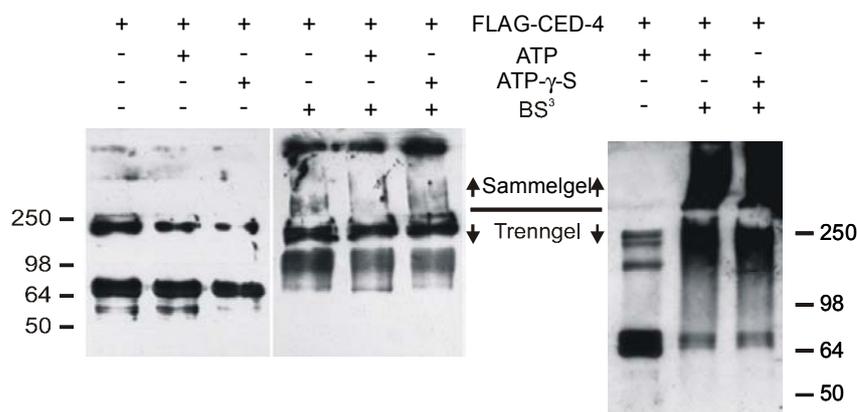


Abb. 12: Chemische Kreuzvernetzung von FLAG-CED-4.

200 ng FLAG-CED-4 wurden wie angegeben mit 2 mM ATP, 1 mM ATP- γ -S oder ohne Nukleotide 30 min. bei RT inkubiert und durch Zugabe von BS³ kreuzvernetzt (15 min.). Konzentrationen bis zu 10 mM ATP- γ -S wurden getestet, brachten aber keine Änderung der Ergebnisse. Die Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt; wegen der Größe der Komplexe wurden sowohl Sammel- als auch Trenngel auf Nitrocellulose übertragen und mit Anti-FLAG gefärbt. Aufgrund der Variabilität der Ergebnisse werden exemplarisch zwei unabhängige Versuche gezeigt.

Da Apaf-1 für die Oligomerisierung Nukleotide und Cytochrom c benötigt, wurde die Abhängigkeit der CED-4-Komplexierung von Faktoren wie Nukleotiden oder cytosolischen Proteinen getestet. Einige Kreuzvernetzungsproben wurden mit ATP oder dem nicht-spaltbaren ATP-Analog ATP- γ -S (Abb. 12) bzw. Jurkat Zellextrakt (nicht gezeigt) versetzt. Die Komplexbildung wurde jedoch von keinem der gewählten Faktoren sichtbar beeinflusst.

Weil zum einen die gebildeten Komplexe sehr groß waren und in der SDS-PAGE nicht genügend aufgetrennt werden konnten, zum anderen die Komplexe unter nativen Bedingungen untersucht werden sollten, wurde eine Größenchromatographie mit einer Superose 6-Säule durchgeführt. Die gewählte Säule kann Proteine und Komplexe bis zu 1,3 MDa auftrennen; die eluierten Fraktionen wurden mit Aceton gefällt und im Western Blot getestet.

Auch unter nativen Bedingungen zeigten sich bei Verwendung der aufgereinigten Proteine die großen Komplexe, die keine distinkte Größe hatten, sondern sich über einen sehr weiten Bereich erstreckten. Der überwiegende Teil von FLAG-CED-4 war im Komplexen von mindestens 1,3 MDa oder größer organisiert. GST-FLAG-CED-4 hingegen bildet bevorzugt etwas kleinere Komplexe, 1,3 MDa und weniger, bis hin zu Monomeren. Die Verteilung erwies sich dabei in der Regel als sehr gleichmäßig (Abb. 13 Mitte).

Um zu untersuchen, ob unter anderen Bedingungen eine Änderung des Elutionsprofils stattfindet, wurden die aufgereinigten Proteine mit Jurkat-Zellextrakt versetzt (Abb. 13 unten). Da die Anwesenheit von cytosolischen Proteinen jedoch keine Veränderung der Ergebnisse brachte, kann davon ausgegangen werden, daß die beobachtete Komplexbildung eine inhärente Eigen-

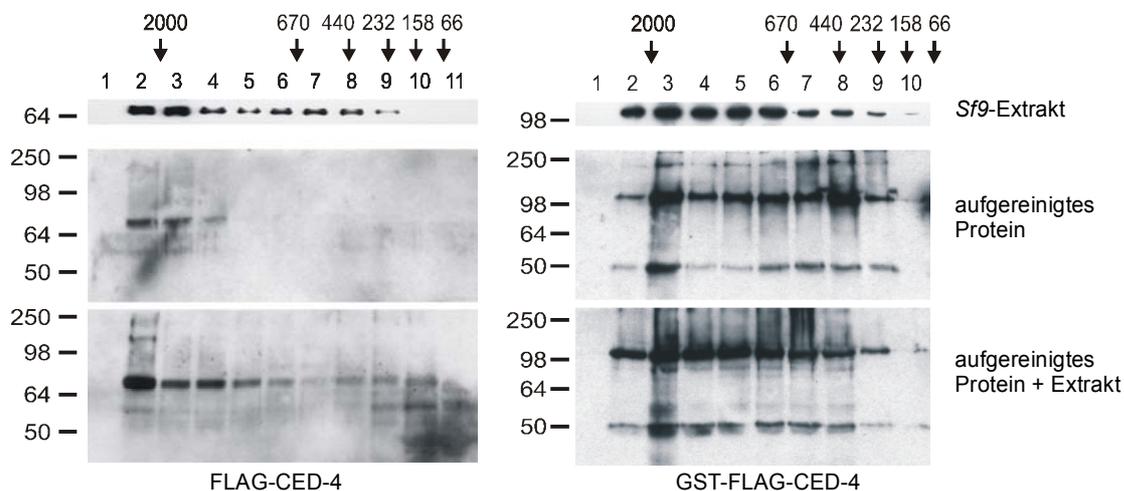


Abb. 13: Größenchromatographie mit rekombinantem CED-4.

FLAG-CED-4 (links) und GST-FLAG-CED-4 (rechts) wurden mit einer Superose 6-Säule aufgetrennt. Es wurden S100-Extrakte aus CED-4-exprimierenden *Sf9*-Zellen (oben), aufgereinigtes CED-4 (Mitte) und zuvor mit Jurkat-Zellextrakt inkubiertes aufgereinigtes CED-4 (unten) auf die Säule gegeben. Die Fraktionen 1-11 wurden gesammelt, mit Aceton gefällt und im Anti-FLAG-Western aufgetrennt. Die Positionen ausgewählter Standardproteine sind über den Fraktionen angezeigt. Bei GST-FLAG-CED-4 ist ein FLAG-positives Abbauprodukt von ca. 45 kDa Größe detektierbar, dessen Laufverhalten jedoch dem des vollständigen Proteins entspricht (vgl. Abb. 10B).

schaft von CED-4 ist und spontan und unabhängig von weiteren Faktoren stattfindet. Weil der zunächst gewählte Laufpuffer nur wenig Salz enthielt und die Salzkonzentration die Interaktion von Proteinen stark beeinflussen kann, wurde ein weiterer Lauf in Gegenwart von 150 mM NaCl durchgeführt, der wiederum keine Änderung der beobachteten Ergebnisse brachte (nicht gezeigt).

Einzig die Auftrennung von S100-Extrakten aus CED-4-exprimierenden *Sf9*-Zellen hatte eine Veränderung zur Folge, indem ein kleiner Teil des FLAG-CED-4-Proteins sich bei ca. 500 kDa ansammelte (Abb. 13 oben). Diese Veränderung war nur geringfügig, aber konstant bei allen Säulenläufen mit S100-Extrakten zu beobachten.

3.1.4 Bindung von Nukleotiden durch CED-4

Sowohl Apaf-1 als auch CED-4 besitzen eine Nukleotidbindungsstelle. Zur Oligomerisierung und anschließenden Bildung des Apoptosoms mit Procaspase-9 benötigt Apaf-1 dATP oder ATP und Cytochrom c (Liu *et al.*, 1996), wobei es dATP gegenüber ATP bevorzugt bindet. Die Bindungscharakteristika von CED-4 hingegen sind bisher nicht untersucht worden. Daher sollten die Nukleotidbindungseigenschaften von CED-4 mittels eines Bindungsversuchs in Anlehnung an Jiang & Wang (2000) ermittelt werden. Dabei wurde FLAG-CED-4 oder GST-FLAG-CED-4 mit [α - 32 P]-ATP oder [α - 32 P]-dATP 30 min. bei 30 °C inkubiert, anschließend mit Hilfe eines Vakuum-Membransaugers (Dot Blotter; Schleicher & Schuell) kreisförmig auf einer Nitrocellulosemembran aufgebracht und die Membran mehrfach gewaschen. Danach wurde die an die Membran gebundene Strahlung im PhosphoImager (Molecular Dynamics/Amersham) gemessen und mittels ImageQuant 4.2a (Molecular Dynamics/Amersham) quantifiziert. In einer Abwandlung des Versuchs wurde die Verdrängung von radioaktiv markiertem ATP aus der Bindung an CED-4 durch Konkurrenz mit den nicht-radioaktiven Nukleotiden ATP, dATP, ADP und den nicht-spaltbaren ATP-Analoga ATP- γ -S und AMP-PNP untersucht.

In diesen Versuchen konnte festgestellt werden, daß CED-4 ATP gegenüber dATP wesentlich besser bindet (Abb. 14A + B). Im Wettbewerbsversuch (Abb. 14C) konnte nicht-radioaktives ATP am besten mit [α - 32 P]-ATP konkurrieren. Die Wettbewerbsfähigkeit des ATP-Analogs ATP- γ -S erwies sich als nur geringfügig niedriger. Auch ein anderes ATP-Analog, AMP-PNP, zeigte ein fast gleich gutes Wettbewerbsvermögen um die CED-4 Bindungsstelle wie ATP- γ -S (nicht gezeigt). Deutlich schlechter hingegen war die Konkurrenz von ADP mit ATP; im Schnitt

waren 100fach höhere Konzentrationen notwendig als von nicht-radioaktivem ATP, um dieselbe Schwärzung zu erreichen, und seine Affinität zu CED-4 war deutlich geringer als die der ATP-Analoga. Einmal wurde nicht-radioaktives GTP im Wettbewerbsversuch verwendet. Dabei zeigte sich, daß GTP auf alle Fälle besser kompetitiert als ADP, und wahrscheinlich genauso gut oder besser als ATP (nicht gezeigt). Um eine Interaktion über den FLAG-Fusionsanteil auszuschließen, wurde FLAG-Caspase-3 im Nukleotidbindungsversuch eingesetzt. Dabei konnte keine Bindung von ATP nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

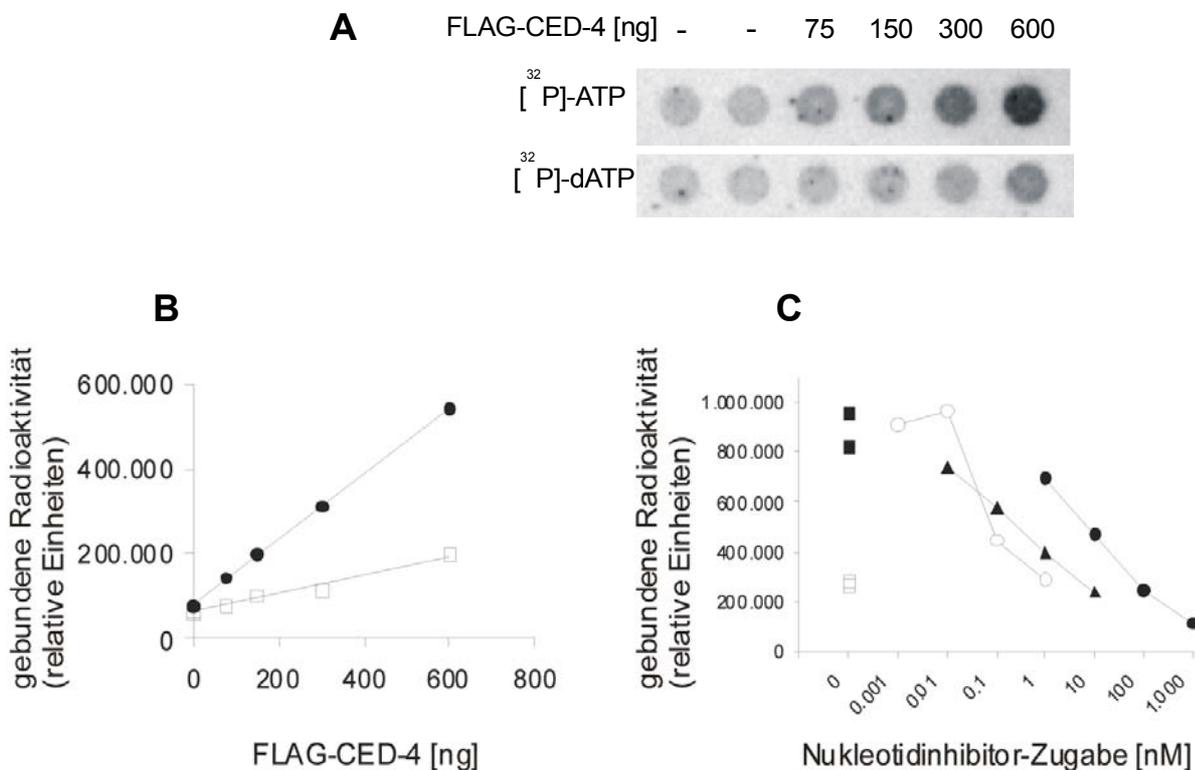


Abb. 14: Nukleotidbindungseigenschaften von CED-4.

A, B: Verschiedene Mengen von FLAG-CED-4 wurden mit 7,1 kBq [³²P]-ATP oder [³²P]-dATP 30 min. bei 37 °C inkubiert und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Nach mehreren Waschschrten wurde die an der Membran verbliebene Radioaktivität gemessen. Die Bindung der Nukleotide wurde als Schwärzung durch den PhosphoImager angezeigt (A) und als relative Einheit „gebundenen Radioaktivität“ quantitativ dargestellt (B).

C: Wettbewerbsversuch mit CED-4 und verschiedenen Nukleotiden. 1 µg FLAG-CED-4 wurde mit 14,8 kBq [³²P]-ATP und den angegebenen Mengen nicht-radioaktivem ATP (weiße Kreise), dATP (Dreiecke) oder ADP (schwarze Kreise) inkubiert und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Nach mehreren Waschschrten wurde die an der Membran verbliebene Radioaktivität gemessen. Als Kontrollen wurden je zwei Ansätze mit FLAG-CED-4 ohne Nukleotide (weiße Quadrate) und mit FLAG-CED-4 und [³²P]-ATP ohne Zugabe der nicht-radioaktiven Nukleotide (schwarze Quadrate) angesetzt.

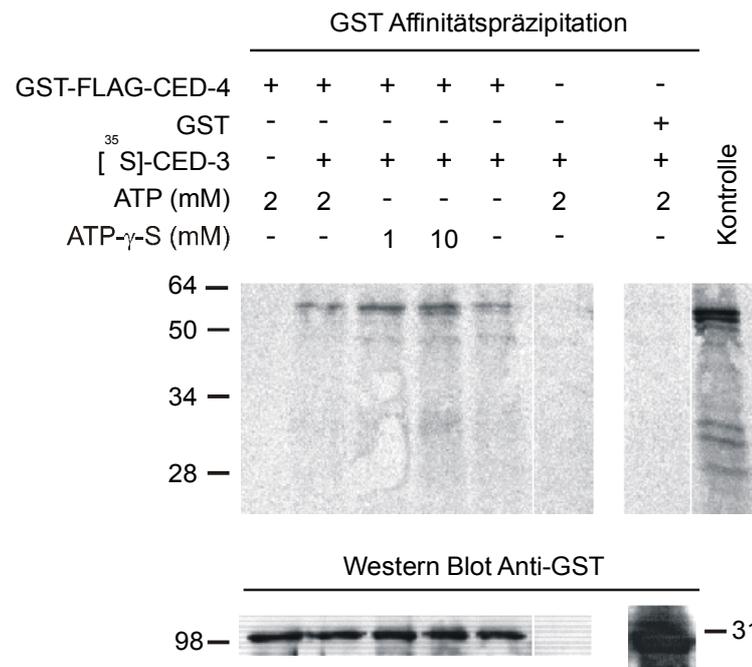


Abb. 15: Affinitätspräzipitation von [³⁵S] Methionin-markiertem CED-3 mit GST-FLAG-CED-4.

GST-FLAG-CED-4 wurde mit [³⁵S] Methionin-markiertem CED-3 und ATP oder ATP- γ -S in den angegebenen Konzentrationen inkubiert und anschließend mit Glutathion-Sepharose präzipitiert. Die Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und CED-3 im PhosphoImager sichtbar gemacht. Als Präzipitationskontrolle dienten GST-Protein (2. Spur von rechts), als SDS-PAGE-Laufkontrolle [³⁵S] Methionin-markiertes CED-3 (ganz rechts; es wurde die Hälfte der in der Affinitätspräzipitation verwendeten Menge ausgetragen). Im Anti-GST-Western Blot (unten) wurde die Präzipitation der GST-Proteine überprüft.

3.1.5 Interaktion von GST-FLAG-CED-4 mit CED-3

Für den Vorgang der Apoptosombildung mit anschließender Aktivierung von CED-3 scheint eine ATP-Hydrolyse notwendig zu sein (Chinnaiyan *et al.*, 1997a). Um den Vorgang genauer zu untersuchen, wurde die Interaktion von GST-FLAG-CED-4 mit CED-3 in Abhängigkeit von ATP und dem ATP-Analog ATP- γ -S untersucht. Dazu wurde eine Affinitätspräzipitation mit Glutathion-Sepharose und [³⁵S] Methionin-markiertem CED-3 durchgeführt.

Es zeigte sich, daß [³⁵S] Methionin-markiertes CED-3 an GST-FLAG-CED-4 bindet und präzipitiert werden kann. Die Gegenwart von ATP oder ATP- γ -S beeinflusste die Bindung von CED-3 an CED-4 nicht, so daß angenommen werden kann, daß der Bindungsvorgang unabhängig von einer ATP-Hydrolyse stattfindet. Eine zu erwartende Spaltung von CED-3 konnte unter den gegebenen Konditionen nicht beobachtet werden, was auf nicht optimale Reaktionsbedingungen zurückzuführen sein könnte.

3.2 Interaktion von CED-4 mit den Histonen H2B, H3, H4

Ein weiteres Ziel dieses Projektes war, ein menschliches Homolog von CED-4 zu finden. Apaf-1 ist bislang das einzige direkte humane Homolog von CED-4 und war zur Zeit der Versuchskonzeption noch unbekannt. Mit rekombinantem CED-4-Protein wurde deshalb in menschlichen Zellextrakten nach Interaktionspartnern gesucht, um diese dann zu identifizieren. Als Methode wurde der Far Western Blot nach Blanar & Rutter (1992) etabliert, mit dem in Vorarbeiten ein mit CED-4 interagierendes Protein mit einer Größe von von ca. 16-20 kDa nachgewiesen werden konnte. Im Far Western Blot werden Zellextrakte analog zum Western Blot mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Anstelle des ersten Antikörpers wird die Membran mit dem Protein inkubiert, dessen Interaktionspartner gesucht ist (in diesem Fall: FLAG-CED-4 oder GST-FLAG-CED-4). Anschließend wird die Bindung dieses Proteins an Zellproteine mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen (hier: Anti-FLAG und Ziege-anti-Kaninchen). Die Aufgabenstellung dieser Arbeit war die Suche nach einem humanem CED-4-Homolog und im Rahmen dessen die Aufreinigung und Identifikation des unbekanntes etwa 20 kDa großen Proteins.

3.2.1 Vorkommen und Extraktion der interagierenden Proteine

Im Verlauf der gesamten Untersuchung stellte sich heraus, daß es sich bei dem gesuchten Protein um eine Gruppe sehr ähnlicher Proteine handeln mußte, da häufig sowohl im Far Western Blot als auch in der Coomassie-Färbung drei Banden (bei sehr gut auftrennenden Gelen sogar vier; Abb. 17, Histonfraktionierung, fl) erkennbar waren. Davon liefen in der SDS-PAGE drei sehr eng beieinander, mit einer Größe von ca. 18-20 kDa, während das vierte Protein etwas kleiner war und bei ca. 14 kDa lief. Die Eigenschaften dieser Proteine in den unterschiedlichen Versuchen wie Far Western Blot, isoelektrische Fokussierung oder Konzentrierung waren jedoch stets sehr ähnlich, so daß angenommen wurde, daß es sich um verwandte Proteine handeln muß.

Die gesuchten Proteine waren in allen getesteten Zelllinien – sowohl humanen als auch murinen – nachweisbar: Jurkat, HeLa, RBL5, CEM, 38-βZ, LB-NTK, TK-1 (Maus-Zelllinie). Die Versuche, die mit *C. elegans* Embryonenlysaten (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Barbara Conradt, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) durchgeführt wurden, sprechen dafür, daß diese Proteine auch in *C. elegans* nachweisbar sind und mit CED-4 interagieren: In zwei CED-4-Far Western Blots sind deutliche Banden auf der richtigen Höhe bei 16 kDa zu erkennen.

Aufgrund von technischen Problemen der Negativkontrolle bzw. der Schwärzung des Blots können die Ergebnisse nicht als „sauber“ gezeigt bezeichnet werden. Auf eine erneute Wiederholung des Versuchs wurde dennoch verzichtet, zum einen aus technischen Gründen, zum anderen, weil die Identifikation eines humanen CED-4-Homologs (oder allgemeiner: einem humanen CED-4-Bindepartner) im Vordergrund stand, nicht die Untersuchung des Signalwegs in *C. elegans* (nicht gezeigt). Um eine Interaktion mit anderen Proteinen auszuschließen, wurde ein Far Western Blot mit bakteriell exprimiertem FLAG-CED-4, das radioaktiv markiert wurde, durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die gleichen Banden zu erkennen waren wie unter Verwendung von Zellextakten und baculoviral exprimiertem FLAG-CED-4 bzw. GST-FLAG-CED-4 (Abb.16D).

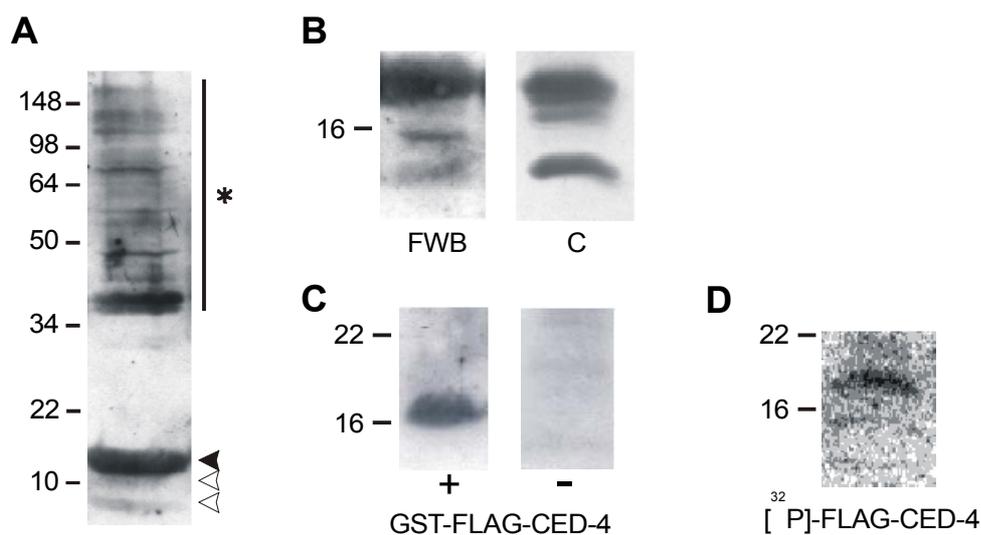


Abb. 16: Nachweis der gesuchten Proteine im Far Western Blot.

A: Typischer Far Western Blot unter Verwendung eines hypotonischen Extrakts (HP). Dieser wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Die Membran wurde mit FLAG-CED-4 inkubiert und dieses mit Anti-FLAG detektiert. Die gesuchten Proteine bei ca. 16 kDa sind als eine starke (schwarzer Pfeil) und zwei sehr schwache Banden (weiße Pfeile) zu erkennen. Unspezifische Hintergrundbanden (Sternchen) erschienen variabel, auch in Abhängigkeit vom verwendeten Extrakt (HP- oder KCl-), wobei HP-Extrakte generell einen stärkeren Hintergrund erzeugten. Zumindest eine der Banden bei ca. 35 kDa könnte Histon H1 darstellen.

B: Far Western Blot mit parallel durchgeführter Coomassie-Färbung. Es sind mehrere Banden zu erkennen, die sowohl im Far Western Blot (FWB) als auch in der Coomassie-Färbung (C) zu sehen sind.

C: Far Western Blot mit und ohne GST-FLAG-CED-4. Ein KCl-Extrakt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und das gesuchte Protein im Far Western Blot mit GST-FLAG-CED-4 (links) und ohne GST-FLAG-CED-4 (rechts) nachgewiesen. Die Auftrennung des Gels ließ nur eine Bande erkennen.

D: Far Western Blot mit [³²P]-FLAG-CED-4 (*E. coli*). Radioaktiv markiertes [³²P]-FLAG-CED-4 wurde nach dem Protokoll von Blonar & Rutter (1992) hergestellt und die gesuchten Proteine im [³²P]-CED-4 Far Western Blot nachgewiesen (s. Material und Methoden). Die Auftrennung des Gels läßt zwei Banden erkennen.

Bei der Extraktion erwiesen sich die Proteine als nur schwer löslich. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß sie weder in Kernextrakten noch in cytosolischen S100-Zellextrakten zu finden waren, so daß Vermutungen aufgestellt wurden, es könne sich um ans Cytoskelett assoziierte Proteine handeln. Erst spätere Wiederholungen der Versuche mit Kernextrakten zeigten, daß die Proteine in verschiedenen Zelllinien in unterschiedlichen Fraktionen der Kernextraktion zu finden sein können. So waren sie in Jurkat-Zellen – wie zuvor beobachtet – weder im cytosolischen, noch im Kernextrakt zu finden, dafür im Sediment des Kernextrakts, das in der Regel verworfen wird. Bei Verwendung von HeLa-Zellen hingegen ließen sich die Proteine mit dem Kernextraktionsprotokoll zumindest teilweise aus den Kernstrukturen lösen und im Kernextrakt nachweisen (nicht gezeigt). Extraktionsversuche mit unterschiedlichen nicht-ionischen Detergenzien (anstiegende SDS-Konzentrationen, CHAPS, Triton X-100, NOGP) brachten die gesuchten Proteine zwar in Lösung; die resultierenden Extrakte ließen sich jedoch wegen des hohen Detergenzgehalts nicht für weitere Versuche wie isoelektrische Fokussierung verwenden. Bemühungen, das Detergens zu entfernen, z.B. durch Dialyse, führten zum Ausfallen der Proteine (nicht gezeigt).

3.2.2 Cytoskelett-beeinflussende Wirkstoffe und Puffer

Aufgrund der Annahme, die Proteine könnten sich am Cytoskelett befinden, wurde versucht, mit Wirkstoffen, die am Cytoskelett angreifen, die Löslichkeit der Proteine zu beeinflussen. Zum einen wurden Zellen mit Taxol behandelt, das zu einer Stabilisierung der Mikrotubuli führt und dadurch deren Depolymerisierung verhindert. Zum anderen wurde Cytochalasin B eingesetzt, welches die Mikrofilamente depolymerisiert. Auch ein Versuch mit Aktinfilament-depolymerisierendem Cytochalasin D wurde durchgeführt. Keiner der verwendeten Wirkstoffe zeigte jedoch eine Wirkung auf Menge und Löslichkeit der gesuchten Proteine (nicht gezeigt).

Weiterhin wurde ein Protokoll nach Dubinsky *et al.* (1999) getestet, das der Depolymerisierung des Aktin-Cytoskeletts dienen soll. Dazu wurde ein hypotonischer Puffer mit 0,6 M KCl versetzt, mit dessen Hilfe sich die gesuchten Proteine bis zu einem gewissen Grade solubilisieren ließ (KCl-Extrakt, s. Material und Methoden). Desweiteren wurde der gleiche hypotonische Puffer ohne KCl verwendet, und auch hiermit ließen sich große Mengen des Proteins in Lösung bringen, allerdings mit einem höheren Anteil an Fremdproteinen (HP-Extrakt; Abb. 17C) Dies schien die Hypothese der ans Cytoskeletts assoziierten Proteine zunächst zu untermauern. Diese Extrakte (vor allem der fast salzfreie HP-Extrakt) dienten als Ausgangsmaterial der folgenden Aufreinigungsschritte.

Mittels eines Microcon-Filters mit einer Durchlässigkeitsgrenze von 30 kDa wurde versucht, die gesuchten Proteine vom Rest der HP- und KCl-Extrakte zu isolieren, aber unerwarteterweise fanden sie sich nicht im Durchlauf, sondern im Überstand. Die Verwendung eines 50 kDa-Filters brachte keine Veränderung. Es stellte sich jedoch heraus, daß die gesuchten Proteine im Überstand durch die Konzentrierung ausfielen und deshalb nicht filtrierbar waren (nicht gezeigt).

3.2.3 2-D-Gelelektrophorese

Zur isolierten Darstellung der Proteine wurden mehrere 2-D-Gelelektrophorese-Durchläufe mit einer IEF im Bereich von pH 3-10 oder pH 6-11, anschließender SDS-PAGE und CED-4-Far Western Blot durchgeführt. Es zeigte sich, daß bei allgemein guter Fokussierung die gesuchten Proteine im Far Western Blot nicht oder nicht eindeutig nachzuweisen war. Erst bei einer weniger deutlichen Fokussierung konnte ein schwach bis gar nicht fokussierter CED-4-positiver Streifen im Far Western Blot gesehen werden, dem meist auch ein im silbergefärbten Gel sichtbarer Streifen zugeordnet werden konnte. Da eine schlechte Fokussierung der Gele häufig durch eine zu hohe Pufferkonzentration verursacht wird, war zu vermuten, daß die Proteine nur bei etwas salz- oder detergenshaltigeren Reaktionsbedingungen löslich war, ansonsten jedoch vor oder während der IEF ausfiel. Aber auch wenn die Proteine in Lösung blieben, ließen sie sich schlechter fokussieren als andere Extraktproteine (nicht gezeigt).

3.2.4 Präparative SDS-PAGE und Sequenzierung

Da sich die gesuchten Proteine in der isoelektrischen Fokussierung nicht ausreichend fokussieren ließen, wurde eine alternative Methode zur Isolierung gesucht. Nachdem in der IEF keine weiteren Proteine auf gleicher Höhe wie die gesuchten Proteine zu erkennen waren, wurde auf die Auftrennung der gesuchten Proteine in der SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung zurückgegriffen. Bei der parallelen Anfertigung eines Coomassie-gefärbten Gels und eines Far Western Blots konnten den CED-4-positiven Banden im Far Western Blot starke Banden derselben Größe im Coomassie-gefärbten Gel zugeordnet werden (Abb. 16B). Weil im relevanten Größenbereich bei 15 kDa bis 20 kDa keine weiteren Banden zu erkennen und die bezeichneten Banden außerdem sehr stark waren, wurde auf weitere Zwischenaufreinigungs- und Anreicherungsschritte verzichtet und direkt eine präparative SDS-PAGE durchgeführt. Dazu wurden zweimal 25 µl KCl-Extrakt auf ein 15 cm x 20 cm SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen

und eine SDS-PAGE durchgeführt (System SE 660). Nach der Elektrophorese wurden die beiden Spuren mit dem Skalpell getrennt und mit der einen eine Coomassie-Färbung, mit der anderen ein Far Western Blot durchgeführt. Die drei in der Coomassie-Färbung identifizierten und im Far Western Blot bestätigten Banden (die Auflösung des großen Gels ließ nicht mehr Banden erkennen) wurden mit dem Skalpell ausgeschnitten und zur Sequenzierung mittels Tandem-Massenspektrometrie geschickt (in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Harald Mischak, Nephrologie, Medizinische-Technische Hochschule, Hannover). Als Ergebnis dieser Sequenzierung wurden – neben geringen Mengen an weiteren, verunreinigenden Proteinen – die Histone H2B, H3 und H4 ermittelt.

3.2.5 Bestätigung der Interaktion von CED-4 und Histonen

a) Histonfraktionierung

Zur Bestätigung oder Widerlegung der Sequenzierungsergebnisse wurden verschiedene Methoden der Histonfraktionierung durchgeführt. Dabei werden die Histone nicht einzeln aufgereinigt, sondern anhand ihrer biochemischen Eigenschaften fraktioniert. Die daraus resultierenden Fraktionen bestehen aus verschiedenen Gemischen unterschiedlicher Histone. Histonfraktion f2(a) ist also nicht identisch mit Histon H2A.

Mit der ersten Methode nach Sambrook *et al.*, (1989; 21.2.5 support protocol 2) wurden säurelösliche Kernproteine inkl. Histonen durch Verwendung von H₂SO₄ aus HP- und KCl-Extrakten extrahiert. In einem Protokoll von Johns (1964) werden zwei weitere Methoden der Histonfraktionierung dargestellt, die beide die Fraktionen f1, f2(a), f2(b) und f3 ergeben. Dabei werden die Zellkerne mit Ethanol, Säure (HCl) und Aceton extrahiert, so daß entsprechend ihrer Löslichkeit verschiedene Histonfraktionen entstehen. Beide Methoden wurden passend für kernhaltige Zellpräzipitate herunterskaliert (Methode 1 nicht gezeigt).

Die Fraktionen wurden parallel im Coomassiegel und im Far Western Blot aufgetrennt. Es zeigte sich, daß nur in den Fraktionen, die Histone enthielten, CED-4-positive Banden im Far Western Blot erschienen (Abb. 17A). Bei der Histonfraktionierung nach Johns (1964) waren die meisten, aber nicht alle Coomassie-Banden der Histone enthaltenden Fraktionen auch im Far Western Blot CED-4-positiv (Fraktionen f1, f3). Manche Banden waren in der Coomassie-Färbung und im Far Western Blot unterschiedlich intensiv gefärbt [Fraktion f2(a)], was darauf hindeutet, daß CED-4 nicht mit allen Histonen gleich gut interagieren kann (Abb. 17B).

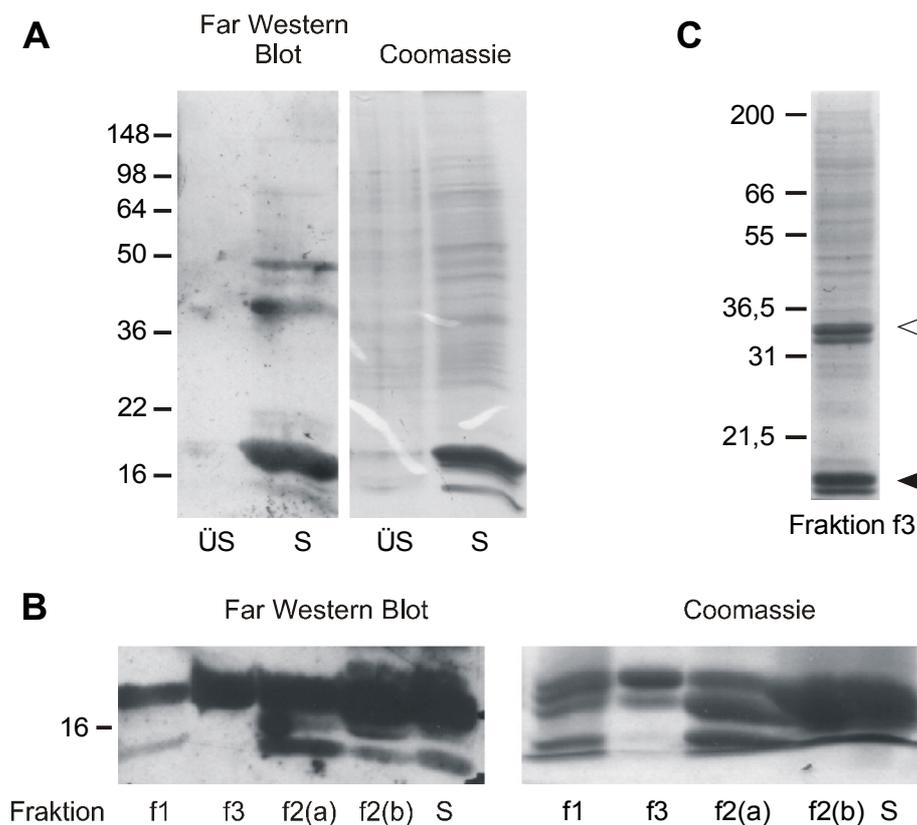


Abb. 17: Verschiedene Methoden der Histonfraktionierung.

A: Histonisolierung mit H_2SO_4 nach Sambrook *et al.* (1989). KCl-Extrakt wurde zunächst mit DNase I behandelt, anschließend mit 0,2 M H_2SO_4 versetzt. Das resultierende Sediment (S) und der keine Histone enthaltende Überstand nach TCA-Fällung (ÜS) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und sowohl im Far Western Blot mit GST-FLAG-CED-4 (links) als auch in der Coomassie-Färbung (rechts) getestet.

B: Histonfraktionierung nach Johns (1964), Methode 2. Kernhaltige Zellpräzipitate wurden nach Johns (1964) mit Ethanol, Aceton und HCl fraktioniert. Die Fraktionen f1, f3, f2(a), f2(b) und das verbliebene, immer noch histonhaltige Sediment (S) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und CED-4-Far Western Blot (links) und Coomassie-Färbung (rechts) durchgeführt. Die Auftrennung der Gele läßt bis zu vier Banden erkennen (s. Fraktion f1, Coomassie-Färbung).

C: Coomassie-Färbung der Fraktion f3 nach Johns (1964), Methode 2a. Es ist eine deutliche Anreicherung von Histonen in zwei Banden bei ca. 16 kDa (schwarzer Pfeil) zu erkennen. Mindestens eine der größeren Banden (weißer Pfeil) könnte ein weiteres Histon darstellen, Histon H1.

b) Expression von Histon H4b in *E. coli*

Obwohl die Histonfraktionierung bereits eine erste Bestätigung der Sequenzierung darstellte, bestand weiterhin die Möglichkeit, daß die korrekte Bande bisher von den starken Histon-Banden überdeckt und das gesuchte Protein bei den Aufreinigungs- und Fraktionierungsschritten nicht sauber von den Histonen getrennt worden war. Für diese Annahme sprachen Far Western Blots, die mit Kälber-Histon, Typ II-A (Sigma), durchgeführt wurden und in denen keine

CED-4-bindende Bande erschien. Außerdem zeigten die Histonfraktionen in der Coomassie-Färbung einen hohen Verunreinigungsgrad (Abb. 17C). Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde das menschliche Histon H4b in *E. coli* exprimiert. Damit läßt sich der eindeutige Nachweis erbringen, daß menschliche Histone – zumindest H4b – mit CED-4 interagieren können.

Die Gene von wahrscheinlich fast allen humanen Histone befinden sich am chromosomalen Locus D6S105. Dazu zählen auch mehrere Gene (und Pseudogene) für Histon H4, deren DNA-Sequenz sich zwar voneinander unterscheidet, die aber eine identische Aminosäuresequenz aufweisen (Albig *et al.*, 1997). Die cDNA eines dieser Gene, Histon *h4b*, wurde zur Expression eines humanen Histons in *E. coli* in dieser Arbeit verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Detlef Doenecke, Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Universität Göttingen). Dazu wurde sie in den Expressionsvektor pET3a kloniert. Es wurden zwei verschiedene Konstrukte angefertigt, das erste mit Histon *h4b* in der richtigen Orientierung (H4+), das zweite als Negativkontrolle mit Histon *h4b* in entgegengesetzter Orientierung (H4-). Die Expression erfolgte nach Burnett & Springer (1999). Zur Expression von H4b wurde der *E. coli*-Stamm AD494(DE3) verwendet, der keine Thioredoxinreduktase besitzt und dadurch die Faltung von Proteinen mit Disulfid-Bindungen erlaubt. Der im Fall von H4b wahrscheinlich ausschlaggebende Grund für eine erfolgreiche Expression ist jedoch eher, daß dieser Stamm nur äußerst langsam wächst.

Die Bakterien wurden mit einem der beiden Konstrukte transformiert und die Expression wie in Material und Methoden beschrieben induziert. Nach einer Expressionszeit von 6 h wurden die Zellen geerntet und in Laemmli-Puffer aufgenommen. Abb. 18A zeigt die Expression von H4b bei knapp 16 kDa im Coomassie-gefärbten Gel und die dazugehörige CED-4-positive Bande im Far Western Blot. Um auszuschließen, daß eine Interaktion über FLAG stattfindet, wurden Lysate von H4+ und H4- gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und entweder ein regulärer Far Western Blot mit FLAG-CED-4 oder einer mit FLAG-Caspase-3 bzw. FLAG-Peptid durchgeführt. Dabei zeigte sich ausschließlich in den Spuren der Histon-H4b exprimierenden Bakterien (H4+) eine CED-4-positive Bande, nicht jedoch in der Transfektionskontrolle (H4-) oder in den Far Western Blots mit den FLAG-Kontrollen. Weitere erkennbare Banden sind sowohl in H4+ als auch in H4- vorhanden. Damit konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß CED-4 und H4b im Far Western Blot interagieren (Abb. 18B).

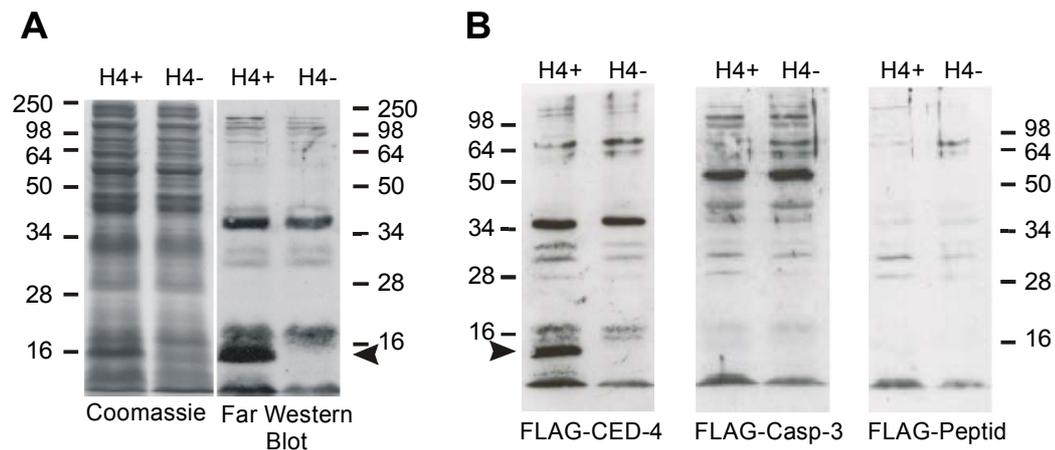


Abb. 18: Histon H4b-Expression in *E. coli* AD494(DE3).

E. coli AD494(DE3) wurden mit pET-*h4b*⁺ (H⁺) oder pET-*h4b*⁻ (H⁴⁻, Negativkontrolle) transformiert, und die Expression von Histon H4b wurde nach Burnett *et al.* (1999) induziert. Die Bakterien wurden in Laemmli-Puffer lysiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression von H4b konnte als Bande bei knapp 16 kDa nachgewiesen werden (Pfeil).

A: H4b-Expressionskontrolle mit Coomassie-Färbung (links) und CED-4-Far Western Blot (rechts).

B: Far Western Blots mit Lysaten aus Histon H4b-exprimierenden Bakterien (H⁴⁺) bzw. kontrolltransformierten Bakterien (H⁴⁻). Die Far Western Blots wurden mit FLAG-CED-4 (links), FLAG-Caspase-3 (Mitte) und FLAG-Peptid (rechts) durchgeführt.

3.2.6 Kopräzipitation von CED-4 und Histonen

Die bisherigen Interaktionsnachweise zwischen CED-4 und Histonen bedienten sich zum Nachweis immer des Far Western Blots. Um die Interaktion in einem unabhängigen System zu zeigen, wurden zunächst verschiedene Kopräzipitationen mit Histonen und CED-4 durchgeführt. Dabei wurde die Histonfraktion f3 (s. 2.5.4.7) eingesetzt, um kopräzipitiert zu werden, da sie Histone enthielt, die nachweislich im Far Western Blot mit CED-4 interagieren. Zum Präzipitieren wurden sowohl FLAG-CED-4 (mit Anti-FLAG und Protein G-Sepharose) als auch GST-FLAG-CED-4 (mit Glutathion-Sepharose) eingesetzt. Dabei war entweder keine Interaktion nachweisbar (Immunpräzipitation mit Anti-FLAG-Sepharose) oder Histone in allen Proben inklusive der Negativkontrolle mit GST-Protein zu finden (Affinitätspräzipitation mit Glutathion-Sepharose). Veränderungen der Detergensenkonzentration im Puffer (HNTG ohne Triton X-100) zeigten, daß Histone ohne Detergens sehr stark an Sepharose binden, wobei diese Bindung durch erhöhte Detergensenkonzentrationen zwar vermindert, nicht jedoch vollständig vermieden werden konnten. Diese unspezifische Bindung wurde für eine „inverse“ Kopräzipitation genutzt, bei Glutathion-Sepharose zunächst mit Histonen abgesättigt wurde, um anschließend CED-4 zu präzipitieren. In dieser Konstellation kam es zunächst scheinbar zu einer Interaktion, die aber auch in der Negativkontrolle (FLAG-Caspase-3) nachweisbar war. Die

Verwendung eines anderen FLAG-Proteins (FLAG-hRPB11) brachte keine Verbesserung, so daß anzunehmen ist, daß diese Interaktion auf dem FLAG-Epitop beruhte. Also war die Interaktion von CED-4 mit Histonfraktion f3 in der Kopräzipitation nicht nachweisbar.

3.2.7 Yeast-Two-Hybrid-System mit CED-4 und Histon H4b

Trotz unterschiedlicher Konstellationen in der Kopräzipitation konnte keine Interaktion zwischen Histonen und CED-4 festgestellt werden. Da nicht auszuschließen ist, daß die Reaktionsbedingungen unpassend waren, wurde stattdessen das Yeast-Two-Hybrid-System ausgewählt, um die Interaktion von CED-4 mit Histonen zu bestätigen.

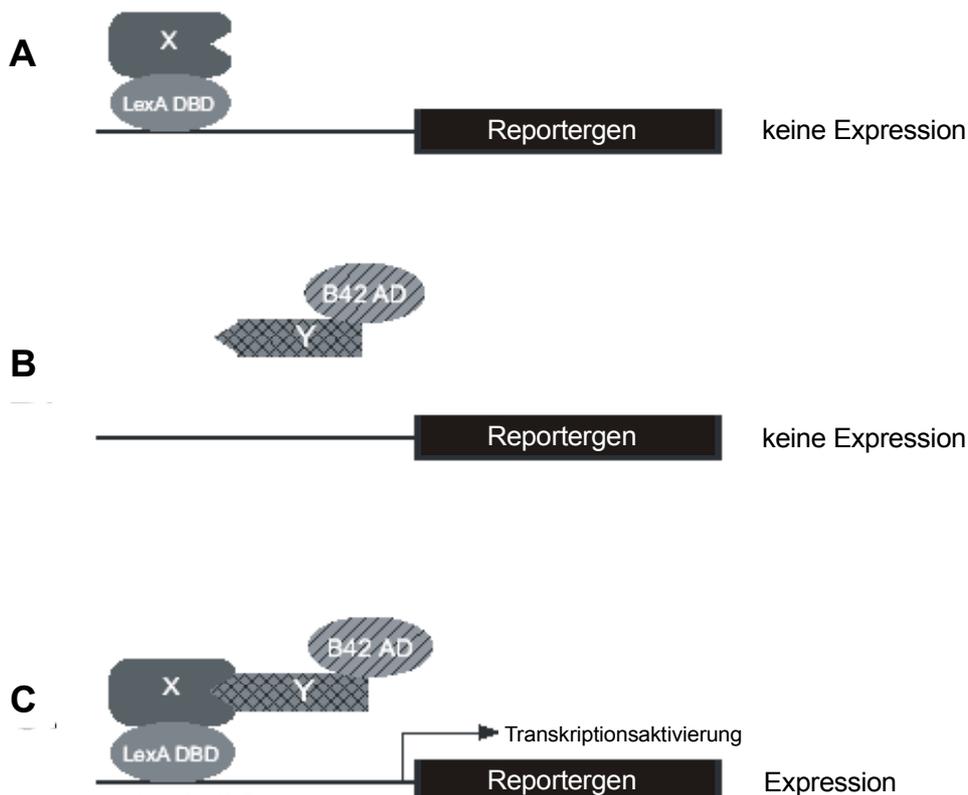


Abb. 19: Schema des Yeast-Two-Hybrid-Systems.

Ein mit der DNA-bindenden Domäne LexA fusioniertes Protein (A) oder ein mit der transaktivierenden Domäne B42 (B) fusioniertes Protein alleine führen nicht zur Expression der Reportergene (*LEU2*, *lacZ*). Liegen beide Proteine gemeinsam vor, und können sie miteinander interagieren, entsteht ein funktioneller Transkriptionsfaktor, der eine Reporterogenaktivierung zur Folge hat (nach Hybrid Hunter D, Invitrogen).

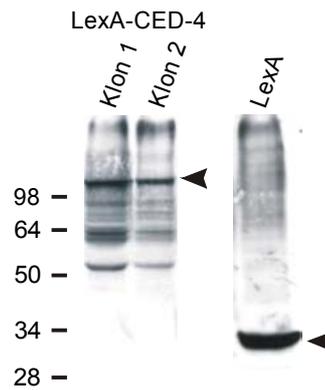


Abb. 20: LexA-CED-4-Expressionskontrolle im Hefestamm *S. cerevisiae* EGY48/pSH18-34.

Der Hefestamm *S. cerevisiae* EGY48/pSH18-34 wurde mit pLexA-CED-4 transformiert und LexA-CED-4 gemäß Protokoll exprimiert (s. Hybrid Hunter, Version D, Invitrogen). Zwei verschiedene Hefeklone wurden ausgewählt, lt. Protokoll vermehrt und lysiert. Die Lysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und LexA-CED-4 (links, Pfeil, ca. 100 kDa) im Anti-LexA-Western Blot nachgewiesen. Als Kontrolle diente eine Klon, der mit pLexA202 transformiert war (rechts, Pfeil, ca. 32 kDa).

Das Yeast-Two-Hybrid-System dient dem Nachweis der Interaktion von zwei Proteinen. Das Funktionsprinzip macht sich zunutze, daß Transkriptionsfaktoren prinzipiell aus zwei Domänen bestehen: einer DNA-bindenden Domäne und einer sogenannten Transaktivierungsdomäne, die den Transkriptionsstart einleitet. Im verwendeten Yeast-Two-Hybrid-System werden die Untereinheiten LexA (ursprünglich aus *E. coli*) und B42 eingesetzt. Von den beiden Proteinen, deren Interaktion festgestellt werden soll, wird eines mit LexA fusioniert (als „bait“ oder Köder bezeichnet), das andere mit B42 („prey“ oder Fisch). B42 und LexA selbst können nicht miteinander interagieren, müssen aber für eine Transkriptionsaktivierung stabil zusammengeführt werden. Dies geschieht bei einer Interaktion der beiden Fusionspartner, die zur Transkription von Reportergenen in der Hefe führt (Abb. 19). Im Reportergentest führt die Aktivierung der Reportergene *LEU2* (β -Isopropylmalat-Dehydrogenase) und *lacZ* (β -Galactosidase) zur Genexpression, die einerseits durch das Wachstum auf Leucin-Mangelmedium (UHWL) sichtbar wird, andererseits durch die Spaltung des Substrats X-Gal durch β -Galactosidase, die zur Bildung eines blauen Farbstoffs führt. (Übersicht in Stephens *et al.*, 2000; Hybrid Hunter Version D, Invitrogen)

Zunächst wurde CED-4 in den pLexA-Vektor (Köder) und Histon H4b in den pYESTrp-Vektor (Fisch) kloniert. Die Expression von LexA-CED-4 im Hefestamm *S. cerevisiae* EGY48/pSH18-34 konnte im Anti-LexA-Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 20). LexA-FLAG-CED-4 läßt sich bei etwa 100 kDa nachweisen; bei den zusätzlichen kleineren Banden, die bei der

LexA:	CED-4	H4	CED-4	P35	N-P35
B42:	CED-4	CED-4	H4	P35	K93,5



Abb. 21: Reportergentest in *S. cerevisiae* mit CED-4 und Histon H4b.

Der Hefestamm *S. cerevisiae* EGY48/pSH18-34 wurde gemäß Protokoll mit den angegebenen LexA- (Köder) und B42-Plasmiden (Fisch) transformiert, auf einer UHW-Platte ausgestrichen und bei 30 °C inkubiert. Nachdem die Kolonien gewachsen waren, wurden sie auf einer UHWL⁻-X-Gal-Platte ausgestrichen. Eine durch Dimerisierung erfolgte Genaktivierung ist an einer Blaufärbung der Hefen zu erkennen. Als Positivkontrolle diente die Interaktion zwischen *AcP35*; als Negativkontrolle wurde der N-Terminus von P35 zusammen mit einem nicht interagierenden Protein eingesetzt.

LexA-Kontrolle nicht zu sehen sind, handelt es sich wahrscheinlich um LexA-haltige unvollständig produzierte oder abgebaute Produkte.

Alle Hefen wurden sowohl auf UHWL⁻- (nicht gezeigt) als auch UHWL⁻-X-Gal-Platten (Abb. 21) ausplattiert. Für die zunächst gewählte Konstellation mit LexA-CED-4 und B42-H4b konnte in beiden Reportergentests keine Genaktivität anhand von Wachstum (UHWL⁻) oder Blaufärbung (UHWL⁻-X-Gal) nachgewiesen werden (Abb. 20 und nicht gezeigt). Da die Möglichkeit bestand, daß die Interaktion durch die großen Fusionspartner LexA und B42 sterisch behindert wird, wurden die Zielgene ausgetauscht (pLexA-H4b und pYESTrp-CED-4). Aber auch in dieser Orientierung ließ sich keine Genaktivierung feststellen. Die Kombination von LexA-CED-4 mit B42-CED-4 hingegen führte zu einer Blaufärbung (Abb. 20) und zu vermehrtem Wachstum (nicht gezeigt) in den Reportergentests, was zeigt, daß sowohl LexA-CED-4 als auch B42-CED-4 funktionell sind und dimerisieren können. Als Positivkontrolle diente die starke Homodimerisierung von P35; als Negativkontrolle wurden der N-Terminus von P35 (LexA-N-P35) mit einem nicht näher beschriebenen Protein (B42-K93,5) eines bereits im Vorfeld durchgeführten Yeast-Two-Hybrid-Experiments eingesetzt (Abb. 20).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte also gezeigt werden, daß CED-4 mit Histonen interagieren kann. Diese Interaktion konnte jedoch nur im Far Western Blot eindeutig nachgewiesen werden. Die Möglichkeit, daß die Interaktion damit ein im Far Western Blot erzeugtes Artefakt ist, kann nicht völlig ausgeschlossen werden. Andererseits besteht die nicht unwahrscheinliche Möglichkeit, daß in den Kopräzipitationsversuchen und im Yeast-Two-Hybrid-System keine passenden Reaktionsbedingungen gefunden werden konnten, ein bei den genannten Methoden nicht selten auftretendes Problem (vgl. Diskussion).

3.3 Identifikation eines zelluläres Proteins, das mit Anti-P35-Antiserum kreuzreagiert

Zum Nachweis des viralen P35-Proteins, einem Caspaseninhibitor aus *AcNPV*, war ein polyklonales Kaninchen-Antiserum hergestellt worden. Es zeigte sich, daß dieses Serum im Western Blot mit einem menschlichen Zellprotein kreuzreagierte, das ein wenig größer als das virale *AcP35* ist. Da die Möglichkeit bestand, daß es sich um ein bisher unbekanntes zelluläres humanes P35-Homolog handelte, war die Anreicherung, Sequenzierung und Identifikation diese Proteins Ziel dieses Projektes.

3.3.1 Extraktion und Komplexierung des gesuchten Proteins

Vorversuche hatten gezeigt, daß das gesuchte Protein in Mitochondrienextrakten enthalten ist. Diese Extrakte wurden aus verschiedenen Zelllinien, überwiegend jedoch unter Verwendung von Jurkat-Zellen hergestellt. Zunächst wurden die Mitochondrien isoliert, wobei auf die Anwendung der sonst zur Isolierung der Mitochondrien üblichen Saccharose verzichtet werden konnte. Die Mitochondrien wurden dann mit einem NOGP-haltigen Puffer extrahiert (s. Material und Methoden). In diesem Mitochondrienextrakt konnte mit einem Anti-P35-Western Blot eine Proteinbande mit einer Größe zwischen 35 kDa und 50 kDa nachgewiesen werden (Abb. 22). Für alle weiteren Aufreinigungsversuche stellten diese Extrakte das Ausgangsmaterial dar. Es zeigte sich, daß das gesuchte Protein unter bestimmten Umständen schnell aggregiert, d.h. im Anti-P35-Western Blot erscheint bei etwa 65 kDa eine manchmal regelmäßige, häufiger aber wie „verschmiert“ aussehende Bande. In manchen Western Blot läßt sich eine weitere Bande bei ca. 98 kDa beobachten. Im selben Maße, in dem die Banden entstehen, verschwindet die Bande des monomeren Proteins (vgl. Abb. 22). Diese Banden lassen sich auch durch SDS und DDT (Laemmli-Puffer) oder Erhitzen kaum beseitigen, so daß anzunehmen ist, daß es sich um eine stabile, möglicherweise kovalente Verbindung handelt. Bei einer angenommenen Größe des monomeren Proteins von etwas über 35 kDa scheinen die etwa 65 kDa und 98 kDa großen Banden auf eine Di- oder Trimerisierung des Proteins hinzuweisen. Aufgrund der unregelmäßigen Erscheinungsform ist nicht auszuschließen, daß weitere Faktoren beteiligt sind bzw. daß es sich um Ansammlungen aus verschiedene Komplexformen handelt (Abb. 24 + 25).

3.3.2 2-D-Gelelektrophorese mit Mitochondrienextrakten

Das Anti-P35-Antiserum hatte sich als ungeeignet zur Immunpräzipitation erwiesen. Deshalb war der erste Ansatz zur Darstellung des gesuchten Proteins eine Auftrennung der Proteine im Mitochondrienextrakt mittels 2-D-Gelelektrophorese. Hierzu wurden Mitochondrien von 60 Mio. Zellen in RHS-Puffer (IEF-Probenpuffer) mit 2 % oder 0,5 % IPG-Puffer (pH 3-10) aufgenommen und fokussiert (Abb. 22 oben und Mitte). Zur Proteinanreicherung wurden außerdem eine Acetonfällung eines Extrakts aus ca. 400 Mio. Zellen mit anschließender Resuspension in RHS-Puffer und die Konzentrierung mit Hilfe eines Microcon 10-Filters versucht (Abb. 22 unten). Beide Anreicherungsverfahren hatten nicht den erhofften Effekt, sondern führten zur verstärkten Aggregation des Proteins.

Mit der üblichen IPG-Konzentration von 2 % war zwar das gesuchte Protein bei 35 kDa bis 50 kDa nachweisbar, es lag jedoch eine unvollständige Fokussierung der Proteine vor (Abb. 22 oben). Zur Ergebnisverbesserung wurde der Salzgehalt der Probe mit 0,5 % IPG-Puffer möglichst niedrig gehalten, was eine deutlich gesteigerte Fokussierung zur Folge hatte, allerdings auch ein Aggregieren des Proteins im Bereich von 65 kDa. Ein Zusatz der Thiol-modifizierenden Substanzen Iodoacetamid (IAA) und N-Ethylmaleimid (NEM), die eine Re-Oxidation reduzierter Cysteinreste verhindern sollen, hatten keinen Einfluß auf die Komplexbildung (Abb. 22 Mitte). In manchen Versuchen kam es auch zum vollständigen Verlust des gesuchten Proteins vor oder während der IEF. Aus diesen Ergebnissen wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß das Protein eine gewisse Salz- oder Detergenkonzentration benötigt, um in Lösung zu bleiben. Auf eine Isolierung der großen Banden wurde verzichtet, da sie sich als sehr resistent gegenüber trennenden Maßnahmen erwies (z.B. keine Auflösung im reduzierenden Laemmli-Puffer) und nicht bekannt war, welche weiteren Faktoren sie enthielt, die möglicherweise eine weitere Aufreinigung und anschließende Sequenzierung negativ beeinflussen könnten.

3.3.3 FPLC: HIC, Anionenaustausch und Größenchromatographie

Da in der IEF für eine korrekte Fokussierung eine niedrige Salz- und Detergenkonzentration unverzichtbar ist, wurde eine alternative Trennungsmethode gesucht, bei der der Salzgehalt in einer höheren Konzentration gehalten werden kann. Dabei wurde die FPLC, bei der die Proteinauftrennung anhand einer stationären festen Phase und einer mobilen flüssigen Phase

geschieht, mit denen die einzelnen Proteine eines Gemisches unterschiedlich gut interagieren, als bestmögliches Verfahren ausgewählt.

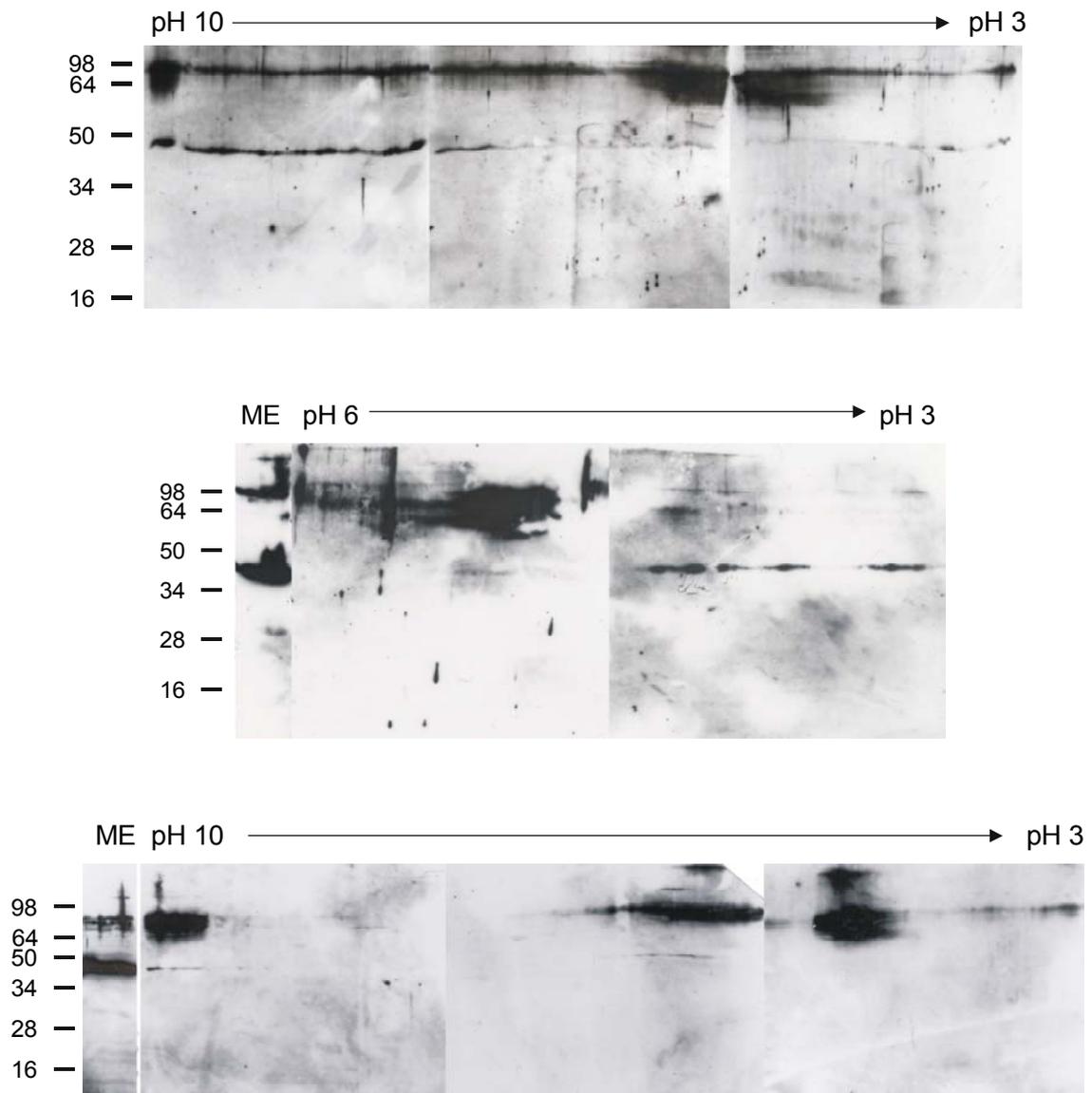


Abb. 22: Isoelektrische Fokussierung von Mitochondrienextrakten.

Mitochondrienextrakte wurden in RHS-Puffer mit der unten angegebenen IPG-Konzentration aufgenommen, und es wurde eine isoelektrische Fokussierung in Streifen mit einem pH-Gradient von pH 3-10 durchgeführt. Die fokussierten Streifen wurden gedrittelt und auf drei SDS-Gele verteilt. Der Western Blot wurde mit Anti-P35 durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde in der zweiten Dimension Mitochondrienextrakt (ME) aufgetragen. Oben: IEF mit 2 % IPG-Puffer. Mitte: IEF mit 0,5 % IPG-Puffer sowie IAA und NEM; Ausschnitt von pH 3-6. Unten: Vor der IEF wurde der Mitochondrienextrakt mit einem Microcon-Filter (10 kDa) filtriert.

Als Vorversuch wurde ein Aussalzungstest durchgeführt, bei dem Mitochondrienextrakt mit 2 M, 1,5 M und 1 M NaCl oder Ammoniumsulfat versetzt wurde, um die „Salzresistenz“ des Proteins zu testen. Nachdem sich herausstellte, daß das Protein auch bei Salzkonzentrationen von 1,5 M zu einem überwiegenden Teil in Lösung blieb, wurde eine hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) mittels einer Phenyl-Sepharosesäule (low sub) durchgeführt. Hier werden Proteine in einem Hochsalzpuffer an der Matrix vorbeigeführt, die eine Bindung von hydrophoben Proteinen bzw. über hydrophobe Domänen erlaubt. Die Elution erfolgt durch ein Absenken der Salzkonzentration. Der Laufpuffer enthielt zu Beginn 1,5 M Ammoniumsulfat, dessen Konzentration im Verlauf der Chromatographie linear bis auf Null gesenkt wurde. Das gesuchte Protein konnte mit abnehmender Salzstärke (bei ca. 1,3 M Ammoniumsulfat) eluiert werden; im Anti-P35-Western Blot jedoch zeigte sich, daß das gesamte Protein komplexiert war (Abb. 23). Deshalb wurde die HIC nicht weiter verfolgt.

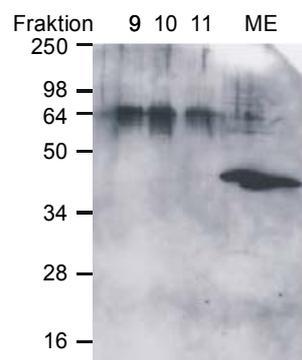


Abb. 23: Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) mit Mitochondrienextrakt.

Mitochondrienextrakt wurde in 1,5 M Ammoniumsulfat aufgenommen und auf eine Phenyl-Sepharosesäule (low sub) appliziert. Die Salzkonzentration wurde während der Laufs kontinuierlich gesenkt. Die resultierenden 1 ml-Fractionen wurden mit Aceton gefällt, in Laemmli-Puffer resuspendiert und ein Anti-P35-Western Blot durchgeführt. Gezeigt werden die Anti-P35-positiven Fraktionen 9-11, die einer Elution bei einer Ammoniumsulfat-Konzentration von etwa 1,3 M entsprechen. Als Positivkontrolle wurde im Western Blot Mitochondrienextrakt (ME) aufgetragen (rechts).

Als nächstes wurde eine Anionenaustauschchromatographie getestet, bei der negativ geladene Proteine an die Säule binden und durch ansteigende Salzkonzentrationen eluiert werden. Als Säulenmatrix diente Q-Sepharose, 20 mM Tris HCl, pH 8,0 als Laufpuffer. Im Laufe von

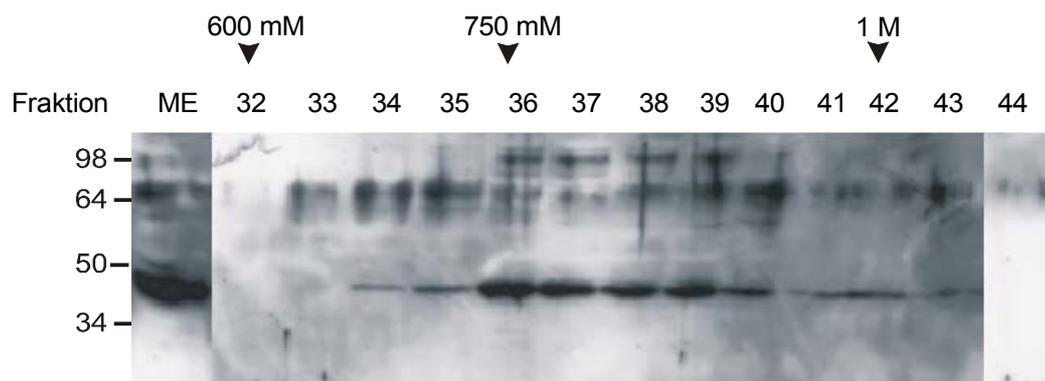


Abb. 24: Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose) mit Mitochondrienextrakt.

Mitochondrienextrakt (12 mg Gesamtprotein) wurde mit 150 mM NaCl versetzt und auf eine Q-Sepharose-säule appliziert. Die NaCl-Konzentration des Laufpuffers wurde kontinuierlich von 150 mM bis 1 M gesteigert. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt, mit Aceton gefällt, in Laemmli resuspendiert und ein Anti-P35-Western Blot durchgeführt. Die Elution des gesuchten Proteins erfolgte etwa ab 750 mM NaCl. Als Positivkontrolle im Western Blot wurde Mitochondrienextrakt (ME) aufgetragen.

mehreren Säulenläufen wurde festgestellt, daß die optimale Salz-Anfangskonzentration 120 mM NaCl oder mehr betrug. Nach 10 min. Einlaufzeit wurde die Salzkonzentration kontinuierlich bis 1 M NaCl erhöht, wobei das gesuchte Protein im Bereich ab 750 mM NaCl zusammen mit dem Großteil der Extraktproteine eluierte. Der Western Blot zeigte, daß das Protein in einem deutlich geringeren Maß aggregierte als in der HIC. Bei der Verwendung von 35 mg Gesamtprotein war die Menge des gesuchten Proteins in den Anti-P35-positiven Fraktionen dennoch so gering, daß in einer Silberfärbung der Aceton-gefällten FPLC-Proben die gesuchte Bande noch nicht sichtbar war (Abb. 25A).

Um sowohl den Aufreinigungsgrad als auch die Proteinmenge zu erhöhen, wurde beschlossen, eine möglichst große Extraktmenge auf eine Anionenaustauschersäule zu bringen, die positiven Fraktionen anschließend zu vereinigen und mit Hilfe einer Größenchromatographie weiter aufzutrennen. Dazu wurden 35 mg Mitochondrienextrakt auf eine Q-Sepharosesäule appliziert, die Anti-P35-positiven Fraktionen vereinigt und auf einer Superose 6-Säule mit 20 mM Tris HCl, pH 8,0 und 300 mM NaCl als Laufpuffer aufgetrennt. Es zeigte sich jedoch, daß während der Größenchromatographie der größte Teil des gesuchten Proteins zu so großen Komplexen aggregierte, daß er im Durchlauf (1,3 MDa und größer) zu finden war. Ein kleiner Teil des Proteins akkumulierte bei etwa 160 kDa, und nur ein geringer Anteil war im Bereich von Monomeren bei ca. 40 kDa zu finden. Die 65 kDa- und 95 kDa großen Komplexierungsbanden

in den Fraktionen 15 und 16 zeigen, daß ein großer Teil der Komplexierung erst nach der Chromatographie stattfindet, entweder durch die Acetonfällung oder die Vorbereitung der Proben für den Western Blot, da die genannten Fraktionen die Protein-Monomere der Größenchromatographie enthalten (66 kDa und kleiner). Weil die genaue Zusammensetzung der Komplexe bei 1,3 MDa bzw. 160 kDa unbekannt ist, wurde keine weitere Größenchromatographie durchgeführt.

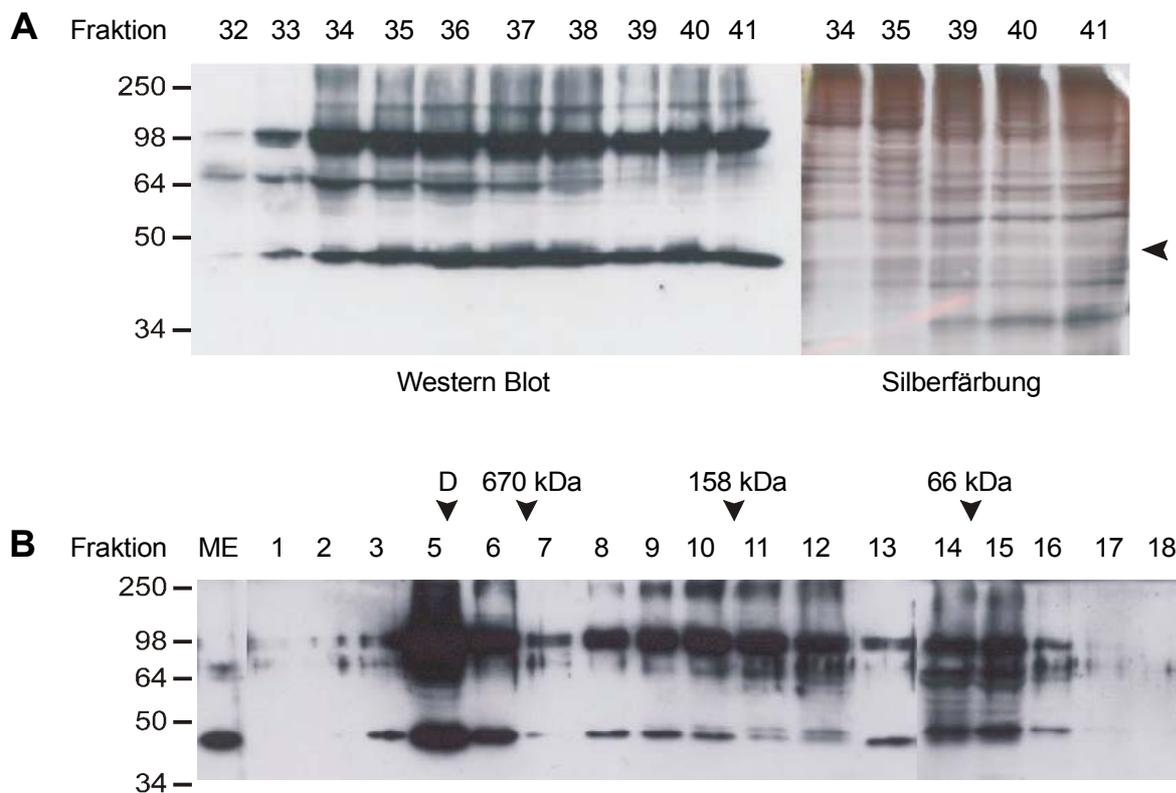


Abb. 25: Anionenaustausch mit anschließender Größenchromatographie.

A: 35 mg Mitochondrienextrakt wurden zunächst mit einer Q-Sepharosesäule aufgetrennt. Die anfängliche Salzkonzentration betrug 150 mM NaCl und wurde kontinuierlich bis auf 1 M gesteigert. 200 µl der 1 ml-Fraktionen wurden mit Aceton gefällt und gelelektrophoretisch aufgetrennt und sowohl ein Anti-P35-Western Blot (links) als auch eine Silberfärbung (rechts) durchgeführt. Die Bande des gesuchten Proteins ist im Western Blot vorhanden, in der Silberfärbung jedoch nicht zu erkennen (Pfeil).

B.: Die Fraktionen 34 bis 41 des unter Abb. 25A durchgeführten Anionenaustauschs wurden vereinigt und auf eine mit 20 mM Tris HCl, pH 8,0 und 300 mM NaCl equilibrierte Superose 6-Säule aufgetragen. Die resultierenden Fraktionen wurden gefällt und ein Anti-P35-Western Blot durchgeführt (es wurde die Hälfte jeder Proben aufgetragen). Die angegebenen Größen (kDa) entsprechen der Position der Standardproteine und des Durchlaufs (D). Als Positivkontrolle diente Mitochondrienextrakt (ME).

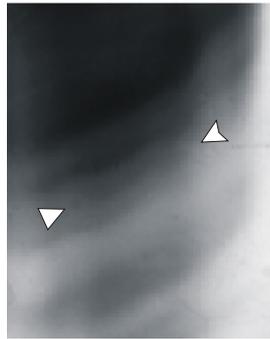


Abb. 26: Coomassie-Färbung der zu sequenzierenden Banden.

Mitochondrienextrakt (10 mg Gesamtprotein) wurden zunächst in einem SDS-Gel mit glycinhaltigen Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt, der Bandenbereich zwischen 30 kDa und 50 kDa ausgeschnitten, in mehrere waagerechte Streifen unterteilt und von den Enden der Streifen ein Anti-P35-Western Blot durchgeführt. Die Anti-P35-positiven Streifen wurden auf ein SDS-Gel aufgebracht und mit tricinhaltigem Laufpuffer aufgetrennt. Ein kleiner Abschnitt des Gels wurde erneut im Anti-P35-Western Blot getestet, das restliche Gel wurde Coomassie-gefärbt und die korrespondierende Bande identifiziert (Pfeil). Dabei handelte es sich um eine Doppelbande (in der Abbildung wegen zu geringer Bildauflösung nicht als solche erkennbar), deren Einzelbanden getrennt ausgeschnitten und zur Tandem-Massenspektrometrie eingesetzt wurden.

3.3.4 Präparative SDS-PAGE mit Glycin/Tricin und Sequenzierung

Nachdem sich die FPLC als ungeeignet zur effizienten Proteinanreicherung erwiesen hatte, wurde versucht, wie bei der Histonidentifizierung das gesuchte Protein direkt aus Mitochondrienextrakten durch präparative SDS-PAGE zu isolieren. Im silbergefärbten SDS-Gel zeigte sich, daß zwar insgesamt sehr viele Proteine im Mitochondrienextrakt enthalten waren, jedoch im relevanten Größenbereich nur eine begrenzte Anzahl von Proteinbanden zu erkennen war. Die Konzentration des gesuchten Proteins war andererseits zu niedrig, um als Bande sichtbar zu werden. Deshalb wurden 10 mg Gesamtprotein in 1,5 ml Mitochondrienextrakt über die gesamte Breite eines 15 cm x 20 cm Gels aufgetragen und in einer SDS-PAGE mit Tris/Glycin-gepuffertem Laufpuffer aufgetrennt. Der gesuchte Bandenbereich zwischen 30 kDa und 50 kDa wurde ausgeschnitten und in waagerechte Streifen unterteilt. Die äußeren Enden jedes Streifens wurden im Anti-P35-Western Blot getestet. Die ungefärbten Anti-P35-positiven Gelstreifen wurden auf ein neues Gel aufgelegt, welches mit Tris/Tricin-gepuffertem Laufpuffer verwendet wurde. Die Gelelektrophorese wurde erst angehalten, nachdem der Bereich der gesuchten Bande fast das untere Ende des Gels erreicht hatte. Nach dem Lauf wurden erneut Streifen für einen Western Blot abgetrennt und das restliche Gel Coomassie-gefärbt und die Bande des gesuchten Proteins mit Hilfe eines Anti-P35-Western Blots identifiziert und ausgeschnitten. Vor dem doppelten Gellauf waren bei mehreren großen Testgelen bereits in der Silberfärbung drei Banden als nähere Kandidaten identifiziert worden. Durch die bessere Auftrennung der kombinierten

Glycin/Tricin-Gele zeigte sich, daß die dünnste der drei möglichen Banden eine Doppelbande war und zudem mit der höchsten Wahrscheinlichkeit die gesuchte Bande darstellte (Abb. 26). Beide Teile der Doppelbande wurden getrennt ausgeschnitten und zur Sequenzierung mittels Tandem-Massenspektrometrie (in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Harald Mischak, Nephrologie, Medizinische-Technische Hochschule, Hannover) geschickt.

3.3.5 Identifikation, Klonierung und Expression von RBP34

Bei der Sequenzierung mittels Massenspektrometrie werden die in den Gelstücken enthaltenen Proteine zunächst mit Trypsin verdaut und die resultierenden Fragmente daraufhin sequenziert. Handelt es sich um bekannte Proteine, können diese Fragmente in anschließenden Datenbankvergleichen den entsprechenden Proteinen zugeordnet werden. Für eine weitgehend gesicherte Annahme, daß ein bestimmtes Protein enthalten ist, sollten mindestens fünf verschiedene Fragmente enthalten sein.

Die Gelstücke der Glycin/Tricin-Gelelektrophorese enthielten ein Gemisch vieler Proteine, von denen viele üblicherweise vorkommende Kontaminationen sind, und die Konzentration der meisten Proteine war so gering, daß in der Regel nur zwei oder drei Fragmente vorhanden waren, die in manchen Fällen keine eindeutige Zuordnung zuließen. Die Liste der potentiellen Kandidaten ist lang und enthält auf den ersten Blick kein hervorstechendes Protein (Tab. 1). Sie umfaßt u.a. den Elongationsfaktor 1-delta, die H-Kette (LDHH) und M-Kette (LDHM) der L-Lactatdehydrogenase, die Syntaxine -4 und -16, das Vorläuferprotein der mitochondrialen Malatdehydrogenase, das 60S-ribosomale Protein L5 und ein zunächst „hypothetisches“ humanes Protein (Q96AG4; in Tab. 1: obere Bande, Nr. 4), das später als Homolog des sogenannten Ribosomenbindenden Proteins P34 (RBP34) der Ratte (rRBP34) identifiziert wurde (Ohsumi *et al.*, 1993). Die Aminosäure-Identität zwischen dem humanen Protein (hRBP34) und rRBP34 liegt bei 95 %. Auch das humane Protein wurde inzwischen kloniert und beschrieben (Skjerpen *et al.*, 2002).

Ein DNA-Sequenzvergleich mit „T-Coffee“ (Notredame *et al.*, 2000) des humanen hRBP34 mit ACP35 und seinen viralen Homologen BmP35 (*Bombyx mori* NPV) und SIP49 (*Spodoptera littoralis* NPV) ergab eine zumindest abschnittsweise gute Übereinstimmung, jedoch – wie bei allen anderen Proteinen - keine hervorstechende Übereinstimmung bezüglich der Gesamthomologie (Abb. 27).

Tab. 1: Ergebnis der Doppelbanden-Sequenzierung.

In dieser Tabelle sind die möglichen Kandidaten der Sequenzierung aufgelistet, zu denen die bei der Sequenzierung gefundenen Peptide passen. Die verschiedenen Proteine, deren Peptidfragmente in einer der beiden sequenzierten Banden gefunden wurden, sind mit 1, 2, 3, etc. durchnummeriert. Kommt für die vorhandenen Fragmente mehr als ein Kandidat infrage, sind diese mit a), b), c) etc. bezeichnet.

Doppelbande	Nr.	Name	Datenbanknummer	Sonstiges
obere Bande	1	a) Elongationsfaktor 1-delta	AAH08012	---
		b) Hypothetisches 61.2 kDa Protein	Q9BW34	Fragment
		c) unbekannt	Q96I38	Protein für MGC:14256
	2	L-Lactatdehydrogenase, H-Kette	P07195	LDHH_HUMAN, (EC 1.1.1.27)
	3	L-Lactatdehydrogenase, M-Kette	P00338	LDHM_HUMAN, (EC 1.1.1.27)
	4	hypothetisches Protein (bei der Ratte: „Ribosomen-bindendes Protein P34“, rRBP34)	Q96AG4	Länge: 307 AS, Molekulargewicht: 34.930 Da
	5	Malatdehydrogenase, mitochondrial	P40926 / AAC03787	Vorläuferprotein
6	Syntaxin-4	S52726/ Q12846	---	
7	a) Guanin Nucleotid-bindendes Protein G(I)/G(S)/G(T), beta Untereinheit 2	AAA35922/	HUMG	
	b) GTP-bindendes regulatorisches Protein, beta-1 Kette	P04901	RGHUB1	
untere Bande	1	GTP-bindendes regulatorisches Protein, beta-1 Kette	P04901	RGHUB1
	2	L-Lactatdehydrogenase, H-Kette	P07195	LDHH_HUMAN, (EC 1.1.1.27)
	3	CGI-86 Protein	Q9Y394	---
	4	a) 60S ribosomales Protein L5	P46777	---
		b) MSTP030		---
	5	L-Lactatdehydrogenase, M-Kette	P00338	LDHM_HUMAN, (EC 1.1.1.27)
	6	a) Syntaxin 16	a)AAB69282/ AF008935 b) Q8WV00	---
b) Hypothetisches 34.8 kDa Protein			---	
7	a) Peroxisomales Membranprotein	a) AAD22466/ AF118240	PEX16	
	b) wie peroxisomaler Biogenesefaktor 16	b) Q9BWB9	---	

<i>AcP35</i>	1	MCVIFPVEID	VSQTI	IRDCQ	..VDKQ	TREL	VYINKIMN..	..TQLTKPVL	44		
<i>BmP35</i>	1	MCVIFPVEID	VSQTV	IRDCH	..VDEQ	TREL	VYINKIMN..	..TQLTKPVL	44		
<i>SlP49</i>	1	MCVLIPT.FN	ASATT	IVDCA	NLSDSS	MRDL	IYVNNVAV	SK NGNYINRAVI	49		
<i>RBP34</i>	1	MTKAGSK.GG	NLRDKL	DGNE	..LDLS	LSLSDL	NEVPVKEL..	..AALPKATI	43		
								LLR →			
<i>AcP35</i>	45	MMFNISGPIR	SVTRKNNNLR	DRIKSKVDEQ	FDQL	.ERDYS	DQMDGF	HDSI	93		
<i>BmP35</i>	45	MMFNISGPIR	SVTRKNNDLR	DRIKSKVDEQ	FDQL	.EREYS	DKIDGF	HDSI	93		
<i>SlP49</i>	50	MALNISGPLV	CVNRVSMHIV	HMYRSHIDRV	FDKFNK	LTYS	ATVTDG	GGAD	99		
<i>RBP34</i>	44	LDLSCN.KLT	TLPSDFCGLT	HLVK..LDLS	KNKLQQ	LPAD	.FG...	82		
<i>AcP35</i>	94	KYFKDEHYSV	SCQNGSVLKS	KFAKILKSHD	YTDKKS	SIEAY	EKYCLP	PKLVD	143		
<i>BmP35</i>	94	QYFKDEHYSV	SCQNGSVLKS	KFAKILKSHD	YTDKKS	SIETY	EKYCLP	QQLVD	143		
<i>SlP49</i>	100	RVFNSSDDYTV	VCMSRGDLLN	NYKNCILLNEM	GATYDD	VEKF	RKYCLK	PLTE	149		
<i>RBP34</i>	83	RLVNLQHLDL	LNNKLVTL	LPV SFAQ.LK	NLK WLDL	KDNP.L	DPVLA	KVAGD	130		
								← LLR			
<i>AcP35</i>	144	ERND.....YY	VAVCVL	KPGF	ENGSNQ	VLSF	EYNP	IGNKVI	179	
<i>BmP35</i>	144	KHND.....CY	VAVCVL	KPGF	ENGSNQ	VLSF	EYNP	IGNKVI	179	
<i>SlP49</i>	150	TENDMMSGSD	VGVEDQ	KPKY	VVICSL	KPKL	LNNKK	.TLCF	TYKPTGQVI	198	
<i>RBP34</i>	131	CLDE.....KQ	CKQC	CANK.VL	QHMKA	.VQAD	QERER	QRRIE	164	
						CC →					
<i>AcP35</i>	180	VPFAHEIN.D	TG..LYEYDV	VAY.VDSVQF	DG.....EQ	FEEFVQ	SLIL		219		
<i>BmP35</i>	180	VPFAHEIN.D	TG..LYEYDV	LAY.VDSVEF	DG.....KQ	FEEFVQ	KLIL		219		
<i>SlP49</i>	199	VPLMHEIN.E	NGSDVY	AYEV	MAM.IK	DVRL	SNKPI	GVLER	LKRSMEQIVL	246	
<i>RBP34</i>	165	VEREA	EKKRE	AK..QRA	KEA QERE	LRKREK	AE.....EK	ERRR	KEYDAL	206	
<i>AcP35</i>	220	PSSFK.....	.NSEK.VL	YY NEASK.NK..	SMIYK	ALEFT	TESSW	GKSEK	259		
<i>BmP35</i>	220	PSSFN.....	.DSEK.VL	YY NEASK.NK..	NMIYK	ALEFT	TESSW	VKSNK	259		
<i>SlP49</i>	247	NHNENRYVMT	NQLES	.LNYY	LKSINS	NKE.	DNDLN	KLMSL	LKSLIDQIEK	294	
<i>RBP34</i>	207	KAAKRE....	.QEK	PKKEA	NQAPK	.SKSG	SRPRK	PPPRK	HTRSVA.VLK	249	
								← CC			
<i>AcP35</i>	260	YNWKIFCNGF	IYDKK..SKV	LYVKL	LHNVT	ALNKN	VILNT	IK~~~~~	299		
<i>BmP35</i>	260	FNWKIFCNGF	IYDKK..SKA	LYVKL	LHNVT	TLNKN	VILDM	IK~~~~~	299		
<i>SlP49</i>	295	VLHKKSICDF	SDDED	DCDVL	VDVKY	HNAM	EDN	IRILLIK	MQQYIDDRHM	344	
<i>RBP34</i>	250	LLLLLLIFGV	AGGLV..AC	RVTEL	QQOPL	CTSVNT	IYDN	AVQGR	.RHE	295	
		TM →		← TM							
<i>AcP35</i>		~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~			
<i>BmP35</i>		~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~			
<i>SlP49</i>	345	FLPPSLSYEN	STKIRL	FENV	TSMK	CFSLG	ELYSF	VKKII	DWKTHETNQK	394	
<i>RBP34</i>	296	ILQWVLOTD.	SQQ	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	307	
<i>AcP35</i>		~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~			
<i>BmP35</i>		~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~			
<i>SlP49</i>	395	LACPEV	VDDK	YAFVKY	DYFG	TAHG	FVYDQR	DRTMY	VKLHC	GIAANRNIYI	444
<i>RBP34</i>		~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~		
<i>AcP35</i>		~~									
<i>BmP35</i>		~~									
<i>SlP49</i>	445	DI	446								
<i>RBP34</i>		~~									

Abb. 27: Sequenzvergleich von hRBP34 mit den P35-Homologen *AcP35*, *BmP35*, *SlP49*.

Es wurden nur Homologien zwischen RBP34 und den viralen P35-Homologen markiert, keine innerhalb der P35-Gruppe. Ähnliche Aminosäuren sind grau unterlegt, identische schwarz. Die Positionen der Domänen von RBP34 sind angedeutet (Leucin-reiche Domäne (LLR), „coiled-coil“ (CC), Transmembrandomäne (TM)). Die Caspasen-Schnittstelle von *AcP35* hinter Position 87 ist gekennzeichnet (Pfeil). Das davorliegende Tetrapeptid ist die Caspasen-Erkennungssequenz. Nähere Erläuterungen zu RBP34 im Text.

Der Sequenzvergleich von RPB34 mit den viralen P35-Homologen deutet auf einen möglicherweise konservierten Aspartatrest in der Caspasen-Erkennungssequenz hin. Die Erkennungssequenz von *AcP35* lautet: Aspartat (84)–Glutamin (85)–Methionin (86)–Aspartat (87), Schnittstelle, Glycin (88), wobei der Aspartatrest an Position 87 für eine Caspasen-Erkennungssequenz entscheidend ist. Dieses Aspartat ist auch bei *BmP35* konserviert. Der Sequenzvergleich zeigt, daß bei RBP34 an dieser Position ebenfalls ein Aspartat sitzen könnte. Dies war der ausschlaggebende Grund dafür, dieses Proteins für weitergehende Untersuchungen auszuwählen. Um eine Kreuzreaktion mit dem Anti-P35-Antiserum festzustellen, sollte eine Expression des Proteins in 293T-Zellen mit anschließendem Anti-P35-Western Blot der Zellysate durchgeführt werden. Auf eine Expression in *E. coli* wurde verzichtet, da bereits bekannt war, daß das Antiserum stark mit Bakterienproteinen kreuzreagiert und im Western Blot zu einer intensiven Hintergrundreaktion führt.

Im Anti-5xHis-Western Blot zeigte sich in den Lysaten der RBP34-exprimierenden Zellen eine zusätzliche Bande zwischen 35 kDa und 50 kDa. Im Anti-P35-Western Blot erschien dieselbe Bande, etwas oberhalb der Banden des endogenen RBP34. Die Anti-P35-positive Bande wurde sowohl mit Anti-P35 (Abb. 28) als auch mit Anti-5xHis als erstem Antikörper sichtbar (nicht

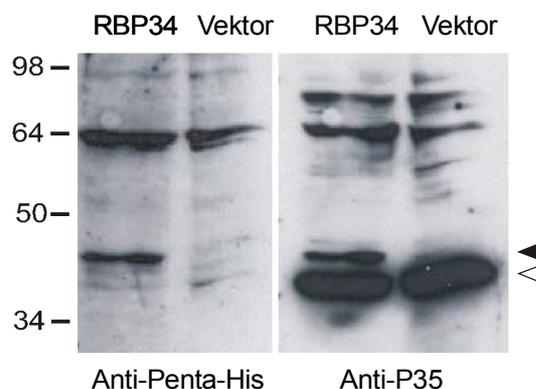


Abb. 28: Extrakte von mit humanem RBP34 und Kontrolle transfizierten 293T-Zellen.

293T-Zellen wurden mit pEF6-RBP34 oder pEFSem (Kontrolle) transfiziert und nach 24 h geerntet. Die Zellen wurden in Laemmli-Puffer lysiert, und zunächst wurde ein Anti-P35-Western Blot (rechts) durchgeführt. Anschließend wurden die Antikörper von der Membran entfernt und mit Anti-5xHis Antikörper (links) die 6xHis-RBP34-Expression überprüft. Dabei wurden die mit pEF6-RBP35 transfizierten Zellen in der linken, die mit pEFSem transfizierten Zellen in der rechten Spur aufgetragen. In beiden Zellysaten ist im Anti-P35-Western Blot endogenes RBP34 (weißer Pfeil) zu erkennen, rekombinantes 6xHis-RBP34 (schwarzer Pfeil) nur in den RBP34-transfizierten Zellen.

gezeigt). Dies zeigt, daß RBP34 mit Anti-P35 reagiert und daher mit hoher Wahrscheinlichkeit das gesuchte mit dem Anti-P35-Antiserum kreuzreagierende Protein ist. Eine Wiederholung der Transfektion brachte das gleiche Resultat (nicht gezeigt).

3.3.6 Theoretische Analysen

Für eine theoretische Analyse von RBP34 wurden verschiedene Computeranwendungen zur Proteinanalyse (unter: www.expasy.ch) eingesetzt. Die Bestimmung des Molekulargewichts ergab 34,9 kDa (ProtParam, Compute pI/Mw, Protéine : M.M., pI, composition, titrage). Eine Analyse der Domänen mit mehreren Programmen zeigte ein vergleichbares Bild zur Beschreibung von RBP34 in der Literatur: Das Protein enthält N-terminal vier Leucin-reiche Wiederholungsmotive („leucin rich repeats“, LLR; zwischen AS 38 und 130), eine „coiled-coil“- (CC)-Region (AS 147-215) und dahinter eine hydrophobe mutmaßliche Transmembranregion (AS 250-266).

Viele oligomerisierende Proteine enthalten eine CC-Domäne. Das Programm MultiCoil (Wolf *et al.*, 1997) sagt die Wahrscheinlichkeit einer gegebenen Aminosäuresequenz voraus, eine aus Dimeren oder Trimeren bestehende „coiled-coil“ zu bilden. Die Summe beider Wahrscheinlichkeiten repräsentiert dabei die Neigung der CC-Region, jegliche Art einer „coiled-coil“ zu bilden (Wolf *et al.*, 1997). Eine Analyse der CC-Domäne von RBP34 ergab eine Dimerisierungswahrscheinlichkeit von ca. 0,45 und eine Trimerisierungswahrscheinlichkeit von ca. 0,3, mit einem Gesamtwert von 0,7. RBP34 ist also seiner Sequenz nach mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Lage zu dimerisieren oder Komplexe höherer Ordnungen zu bilden (Abb. 29). Die Fähigkeit zur Komplexierung konnte im Laufe der Arbeit immer wieder beobachtet werden, wobei unklar blieb, ob es sich bei den beobachteten Komplexen um Homodi- und -trimere oder Heterooligomere mit anderen Proteinen handelt. Zusammen mit den Ergebnissen der theoretische Analyse der CC-Domäne besteht die reelle Möglichkeit, daß die beobachteten (scharfen) Banden bei 65 kDa und 98 kDa tatsächlich Homodi- und -trimere von RBP34 sind. Das Vorhandensein einer hydrophoben Transmembranregion ist wahrscheinlich die Ursache für die Fähigkeit des Proteins sein, an die Matrix der HIC zu binden und ist weiterhin eine naheliegende Erklärung für die Tendenz von RBP34, ohne Detergens oder bei niedrigen Salzkonzentrationen auszufallen, eine Eigenschaft, die es mit anderen Membranproteinen teilt.

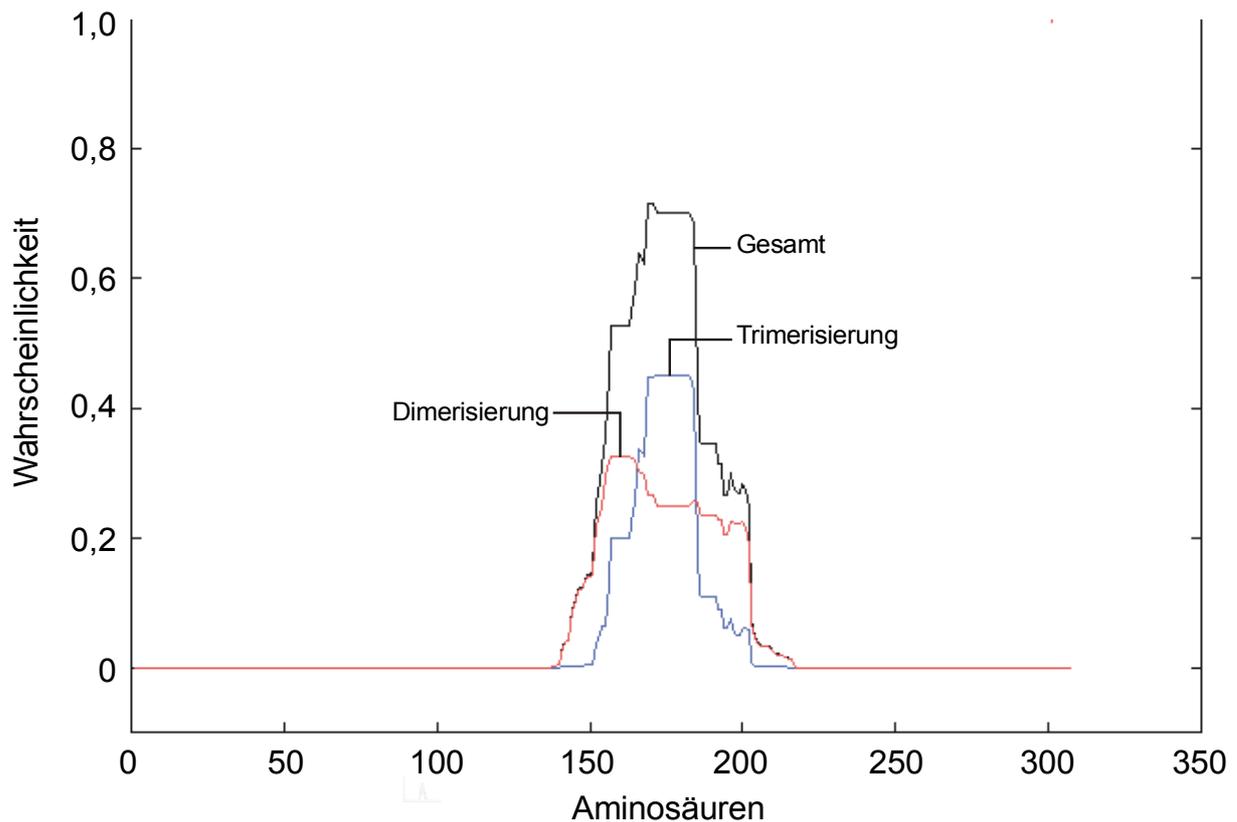


Abb. 29: Multimerisierungswahrscheinlichkeit von RBP34.

Gezeigt wird die Vorhersage von MultiCoil (Wolf *et al.*, 1997) über die Wahrscheinlichkeit von hRBP34, Di- und Trimere zu bilden. Die Gesamtwahrscheinlichkeit stellt dabei die Summe der Einzelwahrscheinlichkeiten für Di- und Trimerisierung dar. Die Multimerisierung ist auf den Bereich von AS 147-215 begrenzt, dem Abschnitt, der der CC-Domäne entspricht.

Die Bestimmung des theoretischen isoelektrischen Punktes mit verschiedenen Programmen ergab einen pI von 9,61 (ProtParam, Compute pI/Mw) oder 10,34 (klassisch) bzw. 10,02 (unter Berücksichtigung der Cysteine; Protéine: M.M., pI, composition, titrage). Vergleicht man die theoretischen Werte mit den Ergebnissen der 2-D-Gelelektrophorese dieser Arbeit (vor allem unter Berücksichtigung der großen Komplexe), kann man – trotz suboptimaler Fokussierung – eine dementsprechende Anreicherung im Bereich von pH 9-10 feststellen. Der Hauptanteil befindet sich allerdings im Bereich von pH 5-6 (Abb. 22).

Da in Vorversuchen eine mitochondriale Lokalisation des gesuchten Proteins festgestellt worden war, wurde das Programm MitoProt (Claros *et al.*, 1996) eingesetzt, das durch die Bestimmung mitochondrialer Zielsequenzen anhand von N-terminalen Proteinregionen die Wahrscheinlichkeit für einen Transport in die Mitochondrien ermittelt. Dabei zeigte sich, daß RBP34 mit 0,0208 nur eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit für eine Lokalisation in Mitochondrien besitzt. Das

gleiche gilt jedoch auch für den N-Terminus von P35, der eine Wahrscheinlichkeit von 0,08 erreicht, und in einem Transfektionsexperiment mit einer P35-Deletionsmutante dennoch eine mitochondriale Position aufsucht (vgl. Einleitung). Die Ergebnisse des Programms zeigen demnach nur, daß beide Proteine keine typische mitochondriale Zielsequenz enthalten. Die tatsächliche Lokalisation kann jedoch offensichtlich von weiteren Faktoren gesteuert werden, die im Programm nicht berücksichtigt werden.

Alles in allem ist das gefundene Protein – RBP34 – nicht eindeutig als Homolog von viralem P35 zu erkennen. Eine große Homologie mit einem bereits bekannten Protein ist andererseits nicht erwartet worden, da ausgiebige Datenbanksuchen mit den baculoviralen P35 kein positives Ergebnis gebracht hatten. Auch wenn die Homologie zwischen RBP34 und den baculoviralen P35-Proteinen insgesamt nicht sehr ausgeprägt sind, zeigt sich dennoch eine abschnittsweise mögliche Homologie zu P35.

4 DISKUSSION

Die vorliegende Diskussion gliedert sich in drei Teile. Der erste Schwerpunkt der Arbeit lag in der Erforschung molekularer Eigenschaften des proapoptotischen Proteins CED-4 aus *C. elegans*. Dabei wurde festgestellt, daß CED-4 in Lösung spontan große Komplexe bilden kann, und daß es während der Expression in *Sf9*-Insektenzellen eine Lokalisation um den Kern einnimmt. Weiterhin wurden die Nukleotidbindungseigenschaften von CED-4 untersucht. Alle gefundenen Eigenschaften werden mit denen des Säuger-Homologs Apaf-1 verglichen, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede herauszuarbeiten.

Der zweite Aufgabenteil beschäftigte sich ebenfalls mit CED-4, diesmal mit der Suche nach einer Gruppe von Bindungspartnern, die mittels Far Western Blot in zellulären Extrakten gefunden worden waren. Ursprüngliches Ziel der Aufgabenstellung war die Suche nach einem menschlichen CED-4-Homolog. Die Bindungspartner wurden als Histone H2B, H3 und H4 identifiziert, und ihre Identität konnte mit Hilfe einer Expression in *E. coli* bestätigt werden; ein Nachweis der Bindung zwischen Histonen und CED-4 in einer unabhängigen Methode steht noch aus. Hier soll nun die Möglichkeit einer physiologischen Funktion dieser Interaktion diskutiert werden.

Der dritte Schwerpunkt der Arbeit war die Identifikation eines zellulären Proteins, das mit einem gegen AcP35 gerichteten Antiserum kreuzreagiert. Der Hintergrund dieses Aufgabenteils war die Suche nach einem zellulären Homolog des viralen Caspaseninhibitors AcP35. Das kreuzreagierende Protein konnte als ein Protein identifiziert werden, das in der Literatur als „Ribosomen-bindendes Protein“ RBP34 beschrieben wird. In der Diskussion soll nun die bisherige Literatur über RBP34 dargestellt werden und mit den Ergebnissen dieser Arbeit verglichen werden, um Übereinstimmungen und Diskrepanzen offenzulegen und die mögliche Bedeutung dieses Befundes zu diskutieren.

4.1 Molekulare Funktionen und Eigenschaften von CED-4

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden mittels zweier rekombinanter, aufgereinigter Fusionsproteine, FLAG-CED-4 und GST-FLAG-CED-4, molekulare Eigenschaften des Proteins CED-4 aus *C. elegans* untersucht. Zur Expression beider Proteine wurde das Baculovirus Ex-

pressionssystem gewählt. Dabei konnte gezeigt werden, daß rekombinantes CED-4 in *Sf9*-Insektenzellen eine ausgeprägte kugelförmige Lokalisation um den Kern einnimmt. Weiterhin wurde festgestellt, daß das aufgereinigte Protein in Lösung spontan große Komplexe bildet. In Nukleotid-Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Nukleotiden konnte gezeigt werden, daß CED-4 ATP gegenüber dATP bevorzugt bindet. Eine ATP-Hydrolyse wurde dabei weder für die Stabilität der Komplexe noch für die Bindung von CED-4 an CED-3 benötigt.

4.1.1 Subzelluläre Lokalisation

Bei der Aufreinigung der beiden CED-4-Fusionsproteine – FLAG-CED-4 und GST-FLAG-CED-4 – stellte sich heraus, daß die Proteine zwar in großen Mengen produziert wurden, aber nur schlecht aus den Zellen herauszulösen waren. Um nach einer möglichen Ursache zu suchen, wurde daraufhin die Lokalisation beider Proteine in infizierten Insektenzellen untersucht. Mittels konfokaler Mikroskopie zeigten sich, daß CED-4 eine sphärische, teilweise netzartige Anordnung um den Zellkern einnahm, manchmal mit Ausläufern ins Cytoplasma, die in erster Linie bei Verwendung von FLAG-CED-4 erkennbar waren. Die Trennung zwischen Ringstruktur und Cytoplasma war vor allem bei FLAG-CED-4 deutlich ausgeprägt, wohingegen GST-FLAG-CED-4 sichtbar diffuser verteilt war. Dies könnte ein Indiz dafür sein, daß GST-FLAG-CED-4 – möglicherweise aufgrund seines GST-Fusionsanteils – weniger stark an Zellkomponenten haftet, ein Phänomen, das bereits bei der Aufreinigung beobachtet werden konnte.

Um eine Sekretion des exprimierten Proteins ins Medium zu ermöglichen, wurde FLAG-CED-4 mit Mellitin-Signalsequenz konstruiert; eine solche Freisetzung war jedoch nicht nachzuweisen. Es besteht daher die Möglichkeit, daß die Ringstruktur durch den Mellitin-vermittelten Transport von FLAG-CED-4 ins ER und eine Ansammlung dort verursacht wurde. Dieser Hypothese steht allerdings die Tatsache entgegen, daß auch GST-FLAG-CED-4 eine Ringstruktur annimmt.

Auf den ersten Blick scheint die Annahme, daß CED-4 selbst unlöslich ist, eine mögliche Erklärung für die Probleme der Aufreinigung. So ist auch Apaf-1S, eine kurze Spleißvariante von Apaf-1, der eine WD40-Domäne fehlt, weniger gut löslich als „normales“ Apaf-1L (Saleh *et al.*, 1999). Dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da das Protein, nachdem es einmal mit Hilfe von Detergenzien aus den Zellen herausgelöst war, auch in Wasser in Lösung blieb und selbst eine Lyophilisation ohne Veränderung der Löslichkeit überstand. Eher ist anzunehmen, daß CED-4 an eine Zellstruktur gebunden vorliegt. Die konfokalen Bilder zeigen deutlich, daß CED-4 nicht frei im Cytoplasma vorliegt, sondern an eine Struktur gebunden ist, entweder an die

Kernmembran selbst oder an eine andere kernnahe Struktur, wie das Cytoskelett. Eine eindeutige Zuordnung ist anhand der vorliegenden Bilder jedoch nicht möglich.

Eine der beobachteten Lokalisation vergleichbare sphärische Anordnung konnten Chen *et al.* (2000) auch *in vivo* in *C. elegans* feststellen. Dabei verwendeten sie eine *ced-3^{-/-}/ced-9^{-/-}*-Doppelmutante, in der CED-4 nicht durch CED-9 an die Membranen sequestriert wird. Diese perinukleäre Lokalisation wurde durch einer Fraktionierung von *C. elegans* Embryonen bestätigt, bei der CED-4 nicht in der cytosolischen oder Membran- und Organellenfraktion, sondern zusammen mit nukleären Laminen in der kernhaltigen Fraktion zu finden war. Auch wenn Chen *et al.* (2000) damit eine direkte nukleäre Lokalisation nahelegen, befindet sich in der gezeigten Fraktion ebenso das Cytoskelett, so daß nicht auszuschließen ist, daß dieses und nicht die Kernmembran der eigentliche Lokalisationsort ist.

Es ist anzunehmen, daß die beobachtete Lokalisation das widerspiegelt, was sich wahrscheinlich auch *in vivo* im Nematoden abspielt. Daß CED-4 diese Lokalisation auch im fremden „Umfeld“ einnehmen kann, legt nahe, daß es sich um eine intrinsische Fähigkeit von CED-4 handelt, für die weitere Proteine oder auslösende Faktoren nicht unbedingt notwendig sind (oder die sowohl in Insektenzellen als auch im Nematoden vorhanden sind).

Es stellt sich nun die Frage, ob es sich um eine Funktion handelt, die für die Apoptose benötigt wird, oder sie unabhängig davon ist. Da Wu *et al.* (1997b) bei der Expression von CED-4 in Säugerzellen (293T-Zellen) diese Lokalisation nicht sahen, sondern stattdessen eine cytoplasmatische Verteilung, und da in Gegenwart von CED-3 trotzdem Apoptose ausgelöst wurde (Wu *et al.*, 1997a), erscheint die Annahme naheliegend, daß die perinukleäre Lokalisation keine grundlegende Aufgabe in der Apoptose spielt und nicht notwendig ist, damit Apoptose stattfinden kann. Es wurde jedoch nicht gezeigt, was in diesem System nach einem Apoptosestimulus tatsächlich passiert. Möglicherweise wird CED-4 nur in „gesunden“ (nicht apoptotischen) Säugerzellen daran gehindert, diese Lokalisation einzunehmen. Nachdem Apoptose ausgelöst wurde, könnte CED-4 dennoch seine perinukleäre Position um den Kern aussuchen und Apoptose vermitteln. Es ist denkbar, daß dieser Rückhaltemechanismus bei niederen Tieren wie *C. elegans* und *S. frugiperda* nicht vorhanden ist, weshalb CED-4 hier auch ohne Apoptosestimulus eine Position um den Kern aufsucht. Auf der anderen Seite handelt es sich bei der Überexpression der beiden Proteine aus *C. elegans* in Säugerzellen um ein System, das möglicherweise den physiologischen Ablauf nicht korrekt widerspiegelt, weshalb die Lokalisationsdaten nicht überbewertet werden sollten. Insgesamt gesehen lassen die oben erwähnten

Ergebnisse die Möglichkeit zu, daß die Lokalisation um den Kern wichtig ist für die Apoptose in *C. elegans*.

Ebenso denkbar ist jedoch die Annahme, daß die perinukleäre Lokalisation eine von der Apoptose unabhängige Funktion darstellt. Eine plausible – theoretische – Erklärung für das Aufsuchen dieser Position im Rahmen der Apoptose läßt sich mit den bisher bekannten Daten nicht in Einklang bringen, da bereits die Oligomerisierung von CED-4 die Aktivierung von CED-3 zur Folge hat und damit zur Apoptose führt. Dieser Vorgang ist zumindest theoretisch nicht von der intrazellulären Position abhängig. Die Beobachtung von James *et al.* (1997), daß CED-4 in Hefen (*Schizosaccharomyces pombe*) eine Position im Kern aufsucht, dort an das Chromatin bindet und gleichzeitig zum Zelltod der Hefen führt, legt eine Funktion von CED-4 in einem anderen, archaischen (Zelltod-) Signaltransduktionsweg nahe. Es ist demnach denkbar, daß die perinukleäre Position von CED-4 ein evolutionäres Relikt ist (vgl. Kapitel 4.2.3).

4.1.2 Komplexbildung

Einmal in Lösung, zeigte CED-4 keine Tendenz, erneut auszufallen. Es wurde jedoch deutlich, daß es spontan große homooligomere Komplexe bildet, die durch chemische Kreuzvernetzung und eine Größenchromatographie unter nativen Bedingungen nachgewiesen wurden. Dabei ließ sich feststellen, daß sehr große Komplexe entstehen können. Bereits in der chemischen Kreuzvernetzung war eindeutig zu erkennen, daß CED-4 keine distinkten Banden bildet, sondern sehr breite Bereiche einnimmt, die wie verschmiert aussehen. Dieses Bild bestätigte sich in der Größenchromatographie: Es gab kein prominentes Maximum, sondern beide Fusionsproteine eluierten über einen sehr weiten Bereich hinweg. Dennoch lassen sich Aussagen über die Größe der Komplexe machen. Es wurden auch Unterschiede zwischen beiden Fusionsproteinen deutlich.

Die mittels „Fold recognition algorithm“ FFAS vorhergesagte Größe für die CED-4-Oligomerisierung ist ein Hexamer (Jaroszewski *et al.*, 2000). Vom Apaf-1-Apoptosom wurde mittlerweile durch Acehan *et al.*, (2002) gezeigt, daß es sieben Apaf-1-Moleküle enthält. Die Ergebnisse dieser Arbeit ergeben für FLAG-CED-4, daß in den großen Komplexen von 1,2 MDa und mehr, die anteilmäßig überwiegen, mindestens 10-20 Moleküle organisiert sein müssen; im kleineren Maximum bei 500 kDa, das in den *Sf9*-Extrakten erkennbar wird, könnten Komplexe von sechs bis acht Molekülen Größe stecken. Die Größe der GST-FLAG-CED-4 Komplexe ist geringer, und sie sind breiter verteilt, von Monomeren bis hin zu 13 Molekülen bei 1,3 MDa und möglicherweise mehr im Durchlauf. Der Unterschied zwischen beiden Proteinen läßt sich even-

tuell durch die Fusionsanteile erklären, die zu einer sterischen Hinderung oder Aggregation führen könnten. Alles in allem deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß CED-4 auch Komplexe bilden kann, die deutlich größer sind als Hexamere.

Das FLAG-CED-4-Maximum bei 500 kDa war nur bei Verwendung von Direktextrakten aus *Sf9*-Zellen zu beobachten. Obwohl der Anteil an der Gesamtmenge sehr gering war, ließen sich diese Komplexe zuverlässig reproduzieren. Die theoretische Anzahl an Molekülen, die zur Bildung dieser Komplexe notwendig sind – sechs bis acht – läßt die Spekulation zu, daß es sich um eine der physiologischen Form nahekommenden Struktur handeln könnte. So wie Apaf-1 in Zellextrakten in zwei Formen, als 700 kDa und als 1400 kDa große Komplexe, vorliegt, von denen der größere inaktiv ist (Cain *et al.*, 2000). Der Vergleich ist nicht vollständig übertragbar, da CED-4 nicht aus *C. elegans* isoliert wurde, sondern aus überexprimierenden, infizierten Insektenzellen. Dennoch ist denkbar, daß die kleineren Komplexe den physiologisch vorliegenden entsprechen und größere Komplexe sich nach Manipulation oder Aktivierung bilden.

4.1.3 ATP-Hydrolyse

Das Modell von Jaroszewski *et al.* (2000) schlägt vor, daß für die Bildung der CED-4-Oligomere ATP benötigt wird, welches erst bei der Komplex-Dissoziation hydrolysiert wird. Ob für die Bildung der Komplexe ATP benötigt wird, kann hier nicht beantwortet werden, da CED-4 bereits zelluläres ATP gebunden haben könnte. Ebenso wenig kann geklärt werden, was bei der Dissoziation der Komplexe geschieht. Da aber das nicht hydrolysierbare ATP- γ -S nicht in der Lage ist, die Komplexe zu zerstören, obwohl es ATP verdrängen können muß, kann davon ausgegangen werden, daß für die Stabilität der Komplexe keine ATP-Hydrolyse benötigt wird.

Bei Apaf-1 wird die Notwendigkeit einer (d)ATP-Hydrolyse bei der Bildung des Apoptosoms kontrovers diskutiert. Li *et al.* (1997), Hu *et al.* (1998b, 1999) und Saleh *et al.* (1999) konnten zunächst Ergebnisse präsentieren, die überwiegend für eine ATP- oder dATP-Hydrolyse sprechen. Dabei wurde der Nachweis der Hydrolyse über die nicht-spaltbaren ATP-Analoga ATP- γ -S oder AMP-PNP anstelle von ATP geführt. Da beide in der Regel die Funktion von Apaf-1 hemmen, ist die Schlußfolgerung, daß nicht die Bindung des Nukleotids den Ausschlag gibt, sondern eine Hydrolyse notwendig ist, naheliegend. Dagegen wiesen Zou *et al.* (1999) die Bildung von ADP direkt nach, konnten also dabei eine ATPase-Aktivität von Apaf1 feststellen. In einer späteren Veröffentlichung der gleichen Gruppe werden jedoch Daten gezeigt, die zeigen, daß bei Verwendung von besser aufgereinigtem Protein so gut wie kein ADP entsteht (Jiang &

Wang, 2000). Als Begründung für die zuvor beobachtete ATP-Hydrolyse wird die geringe Reinheit des damals verwendeten Apaf-1 angegeben. Die Verwendung von ATP- γ -S anstelle von ATP führt auch bei Jiang & Wang (2000) zu einer Inhibition der Apaf-1 Funktion. Die Wahl eines anderen nicht-spaltbaren ATP-Analogs – ADPCP – hingegen zeigt, daß eine ATP-Hydrolyse für die Bildung des Apoptosoms und die Aktivierung von Caspase-9 nicht notwendig ist. Stimmen diese Ergebnisse, dann ist möglicherweise nur die Bindung von ATP/dATP notwendig, jedoch keine Hydrolyse, wobei ATP- γ -S und AMP-PNP aus einem unbekanntem Grund nicht wie gewohnt funktionieren. Normalerweise führt ihre Gegenwart bei Vorgängen, die eine ATP-Hydrolyse benötigen, zu deren Hemmung, da die beiden Analoga nicht hydrolysierbar sind. Eine solche Hemmung ist zwar auch bei Apaf-1 zu beobachten; die Aktivierbarkeit in Gegenwart von ADPCP deutet jedoch darauf hin, daß die Hemmung nicht auf der Unspaltbarkeit von ATP- γ -S und AMP-PNP beruht. Es wäre vorstellbar, daß es stattdessen zu einer sterischen Hinderung kommt. In der Regel wird die Bindung der Nukleotide durch die Walker A- und Walker B-Motive vermittelt. Wenn im Vergleich zu einer „regulären“ Nukleotidbindungsstelle zusätzliche Epitope bei der Bindung eine Rolle spielen würden, könnte es sein, daß ATP- γ -S und AMP-PNP nicht binden können, nur ADPCP.

Für CED-4 existiert nur eine einzige Arbeit von Chinnaiyan *et al.* (1997a), in der gezeigt wird, daß bei Verwendung des nicht-spaltbaren ATP-Analogs FSBA anstelle von ATP keine CED-3-Prozessierung stattfindet. Dabei kommt es bei Verwendung von ATP zu einer CED-3-Aktivierung, die mit FSBA nicht mehr beobachtet werden kann, d.h. eine Nukleotidspaltung ist wahrscheinlich notwendig für die Bildung des aktiven CED-4/CED-3-Holoenzym. Im Hinblick auf die großen Diskrepanzen bei der Erforschung der Apaf-1 Nukleotidbindungsstelle sollten allerdings die Ergebnisse von nur einer Arbeit vielleicht zu diesem Zeitpunkt als nicht abschließend bewertet werden.

Zwei der ATP-Analoga, ATP- γ -S und AMP-PNP, erlauben keine Aktivierung von Caspasen durch das humane Apoptosom, ein anderes, ADPCP, hingegen läßt dies zu. Auch *in vitro* kann Apaf-1 in Gegenwart von ATP- γ -S keine Caspase-9 mehr binden (Hu *et al.*, 1999). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß zumindest die Bindung zwischen CED-3 und CED-4 auch in Anwesenheit von ATP- γ -S möglich ist. Eventuell findet die Hemmung erst bei einem späteren Schritt statt. Ob – wie im Falle von Apaf-1 – auch bei CED-4/CED-3 das Analog ADPCP eine Aktivierung ermöglicht, ATP- γ -S und AMP-PNP hingegen nicht, ist bisher nicht untersucht worden. Bei Verwendung von FSBA bei CED-4 zeigt sich das gleiche Bild wie für ATP- γ -S und

AMP-PNP bei Apaf-1: Es hemmt die Caspasenprozessierung. Wie FSBA sich auf Apaf-1 auswirkt, wurde bisher nicht untersucht.

4.1.4 Weitere Kofaktoren

Weder in der chemischen Kreuzvernetzung noch in der Größenchromatographie ergab sich durch die Zugabe von cytosolischem Extrakt zu aufgereinigtem CED-4 bzw. durch die Auftrennung von CED-4-haltigen *Sf9*-Extrakten eine Veränderung der Komplexe. Die Bildung der Komplexe wird demnach nicht durch Zugabe weiterer cytosolischer Proteine ausgelöst oder in ihrer Stöchiometrie verändert (zumindest nicht in Abwesenheit eines Apoptosestimulus), sondern kann spontan erfolgen, wenn auch möglicherweise mit Hilfe von ATP, das während der Expression in den Insektenzellen gebunden wurde. Darin unterscheidet sich CED-4 erwartungsgemäß von Apaf-1, da CED-4 die bei Apaf-1 für die Interaktion mit Cytochrom c wichtigen WD40-Domänen fehlen. Im inaktiven Zustand maskiert die WD40-Region sowohl die CARD (= Caspasen-bindende Domäne) als auch die Oligomerisierungsdomäne von Apaf-1. Es wird angenommen, daß die Bindung von Cytochrom c eine Konformationsänderung hervorruft, die zu einer Freilegung der zur Bildung des Apoptosoms wichtigen Domänen führt. Die beobachtete spontane Komplexbildung von CED-4 entspricht der Beobachtung, daß eine Apaf-1-Mutante ohne WD40-Domänen konstitutiv aktiv ist und ohne die Co-Faktoren Cytochrom c und dATP oligomerisieren kann (Saleh *et al.*, 1999). Auch die Tatsache, daß aufgereinigtes CED-4 direkt binden kann, während Apaf-1 erst Cytochrom c binden muß, bevor es eine nennenswerte Affinität für dATP entwickelt (Jiang & Wang, 2000), unterstützt die Theorie, daß die Nukleotidbindungsstelle von Apaf-1 durch die WD40-Region maskiert wird, während sie bei CED-4 freiliegt.

Trotz ihrer Homologie werden CED-4 und Apaf-1 unterschiedlich reguliert. Im inaktiven Zustand wird CED-4 von CED-9 an die Membranen sequestriert und bei einer Aktivierung durch EGL-1 freigesetzt (Liu & Hengartner, 1999). Es erscheint plausibel, daß bei *C. elegans* diese Freisetzung von CED-4 ausreicht, um durch spontane Oligomerisierung die Apoptosombildung zu initiieren, während bei Apaf-1 zur Oligomerisierung zunächst eine Bindung von Cytochrom c erfolgen muß, um die Oligomerisierungsdomäne freizulegen, gefolgt von einer dATP-Bindung. Dieser Hemmungsmechanismus erscheint sinnvoll, da Apaf-1 ungebunden im Cytoplasma vorliegt (Hausmann *et al.*, 2000) und eine spontane Komplexierung in Abwesenheit von Apoptose verhindert werden muß.

4.1.5 Nukleotidbindung und Bindung von CED-3

In der Regel können Proteine mit Nukleotidbindungsstelle ATP oder GTP binden und hydrolysieren (ATPasen bzw. GTPasen). Die Präferenz von Apaf-1 für ein Deoxynukleotid ist dementsprechend ungewöhnlich. Die Nukleotidbindungsstellen von CED-4 und Apaf-1 zeigen eine hohe Konservierung, weshalb eine dATP-Präferenz von CED-4 nicht überrascht hätte. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, daß CED-4 ATP gegenüber dATP bevorzugt.

Auch wenn ihre Bindung an CED-4 schwächer war als die von ATP, waren die anderen getesteten Nukleotide und Analoga – ATP- γ -S, AMP-PNP und ADP – in der Lage, mit ATP um die Bindung zu konkurrieren. Im Fall von Apaf-1 war das Diphosphat dADP auch bei hohen Konzentrationen nicht in der Lage, dATP zu verdrängen (Jiang & Wang, 2000), während bei CED-4 hoch konzentriertes ADP ATP durchaus aus der Bindung verdrängen konnte.

Da CED-4 ATP bevorzugt, ist anzunehmen, daß die dATP-Bindung von Apaf-1 eine sehr spezifische Eigenschaft von Apaf-1 ist, die evolutionär wahrscheinlich noch nicht alt ist. Daß Apaf-1 sowohl ATP als auch dATP binden kann, und daß die zellulären Konzentrationen der beiden Nukleotide *in vivo* eine Interaktion mit beiden Nukleotiden erlauben würden, legt die Vermutung nahe, daß Apaf-1 situationsbedingt jeweils mit einem von beiden interagieren könnte. Ob dies *in vivo* tatsächlich der Fall ist, muß derzeit jedoch bezweifelt werden, da bei einer ATP-Depletion der Zelle nach einem Apoptosestimulus (zumindest bei Verwendung von Staurosporin, einem klassischen Apoptoseauslöser) keine Apoptose mehr stattfindet (Nicotera *et al.*, 1998)

Wenngleich GST-FLAG-CED-4 in der Affinitätspräzipitation spezifisch an CED-3 binden konnte, wurde keine Aktivierung von CED-3 im Laufe des Experiments beobachtet, obwohl Chinnaiyan *et al.*, (1997a) in einem ähnlichen Versuch mit Myc/His-fusioniertem CED-4 eine Aktivierung zeigen konnten. Möglicherweise liegt dies an unterschiedlichen Reaktionsbedingungen, die nur in einem Fall eine Aktivierung von CED-3 erlauben, oder an den Fusionsanteilen, die eine Auswirkung auf die Funktion haben können (sterische Behinderung). Dennoch läßt sich anhand der Präzipitationsversuche mit GST-FLAG-CED-4 und [³⁵S] Methionin-CED-3 ablesen, daß für den Bindungsvorgang von CED-3 an CED-4 keine ATP-Hydrolyse benötigt wird.

4.2 Interaktion von CED-4 mit den Histonen H2B, H3, H4

Das ursprüngliche Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war, ein menschliches Homolog von CED-4 zu finden. Das bislang einzige bekannte „direkte“ humane Homolog von CED-4, Apaf-1, wurde erst 1997 entdeckt (Zou *et al.*, 1997) und war zur Zeit der ersten Versuchskonzeption noch unbekannt. Dabei wurde spekuliert, daß CED-4 eventuell mit einem menschlichen Homolog interagieren kann, entweder direkt oder über ein humanes Zellprotein. Deshalb sollte mit rekombinantem CED-4-Protein in menschlichen Zellextrakten nach Interaktionspartnern gesucht werden, und diese sollten dann identifiziert werden. Im Far Western Blot nach Blanar & Rutter (1992) wurde in den Vorarbeiten ein mit CED-4 interagierendes Protein von ca. 20 kDa nachgewiesen, dessen Aufreinigung aus Zellextrakten und Identifikation Aufgabe dieses Projektes war. Zunächst stellte sich heraus, daß es sich um eine Gruppe von wenigen sehr ähnlichen Proteine handelte. Die Darstellung dieser Proteine gelang mittels präparativer SDS-PAGE. Als Ergebnis der Sequenzierung wurden dabei die Histone H2B, H3, H4 gefunden, deren Identität als Bindungspartner von CED-4 im Far Western Blot durch zwei verschiedene Ansätze der Histonfraktionierung und durch Expression von Histon H4b in *E. coli* verifiziert werden konnte.

4.2.1 Histone

Die ursprüngliche Vermutung, es handele sich um ein Cytoskelett-assoziiertes Protein, bestätigte sich nicht. Dennoch war es möglich, mit Hilfe eines Aktin-depolymerisierenden Puffers die schwer löslichen Proteine in Lösung zu bringen und mittels SDS-PAGE zu isolieren, so daß eine Sequenzierung möglich war. Die gesuchten Proteine konnten als Histone H2B, H3 und H4 identifiziert werden. Ein Vergleich des Aktin-depolymerisierenden Hochsalzpuffers mit Puffern zur Kernextraktion zeigt, daß beide sehr ähnlich konzipiert sind und 0,6 M KCl enthalten. Die hohe Salzkonzentration löst so gut wie alle Bindungen, die nicht kovalent sind, so daß auch sehr schwer lösliche Proteine in Lösung zu bringen sind.

Histone sind kleine basische Proteine, die im Kern lokalisiert sind und an der Organisation des Chromatins beteiligt sind. Sie binden an DNA und verhelfen ihr zur Nukleosomenstruktur. Dazu bilden ein H3-H4 Tetramer und zwei H2A-H2B Dimere einen Histon-Oktamer, um den 146 Basenpaare des DNA-Stranges gewunden sind, die durch das Histon H1 am Histon-Oktamer verankert werden. Nukleosomen bilden die Grundeinheit des Chromatins. Auch wenn dies nur

der erste Schritt der Bildung von Chromatinstrukturen höherer Ordnung ist, handelt es sich jedoch um einen für die Regulation der Genexpression essentiellen grundlegenden Schritt und den bisher am besten untersuchten Vorgang (Turner, 2002).

Histone bestehen aus einer globulären Domäne mit einem flexiblen, geladenen N-Terminus, der nach der Bildung der Nukleosomen freiliegt. Durch post-translationale Modifikationen (u.a. Acetylierung und Methylierung) an diesen N-Termini kann die Funktion der Histone und dadurch die Struktur des Chromatins beeinflusst werden. Durch diese Strukturänderung wiederum kann die Zugänglichkeit der DNA für die Transkription und somit die Genexpression reguliert werden. Dabei ist ein dynamischer Übergang zwischen transkriptionell inaktivem heterochromatischem und aktivem euchromatischem Zustand möglich (Übersicht in Jenuwein *et al.*, 2001, Turner, 2002).

Von den mit CED-4 interagierenden Histonen ist Histon H4 mit einem Molekulargewicht von 11 kDa das kleinste Histon, H2B und H3 sind mit 13,9 bzw. 15,3 kDa ein wenig größer. Der isoelektrische Punkt für H4 ist pI 11,7 (oder 11,3), für H3B pI 10,3 und für H3 pI 11,3. Damit sind alle gefundenen Histone wie erwartet sehr basisch.

4.2.2 Yeast-Two-Hybrid-System und Affinitätspräzipitation

Durch die Expression von humanem Histon H4b in *E. coli* konnte verifiziert werden, daß CED-4 mit Histonen interagieren kann. Die Interaktion von CED-4 mit den Histonen wurde erfolgreich mittels Far Western Blot nachgewiesen, für den sowohl FLAG-CED-4 als auch GST-FLAG-CED-4 verwendet wurden. Die Durchführung eines Far Western Blot mit radioaktiv markiertem [³²P]-FLAG-CED-4, das in *E. coli* exprimiert wurde, zeigt, daß eine Interaktion über andere Proteine ausgeschlossen werden kann. Ein Interaktionsnachweis außerhalb des Far Western Blots konnte jedoch bisher nicht erbracht werden. Auch wenn daher nicht ausgeschlossen werden kann, daß es sich bei der Interaktion um ein im Far Western Blot entstandenes Artefakt handelt, ist die Möglichkeit einer reellen Bindung dennoch hoch. Es ist sehr gut denkbar, daß in den gewählten Methoden – Yeast-Two-Hybrid-System und Affinitätspräzipitation – nicht die notwendigen Bedingungen geschaffen werden konnten, um die Interaktion zu zeigen. Beide Systeme sind stark abhängig von den Reaktionsbedingungen; eine Immunpräzipitation kann durch Detergenzien oder Salze beeinflusst werden. So konnte mit nach Standardprotokoll durchgeführten Immunpräzipitationen eine Interaktion von Apaf-1 mit verschiedenen Bcl-2-Proteinen nachgewiesen werden (Pan *et al.*, 1998, Song *et al.*, 1999, Hu *et al.*, 1998a, Inohara *et al.*, 1998). Es zeigte sich allerdings, daß diese Interaktion nur bei Verwendung nichtionischer

Detergenzien wie NP-40 zu sehen ist, die zu einer Konformationsänderung der Bcl-2-Proteine führen (Hsu *et al.*, 1997), nicht jedoch *in vivo* oder in Abwesenheit von Detergenzien (Conus *et al.*, 2000, Moriishi *et al.*, 1999). Nach heutigem Wissensstand wird eine Interaktion von Apaf-1 mit Bcl-2-Proteinen in der Zelle praktisch ausgeschlossen.

Im Yeast-Two-Hybrid-System können die großen Fusionsanhänge vor allem kleine Proteine bei der Interaktion stören; möglicherweise wird ein freier N-Terminus zur Interaktion benötigt (wie bei FLAG-P35). Es entstehen viele falsch positive Interaktionen, aber auch falsch negative. Als Beispiel für solche Diskrepanzen im Yeast-Two-Hybrid-System seien folgende Fälle genannt: Zum einen testeten Tao *et al.* (1999) im Yeast-Two-Hybrid-System die Dimerisierungsfähigkeit von CED-4-Mutanten mit veränderten P-Schleifen-Motiv (Lysin165Glutamin) und konnten unter ihren Versuchsbedingungen keine Dimerisierung feststellen. In einer anderen Untersuchung von Yang *et al.* (1998) konnte in einer Immunpräzipitation die Oligomerisierung einer recht ähnlichen Mutante (Lysin165Arginin) festgestellt werden. Auch wenn die Mutanten nicht identisch sind, sind sie doch mit einer Substitution von Lysin durch die basischen Aminosäuren Arginin bzw. Glutamin ähnlich genug, um zu zeigen, daß die Versuchsbedingungen gerade im Yeast-Two-Hybrid-System als auch in der Affinitätspräzipitation sehr kritisch sein können. Als zweites Beispiel sei die Dimerisierung von CED-4 genannt: So finden sich in der Literatur sowohl Studien, in denen es – wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt – dimerisieren kann (Tao *et al.*, 1999), als auch solche, in denen keine Interaktion festgestellt werden konnte (James *et al.*, 1997, Wu *et al.*, 1997b). Nach heutigem Stand der Forschung ist die Oligomerisierungsfähigkeit von CED-4 die Grundvoraussetzung für die Bildung des Apoptosoms, auch wenn weder James *et al.* (1997) noch Wu *et al.* (1997b) die Interaktion im Yeast-Two-Hybrid-System nachweisen konnten.

4.2.3 Eine mögliche physiologische Bedeutung der Interaktion

Eine physiologische Bedeutung der Interaktion von CED-4 mit Histonen ist durchaus denkbar. Als eukaryotische Pilze haben Hefen keine echte Apoptose. So konnten bei *Saccharomyces cerevisiae* keine Gene bzw. Sequenzmotive identifiziert werden, die charakteristisch für Caspasen sind (Miller, 1999). Trotzdem existieren bei ihnen Hinweise auf eine rudimentäre Form des Zelltods, der durch die Expression von Caspasen gefördert werden kann (Tao *et al.*, 1999). Auch die Expression von CED-4 in *S. cerevisiae* führt zu einem gesteigerten Zelltod, der Caspasen-unabhängig ist (Tao *et al.*, 1999). Eventuell lassen sich hier Spuren eines urtümlichen

Signalwegs erkennen, die sich vor der „echten“ Apoptose entwickelte, und der auch bei höheren Organismen noch latent vorhanden sein könnte. Für eine physiologische Rolle der CED-4-Bindung an Histone könnte sprechen, daß HA-CED-4 (HA = Hämagglutinin) in Hefen (*Schizosaccharomyces pombe*) im Kern lokalisiert und eine Chromatinkondensation mit anschließendem Zelltod induziert (James *et al.*, 1997). Eine Lokalisationsstudie mittels Elektronenmikroskopie zeigt CED-4 in direktem Kontakt mit dem Chromatin. Da Histone für eine Chromatinkondensation benötigt werden, erscheint die Annahme plausibel, daß die Interaktion zwischen CED-4 und dem Chromatin durch die Bindung an Histone vermittelt wird.

Die Funktion der perinukleären Lokalisation von CED-4 in einer *ced-3^{-/-}/ced-9^{-/-}*-Doppelmutante in *C. elegans* ist bis heute ungeklärt. Die Verwendung der Doppelmutante war zwar notwendig für die Erkennung der Lokalisation, da nur in einer Mutante ohne *ced-9* CED-4 nicht an die Mitochondrien sequestriert ist; eine reine *ced-9^{-/-}*-Mutante jedoch nicht lebensfähig ist und nur *ced-3^{-/-}/ced-9^{-/-}*-Doppelmutanten lange genug lebensfähig sind, daß die CED-4-Lokalisation untersucht werden konnte (Chen *et al.*, 2000). Dennoch ist anzunehmen, daß CED-4 auch beim normalen Ablauf der Apoptose in *C. elegans* an den Zellkern wandert. Für die bekannte Funktion von CED-4, die Oligomerisierung von CED-3, erscheint es nach derzeitigem Erkenntnisstand nicht nachvollziehbar, weshalb CED-4 diese Position einnehmen sollte. Es wäre dementsprechend denkbar, daß es sich um ein solches Relikt eines urtümlichen Signalweges handelt, in dem CED-4 eine direkte Rolle in der Chromatinkondensation spielte, die über die beobachtete Interaktion mit Histonen vermittelt wurde. Daß eine Interaktion von CED-4 mit Histonen auch in *C. elegans* stattfinden kann, ist anhand der vorliegenden Ergebnisse sehr wahrscheinlich.

4.3 Identifikation eines zellulären Proteins, das mit Anti-P35-Antiserum kreuzreagiert: RBP34

In diesem Teil der Arbeit wurde ein potentielles humanes P35-Homolog, das von einem polyklonalen, gegen virales P35 gerichteten Antiserum in Zellextrakten erkannt wurde, angereinigt, sequenziert und identifiziert: Die Darstellung gelang mittels präparativer SDS-PAGE und hatte eine erfolgreiche Sequenzierung zur Folge. Von den dabei ermittelten Proteinen wurde eines aufgrund des Sequenzvergleichs mit baculoviralen P35-Proteinen als der beste Kandidat eines „zellulären P35“ ausgewählt. Es handelt sich um das in der Literatur als „Ribosomen-bindend“

beschriebene Protein P34. Die Identität des Protein konnte durch Expression in 239T-Zellen mit anschließendem Western Blot mit dem kreuzreagierenden Antiserum bestätigt werden.

4.3.1 Homologie zwischen *AcP35* und RBP34

Es war vermutet worden, daß es sich bei dem gesuchten Protein um ein zelluläres Homolog von *AcP35* handeln könne. Frühe Datenbankrecherchen hatten bereits ergeben, daß kein eindeutig zu identifizierendes Homolog bekannt ist, sondern daß die Homologie voraussichtlich nur limitiert und auf enge Bereiche begrenzt sein würde, oder daß es sich um ein bislang unbekanntes Protein handeln müsse. Ein Sequenzvergleich von RBP34 mit *AcP35* ergab insgesamt gesehen keine herausragende Sequenzhomologie; RBP34 weist aber einige Abschnitte auf, die vielversprechend aussehen.

Die Caspasen-Erkennungssequenz von *AcP35* liegt exponiert und somit gut erreichbar für eine Caspase (Abb. 30). Sie lautet: 84-Aspartat (P₄)-Glutamin (P₃)-Methionin (P₂)-Aspartat (P₁), Schnittstelle, Glycin-88 (Fisher *et al.*, 1999). Nach Thornberry *et al.* (1997) könnte das essentielle Aspartat (87) an Position P₁ der P35-Schnittstelle in RBP34 konserviert sein (AS 80), und zwei der davorliegenden Aminosäuren, Leucin (P₄) und Alanin (P₂) entsprechen den Präferenzen einiger Caspasen an diesen Positionen (Thornberry *et al.*, 1997). Weniger geeignet wäre hingegen das Prolin an Position P₃. Ob dieses Motiv wirklich eine Caspasen-Schnittstelle darstellt oder nicht, kann nur experimentell herausgefunden werden. Selbst eine sehr gut korrelierende Sequenz kann nur dann eine Caspasen-Schnittstelle sein, wenn sie erreichbar und nicht im Innern des Moleküls liegt.

Auf die gesamte Sequenz bezogen, zeigt sich die höchste Homologie im Bereich der LLR-Domäne, einem Motiv, das für die Interaktion von Proteinen notwendig ist. Allerdings wird P35 nicht zu den LLR-haltigen Proteinen gezählt. Möglicherweise würde die Homologie dennoch für eine Interaktion zwischen beiden ausreichen. Im Bereich der LLR-Domäne liegt auch die oben besprochene potentielle Caspasen-Schnittstelle. Vor der LLR-Domäne ist ein Bereich von etwa elf Aminosäuren zu finden, der eine vergleichsweise hohe Homologie aufweist.

Es fällt auf, daß die Homologie im Bereich der CC-Domäne und der Transmembrandomäne nur sehr gering ist, im Gegensatz zum Abschnitt dazwischen. Der N-Terminus zeigt ebenfalls eine etwas höhere Homologie, die aber hauptsächlich auf dem Vergleich mit *S/P49* beruht, da die beiden anderen Proteine bereits vorher enden.

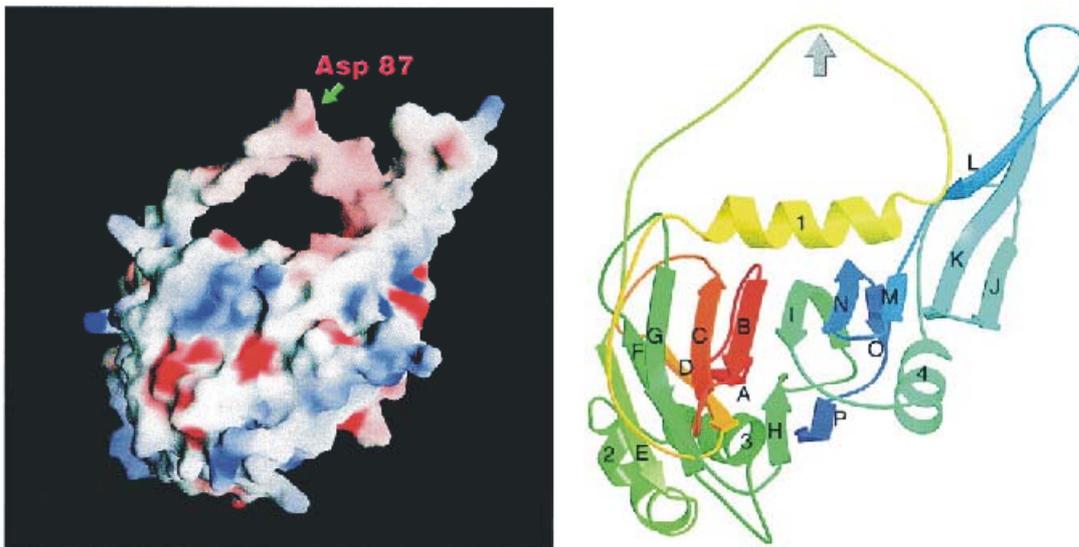


Abb. 30: Struktur von *AcP35*.

Das Oberflächenmodell (links) und das Bandmodell (rechts) der Kristallstruktur von *AcP35* zeigen, daß die Caspasen-Schnittstelle hinter Aspartat 87 exponiert in einer Reaktionsschleife ("reactive site loop") liegen. Links: Die Oberfläche ist entsprechend der elektrischen Ladung eingefärbt, mit positiven Ladungen in blau und negativen in rot. Rechts: Die Färbung des Modells folgt dem Regenbogenspektrum, beginnend mit Rot am N-Terminus und endend mit blau am C-Terminus. Die Reaktionsschleife ist nach oben orientiert, die Schnittstelle wird durch einen Pfeil angezeigt. α -Helices sind mit 1,2,3 etc. durchnummeriert, β -Faltblätter mit A, B, C etc. bezeichnet (aus Fisher *et al.*, 1999).

4.3.2 Weitere Ergebnisse aus Vorarbeiten

In unveröffentlichten Vorarbeiten konnten bereits einige Charakteristika des kreuzreagierenden Proteins festgestellt werden. So stellte es sich durchgehend als mitochondriales Protein dar. Dies konnte zunächst anhand von Fraktionierungen durch differentielle Zentrifugation gezeigt werden, die in Kern- und Cytoskelettfraktion (1.000 x g), einer Fraktion mit Mitochondrien und schweren Membranen (10.000 x g) und einer Fraktion mit leichten Membranen bzw. Mikrosomen (100.000 x g) resultierten. Dabei wurde festgestellt, daß das gesuchte Protein weit überwiegend bei 10.000 x g präzipitierte, wohingegen nichts in der Fraktion bei 100.000 x g nachgewiesen werden konnte. Weiterhin wurde durch eine in humanen Zellen mit Hilfe des Anti-P35-Antiserums durchgeführte Elektronenmikroskopie bestätigt, daß das gesuchte Protein überwiegend in Mitochondrien lokalisiert ist (Abb. 31; in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Arne Luz, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg). Daher wurde in dieser Arbeit die Isolierung des Proteins aus Mitochondrienextrakten durchgeführt.

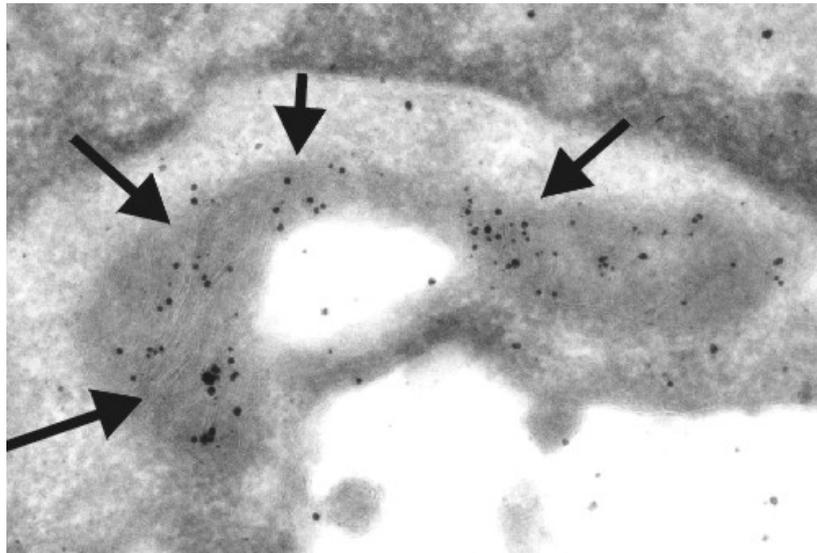


Abb. 31: Elektronenmikroskopie eines mit Anti-P35-Antiserum gefärbten Mitochondrions.

Es wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von COS7-Zellen, die mit Anti-P35-Antiserum und mit einem mit Gold markiertem Zweitantikörper behandelt wurden, angefertigt (in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Arne Luz, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg). Der Bildausschnitt zeigt ein Mitochondrion (Pfeile, grau), in dem eine Ansammlung des mit dem Antiserum kreuzreagierenden Proteins zu sehen ist (schwarze Punkte). Die Cristae des Mitochondrions sind zu erkennen. Die weißen Bereiche in der Mitte des Bildes und unten rechts stellen höchstwahrscheinlich beim Schnitt entstandene Artefakte dar.

In weiteren Vorversuchen wurden Studien zur Apoptose durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, daß RBP34 nach Auslösen von Apoptose im Cytoplasma lokalisiert war. Auch eine vermehrte Komplexierung nach einem Apoptosestimulus konnte wiederholt *in vivo* beobachtet werden. In der Literatur wurde eine Funktion von RBP34 in der Apoptose bisher nicht beschrieben, möglicherweise jedoch auch nicht untersucht.

4.3.3 „Ribosomen-bindendes Protein RBP34“ in der Literatur

Das nur als „hypothetisches Protein“ Q96AG4 in der Datenbank aufgeführte Protein, dessen Aminosäuresequenz lediglich anhand der cDNA-Sequenz abgeleitet worden war, wurde als potentiell menschliches Homolog eines bereits klonierten Proteins bei der Ratte identifiziert. In Veröffentlichungen wird dieses Protein als „Ribosomen-bindenden Proteins P34“ (RPBP34) beschrieben (Ohsumi *et al.*, 1993). Die Homologie zwischen hRBP34 (Mensch) und rRBP34 (Ratte) sowie zwischen dem hypothetischen, auf Proteinebene noch nicht beschriebenen

Homolog der Maus (mRBP34) und hRBP34 liegt jeweils bei etwa 95 % Aminosäure-Identität. In der Zwischenzeit wurde auch das menschliche RBP34 kloniert und untersucht (Skjerven *et al.*, 2002).

Die in der Literatur beschriebenen Befunde lassen sich nur schwer mit den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe in Einklang bringen und sollen im folgenden diskutiert werden. Ichimura *et al.* (1992) beschreiben rRBP34 als ein unter Säugetieren weit verbreitetes Membranprotein, das in rauhen Mikrosomen lokalisiert ist, und das an der Bindung von Ribosomen an die ER- (Mikrosomen-) und Kernmembran beteiligt sein soll. Das 34,9 kDa große Protein soll etwa 1 % der Proteine in der rauhen Mikrosomenmembran ausmachen (Ichimura *et al.*, 1993). Ihm werden folgende anhand der Sequenz abgeleitete Domänen zugeschrieben: ein großer N-terminaler Abschnitt mit zwei Motiven: einer LLR-Domäne (AS 20-123) mit 4,5 Wiederholungsmotiven aus jeweils 23 bis 24 Aminosäuren und einem ursprünglich als KRE-Domäne bezeichneten Abschnitt (AS 156-235), der reich an geladenen Aminosäuren ist, vor allem Lysin, Arginin,

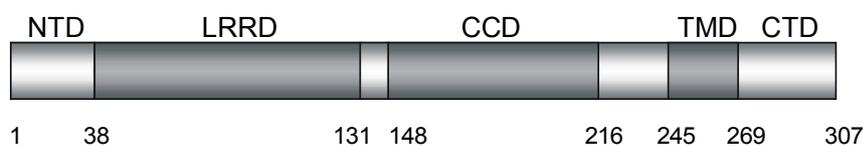


Abb. 32: Schematische Darstellung von RBP34.

Das als „Ribosomen-bindend“ beschriebene Protein RBP34 weist folgenden Domänen: Eine N-terminale Domäne (NTD), deren Funktion bisher nicht genauer charakterisiert wurde, eine LLR-Domäne („leucine-rich repeat“), die der Interaktion mit anderen Proteinen dient, eine CC-Domäne („coiled-coil“), die möglicherweise für eine Di- oder Trimerisierung sorgt, eine mutmaßliche Transmembran-Domäne (TMD) für die Verankerung in Membranen, und einen bislang nicht charakterisierten C-Terminus (nach Skjerven *et al.*, 2002).

Glutaminsäure, und inzwischen als „coiled-coil“-Domäne identifiziert wurde. Dahinter folgt eine hydrophobe Transmembrandomäne (AS 245-269), und eine kurze, aus 38 Aminosäuren bestehende C-terminale Domäne mit nur wenigen geladenen Aminosäureresten und ohne Wiederholungsmotive (Ohsumi *et al.*, 1993). Dieser Aufbau stimmt mit dem in dieser Arbeit ebenfalls theoretisch ermittelten weitgehend überein (Abb. 32).

Weiterhin wird rRBP34 als Typ II Membranprotein eingestuft, d.h. der N-Terminus zeigt ins Cytoplasma (Ohsumi *et al.*, 1993). Nach Ohsumi *et al.* (1993) ist dem hydrophoben Transmembransegment N-terminal eine Ansammlung von positiv geladenen Aminosäureresten vor-

gelagert, die nach Parks *et al.* (1991) der Verankerung des N-terminalen Abschnitts auf der cytoplasmatischen Oberfläche dient und die Translokation des folgenden Abschnitts über die Membran während der Biosynthese verstärkt.

Da sich rRBP34 nicht wie ein peripheres Protein von den rauhen Mikrosomenmembranen lösen ließ, gehen Ichimura *et al.* (1992) davon aus, daß es sich um ein integrales Membranprotein handelt. Dies korreliert mit der Beobachtung in dieser Arbeit, daß das gesuchte Protein auch ohne Saccharose im Extraktionspuffer in der Mitochondrienfraktion vorhanden war und nicht wie ein nur schwach an die Membran gebundenes peripheres Protein bei der Aufarbeitung losgelöst werden konnte.

Zur Identifikation von rRBP34 wurden rauhe Mikrosomen mittels doppelter Affinitätschromatographie fraktioniert und mit der resultierenden Proteinfraction künstliche Liposomen für einen Ribosomen-Bindungsversuch rekonstituiert. In diesem Versuch zeigte diese Fraktion eine Ribosomen-bindende Aktivität. Eine Behandlung mit Trypsin führte zum Verlust der Ribosomen-bindenden Aktivität und dem Verschwinden einer Bande bei 34 kDa in der SDS-PAGE (Tazawa *et al.*, 1991).

In einem zweiten Versuch konnte die Nähe dieses 34 kDa Proteins zur 60S-Ribosomenuntereinheit durch eine Photokreuzvernetzung gezeigt werden. Dazu wurde die Chemikalie SAND (Sulfosuccinimidyl 2-(m-azido-o-nitrobenzamido)-ethyl-1,3'-dithiopropionat) verwendet. 60S-ribosomale Untereinheiten wurden mit SAND vorbehandelt und mit den rekonstituierten Liposomen inkubiert. Die gebildeten Komplexe wurden über einen Saccharosegradienten isoliert und die 60S-Ribosomenuntereinheiten durch Einsatz eines Reduktionsmittels gelöst. Die restlichen Proteine wurden mittels SDS-PAGE und ¹²⁵I Autoradiographie analysiert. Dabei zeigte sich, daß das 34 kDa große Protein die dominierende Komponente war, die an die Ribosomen gebunden war (Tazawa *et al.*, 1991).

Mit einem nicht genau charakterisierten Antiserum gegen rRBP34 konnten Ichimura *et al.* (1993) zeigen, daß es zumindest in der Nähe des Ribosomen-Rezeptors lokalisiert sein muß, möglicherweise aber selbst eine Rolle im Bindungsprozeß spielt. Bei niedrigem Salzgehalt kann aufgereinigtes RBP34 in einer künstlichen Liposomen-Modellmembran Ribosomen binden (Ichimura *et al.*, 1992). Hingegen hat es bei physiologischem Salzgehalt so gut wie keinen Anteil an der beobachteten Bindungsaktivität (Kalies *et al.*, 1994). Daher gehen Murphy *et al.* (1997) davon aus, daß RBP34 zwar nicht den eigentlichen Ribosomen-Rezeptor darstellt, von dem angenommen wird, daß er einen Kanal durch die Membran für das synthetisierte Polypeptid

bildet (Übersicht in Sanders *et al.*, 1992), aber zumindest am möglicherweise mehrstufigen Bindungsprozeß unter bestimmten Voraussetzungen beteiligt sein kann.

4.3.4 Lokalisation und Komplexierung von RBP34

Ichimura *et al.* (1992) weisen mittels Elektronenmikroskopie nach, daß rRBP34 auf rauhen Mikrosomenmembranen und auf der Kernmembran präsent ist. Die Ergebnisse wurden jedoch nicht gezeigt. Ebenso wenig wurde dargestellt, ob rRBP34 auch in anderen Zellkompartimenten lokalisiert ist. Die in unseren Vorversuchen durchgeführte Elektronenmikroskopie zeigt hingegen eine deutliche Expression des kreuzreagierenden Proteins in den Mitochondrien (Abb. 31). Da die elektronenmikroskopischen Bilder von Ichimura *et al.* (1992) nicht präsentiert wurden, ist ein Vergleich mit der vorliegenden Aufnahme und eine Interpretation nicht möglich.

Auch die in einer weiteren Vorarbeit durchgeführte Zellfraktionierung führte zu dem Ergebnis, daß das kreuzreagierende Protein in den Mitochondrien lokalisiert ist. Dabei wurde festgestellt, daß bereits bei 10.000 x g das gesuchte Protein vollständig präzipitierte (Mitochondrienfraktion, schwere Membranen). Mikrosomen (leichte Membranen) hingegen werden erst mit 100.000 x g sedimentiert. Eine Zellfraktionierung mit anschließendem Anti-RBP34-Western Blot von Ichimura *et al.* (1992) zeigt hingegen eine Lokalisation von rRBP34 in rauhen Mikrosomen und in der Kernmembran. In den weiteren Fraktionen – glatte Mikrosomen, Mitochondrien, Cytosol, Kernplasma – sind keine Banden zu erkennen; es bleibt jedoch festzustellen, daß der abgebildete Western Blot zu schwach ist, um das Vorhandensein geringer Mengen rRBP34 in den „negativen“ Fraktionen eindeutig auszuschließen.

Eine Expression von humanem Myc-RBP34 in COS-1-Zellen führte zu einer Kolokalisation mit Calreticulin, einem für das ER typischen Protein (Skjerven *et al.*, 2002). Diese Kolokalisation stimmt jedoch nicht vollständig überein, so daß eine zusätzliche Lokalisation an weiteren Organellen denkbar ist. Untersuchungen zur Kolokalisation mit Mitochondrien wurde von anderen Arbeitsgruppen bisher noch nicht durchgeführt. Auch wenn RBP34 als mikrosomal beschrieben wird, bleibt anhand der in der Literatur präsentierten Ergebnisse die Möglichkeit offen, daß RBP34 auch in den Mitochondrien lokalisiert sein könnte, so wie es in unserer Arbeitsgruppe beobachtet wurde.

Die anhand der Aminosäuresequenz berechnete Wahrscheinlichkeit eines Transports von RBP34 in die Mitochondrien ist nur sehr gering. Das vorliegende Computer-Programm stützt sich dabei

jedoch ausschließlich auf das Vorhandensein von bestimmten mitochondrialen Signalsequenzen. Eine Abwesenheit solcher Sequenzen bedeutet allerdings nicht, daß kein Transport in die Mitochondrien stattfinden kann. Auch für die P35-Deletionsmutante ohne C-Terminus wird vom Programm die Wahrscheinlichkeit einer mitochondrialen Lokalisation als sehr gering berechnet, und trotzdem wurde die Mutante an oder in der Mitochondrien gefunden (unveröffentlichte Beobachtung). Die Qualität der theoretischen Berechnung von Proteinen hängt stark von den vorgegebenen Berechnungsgrundlagen ab und davon, wieviel über die biochemischen Gesetzmäßigkeiten bekannt sind. So schlagen manche Computer-Programme auch eine nukleäre Lokalisation als größte Lokalisationswahrscheinlichkeit für RBP34 vor (PSort II (Horton *et al.*, 1997), unter www.expasy.ch). Dies beruht jedoch ausschließlich auf der Annahme, daß Kernproteine in der Regel basisch sind und alle Proteine mit einem hohen pI als potentielle Kernproteine eingestuft werden – eine vereinfachende Annahme, die im Fall von RBP34, das je nach Vorhersage einen theoretischen pI zwischen 9,6 und 10,3 hat, keinesfalls zutreffend ist.

In dieser Arbeit konnte *in vitro* wiederholt eine schnelle Komplexierung des gesuchten Proteins festgestellt werden. Manchmal erschienen diese als scharf abgegrenzte Banden mit einer Größe von 65 kDa und 98 kDa, die eine Homodi- und -trimerisierung nahelegen, vor allem, da RBP34 eine CC-Domäne enthält und damit eine Multimerisierung wahrscheinlich ist. Eine solche Di- und Trimerisierung mittels CC-Domäne wurde auch anhand der Sequenz als sehr wahrscheinlich vorhergesagt. Häufig waren die Komplexierungsbanden jedoch unscharf und verschwommen, weshalb eine unregelmäßige Beteiligung von anderen Faktoren oder Proteinen nicht ausgeschlossen werden kann. Auch Skjerpen *et al.* (2002) konnten eine Dimerisierung von endogenem RBP34 feststellen, allerdings erst nach einer chemischen Kreuzvernetzung und in sehr geringen Mengen, im Gegensatz zu dieser Arbeit, in der die Komplexe auch ohne Kreuzvernetzung sichtbar und zum großen Teil nicht reversibel sind (zumindest lassen sie sich nicht mit Laemmli-Puffer und Aufkochen beseitigen). Es ist möglich, daß die von Skjerpen *et al.* (2002) beobachteten Komplexe nicht mit den in dieser Arbeit beobachteten Banden übereinstimmen, unklar bleibt aber, weshalb Skjerpen *et al.* (2002) diese Banden nicht sehen.

4.3.5 Welche Schlüsse lassen sich aus den Diskrepanzen ziehen?

Bei der Fraktionierung, die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurde, konnte das gesuchte Protein nicht in der Mikrosomenfraktion gefunden werden, wohingegen RBP34 in der Literatur überwiegend als mikrosomal beschrieben wurde (z.B. Ichimura *et al.*, 1992). Dies ist ein Wider-

spruch, der anhand der bisher bekannten Daten nicht geklärt werden kann. Die Möglichkeit, daß es sich bei RBP34 und dem beobachteten Protein um zwei verschiedene Proteine handelt, kann nicht ausgeschlossen werden, obwohl die Expression von hRBP34 in 293T-Zellen eine eindeutige Kreuzreaktion mit dem Antiserum zeigt und beweist, daß das Antiserum mit hRBP34 kreuzreagiert. Auch wenn es sich demnach beim identifizierten Protein eindeutig um ein mit dem Anti-P35-Antiserum kreuzreagierendes Protein handelt, muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß es nicht mit dem früher in den Mitochondrien beobachtete Protein identisch ist. Dies ist insofern als unwahrscheinlich anzusehen, da zunächst im Western Blot zwar mehrere Kreuzreaktionsbanden zu beobachten waren, allerdings keine so prominent, daß eine Verwechslung möglich wäre, besonders nicht im Bereich von 35-50 kDa. Außerdem wurde das gesuchte Protein aus Mitochondrienextrakten isoliert. Die eingesetzte Methode der Mitochondrienaufräumung mit drei den Fraktionierungsschritten Kernfraktion, Mitochondrienfraktion und cytosolischem Überstand, führt sicherlich nicht zu reinen Mitochondrien, so daß auch Proteine aus anderen Kompartimenten durchaus zu erwarten sind. Dies zeigte sich bereits in der Sequenzierung, in der – abgesehen von den „typischen“ Verunreinigungsbanden – mit dem Vorläuferprotein der mitochondrialen Malatdehydrogenase nur ein einziges mitochondriales Protein gefunden wurde. Mikrosomale Proteine sind allerdings in der mitochondrialen Fraktion nicht zu erwarten, da sie erst bei 100.000 x g sedimentieren.

Die isoelektrische Fokussierung zeigt zwei Bereiche, in denen eine Antiserum-reaktive Ansammlung von Proteinen stattfindet, eine bei pH 9,0-10,0 – dies würde dem theoretischen pI von RBP34 entsprechen – und eine ungefähr bei pH 5,0. Es ist denkbar, daß RBP34 in einer oder mehreren modifizierten Formen vorliegt, die Einfluß auf den isoelektrischen Punkt hat, möglicherweise durch eine Komplexbildung mit anderen Proteinen. Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, daß das Antiserum mit zwei verschiedenen Proteinen gleicher Größe interagiert (in der sequenzierten Doppelbande befand sich RBP34 nur in der oberen Bande), von denen das eine RBP34 ist und das andere ein mitochondriales Protein. Das bedeutet auch, daß bei den verschiedenen Versuchen nur entweder das eine oder das andere Protein nachgewiesen wurde. Voraussetzung wäre aber, daß beide Proteine auf die gleiche Art und Weise komplexieren, da die Ansammlungen im basischen und im sauren Bereich vor allem bei den Komplexen zu beobachten waren.

Ist also RBP34 das in der Arbeitsgruppe beobachtete Protein, das als mitochondrial und bei Apoptose komplexierend gesehen wurde? Die bisherigen Ergebnisse der Literatur scheinen im

Widerspruch dazu zu stehen, es gibt andererseits auch keine eindeutigen Beweise für diese Annahme. Ohne weitere Versuche ist diese Frage nicht zu klären. Hierbei sollten zunächst die Vorversuche zumindest teilweise wiederholt werden, um auszuschließen, daß früher ein anderes Protein beobachtet wurde. Ebenso wäre die Verwendung der Protokolle der anderen Arbeitsgruppen wichtig, um möglicherweise technisch bedingten Ursachen der Unterschiede auf den Grund zu gehen. Auch erscheint eine erneute Zellfraktionierung mit spezifischer Markierung von Mitochondrien und ER sinnvoll; analog dazu sollte die Lokalisation mittels konfokaler Mikroskopie (ebenfalls mit Markierung beider Kompartimente) untersucht werden. Die Herstellung von Mikrosomen nach Ichimura *et al.* (1992) oder anderen Arbeitsgruppen, die RBP34 untersucht haben, könnte zeigen, ob mit Hilfe dieser Protokolle das gesuchte Protein in Mikrosomen nachgewiesen werden könnte. Besonders aufschlußreich wäre die Verwendung des Antiserums von Ichimura *et al.*, (1993), um das gesuchte Protein in den Mitochondrienextrakten nachzuweisen.

Zum Schluß bleibt die Frage, ob es sich bei RBP34 um das gesuchte zelluläre Homolog von P35 handeln kann. Nach den bisherigen Erkenntnissen ist dies noch nicht eindeutig zu beantworten, da die Sequenzhomologie zwischen RBP34 und P35 nur gering ist. Es besteht aber die Möglichkeit, daß es sich dennoch um ein funktionelles Homolog handelt. Die in Vorversuchen durchgeführten Studien zur Apoptose sind die einzigen, die bekannt sind. In der Literatur ist eine Aufgabe von RBP34 in der Apoptose bisher nicht beschrieben worden. Auch hier können nur weitere funktionelle Versuche Aufklärung geben, vor allem hinsichtlich der Prozessierung von RBP34 durch Caspasen, Caspaseninhibierung oder Interaktion mit viralem P35.

Es ist andererseits denkbar, daß ein zelluläres Homolog von P35 keine Funktion in der Apoptose hat. Zum einen gibt es homologe Proteine, die in unterschiedlichen Signaltransduktionswegen involviert sind, dabei aber häufig dennoch die gleiche Grundfunktion aufweisen (z.B. „Aspartat-spezifische Cystein-Proteasen“: Caspase-1, -4, -5 sind an Entzündungsreaktionen beteiligt). Auf der anderen Seite können nur wenige Änderungen der Primärsequenz dazu führen, daß ein Protein eine seiner Funktionen, z.B. eine funktionsfähige Caspasenschnittstelle, verliert und so nicht mehr an der Apoptose beteiligt ist. Eine Rückmutation von nur einer oder wenigen Aminosäuren könnte dann zu einer Rekonstitution der apoptotischen Funktion führen. So ist auch *BmP35* nur ein schlechter Caspaseninhibitor im Vergleich zu *AcP35* (Kamita *et al.*, 1993, Morishima *et al.*, 1998). Möglicherweise führt eine Rückmutation weniger Aminosäuren bei RBP34 wieder zu einem Apoptose-hemmenden Protein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden funktionelle Eigenschaften von *C. elegans* CED-4 untersucht. CED-4 ist ein Adapterprotein aus *C. elegans*, das am exekutiven Apoptose-Signaltransduktionsweg beteiligt ist und dort durch seine Oligomerisierungsfähigkeit die Aktivierung von CED-3, einer Caspase (Cystein Aspartat-spezifische Protease) induziert und dadurch Apoptose vermittelt. CED-4 besitzt neben einer Caspasenrekrutierungsdomäne (CARD) zur Bindung von CED-3 eine Nukleotidbindungsstelle, deren Funktion wahrscheinlich im Bereich der Komplexbildung und Aktivierung von CED-3 liegt, die aber bisher – im Gegensatz zur Nukleotidbindung des Säugetierhomologs Apaf-1 – nicht näher untersucht wurde. Anders als Apaf-1 besitzt CED-4 keine WD40-Region, ein Protein-Interaktionsmotiv, das eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Apaf-1 durch Cytochrom c spielt.

In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, daß rekombinantes FLAG-CED-4 und GST-FLAG-CED-4 während der Expression in *Sf9*-Insektenzellen eine perinukleäre Position einnimmt, die der in *C. elegans* beobachteten Lokalisation gleicht (Chen *et al.*, 2000). Weiterhin wurde festgestellt, daß CED-4 spontan große Komplexe bilden kann, ohne daß wie bei Apaf-1 die Anwesenheit weiterer Proteine erforderlich ist. Obwohl die Größe der Komplexe breit gestreut ist, läßt doch der überwiegende Anteil auf Aggregate von mindestens 10 Molekülen schließen. Daneben waren geringe Mengen weiterer Komplexe von etwa 500 kDa nachweisbar, die auf Komplexe aus 6-8 Molekülen schließen lassen, einer Zahl, die dem für CED-4 vorhergesagten Hexamer (Jaroszewski *et al.*, 2000) bzw. dem Heptamer des funktionellen Apaf-1-Apoptosoms (Acehan *et al.*, 2002) sehr nahe kommen.

Es konnte gezeigt werden, daß CED-4 Nukleotide binden kann, und daß CED-4 eine deutliche Präferenz für ATP gegenüber dATP aufweist. Damit steht CED-4 im Gegensatz zu Apaf-1, welches dATP besser binden kann. Für die Stabilität der beobachteten Komplexe wird keine ATP-Hydrolyse benötigt, ebenso wenig für die Bindung von CED-3 an CED-4.

Der zweite Teil dieser Arbeit widmete sich der Suche nach einem hypothetischen humanen CED-4-Homolog (oder allgemeiner: einem gemeinsamen Bindungspartner) von CED-4. Dabei wurde eine Gruppe von Proteinen, deren Größe im Western Blot 15-20 kDa betrug, aufgereinigt und identifiziert. Diese Proteine waren mittels Far Western Blot nachgewiesen worden. Die Identifikation ergab die Histone H2B, H3 und H4, kleine basische Proteine aus dem Zellkern, die bei der Chromatinorganisation und Genexpression eine wichtige regulierende Rolle spielen.

Durch eine Expression von humanem Histon H4b in *E. coli* konnte im Far Western Blot die Identität der Histone als die gesuchten Bindungsproteine bestätigt werden. Zusammen mit der perinukleären Lokalisation von CED-4, die derzeit nicht erklärt werden kann (s.o.), und dem Ergebnis, daß CED-4 bei der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* an das Chromatin bindet und dadurch Zelltod auslöst (James *et al.*, 1997), könnte diese Interaktion ein Relikt eines (rudimentären) Zelltod-Signaltransduktionsweges vor der evolutionären Entwicklung der „echten“ Apoptose darstellen, bei der CED-4 in den Zellkern wanderte und über eine Interaktion mit dem Chromatin Zelltod auslöste.

Im dritten Teil der Arbeit wurde nach einem zellulären Homolog des viralen P35, einem Caspaseninhibitor aus dem Baculovirus *Autographa californica* NPV (*AcNPV*), gesucht. Von vielen Genen, die für antiapoptotische Proteine kodieren, konnten gemeinsame Homologe bei höheren Tieren und Viren gefunden werden (wahrscheinlich entstammen diese Gene ursprünglich dem Genom des Virus-Wirtes). Neben einigen Homologen bei anderen Baculoviren ist von P35 bisher kein zelluläres Homolog bekannt. Ein gegen virales *AcP35* generiertes polyklonales Antiserum zeigte im Western Blot eine Kreuzreaktion mit einem zellulären humanen Protein (etwas mehr als 35 kDa groß), welches als potentielles P35-Homolog angesehen wurde. Die Identifikation dieses Proteins war das Ziel des Projektes. Dabei wurde das als „Ribosomenbindend“ beschriebene Protein RBP34 gefunden. Die Kreuzreaktion dieses Proteins mit dem Antiserum konnte durch eine Expression in 293T-Zellen mit anschließendem Western Blot erfolgreich bestätigt werden. Die im Rahmen der Arbeit und in Vorarbeiten herausgefundenen Eigenschaften und die in der Literatur für RBP34 beschriebenen stehen jedoch in einem gewissen Widerspruch. Ob es sich um ein echtes P35-Homolog handelt müssen weitere Studien zeigen.

6 LITERATUR

- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., Akey, C. W. (2002).** Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol.Cell* **9**, 423-432.
- Adams, J. M. & Cory, S. (1998).** The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326.
- Adams, J. M. & Cory, S. (2002).** Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr.Opin.Cell Biol.* **14**, 715-720.
- Afonso, C. L., Neilan, J. G., Kutish, G. F., Rock, D. L. (1996).** An African swine fever virus Bcl-2 homolog, 5-HL, suppresses apoptotic cell death. *J.Virol.* **70**, 4858-4863.
- Albig, W. & Doenecke, D. (1997).** The human histone gene cluster at the D6S105 locus. *Hum.Genet.* **101**, 284-294.
- Arnoult, D., Gaume, B., Karbowski, M., Sharpe, J.C., Cecconi, F., Youle, R. J. (2003).** Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J.* **22**, 4385-4399.
- Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. (1998).** Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308.
- Bellows, D. S., Howell, M., Pearson, C., Hazlewood, S. A., Hardwick, J. M. (2002).** Epstein-Barr virus BALF1 is a BCL-2-like antagonist of the herpesvirus antiapoptotic BCL-2 proteins. *J.Virol.* **76**, 2469-2479.
- Benedict, M. A., Hu, Y., Inohara, N., Nunez, G. (2000).** Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra Wd-40 repeat is required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase-9. *J Biol.Chem.* **275**, 8461-8468.
- Blanar, M. A. & Rutter, W. J. (1992).** Interaction cloning: identification of a helix-loop-helix zipper protein that interacts with c-Fos. *Science* **256**, 1014-1018.
- Boatright, K. M., Renatus, M., Scott, F. L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I. M., Ricci, J. E., Edris, W. A., Sutherlin, D. P., Green, D. R., Salvesen, G. S. (2003).** A unified model for apical caspase activation. *Mol.Cell* **11**, 529-541.
- Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D. C., Tarlinton, D. M., Kay, T. W., Kontgen, F., Adams, J. M., Strasser, A. (1999).** Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* **286**, 1735-1738.
- Budd, R. C. (2001).** Activation-induced cell death. *Curr.Opin.Immunol.* **13**, 356-362.
- Burnett, V. L. & Springer, D. L. (1999).** High-level expression of human histone H4 in *E. coli*. *Biotechniques* **26**, 30-2, 34.

- Cain, K., Bratton, S. B., Cohen, G. M. (2002).** The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* **84**, 203-214.
- Cain, K., Bratton, S. B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D. G., Sun, X. M., Cohen, G. M. (2000).** Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* **275**, 6067-6070.
- Cain, K., Brown, D. G., Langlais, C., Cohen, G. M. (1999).** Caspase activation involves the formation of the apoptosome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem* **274**, 22686-22692.
- Chen, F., Hersh, B. M., Conradt, B., Zhou, Z., Riemer, D., Gruenbaum, Y., Horvitz, H. R. (2000).** Translocation of *C. elegans* CED-4 to nuclear membranes during programmed cell death. *Science* **287**, 1485-1489.
- Cheng, E. H., Nicholas, J., Bellows, D. S., Hayward, G. S., Guo, H. G., Reitz, M. S., Hardwick, J. M. (1997).** A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 690-694.
- Chinnaiyan, A. M., Chaudhary, D., O'Rourke, K., Koonin, E. V., Dixit, V. M. (1997a).** Role of CED-4 in the activation of CED-3. *Nature* **388**, 728-729.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Lane, B. R., Dixit, V. M. (1997b).** Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* **275**, 1122-1126.
- Cikala, M., Wilm, B., Hobmayer, E., Bottger, A., David, C. N. (1999).** Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr.Biol.* **9**, 959-962.
- Clarke, P. G. & Clarke, S. (1995).** Historic apoptosis. *Nature* **378**, 230.
- Claros, M. G. & Vincens, P. (1996).** Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur.J.Biochem.* **241**, 779-786.
- Clem, R. J. (2001).** Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. *Cell Death.Differ.* **8**, 137-143.
- Clem, R. J., Fechheimer, M., Miller, L. K. (1991).** Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* **254**, 1388-1390.
- Conradt, B. & Horvitz, H. R. (1998).** The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* **93**, 519-529.
- Conradt, B. & Horvitz, H. R. (1999).** The TRA-1A sex determination protein of *C. elegans* regulates sexually dimorphic cell deaths by repressing the egl-1 cell death activator gene. *Cell* **98**, 317-327.
- Conus, S., Rosse, T., Borner, C. (2000).** Failure of Bcl-2 family members to interact with Apaf-1 in normal and apoptotic cells. *Cell Death.Differ.* **7**, 947-954.
- Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S. A., Zamzami, N., Kroemer, G. (2000).** Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett.* **476**, 118-123.

- del Peso, L., Gonzalez, V. M., Nunez, G. (1998).** *Caenorhabditis elegans* EGL-1 disrupts the interaction of CED-9 with CED-4 and promotes CED-3 activation. *J Biol.Chem.* **273**, 33495-33500.
- Denault, J. B. & Salvesen, G. S. (2002).** Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem.Rev.* **102**, 4489-4500.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., Martinou, J. C. (1999).** Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol.* **144**, 891-901.
- Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., Reed, J. C. (1997).** X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**, 300-304.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. (2000).** Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42.
- Du, Q., Lehavi, D., Faktor, O., Qi, Y., Chejanovsky, N. (1999).** Isolation of an apoptosis suppressor gene of the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. *J Virol* **73**, 1278-1285.
- Dubinsky, W. P., Mayorga-Wark, O., Schultz, S. G. (1999).** Volume regulatory responses of basolateral membrane vesicles from *Necturus* enterocytes: role of the cytoskeleton. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 9421-9426.
- Ellis, H. M. & Horvitz, H. R. (1986).** Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* **44**, 817-829.
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., Martinou, J. C. (2000).** Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol.Cell Biol.* **20**, 929-935.
- Fell, B., Smith, A. M., Hill, R. M., Parmar, P. K., Coates, L. C., Mezey, E., Birch, N. P. (2002).** Characterisation of two serine protease inhibitors expressed in the pituitary gland. *Arch.Physiol Biochem.* **110**, 26-33.
- Fischer, H., Koenig, U., Eckhart, L., Tschachler, E. (2002).** Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **293**, 722-726.
- Fischer, U., Janicke, R. U., Schulze-Osthoff, K. (2003).** Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death.Differ.* **10**, 76-100.
- Fisher, A. J., Cruz, W., Zoog, S. J., Schneider, C. L., Friesen, P. D. (1999).** Crystal structure of baculovirus P35: role of a novel reactive site loop in apoptotic caspase inhibition. *EMBO J.* **18**, 2031-2039.
- Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V., Arnold, E., Varfolomeev, E. E., Brodianskii, V. M., Wallach, D. (1997).** CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *J Biol Chem* **272**, 19641-19644.
- Gross, A., McDonnell, J. M., Korsmeyer, S. J. (1999).** BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 1899-1911.

- Gumienny, T. L. & Hengartner, M. O. (2001).** How the worm removes corpses: the nematode *C. elegans* as a model system to study engulfment. *Cell Death.Differ.* **8**, 564-568.
- Haake, A. R. & Polakowska, R. R. (1993).** Cell death by apoptosis in epidermal biology. *J.Invest Dermatol.* **101**, 107-112.
- Hacker, G. (2000).** The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* **301**, 5-17.
- Haecker, G. & Vaux, D. L. (1994).** Viral, worm and radical implications for apoptosis. *Trends.Biochem.Sci.* **19**, 99-100.
- Hahn, C., Hirsch, B., Jahnke, D., Durkop, H., Stein, H. (1999).** Three new types of Apaf-1 in mammalian cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **261**, 746-749.
- Han, D. K., Chaudhary, P. M., Wright, M. E., Friedman, C., Trask, B. J., Riedel, R. T., Baskin, D. G., Schwartz, S. M., Hood, L. (1997).** MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 11333-11338.
- Hausmann, G., O'Reilly, L. A., van Driel, R., Beaumont, J. G., Strasser, A., Adams, J. M., 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.
- Hengartner, M. (1998).** Apoptosis. Death by crowd control. *Science* **281**, 1298-1299.
- Hengartner, M. O., Ellis, R. E., Horvitz, H. R. (1992).** *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* **356**, 494-499.
- Hershberger, P. A., LaCount, D. J., Friesen, P. D. (1994).** The apoptotic suppressor P35 is required early during baculovirus replication and is targeted to the cytosol of infected cells. *J Virol.* **68**, 3467-3477.
- Horton, P. & Nakai, K. (1997).** Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc.Int.Conf.Intell.Syst.Mol.Biol.* **5**, 147-152.
- Hsu, Y. T. & Youle, R. J. (1997).** Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem.* **272**, 13829-13834.
- Hu, Y., Benedict, M. A., Ding, L., Nunez, G. (1999).** Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J.* **18**, 3586-3595.
- Hu, Y., Benedict, M. A., Wu, D., Inohara, N., Nunez, G. (1998a).** Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 4386-4391.
- Hu, Y., Ding, L., Spencer, D. M., Nunez, G. (1998b).** WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J.Biol.Chem.* **273**, 33489-33494.
- Ichimura, T., Ohsumi, T., Shindo, Y., Ohwada, T., Yagame, H., Momose, Y., Omata, S., Sugano, H. (1992).** Isolation and some properties of a 34-kDa-membrane protein that may be responsible for ribosome binding in rat liver rough microsomes. *FEBS Lett.* **296**, 7-10.

- Ichimura, T., Shindo, Y., Uda, Y., Ohsumi, T., Omata, S., Sugano, H. (1993).** Anti-(p34 protein) antibodies inhibit ribosome binding to and protein translocation across the rough microsomal membrane. *FEBS Lett.* **326**, 241-245.
- Inohara, N., Gourley, T. S., Carrio, R., Muniz, M., Merino, J., Garcia, I., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S., Nunez, G. (1998).** Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death. *J Biol.Chem.* **273**, 32479-32486.
- Inohara, N., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S., Nunez, G. (1997).** CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 10717-10722.
- James, C., Gschmeissner, S., Fraser, A., Evan, G. I. (1997).** CED-4 induces chromatin condensation in *Schizosaccharomyces pombe* and is inhibited by direct physical association with CED-9. *Curr.Biol.* **7**, 246-252.
- Jaroszewski, L., Rychlewski, L., Reed, J. C., Godzik, A. (2000).** ATP-activated oligomerization as a mechanism for apoptosis regulation: fold and mechanism prediction for CED-4. *Proteins* **39**, 197-203.
- Jenuwein, T. & Allis, C. D. (2001).** Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080.
- Jiang, X. & Wang, X. (2000).** Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol.Chem.* **275**, 31199-31203.
- Johns, E. W. (1964).** Studies on histones. 7. Preparative methods for histone fractions from calf thymus. *Biochem.J* **92**, 55-59.
- Kalies, K. U., Gorlich, D., Rapoport, T. A. (1994).** Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex. *J.Cell Biol.* **126**, 925-934.
- Kamita, S. G., Majima, K., Maeda, S. (1993).** Identification and characterization of the p35 gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus that prevents virus-induced apoptosis. *J Virol* **67**, 455-463.
- Karin, M., Liu, Z., Zandi, E. (1997).** AP-1 function and regulation. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**, 240-246.
- Kaufmann, S. H. & Hengartner, M. O. (2001).** Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.* **11**, 526-534.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie A.R. (1972).** Apoptosis: A basis biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* **26**, 239-257.
- Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P. H., Kirchhoff, S. (2001).** FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol.Cell Biol.* **21**, 8247-8254.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lauber, K., Appel, H. A., Schlosser, S. F., Gregor, M., Schulze-Osthoff, K., Wesselborg, S. (2001).** The adapter protein apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1) is proteolytically processed during apoptosis. *J.Biol.Chem.* **276**, 29772-29781.

- Lei, K. & Davis, R. J. (2003).** JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 2432-2437.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., Wang, X. (1997).** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489.
- Liu, Q. A. & Hengartner, M. O. (1999).** The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **887**, 92-104.
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. (1996).** Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**, 147-157.
- Lockshin, R. A. & Williams, C. (1965).** Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol* **11**, 803-809.
- Luckow, V. A. & Summers, M. D. (1988).** Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Biotechnology* **6**, 47-55.
- Martin, S. J. & Green, D. R. (1995).** Apoptosis during HIV infection. A cytopathic effect of HIV or an important host-defense mechanism against viruses in general? *Adv.Exp.Med.Biol.* **374**, 129-138.
- Meier, P., Finch, A., Evan, G. (2000).** Apoptosis in development. *Nature* **407**, 796-801.
- Metzstein, M. M., Stanfield, G. M., Horvitz, H. R. (1998).** Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends.Genet.* **14**, 410-416.
- Miller, L. K. (1997).** Baculovirus interaction with host apoptotic pathways. *J Cell Physiol* **173**, 178-182.
- Miller, L. K. (1999).** An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol.* **9**, 323-328.
- Moriishi, K., Huang, D. C., Cory, S., Adams, J. M. (1999).** Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 9683-9688.
- Morin, P. J., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1996).** Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 7950-7954.
- Morishima, N., Okano, K., Shibata, T., Maeda, S. (1998).** Homologous p35 proteins of baculoviruses show distinctive anti-apoptotic activities which correlate with the apoptosis-inducing activity of each virus. *FEBS Lett.* **427**, 144-148.
- Murphy, E. C. III, Zheng, T., Nicchitta, C. V. (1997).** Identification of a novel stage of ribosome/nascent chain association with the endoplasmic reticulum membrane. *J.Cell Biol.* **136**, 1213-1226.
- Nava, V. E., Cheng, E. H., Veluona, M., Zou, S., Clem, R. J., Mayer, M. L., Hardwick, J. M. (1997).** Herpesvirus saimiri encodes a functional homolog of the human bcl-2 oncogene. *J.Virol.* **71**, 4118-4122.

- Newmeyer, D. D. & Ferguson-Miller, S. (2003).** Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* **112**, 481-490.
- Nicotera, P., Leist, M., Ferrando-May, E. (1998).** Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol.Lett.* **102-103**, 139-142.
- Notredame, C., Higgins, D. G., Heringa, J. (2000).** T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol.Biol.* **302**, 205-217.
- Ogawa, T., Shiga, K., Hashimoto, S., Kobayashi, T., Horii, A., Furukawa, T. (2003).** APAF-1-ALT, a novel alternative splicing form of APAF-1, potentially causes impeded ability of undergoing DNA damage-induced apoptosis in the LNCaP human prostate cancer cell line. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **306**, 537-543.
- Ohsumi, T., Ichimura, T., Sugano, H., Omata, S., Isobe, T., Kuwano, R. (1993).** Ribosome-binding protein p34 is a member of the leucine-rich-repeat- protein superfamily. *Biochem.J.* **294** (Pt 2), 465-472.
- Okada, H., Suh, W. K., Jin, J., Woo, M., Du, C., Elia, A., Duncan, G. S., Wakeham, A., Itie, A., Lowe, S. W., Wang, X., Mak, T. W. (2002).** Generation and characterization of Smac/DIABLO-deficient mice. *Mol.Cell Biol.* **22**, 3509-3517.
- Pan, G., O'Rourke, K., Dixit, V. M. (1998).** Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 Form a Ternary Complex. *J.Biol.Chem.* **273**, 5841-5845.
- Parks, G. D. & Lamb, R. A. (1991).** Topology of eukaryotic type II membrane proteins: importance of N-terminal positively charged residues flanking the hydrophobic domain. *Cell* **64**, 777-787.
- Puthalakath, H., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., King, S. M., Strasser, A. (1999).** The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol.Cell* **3**, 287-296.
- Puthalakath, H. & Strasser, A. (2002).** Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death.Differ.* **9**, 505-512.
- Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L. A., Beaumont, J. G., Coultas, L., Cheney, R. E., Huang, D. C., Strasser, A. (2001).** Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* **293**, 1829-1832.
- Richardson, H. & Kumar, S. (2002).** Death to flies: Drosophila as a model system to study programmed cell death. *J.Immunol.Methods* **265**, 21-38.
- Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., Reed, J. C. (1997).** The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* **16**, 6914-6925.
- Saleh, A., Srinivasula, S. M., Acharya, S., Fishel, R., Alnemri, E. S. (1999).** Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J.Biol.Chem.* **274**, 17941-17945.

- Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. (1999).** Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**, 10964-10967.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanders, S. L. & Schekman, R. (1992).** Polypeptide translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *J.Biol.Chem.* **267**, 13791-13794.
- Savill, J. & Fadok, V. (2000).** Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**, 784-788.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H., Peter, M. E. (1999).** The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 1541-1548.
- Seshagiri, S. & Miller, L. K. (1997).** *Caenorhabditis elegans* CED-4 stimulates CED-3 processing and CED-3-induced apoptosis. *Curr.Biol.* **7**, 455-460.
- Shaham, S. (1998).** Identification of multiple *Caenorhabditis elegans* caspases and their potential roles in proteolytic cascades. *J.Biol.Chem.* **273**, 35109-35117.
- Shaham, S. & Horvitz, H. R. (1996).** An alternatively spliced *C. elegans* ced-4 RNA encodes a novel cell death inhibitor. *Cell* **86**, 201-208.
- Shu, H. B., Halpin, D. R., Goeddel, D. V. (1997).** Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* **6**, 751-763.
- Siegel, R. M., Martin, D. A., Zheng, L., Ng, S. Y., Bertin, J., Cohen, J., Lenardo, M. J. (1998).** Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *J.Cell Biol.* **141**, 1243-1253.
- Skjærpen, C. S., Wesche, J., Olsnes, S. (2002).** Identification of ribosome-binding protein p34 as an intracellular protein that binds acidic fibroblast growth factor. *J.Biol.Chem.* **277**, 23864-23871.
- Song, Q., Kuang, Y., Dixit, V. M., Vincenz, C. (1999).** Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *EMBO J* **18**, 167-178.
- Spudich, J. A. & Watt, S. (1971).** The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J.Biol.Chem.* **246**, 4866-4871.
- Stephens, D. J. & Banting, G. (2000).** The use of yeast two-hybrid screens in studies of protein:protein interactions involved in trafficking. *Traffic.* **1**, 763-768.
- Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V. M. (2000).** Apoptosis signaling. *Annu.Rev.Biochem.* **69**:217-45., 217-245.
- Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., Kroemer, G. (1996).** Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp.Med.* **184**, 1331-1341.

- Tao, W., Walke, D. W., Morgan, J. I. (1999).** Oligomerized Ced-4 kills budding yeast through a caspase-independent mechanism. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **260**, 799-805.
- Tazawa, S., Unuma, M., Tondokoro, N., Asano, Y., Ohsumi, T., Ichimura, T., Sugano, H. (1991).** Identification of a membrane protein responsible for ribosome binding in rough microsomal membranes. *J.Biochem.(Tokyo)* **109**, 89-98.
- Teodoro, J. G. & Branton, P. E. (1997).** Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol* **71**, 1739-1746.
- Thompson, C. B. (1995).** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462.
- Thornberry, N. A. & Lazebnik, Y. (1998).** Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316.
- Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T., Nicholson, D. W. (1997).** A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J.Biol.Chem.* **272**, 17907-17911.
- Turner, B. M. (2002).** Cellular memory and the histone code. *Cell* **111**, 285-291.
- Vaux, D. L. (2002).** Apoptosis and toxicology--what relevance? *Toxicology* **181-182**, 3-7.
- Vaux, D. L. & Silke, J. (2003).** Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **304**, 499-504.
- Vaux, D. L. & Strasser, A. (1996).** The molecular biology of apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **93**, 2239-2244.
- Verhagen, A. M., Coulson, E. J., Vaux, D. L. (2001).** Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol.* **2**, Reviews 3009.1-3009.10.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., 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., Vaux, D. L. (2002).** Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis.* **7**, 163-166.
- Vier, J., Furmann, C., Hacker, G. (2000).** Baculovirus P35 protein does not inhibit caspase-9 in a cell-free system of apoptosis. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **276**, 855-861.
- Vogt, C. (1842).** Untersuchungen über die Entwicklungsbiologie der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). Jent und Gassmann, Solothurn, Switzerland.
- Wang, H. G., Pathan, N., Ethell, I. M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T. F., Reed, J. C. (1999).** Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* **284**, 339-343.
- 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., Korsmeyer, S. J. (2001).** Proapoptotic

BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**, 727-730.

Wolf, E., Kim, P. S., Berger, B. (1997). MultiCoil: a program for predicting two- and three-stranded coiled coils. *Protein Sci.* **6**, 1179-1189.

Wu, D., Wallen, H. D., Inohara, N., Nunez, G. (1997a). Interaction and regulation of the *Caenorhabditis elegans* death protease CED-3 by CED-4 and CED-9. *J.Biol.Chem.* **272**, 21449-21454.

Wu, D., Wallen, H. D., Nunez, G. (1997b). Interaction and regulation of subcellular localization of CED-4 by CED- 9. *Science* **275**, 1126-1129.

Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**, 555-556.

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

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., 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.

Zhivotovsky, B., Samali, A., Gahm, A., Orrenius, S. (1999). Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death.Differ.* **6**, 644-651.

Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V. M., Salvesen, G. S. (1997). Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J.Biol.Chem.* **272**, 7797-7800.

Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., 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., Li, Y., Liu, X., Wang, X. (1999). An APAF-1.Cytochrome c Multimeric Complex Is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9. *J.Biol.Chem.* **274**, 11549-11556.

Danke...

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München auf Anregung und unter Leitung von Prof. Dr. Georg Häcker verfaßt. Ihm gilt mein herzlicher Dank für die engagierte Betreuung und das rege Interesse am Fortgang meiner Arbeit. Seine allzeitige Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft waren eine große Unterstützung, und seine Bereitschaft zu loben hat die Motivation sehr gestärkt.

Bei Herrn Prof. Dr. Johannes Buchner möchte ich mich bedanken für die freundliche Bereitschaft, die Betreuung meiner Arbeit von Seiten der Fakultät für Chemie zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Hermann Wagner danke ich für die Möglichkeit, am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München diese Arbeit anzufertigen.

Meinen Freunden und Kollegen im Arbeitskreis danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und das angenehme und persönliche Arbeitsklima, das auch außerhalb der Arbeitszeit bei Cocktails, mit der "externen Heizvorrichtung" und dergleichen gepflegt wurde: namentlich den "aktuellen" Kolleginnen und Kollegen Anette Bauer, Svetla Chaneva, Silke Fischer, Thomas Harlander, Christina Hilpert, Susanne Kirschnek, Michael Knese, Marc Rehm, Julia Scheffel, Stefan Schliep, Juliane Vier sowie Piia Pulkkinen (unserem Gast bei den Gruppenseminaren) und den "ehemaligen" Corina Anders, Christine Fürmann, Monika Gerhard, Georg Linsinger, Astrid Mack, Catharina Müller-Thomas, Claudia Schwarz und David Takramah.

Weiterhin möchte ich Dr. Heinrich Flaswinkel für die gründliche Einarbeitung in das Baculovirus-Expressionssystem danken und Dr. Stefan Bauer für seine Hilfsbereitschaft vor allem zu Beginn der Arbeit hinsichtlich aller Probleme bei der Arbeit mit Proteinen, sowie allen anderen, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.