

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar
[Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. H. Wagner, Ph. D. (Melbourne)]

Apoptoseinduktion durch artifizielle Protein-Dimerisierung in menschlichen Zellen

Corina Anders

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker
2. apl. Prof. Dr. Th. Chr. Miethke

Die Dissertation wurde am 12.07.2006 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 27.09.2006 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	7
1 Einleitung	8
1.1 Was ist Apoptose?	8
1.1.1 Ursprung der Terminologie	8
1.1.2 Die Morphologie	9
1.1.3 Die Definition	11
1.2 Apoptose im Modell-Organismus: Der Fadenwurm <i>Caenorhabditis elegans</i>	11
1.2.1 Das erste Zelltod-Gen, nuc-1 (<i>nuclease abnormal</i>)	12
1.2.2 Die "Killer-Gene" ced-3 und ced-4	12
1.2.3 Ced-3 und ced-4 und ihre Homologien beim Menschen	12
1.2.4 Ced-9 schützt Zellen vor dem programmierten Zelltod	13
1.2.5 Der molekular-genetische Signaltransduktionsweg des programmierten Zelltodes in <i>C. elegans</i>	13
1.3 Apoptose in Säugetieren	14
1.3.1 Die zentrale Rolle der Caspasen	14
1.3.2 Der Todesrezeptorweg	16
1.3.3 Fas (CD95 oder APO-1)	17
1.3.4 FADD (Mort1)	18
1.3.5 Der mitochondriale Weg	18
1.3.6 Pro- und anti-apoptische Moleküle (Aktivatoren/Inhibitoren)	19
1.4 Apoptose und Erkrankungen des Menschen	19
1.5 Gentherapie	20
1.5.1 Caspasen	20
1.5.2 Künstliche Todes-Schalter (ADS = "Artificial Death Switches")	21
1.6 Zielsetzung der Arbeit	24

2	Material und Methoden	26
2.1	Molekularbiologische und biochemische Standardmethoden	26
2.1.1	Fällen und Reinigung von DNA	26
2.1.2	DNA-Präparation im kleinen Maßstab (Minipräparation)	27
2.1.3	DNA-Präparation im großen Maßstab (Midi- oder Maxipräparation)	27
2.1.4	Konzentrationsbestimmung von DNA	28
2.1.5	Transformation von Bakterien	28
2.1.6	Herstellung kompetenter Bakterien	29
2.1.7	Agarose-Gelelektrophorese	29
2.1.8	DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen	30
2.1.9	Klenow- und T4 DNA-Polymerase	31
2.1.10	Dephosphorylierung von DNA	31
2.1.11	Ligation von DNA-Molekülen	32
2.1.12	Klonieren von DNA-Fragmenten	32
2.1.13	Analyse von DNA-Sequenzen	33
2.1.14	Western-Blotting	35
2.1.15	Allgemeine Zellkulturtechnik	37
2.1.16	Zellextraktion	37
2.2	Transfektion von DNA in Zellen	38
2.2.1	Elektroporation	38
2.2.2	Calcium-Phosphat-vermittelte Transfektion	39
2.3	Spezielle Methoden der Molekularbiologie	40
2.3.1	β -Galaktosidase Färbung	40
2.3.2	Dimerisierung mit Coumermycin und Kreuzvernetzung (Crosslinker-Assay)	41
2.3.3	Luciferase Reporter-System	43
2.3.4	Durchflusszytometrie (FACS = „ <i>Fluorescence-Activated Cell Sorter</i> “)	45
2.4	Materialien	47
2.4.1	Antikörper	47
2.4.2	Bakterien	47
2.4.3	Chemikalien und Biochemikalien	48
2.4.4	Enzyme	49
2.4.5	Expressionsplasmide	50
2.4.6	Geräte	50
2.4.7	Kreuzvernetzende Chemikalien („Crosslinker“)	51
2.4.8	Lösungen, Stammlösungen und Puffer	51
2.4.9	Medien	52
2.4.10	Molekulargewichtsmarker	53
2.4.11	Plasmide/Vektoren	53
2.4.12	Sonstige Materialien	53
2.4.13	Systeme	54
2.4.14	Western Blot	54
2.4.15	Zelllinien	54

3	Ergebnisse	55
3.1	Herstellung von Expressionsvektoren	55
3.2	Klonierung der Expressionsvektoren DR5-DD_Gyr1×_Flag; DR5-DD_Gyr3×_Flag und Gyr1×_FADD_Flag	57
3.3	Untersuchung der Expression der Fusionsproteine	59
3.4	Coumermycin induzierte Dimerisierung der Fusionsproteine und Nachweis anhand kreuzvernetzender Reagenzien	60
3.5	Weitere funktionelle Experimente zur Untersuchung der Expression der Fusionsproteine und der Apoptose- Induktion	65
3.5.1	Kontrolle der Transfektion und des Verhältnisses apoptotischer zu lebenden Zellen mittels β - Galaktosidase Färbung	65
3.5.2	Luciferase-Reporter-Gen-Assay	66
3.5.3	Durchflusszytometrie	68
4	Diskussion	70
4.1	Übersicht	70
4.2	Herstellung der Expressionsvektoren und Expression der Fusions- proteine Gyr1x_FADD_Flag, DR5-DD_Gyr1x_Flag und DR5- DD_Gyr3x_Flag	71
4.3	Coumermycin-induzierte chemische Dimerisierung und die Frage nach der Induktion der Apoptose	75
5	Zusammenfassung	78
	Literaturverzeichnis	80
	Danksagung	89

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin 5'-diphosphat
ADS	“artificial death switch” (= künstlicher Todesschalter)
AMP	Adenosin 5'-monophosphat
Amp	Ampicillin
Apaf-1	“apoptotic protease activating factor 1”
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
BH	Bcl-2-Homologie-Domäne
BSA	Rinderserumalbumin (“bovine serum albumin“)
BS3	Bis(Sulfosuccinimidyl)-suberat
CARD	Caspasenrekrutierungsdomäne
<i>ced</i> , CED	“cell death abnormal“
Da, (kDa, MDa)	Dalton (Kilodalton, Megadalton)
DD	Todesdomäne (“death domain“)
DEAE	Diethylaminoethanol
DED	Todeseffektordomäne (“death effector domain“)
DISC	“death inducing signalling complex“
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Deoxynucleosidtriphosphat(e)
DR5	death receptor-5
DSS	Disuccinimidyl-suberat
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“

FADD	Fas-associated death domain
FasL	Fas-Ligand
FCS	fetales Kälberserum („fetal calf serum“)
GTP	Guanosin 5'-triphosphat
Gyr	Gyrase
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
5xHis, 6xHis	fünf- bzw. sechsfacher Histidin-Fusionsanhang
<i>iap</i> , IAP	„inhibitor of apoptosis protein“
KCM	Kalium-Calcium-Magnesium Puffer
KOH	Kaliumhydroxid
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria Bertani
μF	Mikrofarad, Einheit für elektrische Kapazität
MG	Molekulargewicht
min.	Minute(n)
Mio.	Million(en)
mol	1 Mol enthält 6.022×10^{23} Moleküle
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
NEM	N-Ethylmaleimid
O.D.	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
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)
RT	Raumtemperatur
rpm	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
tBid	trunkiertes Bid
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung “tris-buffered saline”
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin
Tris	Tris (hydroxy-methyl)-aminomethan
TSS	Transformation and Storage Solution
u, U	Einheiten (“units“)
UpM (rpm)	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
v/v	Volumen pro Volumen (“volume per volume”)
w/v	Gewicht pro Volumen (“weight per volume”)

Abbildungsverzeichnis

Abb.: 1	Morphologische Veränderungen während der Apoptose	10
Abb.: 2	molekulargenetische Signaltransduktionsweg in <i>C. elegans</i>	14
Abb.: 3	Signaltransduktionsweg in Säugetieren	17
Abb.: 4	Modell eines künstlichen Todesschalters (ADS = „ <i>Artificial Death Switch</i> “) und seine Funktionsweise innerhalb einer Zelle	22
Abb.: 5	Schema der künstlichen Todesschalter im Vergleich	24
Abb.: 6	Molekularstruktur der kreuzvernetzenden Reagenzien DSS und BS3	43
Abb.: 7	Oligomerisierung am Beispiel des Todesrezeptors Fas	56
Abb.: 8	Modell der Subklonierung am Beispiel des Expressionsvektors Gyr1×_FADD_Flag	58
Abb.: 9	Schema der Expressionsvektoren	59
Abb.: 10	Expression der Fusionsproteine DR5-DD_Gyr1×_Flag und DR5-DD_Gyr3×_Flag	60
Abb.: 11	Schema der Dimerisierung durch Coumermycin	61
Abb.: 12	Schema der Kreuzvernetzung	63
Abb.: 13	Analyse der dimerisierten Fusionsproteine nach Verwendung des kreuzvernetzenden Reagenz (Crosslinker) BS3	64
Abb.: 14	Vergleich zwischen apoptotischen und lebenden Zellen nach β-Galaktosidase-Färbung	66
Abb.: 15	Luciferase-Reporter-Gen-Assay mit den Expressionsvektoren DR5-DD_Gyr1×_Flag und Gyr1×_FADD_Flag	67
Abb.: 16	Durchflusszytometrie am Beispiel des Expressionsvektors DR5-DD_Gyr3x_Flag	69

1 Einleitung

Diese Arbeit befasst sich mit der Coumermycin-induzierten chemischen Dimerisierung von pro-apoptotischen Molekülen in menschlichen Zelllinien. Zur Anwendung kamen FADD und DR5 (Komponenten des Todesrezeptorweges), die mit geeigneten Proteinen (Gyrase B) für eine Kreuzvernetzung (Dimerisierung) fusioniert wurden. Ein wichtiger Schritt der Apoptosesignaltransduktion ist die Oligomerisierung von diesen Proteinen. Durch experimentell induzierte Oligomerisierung der hergestellten Fusionsproteine sollte ein System etabliert werden, das die Liganden unabhängige Aktivierung des Apoptoseweges zulässt. Ein Ziel dabei war es in menschlichen Zelllinien den Zelltod künstlich auszulösen und damit den Signaltransduktionsweg *in vitro* zu verfolgen. Im Folgenden sollen zunächst die Grundlagen und Mechanismen der Apoptose dargestellt werden.

1.1 Was ist Apoptose?

1.1.1 Ursprung der Terminologie

Bereits vor mehr als hundert Jahren beobachtete man, dass Zellen im Rahmen der normalen Entwicklung von komplexen Organismen sterben. Erste Beschreibungen über das Verschwinden von Zellen gehen bis in die Mitte des 19. Jahrhunderts zurück, veröffentlicht in einer Studie über die Entwicklungsbiologie der Geburtshelferkröte (Vogt C 1842). Weitere Hinweise auf eine programmierte Form des Zelltodes finden sich in der Arbeit von Lockshin und Williams im Jahre 1964 bei der Untersuchung einer Insekten-Spezies (Lockshin and Williams 1965). In histologischen Studien an mangeldurchblutetem Lebergewebe von Ratten wurden in den Jahren von 1962 bis 1969 zwei verschiedene Formen des Zelltodes beschrieben (Cain and Gerstenkorn 1962; Kerr 1965; Kerr 1967; Kerr 1969). Eine Form, die bereits als *klassische Nekrose* (= das Absterben von Geweben, Organen o. Organteilen) bekannt war und eine andere Form, die man als Prozess verstand, bei dem sich vereinzelt Zellen abrunden, eine Masse von Zytoplasma mit kondensiertem Kern-Chromatin bilden und bald darauf eliminiert werden. Dieser Prozess unterschied sich von der klassischen Nekrose dahingehend, dass er nur einzelne Zellen oder Gruppen gleichartig differenzierter Zellen betraf, die wie trockene Blätter von einem Baum abfallen, und dadurch, dass eine

Entzündungsreaktion fehlte. Diese zweite Form des Zelltodes führte nicht zur vollständigen Auflösung der Zelle und erhielt daher zunächst die Bezeichnung *shrinkage necrosis* (Schrumpfung) (Kerr 1971). Darüber hinaus haben Kerr, Wyllie und Curie 1972 angenommen, dass dieselben Mechanismen, die für den natürlicherweise auftretenden Zelltod in der Entwicklung verantwortlich sind, womöglich auch eine allgemeine homöostatische Funktion besitzen (z.B. wie bei der Regulierung der Größe von Zellpopulationen unter normalen wie auch pathologischen Bedingungen). Belege hierfür fanden sie in Studien über bösartige Tumoren, zum Beispiel beim Basalzellkarzinoms der Haut des Menschen (Kerr and Searle 1972a; Kerr and Searle 1972b), und in Studien über Tumor-Rückbildungen (z.B. die Rückbildung von experimentell induziertem Brustkrebsgewebe in Ratten nach Entfernung der Eierstöcke) (Kerr et al. 1972). In all diesen Fällen beobachteten sie eine Serie von spezifischen strukturellen Veränderungen der Zellen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die kleinen runden Zellkörperchen von der Kondensation des Zytoplasmas und des Kern-Chromatins her resultieren, von Membranen umschlossen sind, intakte Zell-Organellen enthalten und von angrenzenden Gewebszellen phagozytiert werden. Sie bezeichneten daraufhin diese Form des Zelltodes als *apoptosis* (altgriechisch: ab-, wegfallen) (Kerr et al. 1972). Dieser Begriff findet seitdem, neben Synonymen wie programmierter Zelltod und Zell-Selbstmord, breite Verwendung.

1. 1. 2 Die Morphologie

Die Aktivierung des intrazellulären Signaltransduktionsweges der Apoptose führt zu spezifischen morphologischen Veränderungen der Zelle (Hacker 2000). Die apoptotischen Zellen werden sehr schnell von benachbarten Zellen phagozytiert und verdaut (Kerr et al. 1972; Ellis et al. 1991). Diese Tatsache erschwert es *in vivo*, die morphologischen Veränderungen im Einzelnen zu verfolgen. Studien *in vitro* behelfen sich mit der Licht- sowie Elektronenmikroskopie. Frühzeitige Veränderungen der Zelle beinhalten die Trennung von benachbarten Zellen im Gewebe wie auch von Verbindungen mit der extrazellulären Matrix sowie die Kondensation des Kernchromatins. Später erscheinen blasenförmige Ausstülpungen (Protrusionen) der Plasmamembran, und der Zellkern kondensiert vollständig bevor er in verschiedene Fragmente zerfällt. Die Zellorganellen bleiben im Allgemeinen intakt. Die Zelle zerfällt in so genannte apoptotische Körperchen (*apoptotic bodies*) (Kerr et al. 1972). Am Ende werden die apoptotischen Körperchen von benachbarten Zellen aufgenommen und mittels lysosomaler Enzyme verdaut (Bursch et al. 1985).

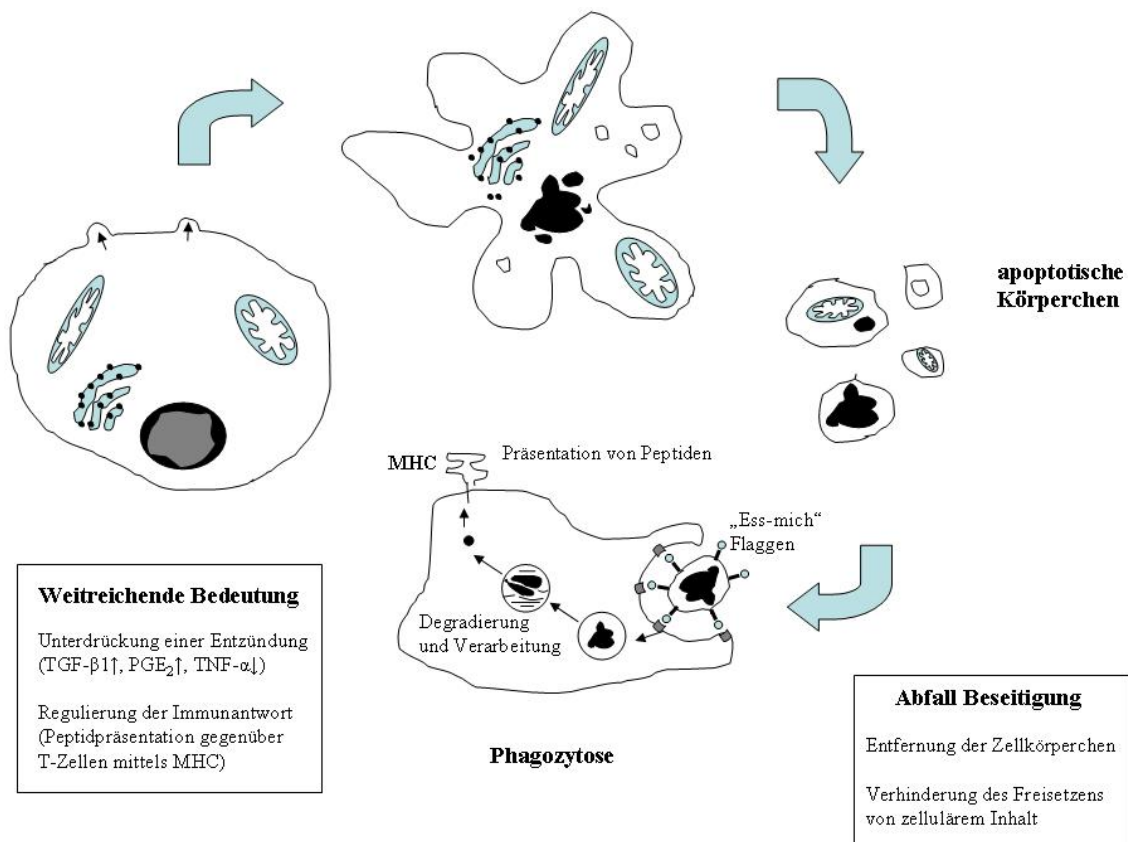


Abb.: 1 Morphologische Veränderungen während der Apoptose

Die apoptotische Zelle löst sich zunächst von benachbarten Zellen im Gewebsverband und von Verbindungen mit der extrazellulären Matrix. Sie rundet sich ab. Danach folgen Ausstülpungen der Plasmamembran, die Kondensation des Chromatins entlang der inneren Zellkernhülle bis hin zur kompletten Kondensation und dem Zerfall des Zellkerns in verschiedene Fragmente. Die Zellorganellen bleiben im Wesentlichen intakt, auch wenn eine Dilatation des endoplasmatischen Retikulums und die Aggregation von Ribosomen beobachtet werden können. Zytoplasmatische Vakuolen können auftreten. Am Ende zerfällt die Zelle in apoptotische Körperchen, die Anteile des zellulären Materials enthalten können. Die apoptotischen Körperchen sind mit so genannten "Ess-mich" Flaggen ausgestattet, wie zum Beispiel durch Exposition von Phosphatidylserin (PtdSer) (normalerweise an der inneren Membran lokalisiert) oder durch Veränderungen der Zuckermoleküle auf der Oberfläche der sterbenden Zelle. Andere Zellen (wie Makrophagen) erkennen diese Zelloberflächenmarker und binden diese über eigene Rezeptoren, wie zum Beispiel Lektine oder Integrine. Die Zellkörperchen werden auf diese Weise aufgenommen (phagozytiert) und über lysosomale Enzyme degradiert und verarbeitet. Die Phagozytose der Zellkörperchen dient nicht nur der sicheren Entfernung von Zellmaterial, sondern besitzt eine weit reichende Bedeutung in Hinblick auf die Regulation von Entzündung, Immunantwort und Gewebs-Umgestaltung. *Entzündung:* Die Aufnahme von apoptotischen Körperchen unterdrückt die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren wie $TNF-\alpha$ von aktivierten Makrophagen. Für den Menschen gefährliche, autoreaktive Zellen wie in Autoimmunkrankheiten (z.B. rheumatoide Arthritis) können z.B. über Apoptose eliminiert werden ohne sekundäre Nekrose oder unkontrollierte Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren. *Regulierung der Immunantwort:* Phagozyten sind in der Lage von ingestierten apoptotischen Körperchen Peptide (Antigene) über MHC-Moleküle den T-Zellen zu präsentieren und somit eine Immunantwort durch zytotoxische Lymphozyten auszulösen. $TGF-\beta_1$, Tumor-Nekrose-Faktor- β_1 ; PGE_2 , Prostaglandin E_2 ; $TNF-\alpha$, Tumor-Nekrose-Faktor- α ; MHC, Haupthistokompatibilitätskomplex. (Hacker 2000; Savill and Fadok 2000)

1. 1. 3 Die Definition

Als Apoptose bezeichnen wir das aufgrund eines Zelltodprogrammes ausgelöste Absterben von Einzelzellen oder Zellgruppen mit konsekutivem Schrumpfen (Kondensation) und Zerfallen der gestorbenen Zellen. Apoptose, als so genannter programmierter Zelltod, ist unter anderem das Schlüsselereignis bei der Embryonalentwicklung (Beseitigung von überflüssigem Baugewebe, z.B. das embryonal angelegte, interdigitale Gewebe der Hände) beim Entzug eines stimulierenden Hormons (z.B. beim physiologischen Abfall der Kortikotropin- Sekretion bei neugeborenen Ratten) (Wyllie et al. 1973b;Wyllie et al. 1973a) sowie bei der zyklischen Endometriumabstoßung oder der Noxenexposition mit genomischer Schädigung.

1. 2 Apoptose im Modell-Organismus: Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*

Bereits 1963 stellten sich Sydney Brenner und seine Kollegen die Frage der genetischen Spezifikation des Nervensystems und die Frage auf welche Weise das Nervensystem arbeitet, um Verhalten zu produzieren. Eine wichtige Bedingung, um dieser Frage nachgehen zu können, bestand darin, einen kleinen Organismus mit einer überschaubaren Anzahl an Nervenzellen zu wählen. Die Anzahl der Neuronen in der Taufliege *Drosophila melanogaster* beträgt über 100 000. Sydney Brenner entschied sich für den Fadenwurm (den Nematoden) *Caenorhabditis elegans* mit ungefähr 300 Neuronen. Diese Nematode ist ein sich selbst-befruchtender Zwitter (Hermaphrodit) mit gelegentlich spontanen männlichen Nachkommen. Die erwachsenen Würmer sind ungefähr 1 mm lang und haben einen Lebenszyklus, der in 3½ Tagen vollendet ist. Diese Tiere sind unter Laborbedingungen einfach zu züchten, auf mit *Escherichia coli* bedeckten Agarplatten; die Bakterien dienen gleichzeitig als Nahrung. Zudem sind sie in einer ausreichenden Menge reproduzierbar, jedes Tier produziert über 300 Eier während eines Zyklus.

Spätere Studien von Robert Horvitz an *C. elegans* waren bahnbrechend für das Verständnis der Regulation der Apoptose.

1. 2. 1 Das erste Zelltod-Gen, nuc-1 (*nuclease abnormal*)

Mit dem Beginn der genetischen Studien an *C.elegans* beobachteten Robert Horvitz und John Sulston, dass neben den 959 Zellen, die während der Entwicklung des Wurms generiert werden, weitere 131 Zellen produziert werden, die beim ausgewachsenen Wurm nicht mehr vorhanden sind (Sulston and Horvitz 1977; Sulston et al. 1983). Diese Zellen fehlten, da sie durch den programmierten Zelltod eliminiert wurden. Das erste Gen *nuc-1*, welches in diesem Zusammenhang entdeckt wurde, fand man bei der Suche nach mutierten Würmern, die in der Zellzahl des zentralen Nervensystems Abnormalitäten aufwiesen (Sulston 1976). John Sulston zeigte, dass in einem Mutanten die Degradierung der DNA in Zellen, in denen der programmierte Zelltod ausgelöst war, defekt ist. Er benannte das entsprechende Gen nach diesem Mutanten *nuc-1*, da es die Aktivität einer DNA-Endonuklease kontrolliert.

1. 2. 2 Die "Killer-Gene" *ced-3* und *ced-4*

Es konnte gezeigt werden, dass in einem Wurm mit der sog. *ced-3*-Mutation alle 131 Zellen, die normalerweise sterben würden, überleben (Ellis and Horvitz 1986). Diese Untersuchungen zeigten, dass die Aktivität des Gens *ced-3* essentiell ist, damit die Zellen durch programmierten Zelltod sterben. Damit konnte demonstriert werden, dass der programmierte Zelltod auf der Funktion spezifischer Gene basiert und daher ein biologisch aktiver Prozess ist, ähnlich wie andere biologische Prozesse: Zellteilung, -migration oder -differenzierung. Weitere Untersuchungen deckten das zweite „Killer-Gen“ *ced-4* auf (Ellis and Horvitz 1986). Sowohl *ced-3* als auch *ced-4* agieren innerhalb der sterbenden Zelle selbst und nicht irgendwo anders im Wurm (Yuan and Horvitz 1990). Dies bestätigte die Vermutung, dass der programmierte Zelltod eine Art zellulären Selbstmord darstellt.

1. 2. 3 *Ced-3* und *ced-4* und ihre Homologien beim Menschen

Nach der Klonierung des *ced-3* Gens und der Suche nach Homologien in der Datenbank, konnte bereits 1992 ein dem CED-3 ähnliches Protein im Menschen identifiziert werden (Yuan et al. 1993). Es handelt sich um das Enzym Interleukin-1 β -converting-enzyme (ICE, heute bezeichnet als Caspase-1), welches die Vorstufe des Zytokins Interleukin-1 β in die aktive Form umwandelt. CED-3 und ICE gelten heute als die Begründer der Familie der Cystein-Proteasen, die als Caspasen bekannt sind (Nicholson 1999). Die Klonierung des *ced-4* Gens lies, im Gegensatz zu anderen bekannten Proteinen zu dieser Zeit, eine ganz neue Sequenz erkennen (Yuan and Horvitz 1992). Einige Jahre später, 1997, wurde ein dem CED-4

ähnliches Protein identifiziert, Apaf-1 (apoptosis protease activating factor 1) (Zou et al. 1997), ein pro-apoptotisches menschliches Protein, das sowohl in der Sequenz, als auch in der Funktion dem *C.elegans* Gen-Produkt CED-4 ähnlich ist.

1. 2. 4 Ced-9 schützt Zellen vor dem programmierten Zelltod

Im Gegensatz zu *ced-3* und *ced-4*, die den programmierten Zelltod fördern, konnte im Jahre 1992 das *ced-9* Gen identifiziert werden, dass die Zellen vor diesem Untergang schützt (Ellis and Horvitz 1991) (Hengartner et al. 1992). Michael Hengartner klonierte *ced-9* und entdeckte, dass es für ein Protein codiert mit Ähnlichkeiten zum menschlichen Onkogen Bcl-2 (*B cell lymphoma*) (Hengartner and Horvitz 1994). Diese molekular ähnlichen Gene können also beide Zellen vor Apoptose schützen. Menschliches Bcl-2, wenn in *C.elegans* als Trans-Gen expremiert, kann den Wurm vor Apoptose schützen, als auch die Funktion von *ced-9* in einem *ced-9* Mutanten ersetzen (Vaux et al. 1992) (Hengartner and Horvitz 1994). Nachfolgende Studien deckten eine ganze Familie von CED-9/Bcl-2 ähnlichen Proteinen auf, die bei der Apoptose in Säugetieren eine Rolle spielen (Gross et al. 1999;Cory and Adams 2002).

1. 2. 5 Der molekular-genetische Signaltransduktionsweg des programmierten Zelltodes in *C. elegans*

Wie in der Abbildung 2 ersichtlich haben die meisten, wenn nicht sogar alle Gene die bei der Apoptose in *C. elegans* involviert sind beim Menschen entsprechende Gegenstücke (Horvitz 2003;Sulston 2003). Dieser dargestellte Signaltransduktionsweg ist offensichtlich unvollständig. In einer Vielzahl an Studien konnten mittlerweile zusätzliche Gene identifiziert werden, die in der Apoptose von *C. elegans* beteiligt sind (Hengartner 1999;Wu et al. 2000;Reddien et al. 2001). Zudem sind Teile dieses Weges immer noch nicht vollständig geklärt.

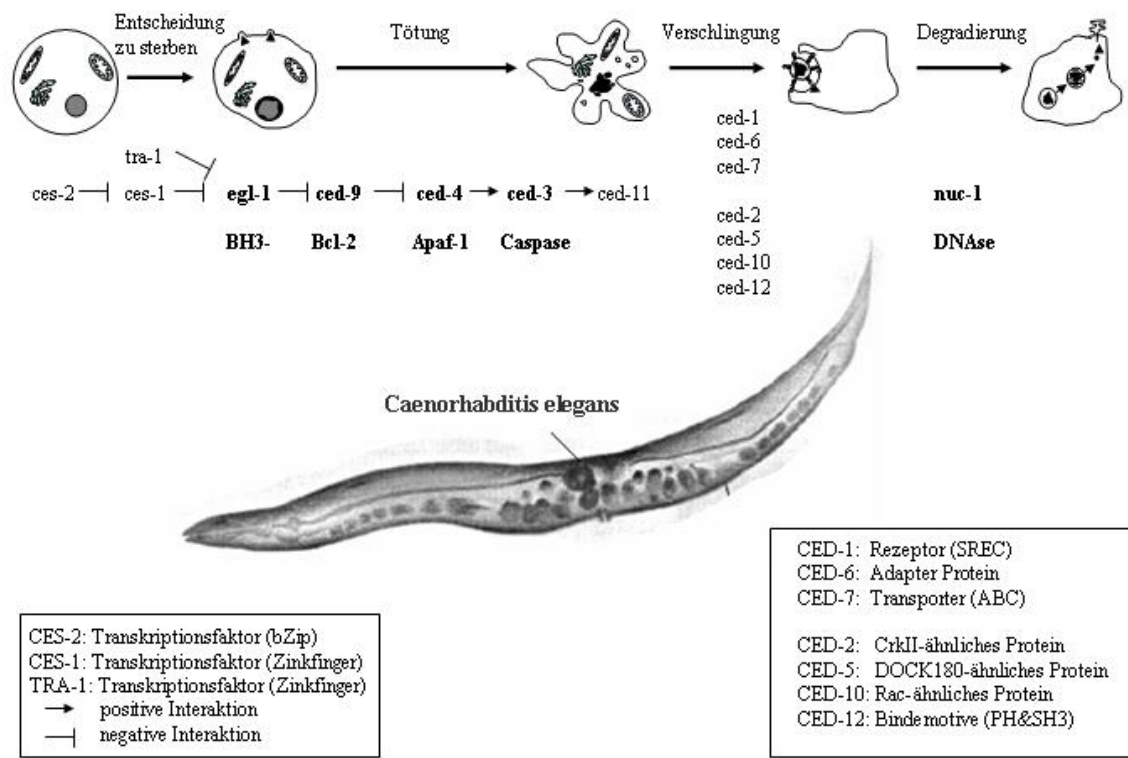


Abb.: 2 molekulargenetische Signaltransduktionsweg in C. elegans

Dargestellt ist der Signaltransduktionsweg des programmierten Zelltodes in C. elegans und die Homologien zwischen den Genprodukten von C. elegans und den entsprechenden Gegenstücken in Säugetierzellen (Horvitz 2003).

1. 3 Apoptose in Säugetieren

1. 3. 1 Die zentrale Rolle der Caspasen

Es ist nicht überraschend, dass initial einfache Todesprogramme, die sich frühzeitig während der Phylogenese (Stammesentwicklung) entwickelten, komplexe Veränderungen in Säugetieren erfahren haben. Eine weitaus größere Familie an Genen kontrolliert die Apoptose in höheren Organismen. Die Apoptose hat entscheidende Auswirkungen auf die Entwicklung und auf die Aufrechterhaltung der Homöostase in multizellulären Organismen. Die Apoptose-Maschinerie ist in der Evolution konserviert und setzt sich aus Aktivatoren, Inhibitoren und Effektoren/Initiatoren zusammen (Muzio et al. 1996). Eine zentrale Rolle in dieser Todes-

Maschinerie spielt eine Gruppe von katabolischen Enzymen, die *Caspasen* (cysteinyll aspartate specific proteases) genannt werden. Caspasen werden konstitutiv in Säugetieren expremiert (Weil et al. 1996). Jede Zelle ist mit einem bestimmten Satz an verschiedenen Caspasen ausgestattet. Bislang sind 15 verschiedene Caspasen in Säugetieren identifiziert worden (Nicholson 1999; Earnshaw et al. 1999; Eckhart et al. 2005). Caspasen liegen in ihrer inaktiven Form als Pro-Enzyme vor und sind in der Lage eine große Anzahl an Struktur-Proteinen nach spezifischen Aspartat-Säure-Resten zu schneiden (Schulze-Osthoff 2003). Sie besitzen eine N-terminale Prodomäne und eine katalytische Protease-Domäne. Die aktivierende Spaltung der Pro-Enzyme findet innerhalb eines kleinen Segmentes statt, welches die große mit der kleinen Untereinheit verbindet (Salvesen and Dixit 1999). In diesem Segment befindet sich ein in all diesen Enzymen konservierter Aspartat-Rest an Position 297. Die proteolytische Aktivierung von Caspasen findet normalerweise an diesem Aspartat-Rest statt, so dass die meisten Caspasen in vitro in der Lage sind, sich selbst und andere Caspasen zu aktivieren (Srinivasula et al. 1996; Muzio et al. 1997; Slee et al. 1999). Die Enzym-Aktivierung wird dabei durch inter-molekulare Prozesse ausgelöst. Nach der Aktivierung bilden die Enzyme aktive Hetero-Tetramäre. Die Einteilung der Caspasen in Effektor oder Initiator-Caspasen basiert auf strukturellen und funktionellen Merkmalen. Caspasen mit einer langen Prodomäne werden als Initiator-Caspasen bezeichnet und befinden sich proximal im Signaltransduktionsweg. Sie enthalten ein oder zwei Protein-Interaktions-Motive, über die die Caspasen mittels spezifischer Adapterproteine in einem Signal-Komplex (DISC = *death inducing signal complex* oder Apoptosom) gebunden werden können. Unter ihnen Caspase-8 und Caspase-10, die in ihrer Prodomäne jeweils zwei Todes-Effektor-Domänen (DED = *death effector domain*) aufweisen (Muzio et al. 1996). Weitere Initiator-Caspasen sind die Caspasen -1, -2, -4, -5, -9, -11, -12 und -13, die jeweils eine Caspase-Rekrutierungs-Domäne (CARD = *caspase recruitment domain*) besitzen (Shi 2002). Im Gegenteil dazu werden Caspasen mit kurzen Prodomänen, wie Caspase-3, -6, -7 und -14 als Effektor-Caspasen bezeichnet und befinden sich distal im Signaltransduktionsweg (Nicholson 1999). Sie besitzen ein geringeres Autoaktivierungs-Potential. Ihre Aktivierung hängt von den weiter proximal befindlichen Caspasen ab. Zur Zeit wird angenommen, dass das Adapter vermittelte *Clustering* (Gruppen bilden) von Initiator-Caspasen zu deren automatischen Spaltung und somit Aktivierung führen (Salvesen and Dixit 1999). Dieses Modell wird von dem Nachweis gestützt, dass die *Oligomerisierung* von Pro-Caspasen zu deren Aktivierung führen (Muzio et al. 1998; Yang et al. 1998; MacCorkle et al. 1998). Es bestehen darüber hinaus Hinweise darauf, dass die Formation von stabilen, vorübergehenden homo-dimeren

Komplexen, Konformationsänderungen bewirken, die wahrscheinlich zur Offenlegung der aktiven Proteasen-Domäne führen und somit die proteolytische Spaltung der Caspasen in aktive Untereinheiten erleichtert (Riedl et al. 2001; Renatus et al. 2001). Die aktiven Zentren zweier Caspasen in einem dimeren Komplex liegen sich spiegelbildlich gegenüber (Chen et al. 2002). Dass Caspasen eine zentrale Rolle in der Apoptose spielen, zeigten Experimente, in denen Caspase-Inhibitoren die typischen apoptotischen Erscheinungen in Zellen verhinderten (Cotter et al. 1992). Dennoch können Zellen trotz Inhibierung der Caspasen sterben (Marsden et al. 2002; Ekert et al. 2004) – dieser Prozeß wird im Allgemeinen als Nekrose bezeichnet.

1. 3. 2 Der Todesrezeptorweg

Die Aktivierung des Rezeptor-vermittelten Signaltransduktionsweges, der unmittelbar zur Aktivierung von Caspase-8 bzw. -10 führt, wird in der Abbildung 3B am Beispiel des Fas-Rezeptors (Apo-1/CD95) mit seinem Liganden (FasL) veranschaulicht (Nagata and Golstein 1995). Todesrezeptoren (DR = *death receptor*) gehören zur Tumor-Nekrose-Faktor Superfamilie (TNFR = *tumor necrosis factor receptor*) und besitzen in ihrem intrazellulären Anteil eine Todes-Domäne (DD = *death domain*) (Locksley et al. 2001). Zu den transmembranen Todesrezeptoren gehören TNF-Rezeptor-1, TRAIL-Rezeptoren (darunter DR-4, DR-5) und Fas. Die entsprechenden Liganden sind unter anderem TNF (= Tumornekrosefaktor), TRAIL (= *TNF - Related Apoptosis - Inducing ligand*) und FasL (= Fas – Ligand).

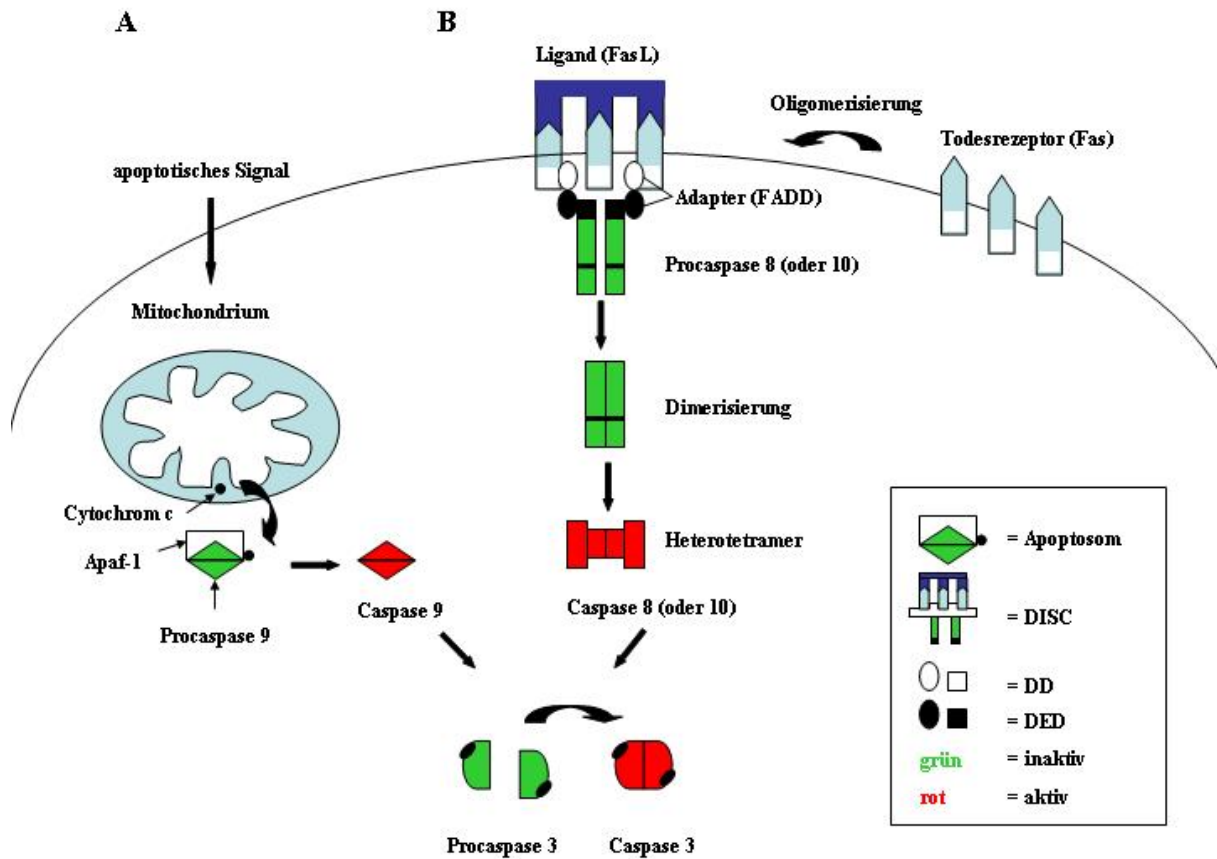


Abb.: 3 Signaltransduktionsweg in Säugetieren

Die Apoptose nimmt vorrangig an zwei Hauptkompartimenten der Zelle ihren Ausgangspunkt. Zum einen an der Zellmembran, die Todesrezeptoren enthält, sowie intrazellulär am Mitochondrium. **A der mitochondriale Weg:** Wenn Mitochondrien ein apoptotisches Signal erhalten, werden pro-apoptische Moleküle wie Cytochrom c ins Zytosol freigesetzt. Zusammen mit ATP (Adenosin-tri-phosphat) oder dATP bildet Cytochrom c mit dem Adapter-Molekül Apaf-1 und Procaspase 9 einen oligomeren Komplex, das Apoptosom, was zur Aktivierung von Caspase 9 führt. **B Todesrezeptorweg:** Die Oligomerisierung von Todesrezeptoren (hier abgebildet der Fas-Rezeptor) mittels spezifischer trimerer Liganden (hier Fas-Ligand) führt zur Rekrutierung des Adapter-Moleküls FADD (*Fas-Associated Death Domain*) und der Procaspase 8 bzw. 10. Sie bilden zusammen den Tod-induzierenden Signalkomplex DISC (*Death-Inducing-Signalling-Complex*), der wiederum zur Aktivierung von Caspase 8 bzw. 10 führt. Die Dimerisierung von zwei homologen Procaspase-Molekülen führt zur Aktivierung einer Caspase. Die aktive Protease bildet ein Heterotetramer. FasL, Fas Ligand; Apaf-1; apoptosis protease-activating factor-1; DD, death domain; DED, death effector domain.

1. 3. 3 Fas (CD95 oder APO-1)

Fas ist ein Rezeptor der Zelloberfläche, der apoptotische Signale ins Innere der Zelle weiterleitet (Ashkenazi and Dixit 1998; Wang et al. 1999; Wallach et al. 1999; Nagata 1996). Das Fas-Protein besteht aus einem 317 Aminosäuren zählendem Transmembran-Glykoprotein mit drei extrazellulären Cystein-reichen Domänen (CRD = *cysteine-rich domains*). Diese Domänen sind charakteristisch für die Tumor-Nekrose-Faktor-Superfamilie. Sowohl der Fas-

Rezeptor als auch sein Ligand (FasL = *Fas Ligand*) bilden Trimere, wobei CRD2 und CRD3 des Rezeptors die Haupt-Kontaktstellen für den Fas-Liganden darstellen (Orlinick et al. 1997; Starling et al. 1997). Mit der Bindung an den Rezeptor **oligomerisiert** der Fas-Ligand die Rezeptor-Monomere. Der zytoplasmatische Anteil des Fas-Rezeptors enthält eine Todesdomäne (DD), die in der Lage ist, das intrazellulär gelegene Adaptermolekül FADD zu rekrutieren.

1. 3. 4 FADD (Mort1)

FADD (*Fas associated death domain*) fungiert als Adapterprotein im Todesrezeptorweg. Es enthält zwei funktionelle Domänen. Am C-Terminus eine Todesdomäne (DD) und am N-Terminus eine Todes-Effektor-Domäne (DED). Die DD von FADD interagiert mit der DD des Fas-Rezeptors oder anderen Todesrezeptoren (DR) nach dessen **Oligomerisierung** durch seinen Liganden (Chinnaiyan et al. 1995; Chinnaiyan et al. 1996). Anschließend tritt die DED von FADD mit der homologen DED von Pro-Caspase-8 in Verbindung, was zur Aktivierung von Caspase 8 führt, die selbst wiederum weiter flussabwärts gelegene Caspasen aktiviert. Die Kreuzvernetzungen zwischen Fas, FADD und Caspase-8 bilden hierbei den Tod-induzierenden Signalkomplex (DISC). Die Überexpression von FADD_DED induziert in Säugetier-Zellen in Abwesenheit eines apoptotischen Signals über den Fas-Rezeptor den Zelltod (Muzio et al. 1996; Medema et al. 1997).

1. 3. 5 Der mitochondriale Weg

Der zweite Weg (siehe Abb.: 3A) der zur Caspasenaktivierung führen kann benutzt Signalprozesse aus den Mitochondrien, und spielt bei den meisten Stimuli eine zentrale Rolle. Mitochondrien setzen während der Apoptose eine Vielzahl an Molekülen frei. Das für die Apoptose Wichtigste ist die Freisetzung von Cytochrom c. Die darauf folgende Bildung eines so genannten Apoptosoms zusammen mit dem Adapterprotein Apaf-1 führt zur Aktivierung von Caspase-9 (Kroemer and Reed 2000). Apaf-1 ist das menschliche Homolog zu CED-4 (Zou et al. 1997). Es ist an der Cytochrom c/dATP-abhängigen Aktivierung von Caspase 3, über die proteolytische Aktivierung von Caspase-9, beteiligt (Li et al. 1997).

1. 3. 6 Pro- und anti-apoptotische Moleküle (Aktivatoren/Inhibitoren)

Neben den bereits beschriebenen Molekülen, die am Signaltransduktionsweg über die Mitochondrien bzw. Todesrezeptoren beteiligt sind, existieren weitere Moleküle, die diese Wege negativ oder positiv beeinflussen können. Sie werden unter den Proteinen der Bcl-2 Familie zusammengefasst. In dieser Familie werden wiederum zwei große Gruppen unterschieden. Auf der einen Seite die anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder, darunter zum Beispiel Bcl-X_L und Bcl-2 (Bcl-w, Bcl-B, Mc1-1, A1, Boo/Diva/Bcl-2-L10 und *C.elegans* CED-9). Diese beinhalten alle drei bis vier charakteristische homologe Domänen (BH1-4 = *Bcl-2 Homology domains*). Auf der anderen Seite werden die pro-apoptotischen Familienmitglieder unterschieden, die aufgrund ihrer Struktur und biochemischen Funktion wiederum in zwei Subklassen unterteilt werden. Die erste Subklasse umfaßt Bax, Bak und vielleicht Bok/Mtd mit drei BH-Domänen. Die zweite Subklasse mit Bad, Bid, Bmf, Noxa, Bik/NBK/Blk, Hrk/DP5, Bim/Bod, Puma/Bbc-3, die jeweils nur die kurze BH3 Domäne beinhalten. Die BH3-Domäne ist dabei entscheidend für die Bindung an die anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder (Huang et al. 2000). Die Hetero-Dimerisierung wird über die BH3-Domäne der proapoptotischen Proteine vermittelt, indem sie an der Oberfläche der anti-apoptotischen Proteine an die hydrophobische Seite (geformt von den BH1-3 Domänen) binden (Sattler et al. 1997). Säugetiere besitzen mindestens 8 BH3-Proteine, die auf Zelltod-auslösende Stimuli die Zelltodkaskade in Gang setzen, indem sie die antiapoptotischen Bcl-2-ähnlichen Proteine antagonisieren und die Bax/Bak-ähnlichen proapoptotischen Proteine aktivieren (Bouillet and Strasser 2002).

BID zum Beispiel (als proapoptotische Bcl-2 Familienmitglied) ist als spezifisches Substrat von Caspase-8 am Fas-Rezeptor-Signalweg beteiligt. Die durch Caspase-8 gespaltene Form (tBID) wird an Mitochondrien rekrutiert und vermittelt so das apoptotische Signal über die Freisetzung von Cytochrom c. Auf diese Weise wird der Todesrezeptor- mit dem mitochondrialen Signalweg verbunden (Li et al. 1998).

1. 4 Apoptose und Erkrankungen des Menschen

Der menschliche Körper besteht aus über 10^{14} Zellen. Die Verbindung zwischen Apoptose und menschlichen Erkrankungen wurde bereits vielfach beschrieben (Hoepfner et al. 1996; Rudin and Thompson 1997; Nicholson 2000; Mullauer et al. 2001; Robertson et al. 2002). Hierbei kann vereinfacht gesagt werden, dass entweder zu viel oder zu wenig Zelltod zu

Krankheiten führen kann. Zu viel Zelltod wird zum Beispiel bei neuro-degenerativen Erkrankungen und bei Schädigungen von Organen, die zur Mangel durchblutung führen, beobachtet. Beispiele hierfür sind Morbus Alzheimer, M. Parkinson, M. Huntington und die amyotrophische Lateralsklerose (ALS), bei denen jeweils spezifische Zelltypen des Nervensystems sterben. Beispiele für Erkrankungen mit Mangel durchblutung sind Schlaganfall, Herzinfarkt und traumatische Gehirnverletzung. Auf der anderen Seite führt zu wenig Zelltod zu einem pathologischen Anstieg der Zellzahl, wie bei bestimmten Krebs-Erkrankungen und Autoimmunkrankheiten. Beispiele hierfür sind das folliculäre Lymphom und das autoimmune lymphoproliferative Syndrom (ALPS). Die Identifikation der Gene und Proteine, die am Prozess des programmierten Zelltodes beteiligt sind, eröffnen daher neue Therapie-Ansatzpunkte, um bei einer großen Anzahl von Krankheiten zu intervenieren.

1.5 Gentherapie

Die Möglichkeit das Leben oder den Tod einer Zelle zu beeinflussen, sei es durch kleine organische Moleküle, Antisens-Oligonukleotide oder Gentherapie, ist Gegenstand vieler wissenschaftlicher Bemühungen, um Krankheiten behandelbar bzw. heilbar zu machen. Mit der Erforschung der biochemischen und molekularen Komplexität des apoptotischen Signaltransduktionsweges eröffnet sich ein neuer Weg für Therapieansätze. In präklinischen Tiermodellen sind bereits erste Erfolge in der Benutzung von Apoptose-modulierenden Therapeutika zu verzeichnen. Beispiele hierfür sind rekombinantes TRAIL ("tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand" = Apo-2L) und Caspasen (Nicholson 2000). Das Ziel dabei ist es Apoptose selektiv zu aktivieren wie z.B. in Krebserkrankungen (TRAIL) oder Zelltod selektiv zu blockieren wie in neurodegenerativen Erkrankungen (Caspasen).

1.5.1 Caspasen

Caspasen waren wahrscheinlich eine der ersten Zielstrukturen gewesen, um den mit dem Zelltod verbundenen Signaltransduktionsweg zu modulieren. Tatsächlich wurden bereits Caspase- Inhibitoren von Pharmafirmen entwickelt bevor überhaupt bekannt war, dass Caspasen eine zentrale Rolle in der Apoptose-Maschinerie spielen. Eine der Zielstrukturen war das Interleukin-1 β -Converting-Enzym (ICE, heute als Caspase-1 bezeichnet) (Alnemri et al. 1996). Caspase-1 ist verantwortlich für die Spaltung und Aktivierung von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie pro-Interleukin-1 β und IGIF/interleukin-18 (Thornberry et al. 1992; Cerretti et al. 1992). ICE-Inhibitoren sind bereits in der klinischen Anwendung bei

entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis. In präklinischen Tiermodellen werden Caspase- Inhibitoren bereits erfolgreich eingesetzt, um den Zelluntergang zum Beispiel bei einer traumatischen Hirnverletzung, dem Status epilepticus, der ALS oder beim M. Parkinson zu verhindern (Yakovlev et al. 1997;Kondratyev and Gale 2000;Li et al. 2000;Schierle et al. 1999). Darüber hinaus gibt es präklinische Daten über die Beeinflussung des programmierten Zelltodes bei Infektionskrankheiten, wie bei der bakteriellen Meningitis oder der Sepsis (Braun et al. 1999;Grobmyer et al. 1999;Hotchkiss et al. 1999).

1. 5. 2 künstliche Todes-Schalter (ADS = “*Artificial Death Switches* „,)

Diese Arbeit hat die Herstellung von sogenannten künstlichen Todesschaltern zum Inhalt. Im Gegensatz zu den herkömmlichen Selbstmord-Genen ("*suicide genes*") basieren die künstlichen Todesschalter (ADS) auf der Verbindung von synthetischen und endogenen pro-apoptotischen Molekülen (MacCorkle et al. 1998). Die Moleküle werden mit Hilfe zugegebener chemischer Reagenzien dimerisiert und dimerisieren sowie aktivieren auf diesem Weg gleichzeitig die pro-apoptotischen Proteine, die an die synthetischen Moleküle fusioniert sind. Die chemischen Reagenzien werden daher als chemische Induktoren der Dimerisierung bezeichnet (CID = "*Chemical Inducers of Dimerization*") (Spencer et al. 1993). Sie sind Lipid- durchlässig (und daher zellpermeabel), nicht- toxisch und in der Lage, als dimere Liganden Proteine kreuz zu vernetzen (cross- linking). Ein entscheidender Vorteil der künstlichen Todes- Schalter ist es, dass sie nicht nur in sich- teilenden Zellen effizient funktionieren, sondern auch in sich nicht- teilenden Zellen. Zudem werden Nebenwirkungen durch die Verwendung von endogenen Genen, im Sinne von Wechselwirkungen mit körpereigenen Substanzen beziehungsweise Gewebe, vermindert (siehe Abbildung 4).

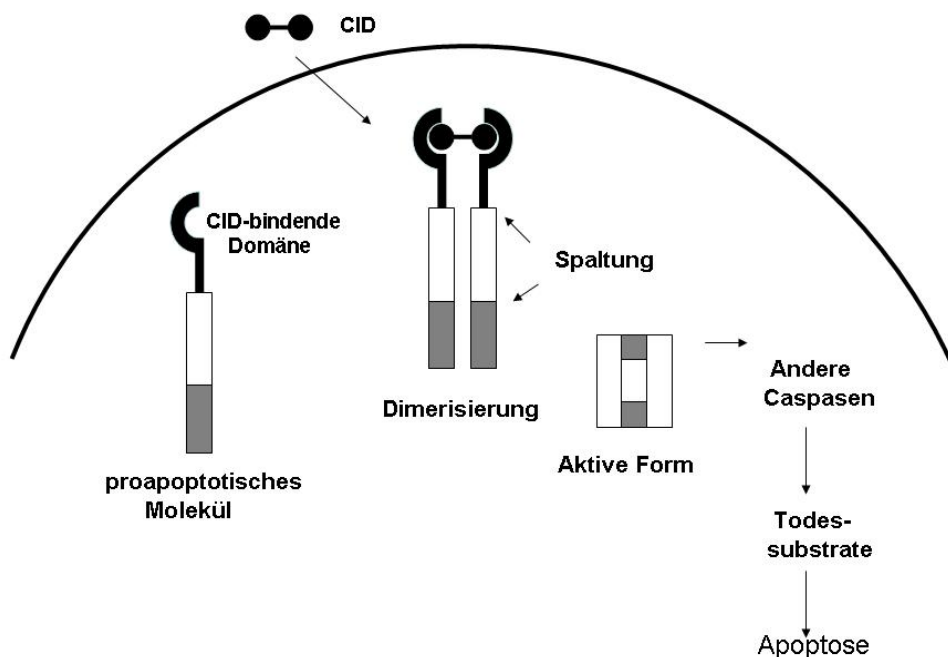


Abb.: 4 Modell eines künstlichen Todesschalters (ADS= „Artificial Death switch“) und seine Funktionsweise innerhalb einer Zelle

Die transmembrane Diffusion eines dimeren Liganden, als chemischer Induktor der Dimerisierung bezeichnet (=CID, chemical inducer of dimerization z.B. FK1012, AP1903), führt zur Kreuzvernetzung (=cross-linking) von intrazellulären proapoptischen Molekülen (z.B. Procaspasen) die genetisch an eine oder mehrere synthetisch hergestellte CID-bindende Domänen (z.B. FKBP12) fusioniert sind. Dies führt zur Aktivierung der proapoptischen Moleküle durch inter-molekulare (trans) Proteolyse. Im abgebildeten Schema führt die Dimerisierung von zwei Procaspase-Molekülen zur aktiven heterotetrameren Form der Caspase.

Ein gut untersuchter künstlicher Todesschalter basiert auf dem menschlichen Protein FKBP12, das mit hoher Affinität eine Vielzahl an natürlichen und synthetischen Molekülen bindet (Schreiber 1991; Babine and Bender 1997). Die physiologische Funktion von FKBP12 liegt z.B. in der Calcium-Kanal-Modulation und Regulierung der Herzentwicklung (Snyder and Sabatini 1995; Marks 1996; Shou et al. 1998). Schreiber und Kollegen (Schreiber 1991) entwickelten das chemische Molekül FKBP (FK1012), welches als künstlicher Imitator der natürlichen zellulären Rekrutierungs-Prozesse dient (Spencer et al. 1996). Als Ligand dient dabei FK506, welches in der Lage ist ein Protein-FKBP zu binden. Die bivalente Version dieses FK506-Proteins ergibt FK1012, einen Liganden der zwei FKBP-Proteine bindet und somit die Proteine dimerisiert. Auf diese Weise entstanden zell-durchlässige Liganden, die in der Lage sind intrazelluläre Signalwege zu kontrollieren, die normalerweise durch Protein-Protein-Interaktionen (=Dimerisierung/ Oligomerisierung) beeinflusst werden (Spencer et al. 1993; Spencer et al. 1996; Keenan et al. 1998). Die Verwendung von FKBP dimerisierenden

Molekülen in vivo wird durch Interaktionen mit endogenen FKBP, die allgegenwärtig in Säugetieren expremiert werden, kompliziert. Daher bediente man sich modifizierten FKBP dimerisierenden Molekülen, die nicht mehr mit der endogenen Form interagieren (z.B. AP1903 nach (Clackson et al. 1998) .

Mit der Hilfe solcher künstlicher Todesschalter können verschiedene apoptotische Proteine in Zellen expremiert werden, die mit ihrer Signal-Domäne an ein oder mehrere FKBP gebunden sind. Die anschließende Behandlung der Zellen mit dimerisierenden Liganden kreuzvernetzt die Fusionsproteine und leitet den Signaltransduktionsprozeß ein. Verschiedene pro-apoptotische Moleküle wurden bereits verwendet, um CID-induzierbare künstliche Todes-Schalter herzustellen, etwa der Fas-Rezeptor (Spencer et al. 1996;Belshaw et al. 1996), Caspase-8 (Muzio et al. 1998;Yang et al. 1998), Caspase-1 wie Caspase-3 (MacCorkle et al. 1998), caspase-9, Apaf-1 (Hu et al. 1998) und Bax (Gross et al. 1998). In all diesen Studien konnte gezeigt werden, dass Proteine des Signaltransduktionsweges durch chemische Induktoren reguliert werden können. Hierbei zeigte sich, dass insbesondere die Dimerisierung der DED von FADD geeignet ist, um Apoptose mit geringerer basaler Toxizität (im Gegensatz zu Fas sowie Caspase-1, -8, -9) sowie mit höherer Sensitivität gegenüber den chemischen Induktoren auszulösen (Fan et al. 1999).

Anhand dieser ADS- Studien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Dimerisierung beziehungsweise Oligomerisierung von apoptotischen Molekülen ein allgemeiner Kontroll-Mechanismus für die Aktivierung im Signaltransduktionsweg ist.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, inwieweit Apoptose in menschlichen Zelllinien durch künstlich induzierte Protein-Dimerisierung ausgelöst werden kann. Wie bereits unter dem Abschnitt 1. 5. 2 "künstliche Todesschalter" (ADS=artificial death switches) beschrieben, basieren derartige Versuchsansätze auf der Verbindung von synthetischen mit endogenen pro-apoptotischen Molekülen. Die in diesem Zusammenhang bereits vielfach getesteten Fusionsproteine, beruhen alle auf der Verbindung des FK506-bindenden Proteins (FKBP) in ein- oder mehrfacher Form und verschiedener pro-apoptotischer Moleküle. Als chemische Induktoren der Dimerisierung (CID = chemical inducers of dimerization) wurden in den bisher veröffentlichten Arbeiten FK1012 und AP1903 verwendet, die in der Lage sind in die Zelle einzudringen und als dimere Liganden an die FKBP-Domäne der Fusionsproteine zu binden.

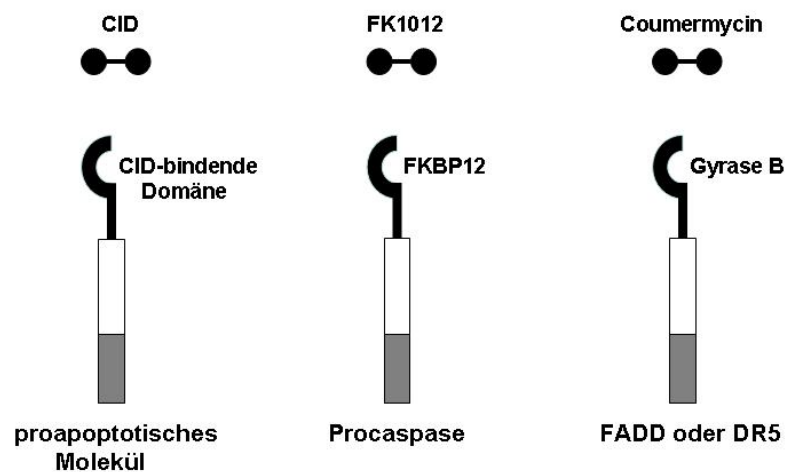


Abb.: 5 Schema der künstlichen Todesschalter im Vergleich

Im Gegensatz dazu entwickelten Farrar und Kollegen eine Methode, in der die chemische Dimerisierung der Fusionsproteine durch Coumermycin induziert wird (Farrar et al. 1996). Coumermycin ist dabei eine synthetisch hergestellte dimere Form des Antibiotikums Novobiocin und in der Lage zwei bakterielle Gyrase B Proteine zu binden. Coumermycin fungiert somit als dimerer Ligand in Form eines chemischen Induktors der Dimerisierung (CID = "chemical inducer of dimerization"). Die Gyrase B selbst ist eine Untereinheit eines an der Verpackung des Chromosoms beteiligten Enzyms aus *Streptomyces* (= grampositive, aerobe zur Verzweigung neigende Bakterien). Gyrasen allgemein sind ein Gruppe von Enzymen, die bei der Reduplikation von DNA eine entscheidende Rolle spielen, indem sie die Tertiärstruktur der DNA-Helix steuern. Der Vorteil von Gyrase gegenüber von FKBP liegt in der Vermeidung von Interaktionen, da die Gyrase auf bakteriellen und nicht menschlichen Proteinen basiert. Bei der Verwendung von FKBP dimerisierten Molekülen kommt es in vivo zu unerwünschten Interaktionen mit endogenen FKBP, die allgegenwärtig in Säugetieren exprimiert werden und unter anderem in der Calciumkanal- Modulation sowie Regulierung der Herzentwicklung mitwirken.

In dieser Arbeit wurde daher der Versuch unternommen, künstliche Todesschalter herzustellen, die anstelle von FKBP, das bakterielle Protein Gyrase B in ein- oder dreifacher Form enthalten und mit den pro-apoptischen Molekülen FADD, DR5 oder Caspase 3 fusioniert sind. Die künstlich hergeleitete Protein- Dimerisierung erfolgte mit dem chemischen Liganden Coumermycin.

2 Material und Methoden

2. 1 Molekularbiologische und biochemische Standardmethoden

2. 1. 1 Fällen und Reinigung von DNA

Zur Entsalzung und/oder Konzentrierung von Nucleinsäurelösungen wurde die DNA mit reinem Ethanol gefällt. Dazu wurden der Probelösung das 2,5fache Volumen Ethanol und 1/10 des Probevolumens an 3 M Na-Acetatlösung zugegeben und die DNA bei Raumtemperatur für 20-30 min gefällt. Nach Zentrifugation (12000 rpm, 20 min) wurde das Pellet zur Entfernung von Salzen mit 70 %igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert und bei 37°C luftgetrocknet. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in H₂O bidest gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Um Nucleinsäurelösungen von unerwünschten Stoffen wie Proteinen und Lipiden zu befreien, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dabei wurde die Probelösung mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform-Lösung versetzt, durch Vortexen durchmischt und 5 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde unter Vermeidung der Interphase in ein neues Gefäß überführt und mit einem gleichen Volumen Chloroform erneut extrahiert. Die wässrige Phase wurde anschließend einer Ethanol fällung unterworfen.

Eine andere Möglichkeit der DNA-Reinigung bestand im Einsatz von Silicagel-Säulchen zur Adsorption der DNA bei hohen Salzkonzentrationen. Nach der Adsorption und einem Waschschriff wurde die DNA mit H₂O bidest von der Säule eluiert. Zur DNA-Reinigung nach dieser Methode wurde das *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen verwendet, wobei mit den Reagenzien und Materialien des Herstellers und nach seinen Vorschriften gearbeitet wurde. Um DNA aus Agarosegelen anzureinigen wurde die DNA-Bande im UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten, in einem Hochsalzpuffer gelöst und mit einer Silica-Suspension versetzt. Nach Adsorption an die Silica-Partikel sowie mehreren Waschschriffen wurde die DNA mit H₂O bidest eluiert. Die Anreinigung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des *QIAEX II Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen.

2. 1. 2 Präparation im kleinen Maßstab (Minipräparation)

Die Minipräparation von DNA nach der Methode der alkalischen Lyse erfolgte nach den Vorschriften aus dem *QIAprep Spin Plasmid Miniprep* Protokoll. Um Plasmid-DNA, die zuvor in Bakterien transformiert worden ist zu isolieren und zu reinigen, muss sie zunächst in einer Übernachtskultur amplifiziert werden. Zur Amplifikation der DNA wurden 2 ml Ampicillin-enthaltendes LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin) mit je einer Kolonie der transformierten Bakterien (siehe Punkt 2. 1. 5) beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von den Übernachtskulturen wurden jeweils 1,5 ml entnommen und 5 min full speed zentrifugiert. Unter dem Einsatz von Silicagel-Säulchen wurden die Bakterien unter alkalischen Bedingungen lysiert und die chromosomale DNA von der Plasmid-DNA getrennt. Zur Abtrennung von Proteinen, RNA und Metaboliten wurde die Plasmid-DNA selektiv und unter hohen Salzkonzentrationen an eine Silicagel-Membran gebunden. Nach einem Waschschritt wurde sie mit H₂O bidest von dem Silicagel-Säulchen eluiert. Zur DNA-Präparation nach dieser Methode wurde das *QIAprep Spin Miniprep Kit* der Firma Qiagen verwendet.

Im Zuge der Klonierung von DNA-Fragmenten (siehe Abschnitt 2. 1. 12) wurden Minipräparationen zum Zwecke des analytischen Restriktionsverdau, d. h. zur Überprüfung der Anwesenheit bzw. richtigen Orientierung eines DNA-Fragments nach Ligation in einen Klonierungsvektor, durchgeführt. Dazu wurden typischerweise nach der Transformation des Ligationsproduktes 8 bis 12 Minipräparationen angefertigt und die gereinigte DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Aus einem Teil der Übernachtskultur desjenigen Minipreps, welches das korrekt ligierte Produkt enthielt, wurde wiederum eine Übernachtskultur für eine Midi- oder Maxipräparation (siehe Abschnitt 2. 1. 3) des Ligationsproduktes angesetzt. Auf diese Weise stand ein fertig ligiertes Produkt in ausreichend hoher Menge und Reinheit für eine Vielzahl weiterer Experimente zur Verfügung.

2. 1. 3 Präparation im großen Maßstab (Midi- oder Maxipräparation)

Die Plasmid-DNA wurde nach dem gleichen Prinzip wie bei den Minipräparationen gewonnen, nachdem die DNA zuvor in 30 ml (Midipräparation) oder 100 ml (Maxipräparation) Bakterien-Übernachtskultur amplifiziert worden war. Für die Reinigung kamen Anionenaustauschersäulen zur Anwendung. Hierbei wird die negativ geladene Plasmid-DNA an die positiv geladenen *DEAE*-Gruppen des Anionenaustauschers gebunden. Verunreinigungen wie RNA, Proteine oder Kohlenhydrate wurden mit einem Puffer

mittelstarker Salzkonzentration von der Säule gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde mit einem Hochsalzpuffer eluiert. Anschließend erfolgte die Fällung der Plasmid-DNA mit Isopropanol. Zum Schluss wurde das getrocknete, durch Waschen mit 70 %igem Ethanol von Salzen befreite DNA-Pellet in einem Volumen von 400-500 µl H₂O bidest aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Zur DNA-Präparation nach dieser Methode wurde das *QIAGEN Plasmid Midi Kit* bzw. *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* der Firma Qiagen verwendet.

2. 1. 4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) der gereinigten DNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum). Dazu wurde die DNA-Lösung um einen definierten Faktor mit H₂O bidest verdünnt, in eine Quarzküvette überführt, und die Extinktion dieser Lösung im Photometer gegen H₂O bidest gemessen. Aus dem Verhältnis der OD₂₆₀ nm und der OD₂₈₀ nm konnte außerdem eine Aussage über die Proteinkontamination in der Lösung getroffen werden (eine proteinfreie Nucleinsäurelösung weist typischerweise ein Verhältnis von 1,8-2,0 auf). Die Konzentration von Nucleinsäurelösungen errechnet sich nach:

$$c \text{ [}\mu\text{g/ml]} = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

c = Konzentration der DNA, V = Verdünnungsfaktor,
F = Multiplikationsfaktor (F = 50 für doppelsträngige DNA)

2. 1. 5 Transformation von Bakterien

Um Plasmid-DNA zu amplifizieren wird sie zuvor in Bakterien eingeschleust. Das Prinzip des Transformierens besteht darin, dass *E. coli*-Zellen hohen Konzentrationen bestimmter zweiwertiger Kationen ausgesetzt werden, so dass ein kleiner Anteil von ihnen für fremde DNA durchlässig wird (Lodish, Molekulare Zellbiologie, deGruyter 1996). Das eingeführte Plasmid trägt typischerweise ein Resistenzgen. In dieser Arbeit wurde ein Resistenzgen verwendet, welches für das Enzym β-Lactamase kodiert. Es ist in der Lage das Antibiotikum Ampicillin zu inaktivieren. Durch das Wachstum auf Antibiotikum-haltigem *LB*-Festmedium bei 37°C können nach Inkubation der *E. coli*-Zellen mit Plasmidvektoren diejenigen Zellen selektioniert werden, die das Plasmid mit dem Resistenzgen aufgenommen haben.

Bei der Transformation des verwendeten Bakterienstammes *E. coli DH5α* mit Plasmid-DNA wurden zu 100 µl kompetenter Bakterien 100 µl der Plasmid-DNA-Lösung gegeben und für

25 min auf Eis gestellt. Die Plasmid-DNA-Lösung wurde hergestellt, indem zu 20 µl 5x KCM-Puffer 0,1-0,5 ng Plasmid-DNA bzw. 5-10 µl Ligationslösung hinzugegeben und mit H₂O bidest auf 100 µl aufgefüllt wurde. Nach Inkubation auf Eis wurde die Bakterien/DNA Suspension auf 42°C für 2 min gehalten (Hitzeschock), auf Eis kurz abgekühlt, mit 500 µl LB-Medium versetzt und für 30 min auf 37°C gehalten. Anschließend wurden 0,5-1 ml (bei Ligationen) bzw. 0,1-0,2 ml (für Plasmid-Präparationen) der Bakteriensuspension auf eine LB-Agar-Platte mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2. 1. 6 Herstellung kompetenter Bakterien

Um Bakterienzellen für die DNA-Aufnahme empfänglich zu machen, wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml einer *E. coli DH5α*-Übernachtskultur beimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde anschließend bei 4°C 10-15 min zentrifugiert (1000 rpm), der Überstand verworfen und die Zellen in 50 ml eisgekühlter, frisch bereiteter 1x TSS- Lösung resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde aliquotiert (je 450 µl), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt. Die auf Eis aufgetauten Aliquots wurden für die Transformation (siehe Punkt 2. 1. 5) eingesetzt.

2. 1. 7 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente lassen sich elektrophoretisch in Agarosegelen auftrennen. Dazu wird eine Spannung an den Enden eines Agarosegels angelegt und auf diese Weise ein elektrisches Feld generiert, in dem die negativ geladenen DNA-Moleküle in Richtung der Anode wandern. Die Migrationsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle wird durch den Reibungswiderstand der Agarosegelmatrix beeinflusst. Größere Moleküle werden stärker gebremst als kleinere, so dass eine Auftrennung nach der Größe erfolgt. Dabei gilt, dass die Migrationsgeschwindigkeit eines linearen DNA-Moleküls umgekehrt proportional zum Logarithmus seines Molekulargewichtes ist (Helling, 1974). Das Molekulargewicht eines DNA-Fragments wird mit Hilfe eines Molekulargewichtsmarkers, in dem DNA-Fragmente definierter Größe enthalten sind, bestimmt. Dazu wird die Laufstrecke des DNA-Fragments mit den Laufstrecken der DNA-Moleküle des Molekulargewichtsmarkers verglichen.

Um DNA-Moleküle im Agarosegel detektieren zu können, wird dem Gel vor der Elektrophorese Ethidiumbromid zugesetzt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff schiebt sich zwischen die Basenpaare der DNA (Interkalation) und fluoresziert nach Bestrahlung mit UV-Licht (260-360 nm) im rot-orangen (560 nm) Spektralbereich (Lodish, Molekulare Zellbiologie,

1996). In der vorliegenden Arbeit wurde die Agarosegel-Elektrophorese eingesetzt, um DNA-Fragmente aufzutrennen, zu detektieren und durch Bestimmung ihres Molekulargewichtes zu identifizieren. Weiterhin wurde sie für die Anreinigung von DNA-Fragmenten eingesetzt, wobei die betreffenden Banden im UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem *QIAEX II Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen angereinigt wurden (siehe Abschnitt 2. 1. 1).

Zur Herstellung der Gele wurden 2,5 g Agarose in 250 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf Handwärme mit 4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Gellösung wurde anschließend in eine Gelwanne gegossen, mit Gelkämme versetzt und zum Auspolymerisieren belassen. Danach wurden die Kämme entfernt und die Gelkammer mit dem erstarrten Gel in eine Elektrophorese-Apparatur eingesetzt. Nach Bedecken mit 1x TAE-Elektrophoresepuffer wurde das Agarosegel mit den DNA-Probeflösungen sowie dem Molekulargewichtsmarker beladen. Die DNA-Probeflösungen wurden zuvor mit 6x-Probenpuffer gemischt (5 Teile Probeflösung + 1 Teil 6x-Probenpuffer) und in Volumina von 20-50 µl pro Geltasche appliziert. Der verwendete Molekulargewichtsmarker *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* der Firma Fermentas mit einer Konzentration von 0.1 mg DNA/ml wurde in einer Menge von 0.1 µg (1µl) per 1mm Geltaschen-Breite auf das Agarosegel appliziert. Mit der verwendeten Apparatur wurde die Elektrophorese bei einer Spannung von 180 V und einer maximal eingestellten Stromstärke von 400 mA durchgeführt. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte im UV-Transluminator bei einer Wellenlänge von 266 nm.

2. 1. 8 DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen spezifische palindromische Sequenzen von vier bis acht Basenpaaren doppelsträngiger DNA. Sie hydrolysieren die Phosphodiesterbindungen beider Stränge, wobei DNA-Moleküle mit definierten Enden entstehen, die sich zu Klonierungszwecken eignen. Für analytische Restriktionsspaltungen wurden 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt, für Restriktionsspaltungen im Zuge von Klonierungsexperimenten 2-5 µg. Die dabei eingesetzten Enzymmengen betragen in der Regel 5 Einheiten pro µg DNA. Die Reaktionen erfolgten in den von den jeweiligen Herstellern mitgelieferten Puffern und wurden gemäß den angegebenen Bedingungen (z. B. Inkubationstemperatur und -dauer) durchgeführt. In allen Fällen wurde darauf geachtet, dass die Menge des eingesetzten Enzyms 10 % des Reaktionsvolumens nicht überschreitet, da zu hohe Glycerinmengen zu unspezifischer Enzymaktivität führen können. Ein typischer Reaktionsansatz war wie folgt:

Komponente	Menge
DNA-Lösung	x µl (2 µg)
10x-Reaktionspuffer	4 µl
Restriktionsenzym	10 u
H2Obidest	ad 40 µl

Inkubationstemperatur: 37°C

Inkubationsdauer: über Nacht

Nach dem Restriktionsverdau wurde der Ansatz entweder sofort weiterbehandelt (Aufreinigung, diagnostischer Verdau, Klenow-Behandlung usw.) oder bei –20°C für eine spätere Verwendung eingefroren. In den Fällen, in denen die zu verdauende DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen behandelt werden musste, wurde zunächst mit einem der beiden Enzyme verdaut. Nach einer Phenol/Chloroform-Reinigung wurde die DNA anschließend mit dem zweiten Enzym gespalten. Der Aufreinigungsschritt konnte jedoch weggelassen werden, falls beide Enzyme in dem gleichen Reaktionspuffer eine ausreichend hohe Aktivität aufwiesen. In einem solchen Falle wurden beide Restriktionsenzyme (je 5 u/µg DNA) zu dem Reaktionsansatz gegeben.

2. 1. 9 Klenow- und T4 DNA-Polymerase

Das Klenowfragment aus der *E. coli* DNA-Polymerase I und die Bakteriophagen T4 DNA-Polymerase sind sich sehr ähnlich: beide Enzyme besitzen die 5' 3'-Polymeraseaktivität sowie die 3' 5' Exonukleaseaktivität. Die Exonukleaseaktivität der T4 DNA-Polymerase ist 200fach höher als die des Klenow-Fragments. Für die Generierung von glatten Enden aus 5'-Überhängen wurde die Klenow-Polymerase verwendet. Nach einem vollständigen Restriktionsverdau wurden zu dem Reaktionsansatz eine Einheit Enzym und 100 pmol Desoxynukleosid-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) hinzugefügt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Nach der Reaktion wurde die DNA einem Reinigungsschritt unterzogen (Abschnitt 2. 1. 1) oder bei –20°C aufbewahrt.

2. 1. 10 Dephosphorylierung von DNA

Um die Religation eines linearen Plasmidvektors mit kompatiblen Enden zu vermeiden und somit eine intermolekulare Ligation zwischen Vektor und DNA-Fragment zu begünstigen, wurden die 5'- Enden von Vektoren mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Nach einem Restriktionsverdau (und gegebenenfalls anschließender Klenow- oder T4-DNA Polymerasenbehandlung) wurde dem gereinigten Reaktionsansatz eine Einheit alkalischer

Phosphatase sowie 1/10 des Reaktionsvolumens 10x- Dephosphorylierungspuffer zugegeben und für 45 min bei 37°C inkubiert. Um bei der folgenden Ligation störende Enzymaktivitäten zu vermeiden, wurde nach der Dephosphorylierung ein Reinigungsschritt durchgeführt (Abschnitt 2. 1. 1).

2. 1. 11 Ligation von DNA-Molekülen

Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'- Phosphat- und einem 3'- Hydroxylende von linearen DNA-Molekülen. Sie vermag sowohl überstehende als auch glatte Enden miteinander zu verknüpfen. Für die intermolekulare Ligation wurden Vektor und Insert-DNA im molaren Verhältnis 1: 3 gemischt. Anschließend wurden 1 µl 10x- Ligationspuffer und eine Einheit T4 DNA-Ligase zugefügt und mit H₂O bidest auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Die Inkubation wurde bei 16°C über Nacht durchgeführt. Statt der T4 DNA Polymerase wurde in zunehmendem Maße das *DNA Ligation Kit* der Firma Takara Biochemicals für die Durchführung von Ligationen verwendet. Hierbei wurde zu der Vektor/Insert-DNA-Lösung ein gleiches Volumen an Takara Solution I gegeben und der Ansatz bei 16°C für 30 min inkubiert. Im Anschluss an die Ligationsreaktion wurde der Ansatz in *E. coli DH5α* transformiert (Abschnitt 2. 1. 5). Bei allen durchgeführten Ligationen wurden jeweils gleichzeitig Kontrollreaktionen durchgeführt, bei denen anstelle der Insert-DNA ein gleiches Volumen an H₂O bidest eingesetzt wurde. Auf diese Weise konnte eine Abschätzung über die Ligationsrate gemacht werden. Eine hohe Ligationsrate wurde erreicht, wenn nach der Transformation in *E. coli* die Anzahl der gewachsenen Kolonien auf der Ligationsplatte um den Faktor 3 höher war als auf der Kontroll- bzw. Religationsplatte.

2. 1. 12 Klonieren von DNA-Fragmenten

Unter dem Begriff Klonieren wird in der Gentechnologie der Einbau einer DNA-Sequenz in einen Klonierungsvektor und dessen massenhafte Vermehrung in geeigneten Wirtszellen, z.B. Bakterien, verstanden (Lodish, Molekulare Zellbiologie 1996). In dieser Arbeit wurden die im Abschnitt 3. 2 beschriebenen Fusionsplasmide mit Hilfe der Klonierungstechnik erzeugt. Dazu wurden die zu klonierenden DNA-Fragmente mit Hilfe von Restriktionsenzymen aus vorhandenen Plasmiden herausgeschnitten, gereinigt, in die entsprechenden Vektoren ligiert und in kompetente *E. coli DH5α*-Bakterien transformiert. Die verwendeten Klonierungsvektoren waren mit dem Ampicillin-Resistenzgen ausgestattet, so dass nach der Transformation eine Selektion in Ampicillin-haltigem LB-Medium in der Weise erfolgte, dass

sich nur diejenigen Bakterienzellen vermehren konnten, die das einklonierte DNA-Fragment aufgenommen hatten oder in denen der Klonierungsvektor zurückligierte, ohne das DNA-Fragment aufgenommen zu haben. Letztgenannte Reaktion ist unerwünscht, daher wird immer eine Vektorkontrolle mitgeführt, um die Anzahl Klone abschätzen zu können, in denen eine Selbstligation stattfand.

Als Beispiel einer Klonierung sei die Subklonierung der DR5-Sequenz in den pEF-Vektor FLAG_3×Gyrase zur Konstruktion des Fusionsplasmids FLAG_3×Gyrase_DR5 beschrieben:

1. Herausschneiden der vollständigen DR5-Sequenz aus dem Plasmid pBlueskript/ DR5 durch Restriktionsverdau (EcoRV/Kpn), danach Behandlung mit T4 DNA Polymerase. Anschließend Agarosegel-Elektrophorese und Reinigung des aus dem Gel herausgeschnittenen Inserts mittels QIAEX-II-Extraktion.

2. Restriktionsverdau (Xba) des pEF-Vektors FLAG_3×Gyrase , danach Behandlung mit T4 DNA Polymerase und Reinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit-Protokoll. Anschließend Dephosphorylierung und nochmalige Reinigung des Vektors mit dem QIAquick PCR Purification Kit-Protokoll.

3. Ligation des DR5-Inserts aus Punkt 1 in pEF_FLAG_3×Gyrase (aus Punkt 2) und Transformation in *E. coli* DH5 α . Nach Minipräparation und analytischem Restriktionsverdau erfolgt die Anreicherung des Ligationsproduktes mittels Maxipräparation.

2. 1. 13 Analyse von DNA-Sequenzen

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde nach der enzymatischen Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger, Proc Natl Acad Sci USA 1977) durchgeführt. Dazu wurde eine DNA Polymerase (AmpliTaq ® DNA Polymerase, FS, im DNA-Sequenzierungs-Kit der Firma Applied Biosystems enthalten) benutzt, um den Komplementärstrang des zu sequenzierenden DNA-Abschnittes herzustellen. Zur Synthese benutzt das Enzym Desoxy-nucleosid-triphosphate, die es an spezifische Primer anhängt. Da sich im Reaktionsansatz auch markierte 2' ,3'- Didesoxyanaloga befinden, nach deren Einbau die weitere DNA-Synthese gestoppt wird, werden Fragmente verschiedenster Länge produziert, die alle an ihrem 3'- Ende das markierte Didesoxyanalogon besitzen. Durch die anschließende Polyacrylamidgel-Elektrophorese werden die DNA-Moleküle aufgetrennt und

je nach verwendeter Markierung sichtbar gemacht. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Kit (ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, USA) wurde die Reaktion in Gegenwart von vier verschiedenen fluoreszenzmarkierten Didesoxyanaloga durchgeführt. Der Einsatz der thermostabilen DNA-Polymerase AmpliTaq® DNA Polymerase FS ermöglichte die Sequenzierreaktion nach der *Cycle-Sequencing*-Methode, die auf dem Prinzip der PCR beruht. Der Reaktionsansatz für die Sequenzierreaktion wurde auf Eis zusammen pipettiert und hatte folgende Zusammensetzung:

Komponente	Menge
DNA-Template	1 µg
5'-Primer	1 µl (50 pmol)
Dye Terminator Mix	8 µl
H ₂ O bidest	ad 20 µl

Der Reaktionsansatz wurde mit Mineralöl als Verdunstungsschutz überschichtet und in den DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer) gestellt. Am Gerät wurde ein fest eingestelltes Programm gewählt, womit für die Sequenzierungsreaktion 25 Zyklen mit folgendem Temperaturprofil durchlaufen werden konnten:

96°C 4 min
 96°C 30 s
 50°C 15 s
 60°C 4 min

Nach der Sequenzierreaktion wurde der Ansatz einer Ethanol-fällung unterworfen (Abschnitt 2. 1. 1). Das trockene DNA-Pellet wurde in 4 µl Probenpuffer (1 Volumenanteil EDTA/Dextran-blau- Lösung + 5 Volumenanteile Formamid) aufgenommen, für 2 min auf 90°C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt, um eine Renaturierung der DNA zu verhindern. Elektrophorese und Detektion: Die Elektrophorese in einem Polyacrylamidgel erlaubt, im Gegensatz zum Agarosegel, eine Auftrennung von Fragmenten mit extrem geringen Größenunterschieden. Unter denaturierenden Bedingungen wandern die DNA-Fragmente aus den Sequenzierreaktionen im elektrischen Feld unterschiedlich schnell und werden nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Herstellung des Polyacrylamidgels wurden in einem Becherglas 30 g Harnstoff, 22 ml H₂O bidest (LiChrosolv®, Merck), 10 ml 30 % Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung (29:1, Biorad) sowie 1 g Ionenaustauscher (Amberlite, Sigma) gegeben und bei 50°C gerührt, bis sich der Harnstoff gelöst hatte. Anschließend wurde der Ansatz durch einen Faltenfilter (Porengröße 0,2 µm) filtriert und zu dem Filtrat

wurden 6 ml 10x TBE-Puffer, 15 µl TEMED sowie 350 µl 10 %ige APS-Lösung hinzugegeben. Unmittelbar darauf wurde das Gel gegossen und für ca. 2 h zur Polymerisation stehengelassen. Die Elektrophorese und Detektion der fluoreszenz-markierten DNA-Fragmente erfolgten mit Hilfe eines Sequenzierautomaten (373 DNA Sequencer Stretch, Applied Biosystems), in dem das auspolymerisierte Gel eingespannt wurde. Nach einer Vorlaufphase, die der Überprüfung des Gels diente, wurde der Elektrophoresepuffer (10x TBE) in die Pufferkammern gefüllt und das Gel mit den zuvor auf Eis gestellten Proben beladen. Für die Durchführung der Elektrophorese wurden die gemäß Herstellerangaben notwendigen Einstellungen am Gerät vorgenommen. Die fluoreszenz-markierten DNA-Fragmente wurden detektiert, sobald sie eine bestimmte Stelle im Gel passierten und von einem Laserstrahl zum fluoreszieren angeregt wurden. Das emittierte Fluoreszenzlicht fiel auf einen Photomultiplier, der die Lichtimpulse in elektrische Impulse umwandelte. Diese Impulse wurden dann an einen Macintosh Computer zur Prozessierung weitergeleitet. Durch die integrierte Software wurden die Signale direkt in eine DNA-Sequenz umgesetzt. Die Sequenzanalyse am Sequenzierautomaten 373 DNA Sequencer Stretch (Applied Biosystems, USA) wurde eingesetzt, um die DNA-Sequenzen der Übergänge zwischen den Fusionsgenen im Expressionsvektor zu bestimmen und somit sicherzustellen, dass der Leserahmen erhalten bleibt.

2. 1. 14 Western-Blotting

Beim Western-Blotting oder Immuno-Blotting wird ein Proteingemisch zunächst in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei dissoziieren die Proteine durch die Wirkung der in der Probelösung sowie im Polyacrylamidgel enthaltenen *SDS*-Moleküle in ihre Untereinheiten und verlieren dabei ihre räumliche Struktur. Durch die Beladung mit *SDS* erhalten die Peptidketten eine stark negative Nettoladung, die die unterschiedlichen Eigenladungen kompensiert und umso stärker ist, je größer das Peptid ist. Bei der Elektrophorese werden diese *SDS*-beladenen Peptide nicht mehr nach Ladung, sondern nur noch nach Größe aufgetrennt. Im Anschluss an die Elektrophorese werden die Peptide durch eine senkrecht zum Gel angelegte Spannung auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Diese Membran wird mit einer Lösung eines ersten Antikörpers inkubiert, der spezifisch für das gesuchte Protein ist. Nach einem Wasch-Schritt wird die Membran anschließend mit einem enzymmarkierten zweiten Antikörper inkubiert, der spezifisch an den ersten Antikörper bindet. Durch den Enzymanteil des zweiten Antikörpers kann die Position der immobilisierten Proteine auf der Membran sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurde das an den

zweiten Antikörper gekoppelte Enzym Meerrettich-Peroxidase zur Detektion von Proteinen verwendet. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation des Substrates Luminol unter Beteiligung von Wasserstoffperoxid, welches dabei als Oxidationsmittel fungiert. Die Reaktion hat eine Lichtemission im sichtbaren Bereich (428 nm) zur Folge. Diese enzymkatalysierte Chemilumineszenz wurde ausgenutzt, um einen Film zu belichten und somit die Proteinbanden (nach einem Entwicklungs- und Fixierprozess) sichtbar zu machen. Zur Überprüfung der Expression der Fusionsplasmide wurden die nach Abschnitt 2. 3. 2 gewonnenen Lysate eingesetzt. Je 15 µl Lysat wurden mit 5 µl 4x Probenpuffer versetzt und für 5 min auf 96°C zur Denaturierung der Proteine erhitzt und vor dem Auftragen auf ein vertikales, 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel auf Eis gestellt. Das Gel wurde dabei nach folgendem Schema hergestellt (10 ml-Ansatz):

Komponente	Trenngel	Sammelgel
30 % Acrylamid/0,8 % Bis-Acrylamid-Lösung (37,5:1)	3,3 ml	0,6 ml
LGB (UGB)	2,5 ml	0,94 ml
H ₂ O bidest	4,2 ml	3,45 ml
TEMED	10 µl	7,5 µl
10 % APS	60 µl	17,5 µl

Nach dem Gießen und Auspolymerisieren des Trenn- und Sammelgels wurde das fertige Gel in die Elektrophoresekammer gestellt und 1x Laufpuffer hinzugegeben. Die Proben und der Molekulargewichtsmarker (je 5 µl) wurden appliziert und die Elektrophorese wurde gestartet. Dabei wurden für die Wanderung der Proteine durch das Gel folgende Einstellungen an der Stromquelle gewählt: Sammelgel: U = 130 V, I_{max} = 400 mA; Trenngel: U = 180 V, I_{max} = 400 mA. Der Lauf wurde abgebrochen, nachdem die Bromphenolblau-Bande das untere Ende des Gels erreicht hatte. Das Gel und die Nitrocellulosemembran wurden nach der *SDS-PAGE*-Gelelektrophorese für einige Minuten in 1x Transferpuffer (+ 20 % Methanol) äquilibriert, während die Blotkammer vorbereitet wurde. Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran (blotting) erfolgte in 1x Transferpuffer (+ 20 % Methanol) unter Kühlung bei 100 Volt und 400 mA (maximal eingestellter Wert) für 1½ h. Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrocellulosemembran in Blockierlösung für 1 h inkubiert. Danach wurde die Blockierlösung verworfen und der Blot mit dem ersten Antikörper (*Anti-Flag*, 1:1000 in Blockierlösung verdünnt) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde anschließend in Waschpuffer für 10 min inkubiert, wobei der Waschpuffer mehrmals

ausgetauscht wurde. Der Blot wurde dann mit dem zweiten Antikörper (*GaM*, 1:2000 in Blockierlösung verdünnt) für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 30 min in Waschpuffer inkubiert, wobei der Waschpuffer mehrmals ausgetauscht wurde. Danach wurde die Membran unter Zugabe von je 1 ml Luminol- und Oxidations-Reagenz (aus dem *Chemiluminescence Reagent-Kit* der Firma NEN, USA) in eine Klarsichtfolie eingewickelt und in einem Dunkelraum auf den Chemilumineszenz- Film gelegt. Daraufhin folgte die Filmentwicklung.

2. 1. 15 Allgemeine Zellkulturtechnik

Die Zellen der Zelllinien HL60 (myeloide menschliche Zellen, Medium *Click*) und 293-T (embryonale Nierenfibroblasten, Medium *DMEM*) wurden in Brutschränken bei 7 % CO₂, 37°C und einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre inkubiert. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten in Sterilbänken. Spätestens bei Erreichen der Konfluenz (100 %) wurden die Zellen passagiert und mit frischem Medium versorgt. Zur Lagerung wurden die Zellen in *FKS* supplementiert, mit 10 % *DMSO* aufgenommen und für 2 h bei -20°C aufbewahrt. Danach wurden sie in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt und dort gelagert. Zellzahlen wurden mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

2. 1. 16 Zellextraktion

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 anschließendem Vortexen für 10 sec, 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)

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. Die Inkubation auf Eis für 15-30 min 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)

Proteinbestimmung in Extrakten

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

2. 2 Transfektion von DNA in Zellen

2. 2. 1 Elektroporation

Eine Methode zur stabilen Transfektion der Zellen ist die Elektroporation. Bei diesem Verfahren werden die Zellen nach einem kurzen elektrischen Schock von einigen tausend Volt vorübergehend für DNA durchlässig. Dabei entstehen kurzzeitig Löcher in der Zellmembran, durch die die DNA in die Zellen gelangen kann, bevor sich die Löcher wieder schließen (Lodish, Molekulare Zellbiologie, 1996). Mit Hilfe des Elektroporationsgerätes wurde an die Elektroden der Küvette ein Spannungsimpuls von 0,23 Volt angelegt. Der Spannungsimpuls wurde dabei von einem Kondensator mit einer Kapazität von 960 Mikrofarad generiert.

Für eine Transfektion sind jeweils 5 Millionen Zellen und 20 µg DNA verwendet worden. Dabei wurden je 400 µl resuspendiertes Zellpellet und 20 µg DNA in einer Küvette elektroporiert. Nach 10 min Ruhepause wurde die Zellsuspension in 5 ml Medium aufgenommen, bei 1500 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet mit 3 ml Medium resuspendiert und anschließend in eine Zellkulturschale mit 7 ml Medium überführt.

Nach 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C wurden die Zellen lysiert (mit *S100* 192 µl + 8 µl *PI* + 0.4 µl *DTT* = gesamt 200 µl). Davon sind je 15 µl Zellysate mit 5 µl 4x Probenpuffer pro Spur auf ein 10 % SDS- Gel aufgetragen worden (siehe Abschnitt 2. 1. 14).

Für die Überprüfung der Dimerisierung der Fusionproteine nach Abschnitt 2. 3. 2 sowie für die anschließenden funktionellen Experimente zur Untersuchung der Apoptose (siehe Abschnitte 2. 3. 1; 2. 3. 3 und 2. 3. 4) wurden Zellen mit den entsprechenden Expressionsvektoren (siehe Abschnitt 3. 2, Abb.: 9) transfiziert. Dazu wurden Zellkulturen der in Abschnitt 2. 4. 15 genannten Zelllinien zunächst solange in Kultur gehalten, bis sie eine Konfluenz von 60-80 % aufwiesen. Bei den adherenten 293T-Zellen wurde pro 150 mm-Zellkulturschale, nach Absaugen des Mediums, vorsichtig 5 ml PBS-Lösung auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde das PBS abgesaugt und durch je 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung ersetzt. Die mit Trypsin behandelten Zellen wurden dann für einige Minuten in den Brutschrank gestellt. Während dieser Zeit lösten sich die Zellen vom Boden der Zellkulturplatten. Anschließend wurden die Zellsuspensionen zusammengeführt, in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, bei 1500 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und in 10-20 ml Medium resuspendiert. Bei den nicht adherenten HL60 erübrigte sich der Schritt mit Trypsin, hier wurden die Zellen nur mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Nach Bestimmung der Zellkonzentration mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurde die für die Transfektionen benötigte Anzahl an Zellen aus der Suspension entnommen und erneut zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde danach in einem definierten Volumen Medium aufgenommen. Das Gesamtvolumen des Mediums richtete sich nach der Anzahl der Transfektionen, wobei je Transfektionsansatz 5×10^6 Zellen (für den Expressionsnachweis) in einem Volumen von 400 µl eingesetzt wurden.

2. 2. 2 Calcium-Phosphat-vermittelte Transfektion

Für die transiente Transfektion wurde eine chemische Methode mit Calciumphosphat verwendet. Die Effektivität einer Calciumphosphat-Transfektion hängt von der DNA-Menge im Präzipitat ab und der Zeit mit der die Präzipitate auf den Zellen belassen werden. In dieser Arbeit wurden adherent-wachsende 293T-Zellen je nach Experimentansatz (siehe Schema unten) transfiziert. Die Transfektion erfolgte unter sterilen Bedingungen. Während der Inhalt des 2. Reaktionsgefäßes (Eppi = Eppendorf- Reaktionsgefäß) auf einem Vortexer gleichmäßig geschüttelt wurde, ist der Inhalt des 1. Eppis langsam mit der Pipette hinzuge tropft worden. Im Anschluss daran wurde das gesamte Gemisch mittels Pipette auf eine Zellkulturschale mit

dem entsprechenden Medium verteilt, kurz geschwenkt und für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Im Lichtmikroskop waren die Präzipitate sichtbar.

Zellzahl:	4 Mill.	2 Mill.	500 000	250 000
Well.:	groß	mittel	6 -	12 -
Vol.:	20 ml	10 ml	2 ml	1 ml
DNA.:	20 µg	10 µg	2.5 µg	1.25 µg
Epi 1:	125 µl CaCl 1000 µl H ₂ O	62,5 µl CaCl 500 µl H ₂ O	15,62 µl CaCl 125 µl H ₂ O	7,8 µl CaCl 62,5 µl H ₂ O
Epi 2:	1000 µl 2HBS	500 µl 2HBS	125 µl 2HBS	62,5 µl 2HBS

2. 3 Spezielle Methoden der Molekularbiologie

2. 3. 1 β-Galactosidase Färbung

Das Reporter- Gen *CMV- lacZ*, kodiert für das Enzym β-Galactosidase. Dieses Enzym ist histologisch sehr leicht nachzuweisen durch Hinzufügen des Substrats *X-gal* (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid), welches durch den enzymatischen Abbau in einen blauen Niederschlag umgewandelt wird. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um das Verhältnis apoptotischer zu vitaler Zellen nach der Transfektion mit den Fusionsplasmiden im Mikroskop sichtbar zu machen. Hierzu sind jeweils 200 000 293 T Zellen neben den Expressionsvektoren (siehe Abschnitt 3. 2, Abb.: 9) mit dem Reporter- Gen *CMV- lacZ* in einem DNA- Konzentrationsverhältnis von 4:1 kotransfiziert worden (2µg:0,5µg). Einen Tag nach der Transfektion wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit je 1 ml PBS gewaschen und anschließend 5 min bei Raumtemperatur fixiert (Fixierlösung siehe unten.). Danach wurde die Fixierlösung abgesaugt, die Zellen erneut vorsichtig mit PBS gewaschen und schließlich die Färbelösung (siehe unten) je 1 ml hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C 1h-24h je nach Färbeverhalten. Im Mikroskop wurde das Verhältnis zwischen den blauen, apoptotischen Zellen und den nicht-angefärbten, vitalen Zellen ausgezählt.

Fixierlösung:

ad PBS
0,2 % Glutaraldehyd
5 mM EGTA (MG: 380,4)
5 mM MgCl (MG: 203,1)

Färbelösung:

ad PBS
5 mM EGTA (MG: 380,4)
5 mM MgCl (MG: 203,1)
10 mM K₃ [Fe(CN)] (MG: 329,2)
10 mM K₄ [Fe(CN)] (MG: 422,4)
0,5 mg X-Gal

2. 3. 2 Dimerisierung mit Coumermycin und Kreuzvernetzung (Crosslinker-Assay)

Für die experimentell induzierte Dimerisierung der Fusionsproteine wurde die Chemikalie Coumermycin eingesetzt. Coumermycin besitzt zwei Bindungsstellen für Gyrase und stellt damit eine Möglichkeit dar, um zwei Fusionsproteine (wie z.B. zwei Moleküle FADD_1×Gyrase) zu dimerisieren. Die anschließende Kreuzvernetzung der Proteine dient der Überprüfung, ob die Dimerisierung durch Coumermycin stattgefunden hat und der Sichtbarmachung der Proteinkomplexe im Westernblot. Die kreuzvernetzenden Reagenzien sind nur in der Lage Proteine zu vernetzen, die bereits nah genug miteinander fusioniert sind (wie in diesem Fall durch Coumermycin).

Verwendung fanden die nicht-membrangängige, kreuzvernetzende Chemikalie *BS3* und die membrangängige Form *DSS*. Bei der Verwendung von *BS3* wurden die Zellen einen Tag nach der Transfektion mit *NP40* (siehe Abschnitt 2. 1. 16) lysiert. Diese Zellysate wurden auf zehn Eppendorf-Reagenzgefäße verteilt, bei einem Reaktionsansatz von je 40 µl. Anschließend wurde Coumermycin für die Dimerisierungsreaktion der Fusionsproteine je nach Verdünnungsreihe hinzugegeben (siehe unten). Dabei wurden je zwei Eppendorf-Gefäße mit 0.1 µM Coumermycin, zwei mit 0.3 µM, zwei mit 1 µM und zwei mit 3 µM vermischt und zwei davon blieben unbehandelt. Nach einer Inkubationszeit von 1h bei 30 °C erhielten fünf Eppendorf-Gefäße je 4 µl *BS3*-Zitronensäure Gemisch (siehe unten) bei einer Endmolarität zwischen 1-2 mM. Die anderen fünf Eppendorf-Gefäße verblieben ohne kreuzvernetzende Reagenz zur Kontrolle. Nach 30 min Raumtemperatur erfolgte ein Reaktionsstop mit je 1µl eines 1 Molaren *TRIS*-Puffers (pH 7,5). Dabei stoppt *TRIS* die kreuzvernetzende Reaktion. Nach weiteren 15 min bei Raumtemperatur erfolgte die Auftragung von je 20 µl Zellysate im Westernblot.

Bei Verwendung der zellpermeablen, kreuzvernetzenden Chemikalie *DSS* wurde von den Zellen einen Tag nach der Transfektion mit den Expressionsvektoren (je 500 000 Zellen; 2,5

μg DNA) das Medium abgesaugt, die Zellen mit *PBS* gewaschen, zentrifugiert (1600rpm/5min), das Zellpellet mit Medium resuspendiert und die Zellen auf eine 12-Well-Platte aufgeteilt (40 000 Zellen pro Well, in je 1 ml Medium). Anschließend wurden die Zellen 2-3 Stunden mit Coumermycin anhand der Verdünnungsreihe (siehe unten) inkubiert. Wie bei der Verwendung von BS3 erhielten von 10 Well jeweils 5 Coumermycin von 0-3 μM . Danach wurde das Medium abgesaugt, das *DSS-DMSO*-Gemisch (siehe unten) bei der Hälfte in einem Verhältnis von 1:10 (pro Well 4 μl Crosslinker + 40 μl *PBS*) hinzupipetiert. Die andere Hälfte verblieb wieder ohne kreuzvernetzende Reagenz. Nach 30 min Raumtemperatur erfolgte ein Reaktionsstop mit je 1 μl eines 1 Molaren *TRIS*-Puffers (pH 7,5). Nach weiteren 15 min bei Raumtemperatur wurden von den Zellen *NP40* - Zellextrakte hergestellt und je 20 μl Zelllysate (incl. 4 \times Laufpuffer) im Westernblot aufgetragen.

Verdünnungsreihe Coumermycin 10mM:

→ 1:1000	→ 10 μM	(1 μl Coum. + 999 μl Medium)
	→ 1:3,3	→ 3 μM
	→ 1:10	→ 1 μM
	→ 1:33,3	→ 0,3 μM
	→ 1:100	→ 0,1 μM

Berechnung der kreuzvernetzenden Reagenzlösungen:

20 mM **BS3** → 87,33 $\mu\text{l}/\text{mg} \times \dots \text{mg}$ (abgewogene Menge des Crosslinkers)
 = Menge in μl an Zitronensäure (=5 mM bei pH 5,0), die mit der abgewogenen Menge an Crosslinkers vermischt wird

20 mM **DSS** → 135,7 $\mu\text{l}/\text{mg} \times \dots \text{mg}$ (abgewogene Menge des Crosslinkers)
 = Menge in μl an *DMSO* (=5 mM)

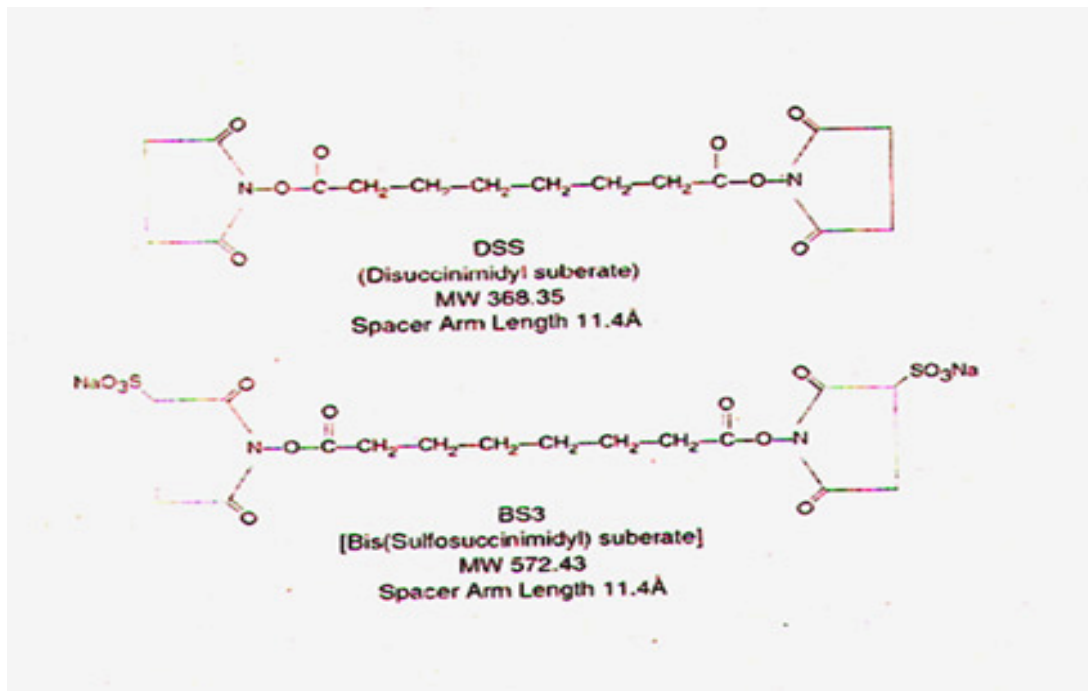


Abb.: 6 Molekularstruktur der kreuzvernetzenden Reagenzien DSS und BS3
 (Bild aus der Bedienungsanleitung nach Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)

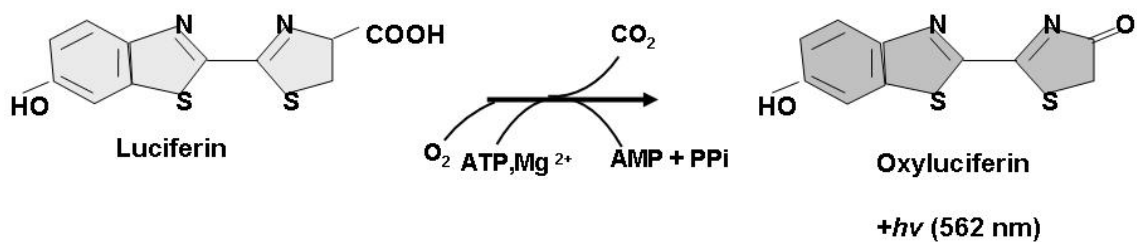
DSS ist ein nicht wasserlöslicher, homobifunktionaler N-Hydroxysuccinimide-Ester (NHS- Ester); BS3 ist das wasserlösliche Analogon. NHS- Ester reagieren vor allem mit primären Aminen. α - Amino- gruppen, die für eine Reaktion mit den Estern zugänglich sind, befinden sich an den N-Termini von Peptiden und Proteinen. Da jedoch α -Amine selten an einem Protein verfügbar sind, rückt die Reaktion mit den Seitenketten der Aminosäuren in den Vordergrund. Obwohl fünf Aminosäuren Stickstoff in ihren Seitenketten aufweisen, reagieren nur die ϵ - Amine von Lysin signifikant mit den NHS- Estern. NHS- Ester gehen eine kovalente Amid-Bindung mit den primären Aminen ein, unter Freigabe von N- Hydroxysuccinimide. MW = *Molecular Weight* (Molekulargewicht).

2. 3. 3 Luciferase Reporter-System

Um den Einfluss der Dimerisierung der Fusionsproteine auf das Zellüberleben zu untersuchen wurde eine weitere Methode eingesetzt, die als Reporter-System oder Reporter-Assay bezeichnet wird. Diese Methode wird zur Messung der Regulation von Genen in Zellen verwendet. Das Reporterplasmid besteht aus einem Promotor und dem eigentlichen Reporter, der für das Enzym Luciferase des Glühwürmchens kodiert. Die Aktivität des Promotors korreliert direkt mit der Expression der Luciferase, die wiederum sehr sensitiv nachgewiesen werden kann. Damit kann in diesem System der Einfluss experimentell applizierter Manipulationen (wie hier die Dimerisierung von proapoptischen Molekülen) auf die Aktivität des Promotors untersucht werden. Das Reporterplasmid wurde zusammen mit den Expressionsvektoren in menschliche Zellen eingeführt (293T). In den transfizierten Zellen

konnten die exprimierten Fusionsproteine DR5_DD_Gyr1x_Flag und Gyr1x_FADD_Flag, sofern sie durch die Dimerisierung einen Einfluss auf das Zellüberleben (Auslösung der Apoptose) hatten, die Transkription des Luciferase-Gens hemmen. In den Lysaten der transfizierten Zellen wurde die Reporterogenaktivität gemessen.

Der Messung der Reporterogenaktivität liegt die durch Luciferase katalysierte Umsetzung von Luciferin zugrunde. Dabei tritt das Phänomen der Biolumineszenz auf, welches für die Messung ausgenutzt wird. In Gegenwart von Luftsauerstoff wird das Substrat Luciferin in einer ATP- abhängigen Reaktion und in Gegenwart von Mg^{2+} - Ionen zu Oxyluciferin oxidiert, wobei eine Lichtemission erfolgt (durch Zerfall eines 1,2- Dioxetans, das als Zwischenprodukt auftritt und zu Oxyluciferin und CO_2 zerfällt). Diese Lichtemission ist proportional zur Luciferase-Konzentration, welche wiederum proportional zur Aktivität des vorgeschalteten Promoters ist. Die durch die Luciferase katalysierte Reaktion kann folgendermaßen zusammengefasst werden (nach Ibelgaufts, 1993 und Vollhardt, 1990):



Die Lichtemission wurde mit Hilfe eines Luminometers gemessen, wobei die auf einen Photomultiplier auftreffenden Photonen in Elektronen umgewandelt und als Einzelimpulse verstärkt wurden. Ein Computer zählte die Impulse, deren Gesamtzahl direkt der emittierten Lichtmenge – und somit indirekt der Enzymkonzentration – proportional war.

Jeweils 5 Mill. Zellen wurden mit 4 µg pef-Luzi-Max + 16 µg Gyr1x_FADD_Flag (bzw. DR5_DD_Gyr1x_Flag oder Kontrollvektor pEF-SEM) durch Elektroporation (siehe Abschnitt 2. 2. 1) transfiziert, danach in einer Zellkulturplatte (24 Well) aufgeteilt (je 25 000 Zellen in 0,5 ml DMEM pro Well) und jeweils mit Coumermycin (0, 0.1, 0.3, 1, 3 µM) vermischt. Nach 24 h im Brutschrank bei 37 °C wurde das Medium abgesaugt die Zellen kurz mit je 0,5 ml PBS pro Well bedeckt, wieder abgesaugt und anschließend mit je 100 µl 1x-Lysepuffer (Promega, USA) versetzt. Die Ansätze wurden für 10 min bei Raumtemperatur stengelassen. Die lysierten Zellen wurden danach in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und bei -70°C für mindestens 1 h eingefroren. Nach dem Auftauen der Ansätze auf Raumtemperatur wurden diese für 5 min (13000 rpm, RT) zentrifugiert. Vom Überstand wurden jeweils 20 µl Zellysate in ein 5 ml Rundbodenröhrchen überführt, in die Probenaufnahmevorrichtung des Luminometers gestellt und die Messung wurde per Knopfdruck gestartet. Dabei wurde in die Probelösung 100 µl Substrat-Lösung (aus dem *Luciferase Assay System-Kit* der Firma Promega) injiziert und die Lichtmenge der Reaktion bei einer eingestellten Messzeit von 10 Sekunden gemessen. Als Maßeinheit für die gemessenen Lichtimpulse wurden die so genannten relativen Lichteinheiten (RLU = „*Relative Light Units*“) gewählt. Diese entstanden durch Division der direkt gezählten Impulse durch den Faktor zehn.

2. 3. 4 Durchflusszytometrie (FACS = „*Fluorescende- Activated Cell Sorter*“)

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, um Zellen bezüglich ihrer Größe und der Quantität ihrer granulären Strukturen innerhalb der Zellen im so genannten Durchflusszytometer beurteilen zu können. Das Flüssigkeitssystem führt die zu analysierenden Zellen aus dem Probenröhrchen durch den Laserstrahl. Dazu wird der Probenstrahl von einem Hüllstrom (*Sheath Fluid*) zu einem sehr dünnen Flüssigkeitsfaden auseinander gezogen. Das von der Zelle in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht wird vom *FSC*-Detektor (*Forward Scatter* = Zellgröße), das Seitwärtsstreulicht (*SSC, Side Scatter* = Menge granulärer Strukturen in der Zelle) und verschiedene Fluoreszenzfarben rechtwinklig zum Laserstrahl aufgenommen und durch ein Objektivsystem, verschiedene Farbfilter und Teilerspiegel auf die verschiedenen Detektoren gelenkt. Die Signale der Photomultiplier werden verstärkt und können im Computer ausgewertet und dargestellt werden. Um damit das Verhältnis apoptotischer zu vitaler Zellen nach Transfektion der Zellen mit den Fusionsplasmiden und der Inkubation mit Coumermycin zu messen, sind die Zellen (ca. 250

000) in 500 µl Medium für 2 min bei 1500 rpm zentrifugiert wurden. Das Zellpellet mit 500 µl *PBS* resuspendiert und wiederum für 2 min bei 1500 rpm zentrifugiert wurden. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl 70 % igem Ethanol für 30 min bei Raumtemperatur fixiert (bzw. über Nacht bei -20°C). Danach wurden die Zellen wieder mit 500 µl *PBS* gewaschen und für 2 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 400 µl Propidium-Jodid-*PBS*-Gemisch aufgenommen. Wobei das Verhältnis des Gemisches (*PI:PBS*) 1:40 betrug. Diese 400 µl wurden in speziell für das Durchflusszytometrie-Gerät vorgesehene Proberöhrchen überführt und gemessen.

2. 4 Materialien

2. 4. 1 Antikörper

<i>Name</i>	<i>Herkunft</i>	<i>spezifisch für</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-FLAG® M2 Antibody	Maus	Monoklonaler IgG ₁ -Antikörper gegen FLAG-Epitop gerichtet	Erst-Antikörper zur Detektion der Fusions- plasmide im Western- Blot	Sigma-Aldrich Steinheim
Anti-Rabbit IgG	Ziege	Anti-Kaninchen Antikörper, Meerrettich-Peroxidase- gekoppelt	Zweit-Antikörper im Western-Blot	Sigma-Aldrich Steinheim
Cy3™- conjugated Goat Anti- Mouse IgG	Ziege	Anti-Maus- Antikörper, Cy3-gekoppelt	FACS-Färbung und Fluoreszenzmikros- kopie	Dianova, Hamburg

2. 4. 2 Bakterien

Für sämtliche Arbeiten zur Amplifikation von Plasmidvektoren wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH5α verwendet. Die Bakterien wurden bei 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).

<i>Stamm</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Hersteller</i>
DH5α	<i>E. coli</i> FO- recA1 endA1 hsdR17 (rK-,mK+), Δ (lacZYA-argF)U169F80d lacZDM15 supE44 thi-1 gyrA96 relA1	Life Technologies

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

Bakterien-Selektivmedien

LB-Amp-Platten: 100 µg/ml Ampicillin (Zugabe erfolgte nach Abkühlen auf <55°C)

2. 4. 3 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
Albumin, Bovine (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Click/RPMI-Trockenmedium	Biochrom, Berlin
Deoxynucleotide (dATP, dCTP, cGTP, dTTP)	Boehringer/Roche, Mannheim
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka, Neu-Ulm
DMEM-Trockenmedium	Biochrom, Berlin
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
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
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
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
HEPES	Biochrom, Berlin
IPTG (Isopropylthiogalactosid)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
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
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
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phenol Rotipuran	Roth, Karlsruhe
5x Reporter Lysepuffer	Promega, Madison, WI, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure 25 %	Roth, Karlsruhe
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
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 % w/v)	Biochrom, Berlin
Tween 20 (Polyethylensorbitan Monolaureat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Vancomycin	Sigma, Deisenhofen
X-Galaktopyranosid (X-Gal)	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

2. 4. 4 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,

Taq Polymerase
T4 DNA Polymerase

MBI Fermentas, Wilna, Litauen
Eigene Herstellung (*E. coli*)
MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.4.5 Expressionsplasmide

In diesen Konstrukten steht die Expression des jeweiligen Proteins unter der Kontrolle des in Säugetierzellen konstitutiv aktiven Elongationsfaktor (EF)-Promoters.

<i>Plasmid</i>	<i>Exprimiertes Protein</i>	<i>Referenz</i>
pEF-FLAG/Gyr-DR5	1×Gyr-DR5 /FLAG-Fusionsprotein (FLAG-Tag ist C-terminal)	Eigene Herstellung
pEF-FLAG /3×Gyr-DR5	3×Gyr-DR5 /FLAG-Fusionsprotein (FLAG-Tag ist C-terminal)	Eigene Herstellung
pEF-FLAG/FADD-DED-Gyr	FADD-DED-Gyr /FLAG-Fusionsprotein (FLAG-Tag ist N-terminal)	Eigene Herstellung

2.4.6 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Autoklav	S-ECZ	Wolf Sanoclav, Geislingen
Blotkammer	Mini Trans-Blot Cell Criterion Blotter	Bio-Rad, München
Brutschränke: Hefen und Bakterien Zellen	WB 300 BB 6220	Mytron, Heiligenstadt Heraeus, Hanau
Durchflußcytometer FACS	FACS-Calibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Elektrophoresekammern: Agarose-Gele	Max Submarine Unit HE99X	Hoefer, San Francisco, CA, USA
SDS-PAGE-Gele	Mighty Small SE260 Mini-vertical Unit	Hoefer, San Francisco, CA, USA
Elektroporationsapparat	Gene Pulser	Bio-Rad, München
Konfokales Mikroskop	Axiovert 100 M Laser Scanning Microscope	Zeiss, Jena
Lichtmikroskope	ID203, Axiovert 100	Zeiss, Jena
Luminometer	Lumat LB9507	EG&G Berthold, Bad Wildbad
Photometer	4054 Ultrospec Plus	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

Spannungsquellen: Agarosegelelektrophorese	PS500XT DC Power Supply	Hoefer, San Francisco, CA, USA
SDS-PAGE-Gelelektrophorese	EPS 1001	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Sterilwerkbank	HERAsafe HSP 18	Heraeus, Hanau
UV-Transluminator	Eagle Eye™ II - Still Video System	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Zentrifugen: Tischzentrifugen	Centrifuge 5415C (RT) Biofuge 15 R (4 °C) Biofuge fresco (4 °C) Omnifuge 2.ORS (RT)	Eppendorf Heraeus, Hanau Heraeus, Hanau Heraeus, Hanau
Großzentrifugen	Megafuge 1.0 R (4 °C) Sorvall RC 26 Plus (4 °C)	Heraeus, Hanau Du Pont, Newton, CT, USA

2. 4. 7 Kreuzvernetzende Chemikalien („Crosslinker“)

Name	chemische Bezeichnung	Hersteller
DSS	Disuccinimidyl-suberat, Thiol-spaltbar	Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA
BS ³	Bis(Sulfosuccinimidyl)-suberat	Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA

2. 4. 8 Lösungen, Stammlösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden mit H₂O bidest angesetzt. Wenn ein anderes Lösungsmittel als Wasser verwendet wurde oder wenn zusätzlich steril filtriert wurde, ist dies entsprechend vermerkt. Puffer, die in gebrauchsfertigem Zustand, als Trockenmischung oder als Stammlösung von den entsprechenden Firmen bezogen wurden, werden gesondert aufgeführt.

Verwendung	Zusammensetzung
Agarosegelelektrophorese	
6x Probenpuffer (DNA)	40 % (w/v) Saccharose, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
50x TAE	2 M Tris, 1 M Eisessig, 0,05 M EDTA (pH 8,0)
Western-Blot	
Ammoniumpersulfatlösung	10 % (w/v) APS
Blockierlösung	5 % (w/v) Magermilchpulver, 0,1 % (v/v) Tween 20
5x Laufpuffer	125 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,25 M Glycin, 0,5 % (w/v) SDS
4x Probenpuffer	200 mM Tris-HCl (pH 6,8), 400 mM DTT, 8 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerol, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
SDS-Stammlösung	10 % (w/v) SDS
2x Transferpuffer	96 mM Tris-HCl (pH 8,0), 78 mM Glycin, 0,074 % (w/v) SDS

1,5 M Tris-HCl Waschpuffer	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 65 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20
-------------------------------	---

Sonstige Lösungen

Kompetente Bakterien:

1 x TSS	10 % (w/v) PEG-4000, 5 % (v/v) DMSO, 50 mM MgCl (pH 6,5), in LB, sterilfiltriert
Glycerol, 10 %ig	10 % (v/v) Glycerol
Ampicillin-Stammlösung	5 % (w/v) Ampicillin, sterilfiltriert
Ethanol, 70 %ig	70 % (v/v) Ethanol
Na-Acetat-Lösung	3 M Na-Acetat, pH 4,8
X-Gal-Stammlösung	4 % (w/v) X-Gal (in DMF), sterilfiltriert

Plasmidpräparationen

(Minipräparationen):

Lösung I	50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0),
Lösung II	0,2 N NaOH, 1 % (w/v) SDS, frisch hergestellt
Lösung III	3 M K-Acetat, 11,5 % (v/v) Eisessig

Transformation von *E. coli*:

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

2. 4. 9 Medien

Verwendung	Zusammensetzung
<i>Zellkultur:</i>	
Click's RPMI 1640	Trockenmedium Click/RPMI 1640 (1:1, w L-Glutamin, w/o NaHCO ₃) der Firma Biochrom, supplementiert mit: 1,175 g/l NaHCO ₃ 2,383 g /l HEPES; pH 7,2 10 % (v/v) FCS 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin/ Streptomycin-Lösung
DMEM	Trockenmedium Dulbecco's MEM (w D-Glucose, w L-Glutamin, w/o NaHCO ₃ , w/o Na-Pyruvat) der Firma Biochrom, supplementiert mit: 3,7 g/l NaHCO ₃ ; pH 7,2 10 % (v/v) FCS 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin/ Streptomycin-Lösung
Alle Medien wurden sterilfiltriert.	
<i>Zusatzstoffe/Antibiotika:</i>	
Fetales Kälberserum (FCS)	(Biochrom, Berlin): Komplement wurde 60 min. bei 56 °C inaktiviert.
L-Glutamin	(Biochrom, Berlin)
Penicillin/Streptomycin	(Biochrom, Berlin): (10.000 U/10000 µg/ml)
Trypsin/EDTA-Lösung	(Biochrom, Berlin): (0,25 % / 0,02 % (w/v) in PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺)

2. 4. 10 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. 4. 11 Plasmide/Vektoren

<i>Name</i>	<i>Eigenschaften</i>	<i>Insert-DNA</i>	<i>Referenz</i>
pBluescript/DR5	Ausgangsplasmid für die Klonierung des Fusionsplasmid pEF-FLAG /3×Gyr-DR5	Kodierende Region des DR5-Gens	Deutsches Ressourcen Zentrum für Genomforsch.
pEF-FLAG/3×Gyr	Ausgangsplasmid für die Klonierung des Fusionsplasmid pEF-FLAG /3×Gyr-DR5		Institut für Mikrobio. und Immunologie TUM,München
pQE60/FADD-DED-Gyr	Ausgangsplasmid für die Klonierung des Fusionsplasmid pEF-FLAG/FADD-DED-Gyr	Kodierende Region FADD-DED-Gyr	Institut für Mikrobio. und Immunologie TUM,München
pEF-FLAG (mit Puromycinkassette)	Ausgangsplasmid für die Klonierung des Fusionsplasmid pEF-FLAG/FADD-DED-Gyr		Dr. David Huang, WEHI, Melbourne
pEFSem (Derivat von pEFBos mit Puromycin-Kassette)	Transfektionskontrolle für Expressionsexperimente		Dr. Hans Häcker TUM,München

2. 4. 12 Sonstige Materialien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Zellkulturartikel:	
Falcon® Zellkulturschalen Integrid™ 150 x 25 mm	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Falcon® Zellkulturschalen 100 x 20 mm	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Falcon® Zellkulturplatten Multiwell™, 6- bzw.12-Well	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Neubauer Zählkammer	Merck, Darmstadt
Sonstige Materialien:	
Gene Pulser® Elektroporationsküvetten, 0,4 cm Elektrodenabstand	Biorad, Hercules, CA, USA

2. 4. 13 Systeme

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Kits zur DNA-Aufreinigung:	
QIAGEN Plasmid Midi, Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAEX II Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
Sonstige Kits:	
DNA Ligation Kit	Takara Biochemicals, Berkeley, CA, USA
DNA-Sequenzierungs-Kit:	
ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Luciferase Assay System	Promega, Madison, WI, USA

2. 4. 14 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
Whatman Papier	Schleicher & Schüll, Dassel

2. 4. 15 Zelllinien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Bezugsquelle</i>
293T	Fibroblasten, humane embryonale Nierenepithelzellen	ATCC CRL 1573
HL60	Monozyten, humane myeloide Zellen	

Alle genannten Zelllinien wurden in Brutschränken bei 5 % CO₂, 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Als Kulturmedium wurde DMEM für adhärente Zellen (293T) und Click-RPMI für Suspensionszellen (HL60) verwendet. Die Zellpassage bei adhärenen Zellen erfolgte, wenn die Zellkonfluenz 80-100 % betrug. Die Zellen wurden abtrypsiniert, in PBS gewaschen und auf neue Zellkulturplatten verteilt. Suspensionszellen wurden gezählt und bei einer Dichte von 1 Mio./ml oder mehr auf 0,5 Mio./ml verdünnt.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung von Expressionsvektoren

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die in vivo ligandenabhängig ablaufende Oligomerisierung zwischen apoptotischen Molekülen und die damit verbundene Auslösung der Signalkaskade, die am Ende zum Zelltod führt, in vitro (in Zellkultur) ligandenunabhängig nachzuahmen. Ansatzpunkt hierbei ist der Signaltransduktionsweg über die Todesrezeptoren. Die Aktivierung dieser Rezeptoren erfolgt über spezifische Liganden, die zur Oligomerisierung des Rezeptors führen. Der intrazelluläre, zytoplasmatische Anteil der Todesrezeptoren besteht aus so genannten Todesdomänen (*death domains*). Diese sind in der Lage das Adapterprotein FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*) zu binden, welches selbst eine Todesdomäne besitzt. Auch hier findet eine Oligomerisierung bzw. Dimerisierung zwischen den Todesdomänen statt. FADD wiederum besitzt zudem am anderen Ende eine Todes-Effektor-Domäne (*death effector domain*). Diese DED dimerisiert im weiteren Verlauf der Signalkaskade mit der DED der Pro-Caspasen 8 bzw. 10. Die daraus resultierende Aktivierung der weiter abwärts befindlichen Caspasen (Caspasen 3,6, 7) führt letztendlich zur Spaltung bestimmter zellulärer Substrate und somit zum Zelltod (siehe Abbildung 7).

Um die Oligomerisierung in vitro im experimentellen Ansatz nachahmen zu können, bestand die Überlegung darin, Moleküle des Todesrezeptorweges mit einem geeigneten Protein für die Dimerisierung zu fusionieren (siehe Einleitung 1.6). In dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Subklonierung von DNA-Fragmenten drei verschiedene Expressionsvektoren generiert, die die DNA-Sequenz für ein apoptotisches Protein, für den dimerisierbaren Fusionspartner Gyrase B sowie die kodierende Sequenz für ein Antikörperepitop (Flag) enthalten. Als Apoptoseinduktoren kamen das Adapterprotein FADD und der intrazelluläre Anteil des Todesrezeptors TRAIL-R2/DR-5 zur Anwendung. Als Protein für die Dimerisierung der Fusionsproteine wurde die Gyrase B verwendet. Die Untereinheit B der Gyrase von *Streptomyces* kann durch das zellgängige, synthetische Molekül Coumermycin dimerisiert werden. Dies führt gleichzeitig zur Dimerisierung des Fusionspartners (z. B. FADD). Das synthetische Molekül Coumermycin leitet sich von Novobiocin einem Gyrasehemmer ab, wobei zwei Moleküle Novobiocin das Molekül Coumermycin ergeben, welches in der Lage

ist zwei Gyrase-Proteine zu binden. Coumermycin fungiert daher als chemischer Induktor der Dimerisierung (CID). Die kurze Flag-Sequenz dient dem Expressionsnachweis der Fusionsproteine im Westernblot, mittels eines spezifisch gegen Flag gerichteten Antikörpers.

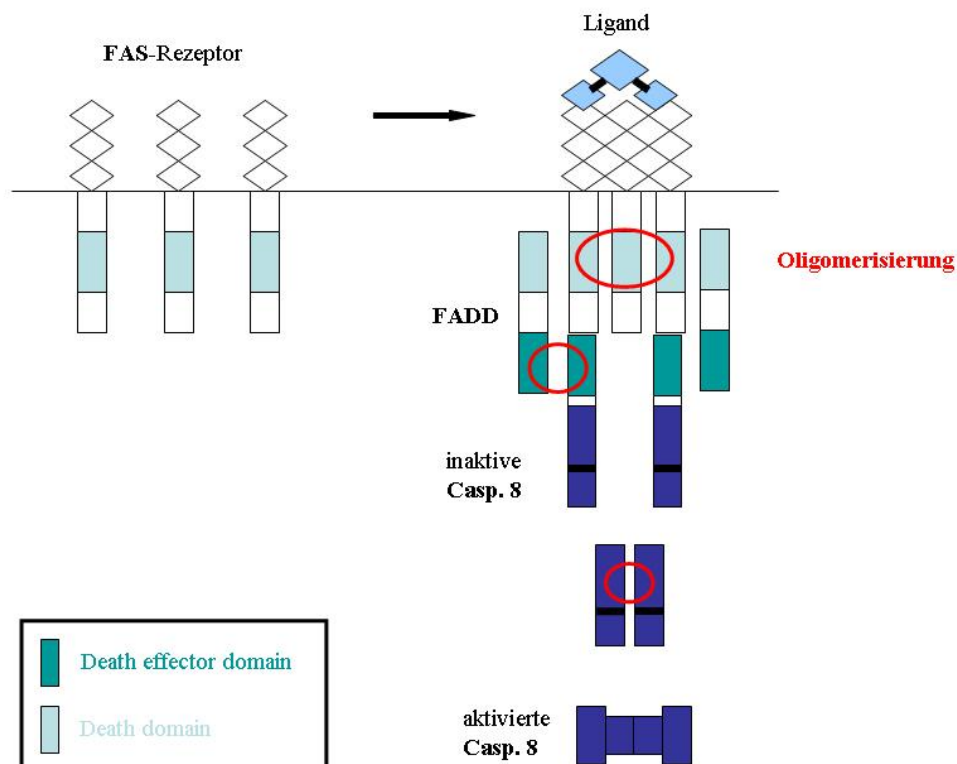


Abb.: 7 Oligomerisierung am Beispiel des Todesrezeptors Fas

In der extrazellulären Domäne von Fas (auch bekannt als APO-1 oder CD95) befinden sich mehrere cysteinreiche Regionen, die die Bindung von Liganden vermitteln. Alle Liganden liegen in ihrer aktiven Form als Trimere vor und aktivieren ihre Rezeptoren durch Oligomerisierung. Eine intrazelluläre Region wird als Todesdomäne (death domain = hellblau) bezeichnet. Nach Aktivierung der Rezeptoren vermittelt die Todesdomäne die Interaktion mit dem Adapterprotein FADD (Fas-associated death domain protein), das ebenfalls eine Todesdomäne besitzt. Das Adapter-Protein FADD bindet an den CD95-Rezeptor und verursacht hierdurch die Komplexierung mit der Caspase-8 bzw. Caspase 10 über die Todes-Effektor-Domänen (death effector domain = türkis). Die am Rezeptorkomplex selbst durch Dimerisierung aktivierte Caspase-8 kann im Weiteren andere Procaspasen (wie 3, 6, 7) aktivieren. Dies führt letztendlich zur Spaltung zellulärer Substrate bis hin zum Zelltod (*Los et al., 1995; Ferrari et al., 1998*).

3. 2 Klonierung der Expressionsvektoren DR5-DD_Gyr1×_Flag; DR5-DD_Gyr3×_Flag und Gyr1×_FADD_Flag

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Expressionsvektoren auf der Grundlage eines pro-apoptotischen Moleküls (FADD oder intrazelluläre Domäne=DD von DR5) und des Proteins Gyrase B generiert. Das Grundprinzip hierbei ist es, eine DNA-Sequenz (als Insert bezeichnet) in einen Vektor zu klonieren, der die Expression des Proteins in menschlichen Zellen treibt (Expressionsvektor).

Zunächst wurden die kodierenden Sequenzen der apoptotischen Moleküle FADD bzw. DR5-DD aus entsprechenden Ausgangsplasmiden herausgeschnitten und anschließend in Klonierungsvektoren subkloniert (*siehe Abb. 8*). Die verwendeten Klonierungsvektoren (pEF-Flag bzw. pEF-Flag/3×Gyr) basieren auf dem Vektor pEF-BOS (Mizushima and Nagata 1990) und enthielten bereits eine Flag-Sequenz bzw. eine Flag- und Gyrase-Sequenz. (*siehe Material und Methoden Abschnitt 2. 1. 12; 2. 4. 5 sowie 2. 4. 11*). Die Expressionsvektoren (*siehe Abb. 9*) DR5-DD_Gyr1×_Flag und DR5-DD_Gyr3×_Flag setzen sich aus dem intrazellulären Anteil des Todesrezeptors TRAIL-R2/DR-5 (ca. 600 AS), der Gyrase B in einfacher Form (ca. 750 AS) oder als Fusion von drei Gyrasemolekülen und Flag (24 AS) zusammen. Der Expressionsvektor Gyr1×_FADD_Flag enthält anstelle von DR5-DD das Adapter-Protein FADD (Fas-Associated Death Domain Containing Protein ca. 460 bp). Der Verwendung des Proteins Gyrase in dreifacher Form liegt die Vorstellung zugrunde, dass hierdurch größere Komplexe initiiert werden, die den Bedingungen in vivo näher kommen und somit effizienter sind. Der Aufbau der hergestellten und verwendeten Vektoren ist in Abbildung 9 (siehe unten) schematisch dargestellt.

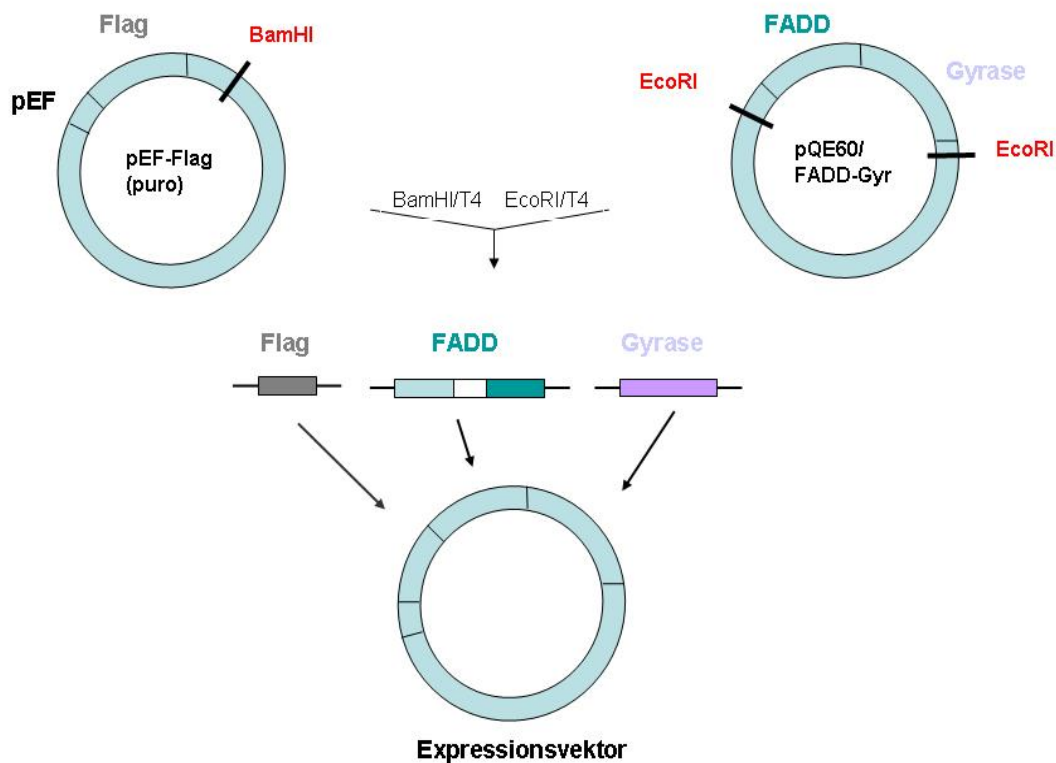


Abb.: 8 Modell der Subklonierung am Beispiel des Expressionsvektors Gyr1×_FADD_Flag

Mit Hilfe des Restriktionsenzym *EcoRI* wurde zunächst die kodierende Sequenz für *FADD_Gyrase* aus dem Ausgangsplasmid *pQE60/FADD_Gyr* herausgeschnitten und danach mit *T4 DNA-Polymerase* behandelt (zur Beseitigung des Überhangs). In der Agarosegel-Elektrophorese wurde das DNA-Fragment anschließend aufgetrennt, unter UV-Licht detektiert und aus dem Gel isoliert. Nach der Reinigung mittels *QIAEX-II-Extraktion* stand das Insert zur Ligation zur Verfügung. Der Klonierungsvektor *pEF_Flag* wurde mit dem Restriktionsenzym *BamHI* versetzt und anschließend ebenfalls mit der *T4 DNA-Polymerase* behandelt. Nach diesem Schritt erfolgte die Aufreinigung des Vektors nach dem *QIAquick PCR Purification Kit*-Protokoll. Danach wurde der Vektor dephosphoryliert, um spätere Religationen zu vermeiden sowie nochmalig einem Reinigungsschritt unterzogen. Zum Schluss wurde das Insert (*FADD_Gyrase*) in den Klonierungsvektor (*pEF_Flag*) mittels Ligation eingefügt (siehe *Material und Methoden Abschnitt 2. 1. 7- 2. 1.12*).

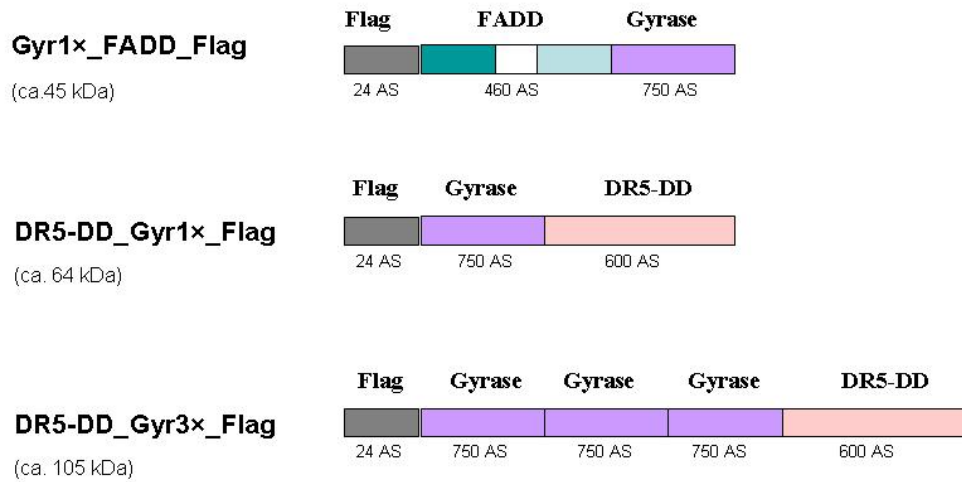


Abb.: 9 Schema der Expressionsvektoren

Dargestellt sind die in dieser Arbeit klonierten Expressionsvektoren zusammen mit dem vorhergesagtem Molekulargewicht und der Anzahl der Aminosäuren. *AS*= Aminosäuren; *kDa*= kilo-Dalton; *FADD*= Fas-associated death domain protein; *DR5*= death receptor 5, *DD*= death domain

3. 3 Untersuchung der Expression der Fusionsproteine

Ziel dieses Experimentes war es, zu überprüfen, ob menschliche Zelllinien nach der Transfektion mit den generierten Expressionsvektoren entsprechende Fusionsproteine exprimieren. Die Grundlage für dieses Experiment ist die Westernblot – Analyse. Hierfür wurden 293T (embryonale Nierenfibroblasten) bzw. HL60 Zellen (myeloide menschliche Zellen) mittels Elektroporation mit dem Expressionsvektor DR5-DD_Gyr1x_Flag beziehungsweise DR5-DD_Gyr3x_Flag transfiziert. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurden diese Zellen lysiert und im Westernblot auf die Anwesenheit der Fusionsproteine überprüft. Als Kontrolle diente der Leervektor pEF-SEM.

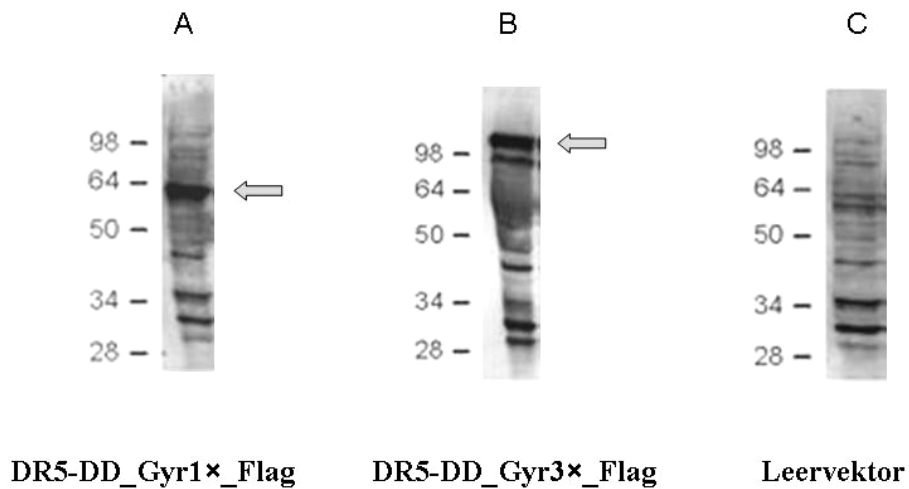


Abb.: 10 Expression der Fusionsproteine DR5-DD_Gyr1x_Flag und DR5-DD_Gyr3x_Flag

Die Abbildung zeigt, dass die beiden Fusionsproteine als Banden mit der zu erwartenden Größe von 64 kDa (DR5-DD_Gyr1x_Flag) (A) bzw. 105 kDa (DR5-DD_Gyr3x_Flag) (B) im Westernblot nachweisbar waren. Für die Western-Blot-Analyse wurden jeweils 5×10^5 293T (A+C) bzw. HL60 (B) Zellen mit dem Expressionsvektor DR5-DD_Gyr1x_Flag (A) beziehungsweise DR5-DD_Gyr3x_Flag (B) (je 20µgDNA) mittels Elektroporation transfiziert. Als Negativ- Kontrolle wurden 293T Zellen mit einem Leervektor pEF-SEM transfiziert (C). Nach 24h bei 37°C wurden S100 Zelllysate (Ges.-vol. je Ansatz 200 µl) hergestellt. Jeweils 20 µl Zelllysate wurden auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte im α-Flag-Western Blot. Der Molekulargewichtsmarker ist jeweils am linken Rand eingezeichnet. Die Pfeile zeigen die jeweiligen Proteine an. Eine Anzahl von Hintergrundbanden ist sichtbar, die unspezifischen Antikörperreaktionen entsprechen.

3. 4 Coumermycin induzierte Dimerisierung der Fusionsproteine und Nachweis anhand kreuzvernetzender Reagenzien

In diesem Experiment wurde die Dimerisierbarkeit der Fusionsproteine durch Coumermycin überprüft. Hierfür wurden 293T und HL60 Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit den Expressionsvektoren (DR5-DD_Gyr1x_Flag bzw. DR5-DD_Gyr3x_Flag) mit Coumermycin behandelt. Die verwendeten Expressionsvektoren basieren alle auf der Verbindung mit Gyrase B. Da Coumermycin zwei Bindungsstellen für die Gyrase B besitzt, eignet sich diese

Chemikalie als chemischer Induktor für die Dimerisierung der Fusionsproteine (*Prinzip siehe Abb. 11*). Zunächst wurde die Dimerisierung in Zelllysaten geprüft.

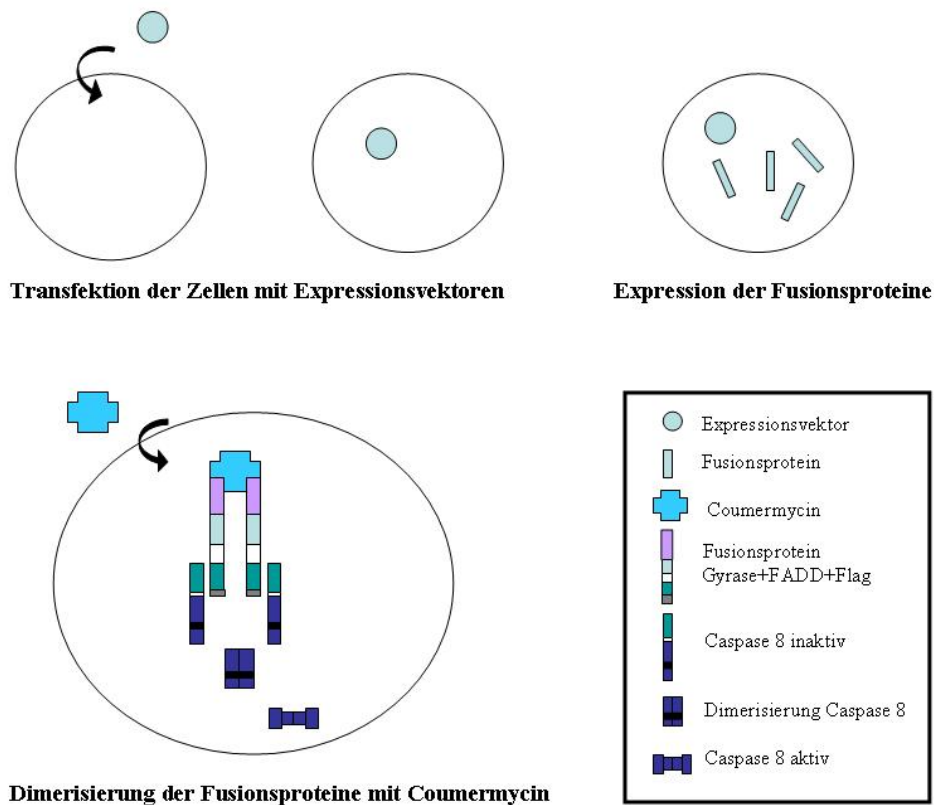


Abb.: 11 Schema der Dimerisierung durch Coumermycin

In diesem Schema ist das Prinzip der Dimerisierung der Fusionsproteine durch die zellgängige, synthetische Substanz Coumermycin abgebildet. Coumermycin fungiert hier als chemischer Induktor der Dimerisierung (CID=chemical inducer of dimerization). Es ist in der Lage zwei Moleküle Gyrase (hier hellblau) zu binden und dimerisiert auf diese Weise die an die Gyrase fusionierten pro-apoptischen Proteine (hier hellblau-weiß-türkis = Adaptorprotein FADD). Würde man den Signaltransduktionsweg weiterverfolgen, würde man nach der chemisch induzierten Protein-Protein-Interaktion (hier Dimerisierung zweier FADD-Proteine) eine Rekrutierung der Caspase 8 (bzw. 10) über deren DED (hier türkis) an die DED (ebenfalls türkis) des Adaptorproteins FADD erwarten. Im abgebildeten Schema wird angenommen, dass nach erfolgter Dimerisierung der Fusionsproteine *in vitro* Caspase 8 ebenfalls rekrutiert werden kann und selbst durch die Formation stabiler, vorübergehender homo-dimerer Komplexe (hier zweier Caspase 8 Moleküle) aktiviert wird und somit die Signalkaskade auslöst, die letztendlich zum Zelltod führt (wie es *in vivo* nach der Dimerisierung des Adapter-Proteins FADD der Fall wäre).

Um die Dimerisierung der Fusionsproteine nach erfolgter Coumermycin-Behandlung im Westernblot nachweisen zu können, wurden zusätzlich kreuzvernetzende Reagenzien eingesetzt. Die in dieser Arbeit eingesetzten kreuzvernetzenden Reagenzien (*BS3* und *DSS*) sind in der Lage an freie α -Aminogruppen am N-Terminus von Peptiden zu binden. Da die α -Aminogruppen der Proteine aber selten frei zugänglich sind, rückt die Reaktion mit den Seitenketten der Aminosäuren in den Vordergrund. Dabei reagiert nur das ϵ -Amin von Lysin signifikant mit den kreuzvernetzenden Reagenzien. *BS3* und *DSS* besitzen jeweils zwei Bindungsdomänen und sind von ihrer Größe her relativ kleine Moleküle, was zur Folge hat, dass nur Proteine effizient kreuzvernetzt werden, die nah genug aneinander liegen (siehe Abbildung 12). Diese Voraussetzung ist in diesem Experiment nur gegeben, wenn vorher die Dimerisierung der Proteine durch Coumermycin stattgefunden hat. Damit dient die Verwendung der kreuzvernetzenden Reagenzien dazu, eine Dimerisierung der Fusionsproteine durch Coumermycin nachvollziehbar zu machen. Für dieses Experiment wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Zum einen wurden die Fusionsproteine in Zelllysaten kreuzvernetzt, zum anderen in intakten Zellen. Das kreuzvernetzende Reagenz *BS* wurde für die Zell- Lysate verwendet und die zellpermeable Reagenz *DSS* für intakte Zellen.

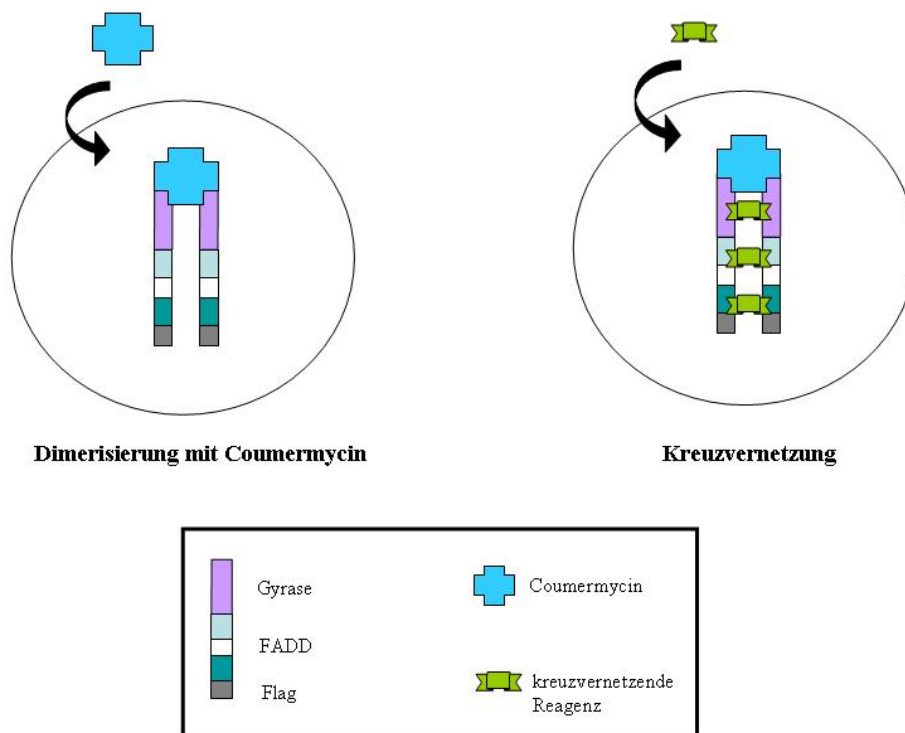


Abb.: 12 Schema der Kreuzvernetzung

Nach der Dimerisierung der Fusionsproteine mit Coumermycin (hier blau) erfolgte die Kreuzvernetzung (hier grün) zweier Fusionsproteine (hier Gyr1x_FADD_Flag).

Die anschließend durchgeführte Western-Blot-Analyse (siehe Abbildung 13) ergab, dass bei der Verwendung von 293T Zelllysaten die Dimerisierung des Fusionsproteins DR5-DD_Gyr1x_Flag mittels Coumermycin induziert wurde. Mit steigender Coumermycin Konzentration stieg zudem die Menge an dimerisierten Proteinen. Allerdings war eine relativ hohe Konzentration von Coumermycin notwendig, um eine Dimerisierung auszulösen.

Bei dem Fusionsprotein DR5-DD_Gyr3x_Flag fand dagegen anscheinend eine Spontanaggregation eines kleinen Teils des Proteins statt. Coumermycin induzierte in diesem Fall keine zusätzliche Aggregation (siehe Abbildung 13). Sowohl bei der Verwendung von Gyr1x_FADD_Flag als auch bei der Verwendung von intakten Zellen und der zellpermeablen kreuzvernetzenden Reagenz DSS konnte die Dimerisierung nicht gezeigt werden (nicht abgebildet).

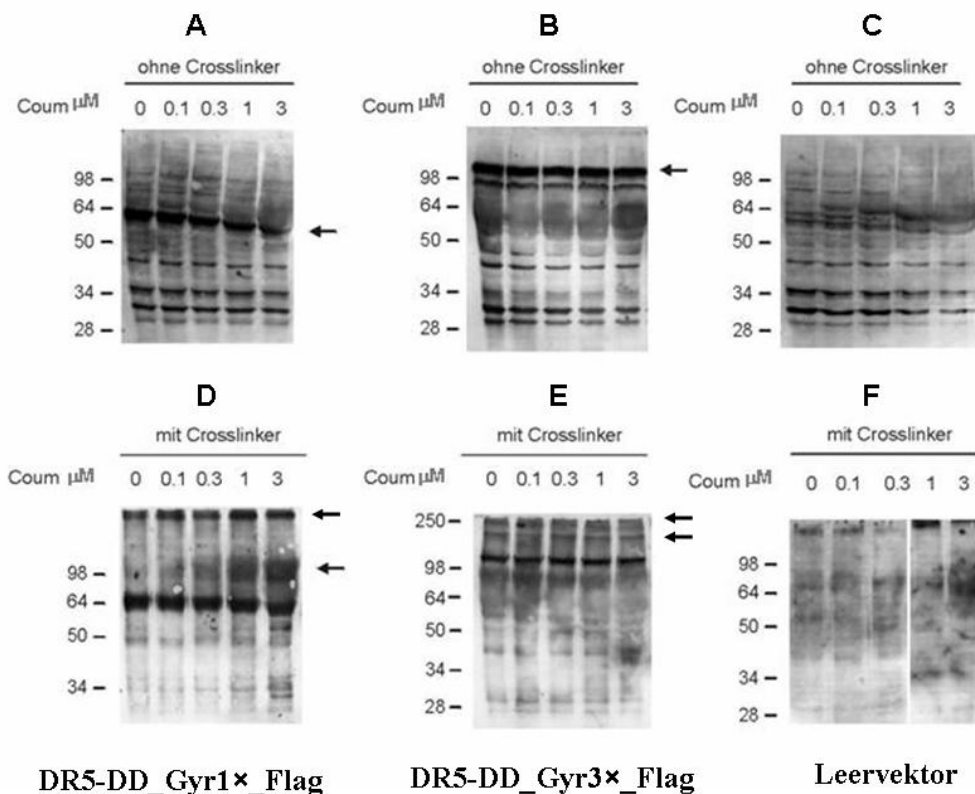


Abb.: 13 Analyse der dimerisierten Fusionsproteine nach Verwendung der kreuzvernetzenden Reagenz (Crosslinker) BS3

Nach der Transfektion von je 5×10^5 293T (A,C,D,F) bzw. HL60 (B, E) Zellen mit den Expressionsvektoren DR5-DD_Gyr1×_Flag bzw. DR5-DD_Gyr3×_Flag oder dem Leervektor pEF-SEM erfolgte nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37°C (erwarteter Zeitraum bis zur Expression der Fusionsproteine) die Lyse (S100, 200 μ l Ges.-Vol.) der Zellen. Die Zellysate wurden jeweils auf 10 Eppendorf-GefäÙe verteilt (je 20 μ l) und mit der Chemikalie Coumermycin in einer Verdünnungsreihe (von 0-3 μ M) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1h bei 30 °C erhielten 5 Eppendorf-GefäÙe je 4 μ l BS³-Citronensäure Gemisch, die anderen 5 GefäÙe verblieben ohne kreuzvernetzende Reagenz. Nach 30 min RT erfolgte ein Reaktionsstop mit je 1 μ l Tris/pH 7,5. Nach weiteren 15 min bei RT erfolgte die Auftragung der Zellysate (je 20 μ l) und die Detektion im Westernblot (10% SDS-Gel, GaM+ α -flag). Bei der Verwendung der membrangängigen kreuzvernetzenden Reagenz DSS (Ergebnisse hier nicht abgebildet) wurden zuerst die intakten Zellen 2-3 Stunden bei 37°C mit Coumermycin inkubiert und erst nach der Zugabe von DSS bei einer weiteren Inkubationszeit von 30min bei RT, lysiert (NP40). RT= Raumtemperatur; GaM= Goat anti Mouse (Antikörper)

A: Expression des Fusionsproteins (DR5-DD_Gyr1×_Flag) bei ca.64 kDa

B: Expression des Fusionsprotein (DR5-DD_Gyr3×_Flag) bei ca.105 kDa

D: Zeigt eine erfolgte Dimerisierung (bei ca. 120 kDa) des Fusionsproteins DR5-DD_Gyr1×_Flag nach Inkubation mit BS³. Mit steigender Coumermycin Konzentration steigt die Menge an dimerisierten Proteinen (die Stärke der Bande nimmt zu). Zum Teil sind auch größere Komplexe bei ca. 250 kDa detektierbar.

E: Neben der Bande bei 105 kDa (was dem Monomer des Fusionsprotein entspricht) ist eine Größenzunahme zu ca. 200 kDa und 250 kDa erkennbar. Das Fusionsprotein wurde unabhängig von der Coumermycin Konzentration teilweise dimerisiert.

C+F: Kontrollvektor pEF-SEM

3. 5 Weitere funktionelle Experimente zur Untersuchung der Expression der Fusionsproteine und der Apoptose-Induktion

3. 5. 1 Kontrolle der Transfektion und des Verhältnisses apoptotischer zu lebenden Zellen mittels β - Galaktosidase Färbung

In diesem Experiment wurde die Apoptoseinduktion durch Ko-Transfektion mit einem Markerplasmid und lichtmikroskopische Analyse untersucht. Hierzu wurden 293T Zellen zusätzlich zu den verschiedenen Expressionsvektoren (Gyr1x_FADD_Flag; DR5-DD_Gyr1x_Flag; DR5-DD_Gyr3x_Flag) mit einem Reporter – Gen (lac-z) – Konstrukt kotransfiziert (siehe Abschnitt 2. 3. 1). Am darauf folgenden Tag wurden die transfizierten Zellen mit einer Coumermycin-Verdünnungsreihe (siehe Abschnitt 2. 3. 2) behandelt. Ein Teil der Zellen blieb jeweils unbehandelt. Der Reporter kodiert hierbei für das Enzym β - Galaktosidase. Diese Enzymaktivität wird wiederum genutzt, um die transfizierten Zellen nach Fixierung und Zugabe des Substrates X –Gal (dieses wird durch den enzymatischen Abbau in einen blauen Niederschlag umgewandelt) blau zu färben. Die Enzymaktivität kann nach Zugabe des entsprechenden Substrates (X-Gal) indirekt durch die Anfärbung der Zellen nachgewiesen werden. Anhand der Blaufärbung und der Zellmorphologie konnte unter dem Lichtmikroskop das Verhältnis der apoptotischen zu den lebenden Zellen bestimmt werden. Die Bestimmung des Verhältnisses erfolgte durch das Auszählen von jeweils 300 Zellen pro Versuchsansatz.

Eine Induktion der Apoptose wurde durch die alleinige Überexpression der verschiedenen Fusionsproteine nicht gesehen. Auch nach der Behandlung der Zellen mit Coumermycin konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den unbehandelten Zellen beziehungsweise im Vergleich zu den mit dem Leervektor pEF-SEM transfizierten Zellen gezeigt werden. Der Anteil apoptotischer Zellen (bezogen auf jeweils 300 ausgezählte Zellen) belief sich im Durchschnitt auf 1-3 %. In der folgenden Abbildung Nr. 8 seien beispielhaft blau angefärbte, apoptotische Zellen nach dem Prinzip der β -Galaktosidase-Färbung gezeigt.

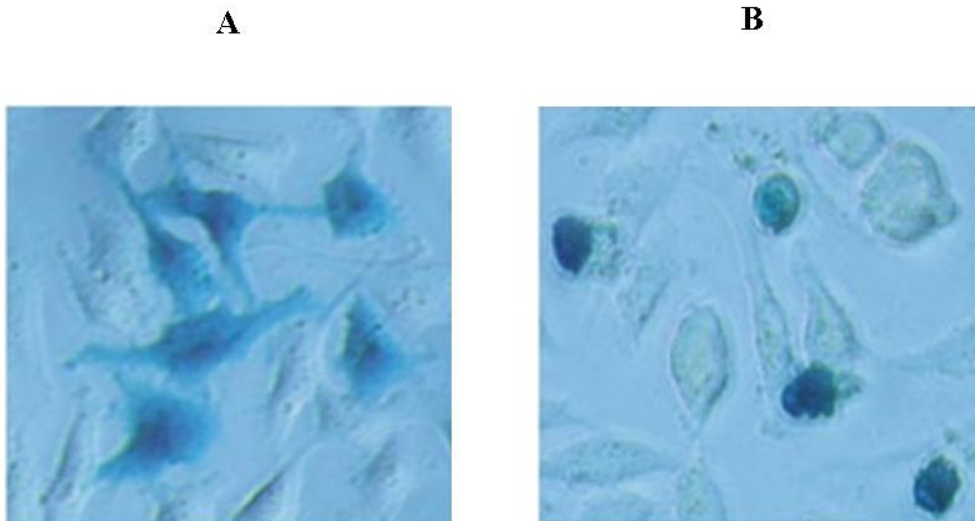


Abb.: 14 Vergleich zwischen apoptotischen und lebenden Zellen nach β -Galaktosidase-Färbung

Die Abbildung zeigt ein Beispiel einer β -Galaktosidase Färbung. Blau angefärbte Zellen gelten hierbei als apoptotisch und ungefärbte, weiße Zellen als vital. **A:** Die blau angefärbten Zellen zeigen noch Zellausläufer. **B:** Die blauen Zellen haben sich vollständig vom Zellverbund abgelöst, apoptotische Körperchen (*apoptotic bodies*) sind sichtbar (Apoptoseinduktion durch Transfektion von Bim; lichtmikroskopische Aufnahme mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. S. Fischer).

3. 5. 2 Luciferase-Reporter-Gen-Assay

Um in einem weiteren Experimentansatz zu untersuchen, ob nach erfolgter Dimerisierung der Fusionsproteine mittels Coumermycin die zu erwartende Auslösung des Zelltodes eintritt, wurde eine Methode eingesetzt, die als Reporter- Assay bezeichnet wird. Diese Methode wird zur Messung der Regulation von Genen in Zellen verwendet. Das in diesem Experiment verwendete Reporter- Gen- Konstrukt besteht aus einem Promotor und dem eigentlichen Reporter, der für das Enzym Luciferase kodiert. Als Promotor wurde ein konstitutiv aktiver Promotor verwendet, daher korreliert die Luciferaseaktivität mit der Anzahl lebendiger, transfizierter Zellen. In apoptotischen Zellen ist die Transkription des Luciferase- Gens gehemmt, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die Enzymaktivität in

apoptotischen Zellen signifikant geringer ist, als in aktiven Zellen. Eine niedrige Luciferaseaktivität weist daher auf Zelltod hin.

Für dieses Experiment wurden 293T Zellen verwendet, die neben den Expressionsvektoren DR5-DD_Gyr1×_Flag beziehungsweise Gyr1×_FADD_Flag mit dem Luciferase- Reporter-Gen kotransfiziert wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit mit Coumermycin wurden die Zellen lysiert und daraufhin die Enzymaktivität gemessen (siehe Abschnitt 2. 3. 2). Die Messung der Enzymaktivität erfolgte indirekt über die Zugabe des Substrates Luciferin und weiterer Ausgangssubstanzen (siehe Abschnitt 2. 3. 3), die von der Luciferase zu Oxyluciferin und Licht umgewandelt werden. Dieses Licht (Chemi-Lumineszenz) wurde in einem Luminometer gemessen.

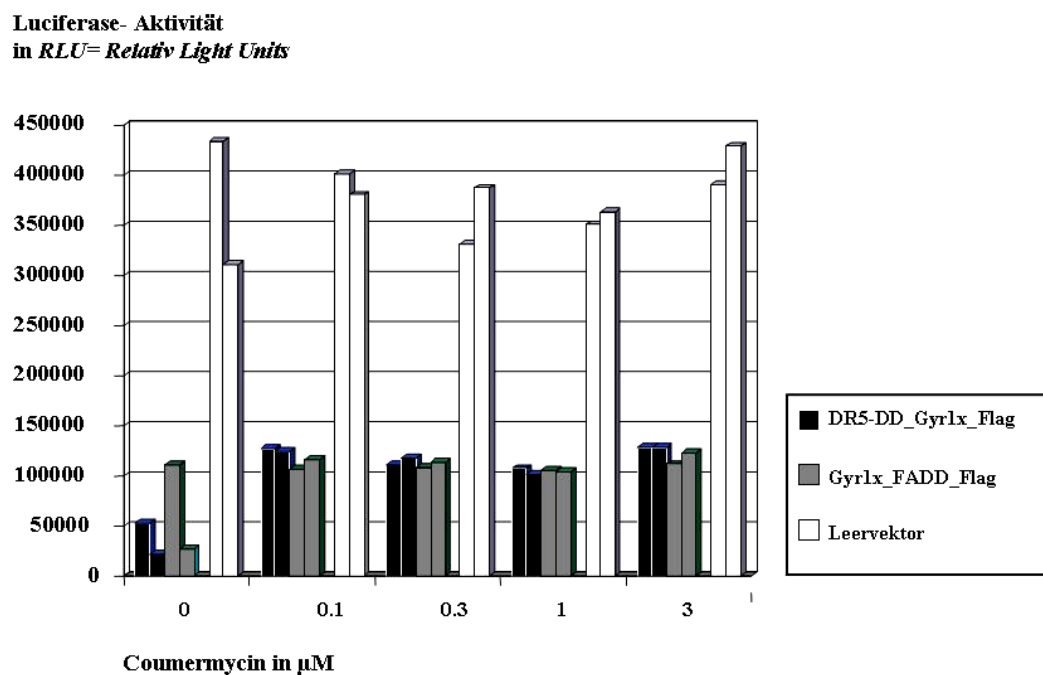


Abb.: 15 Luciferase-Reporter-Gen-Assay mit den Expressionsvektoren DR5-DD_Gyr1×_Flag und Gyr1×_FADD_Flag

In diesem Experiment wurden jeweils 5 Mill. 293T Zellen neben den Expressionsvektoren (DR5-DD_Gyr1×_Flag bzw. Gyr1×_FADD_Flag) mit pEF-Luci-Max (Verhältnis 4:1) cotransfiziert, danach wurden die Zellen auf eine Zellkulturplatte (24 Well) zu je 25 000 aufgeteilt und mit Coumermycin (0, 0.1, 0.3, 1, 3 µM) für 24 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1x-Lysepuffer lysiert und für 1h bei -70 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden jeweils 20 µl Lysat für die Luciferase- Aktivitätsmessung verwendet. Hierbei ist die chemische Lumineszenz ein Maß für die Enzymaktivität.

Im Vergleich zu den Zellen mit den Expressionsvektoren ist bei den Zellen mit dem Kontrollvektor eine deutlich höherer Enzymaktivität (Lumineszenz) messbar, die unabhängig von der Zugabe an Coumermycin in steigender Konzentration bestehen blieb. Dies deutet darauf hin, dass vor der Lyse der Zellen eine deutlich höhere Anzahl an intakten Zellen, als an apoptotischen Zellen im Falle der mit Leervektor transfizierten Zellen bestand. Bei den Zellen mit den Expressionsvektoren wurde nur 25 % der Enzymaktivität im Vergleich zum Kontrollvektor gemessen, ebenfalls unabhängig von der Coumermycin- Konzentration. Dies kann als durch Spontanaggregation induzierte Apoptose interpretiert werden, die zu einer hohen Anzahl an apoptotischen Zellen führte. Eine Induktion der Apoptose, verursacht durch unterschiedliche Konzentrationen an Coumermycin, konnte nicht gezeigt werden.

3. 5. 3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode um Bestandteile oder strukturelle Merkmale von Zellen quantifizieren zu können. Hierbei werden die Zellen im Durchflusszytometer wie auf einer Perlschnur einzeln aneinandergereiht und durch einen Laserstrahl geführt. Der Laser regt wiederum spezifische, experimentell eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe an, die etwa über Antikörper gekoppelt an den Zellen gebunden sind. Das resultierende Fluoreszenzlicht wird von verschiedenen Lichtdetektoren aufgefangen und nach Intensität und Farbe getrennt vom Computer registriert. Diese Methode wurde verwendet, um das Verhältnis apoptotischer zu lebenden Zellen nach Coumermycin-induzierter Dimerisierung zu untersuchen. In diesem Experiment wurden einerseits stabil transfizierte HL60 (Puromycin- Resistenz- tragendes Plasmid) Zellen mit dem Expressionsvektor DR5-DD_Gyr3×_Flag untersucht und andererseits transient transfizierte 293T-Zellen mit dem Expressionsvektor Gyr1×_FADD_Flag. Als Kontrolle dienten entsprechende Leervektoren (HL60= pEF-Puro; 293T= pEF-SEM). Am Beispiel des Expressionsvektors DR5-DD_Gyr3×_Flag sei in folgender Abbildung Nr.16 das Ergebnis der Durchflusszytometrie aufgezeigt.

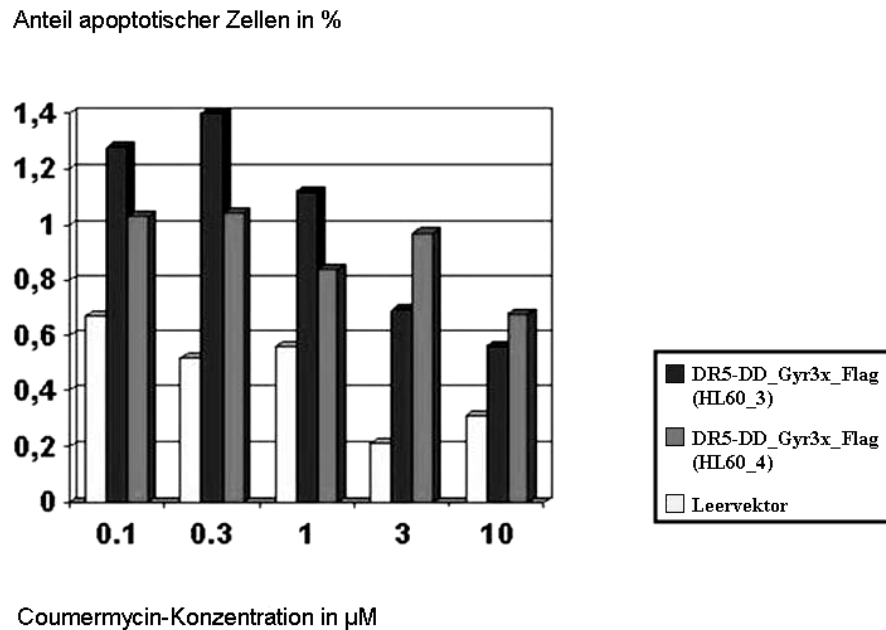


Abb.: 16 Durchflusszytometrie am Beispiel des Expressionsvektors DR5-DD_Gyr3x_Flag

In diesem Experiment wurden jeweils 5 Mill. HL60-Zellen mit 20 μg DNA (DR5-DD_Gyr3x_Flag) mittels Elektroporation transfiziert. Unter Zugabe von Puromycin (1mg/ml) wurden stabile Zellklone selektiert. Jeweils 25 000 Zellen wurden anhand einer Coumermycin-Verdünnungsreihe (0.1-10 μM) behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 2-3h bei 37°C wurden die Zellen zentrifugiert, mit PBS gewaschen und anschließend mit 70%igem Ethanol für 30min bei RT fixiert. Nach einem weiteren Waschschriff und einer Zentrifugation wurde das Zellpellet in jeweils 400 μl Propidium-Jodid-PBS-Gemisch (1:40) aufgenommen und dem Durchflusszytometer zur Analyse zugeführt. Hierbei wurden die Sub-G1-Zellen anhand ihrer Fluoreszenz gemessen (*fluorescence units/min*). Propidiumjodid interkaliert dabei in die DNA. Das resultierende Fluoreszenzsignal korreliert somit mit dem DNA-Gehalt der Zelle. Apoptotische Zellen emittieren in diesem Ansatz typischerweise weniger Fluoreszenz als Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus (Sub-G1) (Nicoletti et al. 1991).

Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtzellzahl belief sich im Durchschnitt auf 0.2 bis 1.4 Prozent. Es konnte kein klarer Unterschied zwischen den Zellen mit dem Leervektor und den Zellen mit dem Expressionsvektor DR5-DD_Gyr3x_Flag gezeigt werden. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass keine Induktion der Apoptose durch Coumermycin stattgefunden hat. Gleiches gilt für den Expressionsvektor Gyr1x_FADD_Flag (Ergebnisse hier nicht abgebildet).

4 Diskussion

4.1 Übersicht

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Etablierung künstlicher Todesschalter (ADS = *artificial death switches*) auf der Grundlage der proapoptotischen Moleküle FADD beziehungsweise DR5-DD und dem bakteriellen Protein Gyrase B sowie in der Untersuchung dieser Fusionsproteine auf ihre apoptotische Wirkung mit Hilfe der Methode der Coumermycin-induzierten chemischen Dimerisierung. Diese Methode wurde von der Gruppe unter Farrar etabliert (Farrar et al. 1996) und bereits erfolgreich in der künstlichen Induktion der MAP-Kinase-Kaskade (MAP = Mitogen-aktivierte Protein- Kinase) angewandt. Das Ziel dieser Arbeit war es, unter der Verwendung von proapoptotischen Molekülen des Todesrezeptorweges und der Methode der Coumermycin- Dimerisierung, den Apoptoseweg in Zellen *in vitro* direkt auszulösen. Damit sollte ein experimenteller Versuchsansatz geschaffen werden, der es ermöglicht *ex vivo* die apoptotische Signalkaskade zu verfolgen und in ihren einzelnen Schritten zu analysieren.

Die Diskussion wird im Folgenden anhand von zwei Schwerpunkten dargelegt. Der erste Teil beschäftigt sich mit der Expression der hergestellten Fusionsproteine Gyr1x_FADD_Flag, DR5-DD_Gyr1x_Flag und DR5-DD_Gyr3x_Flag. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle drei Fusionsproteine in menschlichen Zelllinien (myeloide Zellen bzw. embryonale Nierenfibroblasten) exprimiert werden s.o. Wobei die alleinige Überexpression der Fusionsproteine nicht zur Induktion der Apoptose führte.

Der zweite Aufgabenteil beschäftigt sich mit der Coumermycin-induzierten chemischen Dimerisierung der Fusionsproteine und der Frage nach der Induktion der Apoptose. Hierbei konnte für das Fusionsprotein DR5-DD_Gyr1x_Flag gezeigt werden, dass es mit Hilfe von Coumermycin dimerisiert beziehungsweise zu größeren Komplexen aggregiert. Die Menge an dimerisierten Proteinen war dabei von der Coumermycin-Konzentration abhängig. Je höher die Coumermycin-Konzentration war, desto größer war die Menge an dimerisierten Proteinen. Die Frage nach der Induktion der Apoptose konnte in der vorliegenden Arbeit nicht positiv beantwortet werden. Es soll daher in diesem Teil der Diskussion unter verschiedenen Blickwinkeln erörtert werden, warum die erfolgreiche Dimerisierung der Fusionsproteine nicht zur erwarteten Induktion der Apoptose führte.

4.2 Herstellung der Expressionsvektoren und Expression der Fusionsproteine Gyr1x_FADD_Flag, DR5-DD_Gyr1x_Flag und DR5-DD_Gyr3x_Flag

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden drei verschiedene Expressionsvektoren hergestellt. Gyr1x_FADD_Flag, DR5-DD_Gyr1x_Flag sowie DR5-DD_Gyr3x_Flag (siehe Ergebnisse 3.1 sowie Abbildung 8 und 9). Auf diese Weise entstanden künstliche Todesschalter (ADS = *Artificial Death Switches*) auf der Basis eines synthetischen CID- bindenden Proteins, dem bakteriellen Protein Gyrase B und eines endogenen proapoptotischen Moleküls FADD bzw. DR5-DD. Wie der Name "künstlicher Todesschalter" (erstmalig benutzt bei MacCorkle et al. 1998) bereits andeutet, war es das Ziel, künstliche (in vivo so nicht vorkommende) Genprodukte herzustellen, die durch eine chemische Substanz beeinflussbar sind und die eine gezielte Aktivierung von ausgewählten proapoptotischen Molekülen ermöglichen. Die chemische Substanz ist dabei in der Lage indirekt zwei proapoptotische Moleküle kreuzzuvernetzen (zu dimerisieren), die an den Enden zweier spezifischer Bindungsproteine (= Schalter) fusioniert sind und setzt dadurch die Signalkaskade in Gang bis hin zum Zelltod.

Das System der künstlichen Todesschalter wurde entwickelt, um bestimmte Abläufe in der Signalkaskade der Apoptose in vitro nachvollziehbar zu machen und sich damit in vivo ablaufende Prozesse erklärbar zu machen. Die chemisch induzierte Dimerisierung wurde bereits erfolgreich in der Untersuchung der Caspasenaktivierung angewandt ((Muzio et al. 1998; Yang et al. 1998; MacCorkle et al. 1998; Salvesen and Dixit 1999). Mit Hilfe der Technologie der induzierbaren Dimerisierung auf der Basis des synthetischen FKBP12 zeigte zum Beispiel die Gruppe unter David Spencer (Chen et al. 2002), dass intramolekulare (trans) Spaltung der erste Schritt in der Aktivierung von Initiator-Caspasen ist. Darüberhinaus zeigten sie, dass eine Heterodimerisierung der Caspasen (die Kreuzvernetzung zweier nicht identischer Proteine, z.B. Caspase 8 mit Caspase 3) weder zur Aktivierung noch zur Auslösung der Apoptose führte. Dies wiederum bekräftigt das Modell der homodimeren Caspasenaktivierung (die Kreuzvernetzung zweier identischer Caspasen, z.B. Caspase 8 + Caspase 8), welches von den meisten Autoren postuliert wird (Srinivasula et al. 1998) (Muzio et al. 1998; Yang et al. 1998; MacCorkle et al. 1998) bestätigte. Die Bildung eines stabilen vorübergehenden homodimeren Komplexes zwischen den Protease-Domänen zweier Procaspase-Moleküle scheint unabdingbar für die Caspasenaktivierung.

Bereits in zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die proapoptotischen Moleküle des Fas-Signaltransduktionsweges durch chemische Induktoren der Dimerisierung (CID = *chemical inducers of dimerization*) reguliert werden können. Sowohl der Fas-Rezeptor (Belshaw et al. 1996; Spencer et al. 1996), die Caspasen 1 und 3 (MacCorkle et al. 1998), Caspase 8 (Muzio et al. 1998; Yang et al. 1998), Caspase 9 sowie Apaf-1 (Hu et al. 1998), Caspase 10 (Chen et al. 2002) und Bax (Gross et al. 1998) fanden in diesen Studien Verwendung. Caspasen, wie z.B. die Caspase 1 und 8, können, wenn sie überexprimiert werden, spontan aggregieren bzw. autodimerisieren ohne ein vorangehendes apoptotisches Signal. Boldin und seine Gruppe zeigten dieses Verhalten der Autodimerisierung auch bei der Überexpression von Fas (Boldin et al. 1995). Die Gruppe unter Spencer untersuchte zudem inwieweit die CID-vermittelte Kreuzvernetzung des Adapter-Moleküls FADD Apoptose auszulösen vermag. Sie fusionierten dafür das aminoternale Ende von FADD, das die DED enthält, mit FKPP12 in dreifacher Form (Fan et al. 1999). Mit Hilfe des CID AP1903 (Clackson et al. 1998) konnten sie daraufhin zeigen, dass die chemisch-induzierte Dimerisierung der DED von FADD Apoptose in Jurkat-Zellen auslöst.

Im Vergleich zu den oben erwähnten Studien kamen in dieser Arbeit FADD und DR5 aus dem Todesrezeptorweg zur Anwendung. FADD einerseits, da die Induktion der Apoptose bereits mit Hilfe der chemisch-induzierten Dimerisierung durch AP1903 gezeigt werden konnte. Dies sollte daher auch mit Hilfe von Coumermycin anstelle von AP1903 funktionieren. Der intrazelluläre Anteil von DR5 (DD) auf der anderen Seite, um den bis dahin noch ungeklärten Signalweg über diesen Rezeptortyp analysieren zu können. Zudem wäre dieses System neben der reinen Analyse des Signalweges auch interessant gewesen, um in vivo Apoptose zu induzieren (etwa in etablierten Tumoren). Ein weiterer Versuch einen ADS (Todesschalter) auf der Basis von Caspase 3 herzustellen blieb aufgrund von technischen Problemen während der Klonierung ohne Erfolg.

Ein wichtiger Vorteil des in dieser Arbeit verwendeten Systems auf der Basis des bakteriellen Proteins Gyrase B und der chemischen Substanz Coumermycin gegenüber anderen publizierten Arbeiten liegt darin, dass Coumermycin nicht an zelluläre Proteine bindet und somit ungewünschte Interaktionen, wie zum Beispiel die Bildung von großen Proteinkomplexen, verhindert werden. Auf der anderen Seite ist Gyrase B kein menschliches Protein und wird daher in vivo nicht durch Interaktionen mit endogenen Proteinen, wie im

Falle der FKBP, die allgegenwärtig in Säugetieren expremiert werden, beeinflusst und stört seinerseits, soweit bekannt, keine weiteren Signalwege.

Der Todeschalter in dieser Arbeit stellt sich in Form von Gyrase B in einfacher oder dreifacher Form da, an die unmittelbar FADD (mit DD+DED) bzw. DR5 (nur der intrazelluläre Anteil = DD) fusioniert sind. Die chemische Substanz Coumermycin, besitzt zwei spezifische Bindungsstellen für Gyrase B und ist somit in der Lage den Schalter zu aktivieren. Die Verbindung (Dimerisierung) von zwei Gyraseproteinen führt damit automatisch zur Verbindung zweier übereinstimmender (homologer) proapoptotischer Moleküle. Im Fall des Konstruktes mit FADD, sollte die Dimerisierung zweier FADD-Moleküle zur Rekrutierung zweier in der Zelle vorhandenen Caspase-8 Moleküle führen, somit zur Aktivierung von Caspase 8, über diese wiederum zur Aktivierung von Effektorcaspasen, wie Caspase 3, was letztendlich im Zelltod mündet (z.B. über die Spaltung von Strukturproteinen in der Zelle). Im Gegensatz dazu sollte im Falle des Konstruktes mit DR5 das Adapterprotein FADD gebunden werden und über die Rekrutierung von Procaspase 8 Molekülen Apoptose induziert werden.

Im Folgenden soll anhand des Vergleiches mit anderen Studien nochmals die Bedeutung von FADD und DR5 im Signaltransduktionsweg erörtert werden. Die primäre Rolle von FADD liegt in der Bindung an den in der Zellmembran befindlichen Fas-Rezeptor und die damit verbundene Rekrutierung von Procaspase-8 Molekülen. Innerhalb dieses sogenannten Tod-induzierenden Signal-Komplexes (DISC = *death-inducing signaling complex*) werden die rekrutierten Procaspase-8 Moleküle durch Dimerisierung/Oligomerisierung ((Boatright et al. 2003; Donepudi et al. 2003) aktiviert. Geht man von dem allgemein akzeptierten Modell der Dimerisierung bzw. Oligomerisierung von proapoptotischen Molekülen und der Autoproteolyse der Caspasen aus, ist es nicht verwunderlich, dass in einigen Studien gezeigt werden konnte, dass bereits die Überexpression von proapoptotischen Molekülen zum Zelltod führten (Wilson et al. 1994) (Shi 2002; Acehan et al. 2002). In diesen Fällen führte die Überexpression der Proteine zu einer gewissen Autodimerisierung zwischen den Molekülen und somit zur Auslösung der Signalkaskade ohne äußeren Stimulus wie eines Fas-Liganden oder einer chemischen Substanz wie Coumermycin. Proapoptotische Proteine, die in Zellen expremiert werden, weisen normalerweise nur eine minimale oder gar keine Toxizität auf. Ihre Toxizität kann daher erhöht oder reguliert werden durch Lipid-permeable-Chemikalien. MacCorkle et al. ((MacCorkle et al. 1998) bezeichneten derartige induzierbare Proteine als

„künstliche Todesschalter“ (ADS = *artificial death switches*) und nannten den Prozess an sich „chemisch induzierbare Apoptose“ (CIA = *chemically induced apoptosis*). CID- induzierte Aggregation und Aktivierung von Caspasen und anderen proapoptotischen Molekülen können daher zum Zelltod führen (Fan et al. 1999;Shariat et al. 2001;Belshaw et al. 1996;Spencer et al. 1996;Muzio et al. 1998;Yang et al. 1998). Die Daten deuten darauf hin, dass bereits vor der Dimerisierung der Fusionsproteine durch den CID Coumermycin eine gewisse Autodimerisierung zwischen den homologen Proteinen stattfindet (siehe Ergebnisse Abbildung. 13). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein DR5-DD_Gyr1×_Flag durch Coumermycin zusätzlich dimerisiert bzw. zu größeren Komplexen aggregiert. Bei der Verwendung von DR5-DD_Gyr3×_Flag konnte durch Coumermycin keine weitere Aggregation bzw. Dimerisierung der Fusionsproteine erreicht werden.

Im Gegensatz dazu haben andere Studien gezeigt, dass die Expression der DED von FADD eine gewisse Autotoxizität zur Folge hat (Muzio et al. 1996;Medema et al. 1997). Die Gruppe um Spencer et al. (Fan et al. 1999) konnte demonstrieren, dass die Oligomerisierung der DED des Fas-assoziierten Proteins FADD, erfolgreich zur Auslösung von Apoptose führt, somit liegt die Schlußfolgerung nahe, dass die primäre Funktion von FADD, wie die von Apaf 1, in der Oligomerisierung von rekrutierten Caspasen liegt.

Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit verwendeten intrazellulär vorkommenden Adaptorprotein FADD, kam auch ein in der Zellmembran vorkommender Todesrezeptor Nummer 5 zur Anwendung, der in dieser Form in anderen Studien mit induzierbaren proapoptotischen Molekülen noch nicht untersucht wurde. DR5 (= *death receptor 5*) gehört zu der Gruppe der TRAIL-Rezeptoren (Pan et al. 1997) (Cha et al. 2004;Jin et al. 2004;Thomas et al. 2004) und besitzt wie der Fas-Rezeptor einen intrazellulären Anteil in Form von Todesdomänen (DD = *death domain*). Über diese Todesdomänen wird in vivo, wie man mittlerweile herausgefunden hat (zu Beginn dieser Arbeit noch nicht geklärt), normalerweise das Adapterprotein FADD rekrutiert und weiter über die Caspase 8 und Caspase 3 der Zelltod induziert. Bei der Verwendung des Konstruktes mit DR5 konnte wie bei FADD gezeigt werden, dass die DR5 Moleküle dimerisieren, die erwartete Rekrutierung des Adapterproteins FADD und damit die Auslösung der Signalkaskade blieb jedoch aus.

Nach dem Einschleusen der Expressionsvektoren in die menschlichen Zelllinien 293T (embryonale Nierenfibroblasten) beziehungsweise HL60 (myeloide Zellen) wurde untersucht

inwieweit die daraus resultierenden Fusionsproteine exprimiert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle drei Fusionsproteine in ausreichender Menge exprimiert werden, sowohl in den Nierenfibroblasten, die adherent wachsen, als auch in den myeloiden Zellen, die ein nicht-adherentes Wachstum aufweisen (siehe Ergebnisse 3.3 und 3.4). Die alleinige Überexpression der Fusionsproteine und damit der proapoptischen Moleküle FADD beziehungsweise DR5 führte hierbei nicht zur Auslösung der apoptotischen Signalkaskade.

4.3 Coumermycin-induzierte chemische Dimerisierung und die Frage nach der Induktion der Apoptose

Eine Vielzahl an zellulären Prozessen wird von Interaktionen zwischen Proteinen geleitet. Um die Interaktion zwischen spezifischen intrazellulären Proteinen *in vitro* nachahmen zu können oder nachvollziehbar zu machen und damit Rückschlüsse auf Gegebenheiten *in vivo* ziehen zu können, muss man sich einer Methode bedienen, die in der Lage ist die Interaktion zwischen den zu untersuchenden Proteinen künstlich zu induzieren. Die Gruppe von Roger Perlmutter (Farrar et al. 1996) konnte über die Methode der Coumermycin-induzierten künstlichen Dimerisierung nachweisen, dass die Dimerisierung von Raf- Proteinen allein, unabhängig von Membranbestandteilen ausreicht, um Raf- Proteine zu aktivieren und damit die MAP- Signalkaskade zu stimulieren. Mit diesen *in vitro* Experimenten an Raf-Proteinen konnten sie einen Rückschluß auf die Begebenheiten *in vivo* ziehen, indem die Oligomerisierung dieser Proteine einen entscheidenden Prozess in der Raf-Aktivierung darstellen.

Die Oligomerisierung beziehungsweise die Dimerisierung von apoptotischen Molekülen *in vivo* stellt einen allgemein gültigen und anerkannten Mechanismus im Signaltransduktionsweg der Apoptose dar. Dieser Mechanismus konnte bereits vielfach anhand von chemisch induzierten Dimerisierungen *in vitro* (CIDs) nachvollzogen werden (Spencer et al. 1996;Chen et al. 2002;MacCorkle et al. 1998), auch wenn in dieser Studie und in einigen Studien von Anderen die Dimerisierung von FADD oder DR5 beziehungsweise Caspase 3 nicht zur erwarteten Induktion der Apoptose führte (Yang et al. 1998;Grimm et al. 1996). Diese gegensätzlichen Ergebnisse können zum Einen darauf zurückgeführt werden, dass oft der Abstand zwischen den Zielproteinen und den dimerisierenden Domänen eine entscheidende Rolle spielt in Bezug auf die Weiterleitung des apoptotischen Signals. Zum

Anderen kann aus den negativen Ergebnissen geschlossen werden, dass auch eine korrekte Orientierung der dimerisierten Moleküle von Bedeutung sein könnte.

Ergebnisse anderer Studien

Die Gruppe Spencer konnte mittels der FK1012-induzierten Dimerisierung zeigen, dass ein Fusionsprotein mit dem intrazellulären Anteil des Erythropoietin-Rezeptors und mit entweder einer oder drei FKBP12 Domänen durch die Chemikalie FK1012 dimerisierte bzw. zu größeren Komplexen oligomerisierte (MacCorkle et al. 1998). Der Signaltransduktionsweg, der normalerweise in vivo durch Erythropoietin aktiviert wird und in Anwesenheit von Interleukin 3 zur Proliferation von Zellen führt, konnte mit Hilfe dieses Konstruktes in vitro in einer murinen Zelllinie (Ba/F3) ausgelöst werden. Zellen die Fusionsproteine mit nur einer FKBP12 Domäne exprimierten zeigten dabei eine niedrigere Proliferationsrate, als diejenigen mit drei FKBP12 Domänen. Hier wurde angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit der Dimerisierung in Klonen mit drei versus einer FKBP12 Domäne höher ist beziehungsweise die Bildung von größeren oligomeren Komplexen effizienter in der Weiterleitung des mitogenen Signals ist.

Beide in dieser Arbeit getesteten Zelllinien (HL60 und 293T) waren soweit es nach dem bisherigen Stand der Experimente beurteilbar ist, nicht sensitiv auf die hergestellten, induzierbaren Todesschalter. Das Ziel, mittels der hergestellten Fusionsproteine in menschlichen Zelllinien künstlich Apoptose durch die Dimerisierung mit Coumermycin auszulösen, konnte nicht erreicht werden. Die zugrunde liegenden Ursachen dieser Resistenz sind noch nicht völlig geklärt. Einige Ursachen könnten in der Caspase-8 Aktivierung durch dominant negative Caspase 8-Homologe liegen, in der Existenz von Inhibitoren der Caspase-Aktivierung (Deveraux et al. 1997), der Überexpression von sogenannten Kontrollgenen (*checkpoint genes*) wie zum Beispiel Bcl-2 und Bcl-xl (Veis et al. 1993) sowie durch das Mitwirken weiterer antiapoptotischer Proteine wie c-FLIP (Irmeler et al. 1997), die alle in der Lage sind den Fas-Signaltransduktionsweg zu beeinflussen beziehungsweise zu blockieren.

Konformation der Fusionsproteine

Auch wenn wir für das Fusionsprotein DR5-DD_Gyr1x_Flag demonstrieren konnten, dass Coumermycin zwei homologe Fusionsproteine zu dimerisieren vermochte beziehungsweise

zur Aggregation von mehreren homologen Fusionsproteinen führte (siehe Ergebnisse Abbildung 13D), wissen wir nicht inwieweit eventuelle Konformationsänderungen der Proteine durch die Interaktion untereinander die weitere Signaltransduktion hemmte oder verhinderte.

Alle in dieser Arbeit hergestellten Fusionsproteine enthalten sowohl Gyrase (750 Aminosäuren) als auch FLAG (14 AS) (siehe Ergebnisse Abbildung 9). Die Verbindung dieser Moleküle mit den untersuchten proapoptotischen Molekülen könnte durchaus die Interaktionen zwischen den Proteinen gestört haben und somit die Dimerisierung bzw. die Rekrutierung von Caspasen durch unbekannte Konformationsänderungen unmöglich haben werden lassen. Betrachten wir zum Beispiel das Fusionsprotein Gyr1x_FADD_Flag. Hier können wir nicht sicher ausschließen, dass eventuell die Amino-terminale Lage der Gyrase, die weitere Interaktion der DED von FADD mit der DED von Caspase 8 verhinderte.

Subzelluläre Lokalisation

Eine weiterer Punkt, der in Betracht gezogen werden muß, liegt in der subzellulären Lokalisation der Todes-Domäne des transmembranen Todesrezeptors DR5. In dieser Arbeit wurde nur der intrazelluläre Anteil (DD) verwendet. Hier stellt sich ebenfalls die Frage, ob für eine korrekte Bildung eines vorübergehenden homodimeren Komplexes während der Dimerisierung und die anschließende Rekrutierung von Caspasen nicht der komplette Rezeptor mit transmembranem Anteil und subzellulärem Anteil von Bedeutung ist. Zudem kommt hinzu, dass der Signaltransduktionsweg über den DR5-Rezeptor zum Beginn dieser Arbeit noch unzureichend aufgeklärt war. Mittlerweile geht man davon aus, dass die Signaltransduktion über die sogenannten TRAIL-Rezeptoren (darunter DR5) ebenfalls über die Rekrutierung des Adapterprotein FADD verläuft (Walczak et al. 1997; Walczak and Kramer 2000).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung des proapoptotischen Moleküls DR5 durch die Induktion mit Coumermycin *in vitro* erfolgte. Der erwartete Anstoß der Signalkaskade in Form der Rekrutierung und Aktivierung von Procaspase- 8- Molekülen und die Auslösung des Zelltodes über die Aktivierung von Effektorcaspasen, wie Caspase 3, blieb jedoch aus. In Bezug darauf wäre es interessant in weiterführenden Experimenten, die dimerisierten Komplexe des Fusionsproteins DR5-DD_Gyr1x_Flag (siehe Ergebnisse Abbildung 13D hier die Komplexbildung bei 120 bzw. 250 kDa) aufzuschlüsseln und zu schauen inwieweit Proteine wie FADD in den Komplexen vorhanden sind.

Komplexbildung mit endogenen Molekülen

Darüberhinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine ungewollte Komplexbildung mit endogenen Molekülen stattgefunden hat. Ein bekanntes Problem, dass bereits bei der Verwendung von dem von Schreiber und Kollegen entwickeltem FK1012 durch die Interaktionen mit endogenen FKBP's aufgetreten ist. Auch wenn in der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung von Gyrase, die auf bakteriellen und nicht menschlichen Proteinen wie FKBP12 basiert, die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion mit endogenen Molekülen vermindert wird, ist diese ungewollte Komplexbildung nicht ausgeschlossen. Um herauszufinden inwieweit in der vorliegenden Arbeit endogene Moleküle bzw. andere rekrutierte Moleküle (wie FADD oder Caspase 8 Moleküle) an der Komplexbildung beteiligt sind, könnte man sich in weiterführenden Experimenten zum Beispiel der Immunpräzipitation bedienen. Darüberhinaus besteht mit Hilfe des Western-Blottings die Möglichkeit der Frage nachzugehen, ob FADD-Moleküle auch in den größeren Komplexen mitgelaufen sind und somit einen Hinweis auf eine Komplexbildung mit anderen Molekülen geben.

5 Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Fusionsproteine im Sinne künstlicher Todesschalter (*ADS = Artificial Death Switches*) hergestellt und überprüft, ob sie in menschlichen Zelllinien expremiert werden. Dabei wurde zum einen FADD gewählt, ein Adapterprotein, das am exekutiven Apoptose-Signaltransduktionsweg beteiligt ist und dort durch seine rezeptorinduzierte Oligomerisierung die Aktivierung von Caspasen (Cystein Aspartat-spezifische Protease, speziell die Caspase 8) induziert und dadurch Apoptose vermittelt. Zum anderen kam der Todesrezeptor DR5 zur Anwendung, der bisher in Verbindung mit künstlichen Todesschaltern nicht näher untersucht wurde und bezüglich seiner Funktion innerhalb der Signalkaskade zu Beginn der Arbeit noch nicht eindeutig zugeordnet werden konnte. DR5 enthält wie der Fas-Rezeptor einen intrazellulären Anteil in Form einer Todesdomäne (DD = *Death Domain*). Über Todesdomänen wird in vivo, wie man mittlerweile weiß, normalerweise das Adapterprotein FADD rekrutiert und weiter über die Caspase 8 und Caspase 3 Zelltod induziert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Gyr1x_FADD_Flag, DR5-DD_Gyr1x_Flag und DR5-DD_Gyr3x_Flag sowohl in myeloiden Zellen (HL60), als auch in embryonalen Nierenfibroblasten (293T) exprimiert werden können. Bereits die alleinige Expression der Fusionsproteine führte teilweise zur Autodimerisierung bzw. Aggregation der Proteine ohne der Hilfe kreuzvernetzender Substanzen. Darüberhinaus sprechen die Ergebnisse dafür, dass diese Spontanaggregation der Fusionsproteine (DR5-DD_Gyr1x_Flag beziehungsweise Gyr1x_FADD_Flag) zum Teil zur Auslösung des Apoptose - Signaltransduktionsweges führte (siehe Ergebnisse Abbildung 15).

Der zweite Teil dieser Arbeit widmete sich der Coumermycin-induzierten chemischen Dimerisierung und der Frage nach der Induktion der Apoptose. Es konnte gezeigt werden, daß das Fusionsprotein DR5-DD_Gyr1x_Flag mit Hilfe von Coumermycin dimerisierte beziehungsweise zu größeren Komplexen aggregierte (siehe Ergebnisse Abbildung 13D). Die Menge an dimerisierten Proteinen war dabei von der Coumermycin-Konzentration abhängig. Die erwartete Auslösung der Apoptose-Signalkaskade über die Rekrutierung des Adapterproteins FADD über die Todesdomäne (DD) und damit die Oligomerisierung homologer Todesdomänen jeweils von FADD und DR5 und weiter über die Caspase-8 und Caspase 3 blieb aus. In Bezug auf das Fusionsprotein DR5-DD_Gyr3x_Flag konnte keine Kreuzvernetzung durch Coumermycin gezeigt werden. Die Spontanaggregation der Proteine verlief unbeeinträchtigt von der Zugabe von Coumermycin.

Die grundsätzliche Möglichkeit der Kreuzvernetzung von Molekülen des Apoptosewegs durch Verwendung des Gyrase-Coumermycin Systems konnte also gezeigt werden. Ob die Komplexbildungen mit endogenen Molekülen, die subzelluläre Lokalisation der Todesdomäne des transmembranen Todesrezeptors DR5 oder eventuelle Konformationsänderungen der Proteine durch die Interaktion untereinander die weitere Signaltransduktion hemmte oder verhinderte, müssen weitere Studien zeigen.

Literaturverzeichnis

1. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9:423-432
2. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87:171
3. Ashkenazi A, Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-1308
4. Babine RE, Bender SL (1997) Molecular Recognition of Proteinminus signLigand Complexes: Applications to Drug Design. *Chem Rev* 97:1359-1472
5. Belshaw PJ, Spencer DM, Crabtree GR, Schreiber SL (1996) Controlling programmed cell death with a cyclophilin-cyclosporin-based chemical inducer of dimerization. *Chem Biol* 3:731-738
6. Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR, Salvesen GS (2003) A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 11:529-541
7. Boldin MP, Mett IL, Varfolomeev EE, Chumakov I, Shemer-Avni Y, Camonis JH, Wallach D (1995) Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem* 270:387-391
8. Bouillet P, Strasser A (2002) BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 115:1567-1574
9. Braun JS, Novak R, Herzog KH, Bodner SM, Cleveland JL, Tuomanen EI (1999) Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat Med* 5:298-302
10. Bursch W, Taper HS, Lauer B, Schulte-Hermann R (1985) Quantitative histological and histochemical studies on the occurrence and stages of controlled cell death (apoptosis) during regression of rat liver hyperplasia. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 50:153-166
11. Cain H, Gerstenkorn B (1962) [Karyological, karyometric and histochemical studies on cell death and necrosis in liver implant in rats]. *Beitr Pathol Anat* 126:426-453
12. Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA, . (1992) Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256:97-100
13. Cha SS, Song YL, Oh BH (2004) Specificity of molecular recognition learned from the crystal structures of TRAIL and the TRAIL:sDR5 complex. *Vitam Horm* 67:1-17

14. Chen M, Orozco A, Spencer DM, Wang J (2002) Activation of initiator caspases through a stable dimeric intermediate. *J Biol Chem* 277:50761-50767
15. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81:505-512
16. Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM (1996) FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 271:4961-4965
17. Clackson T, Yang W, Rozamus LW, Hatada M, Amara JF, Rollins CT, Stevenson LF, Magari SR, Wood SA, Courage NL, Lu X, Cerasoli F, Jr., Gilman M, Holt DA (1998) Redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10437-10442
18. Cory S, Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2:647-656
19. Cotter TG, Lennon SV, Glynn JM, Green DR (1992) Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. *Cancer Res* 52:997-1005
20. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388:300-304
21. Donepudi M, Mac SA, Briand C, Grutter MG (2003) Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell* 11:543-549
22. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68:383-424
23. Eckhart L, Ballaun C, Uthman A, Kittel C, Stichenwirth M, Buchberger M, Fischer H, Sipos W, Tschachler E (2005) Identification and characterization of a novel mammalian caspase with proapoptotic activity. *J Biol Chem*
24. Ekert PG, Read SH, Silke J, Marsden VS, Kaufmann H, Hawkins CJ, Gerl R, Kumar S, Vaux DL (2004) Apaf-1 and caspase-9 accelerate apoptosis, but do not determine whether factor-deprived or drug-treated cells die. *J Cell Biol* 165:835-842
25. Ellis HM, Horvitz HR (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44:817-829
26. Ellis RE, Horvitz HR (1991) Two *C. elegans* genes control the programmed deaths of specific cells in the pharynx. *Development* 112:591-603
27. Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7:663-698

28. Fan L, Freeman KW, Khan T, Pham E, Spencer DM (1999) Improved artificial death switches based on caspases and FADD. *Hum Gene Ther* 10:2273-2285
29. Farrar MA, Alberol I, Perlmutter RM (1996) Activation of the Raf-1 kinase cascade by coumermycin-induced dimerization. *Nature* 383:178-181
30. Grimm S, Stanger BZ, Leder P (1996) RIP and FADD: two "death domain"-containing proteins can induce apoptosis by convergent, but dissociable, pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10923-10927
31. Grobmyer SR, Armstrong RC, Nicholson SC, Gabay C, Arend WP, Potter SH, Melchior M, Fritz LC, Nathan CF (1999) Peptidomimetic fluoromethylketone rescues mice from lethal endotoxic shock. *Mol Med* 5:585-594
32. Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ (1998) Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* 17:3878-3885
33. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13:1899-1911
34. Hacker G (2000) The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 301:5-17
35. Hengartner MO (1999) Programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Recent Prog Horm Res* 54:213-222
36. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR (1992) *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356:494-499
37. Hengartner MO, Horvitz HR (1994) *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76:665-676
38. Hoepfner DJ, Hengartner MO, Fisher DE (1996) Programmed cell death: from development to disease. Meeting report. *Biochim Biophys Acta* 1242:217-220
39. Horvitz HR (2003) Worms, life, and death (Nobel lecture). *ChemBiochem* 4:697-711
40. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Chang KC, Cobb JP, Buchman TG, Korsmeyer SJ, Karl IE (1999) Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14541-14546
41. Hu Y, Ding L, Spencer DM, Nunez G (1998) WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem* 273:33489-33494
42. Huang Q, Deveraux QL, Maeda S, Salvesen GS, Stennicke HR, Hammock BD, Reed JC (2000) Evolutionary conservation of apoptosis mechanisms: lepidopteran and baculoviral inhibitor of apoptosis proteins are inhibitors of mammalian caspase-9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1427-1432
43. Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388:190-195

44. Jin TG, Kurakin A, Benhaga N, Abe K, Mohseni M, Sandra F, Song K, Kay BK, Khosravi-Far R (2004) Fas-associated protein with death domain (FADD)-independent recruitment of c-FLIPL to death receptor 5. *J Biol Chem* 279:55594-55601
45. Keenan T, Yaeger DR, Courage NL, Rollins CT, Pavone ME, Rivera VM, Yang W, Guo T, Amara JF, Clackson T, Gilman M, Holt DA (1998) Synthesis and activity of bivalent FKBP12 ligands for the regulated dimerization of proteins. *Bioorg Med Chem* 6:1309-1335
46. Kerr JF (1965) A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol* 90:419-435
47. Kerr JF (1967) Lysosome changes in acute liver injury due to helioitrine. *J Pathol Bacteriol* 93:167-174
48. Kerr JF (1969) An electron-microscope study of liver cell necrosis due to helioitrine. *J Pathol* 97:557-562
49. Kerr JF (1971) Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 105:13-20
50. Kerr JF, Searle J (1972a) A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. *J Pathol* 107:41-44
51. Kerr JF, Searle J (1972b) The digestion of cellular fragments within phagolysosomes in carcinoma cells. *J Pathol* 108:55-58
52. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257
53. Kondratyev A, Gale K (2000) Intracerebral injection of caspase-3 inhibitor prevents neuronal apoptosis after kainic acid-evoked status epilepticus. *Brain Res Mol Brain Res* 75:216-224
54. Kroemer G, Reed JC (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6:513-519
55. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501
56. Li M, Ona VO, Guegan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, Olszewski AJ, Stieg PE, Lee JP, Przedborski S, Friedlander RM (2000) Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* 288:335-339
57. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489
58. Lockshin RA, Williams CM (1965) PROGRAMMED CELL DEATH--I. CYTOLOGY OF DEGENERATION IN THE INTERSEGMENTAL MUSCLES OF THE PERNYI SILKMOTH. *J Insect Physiol* 11:123-133

59. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104:487-501
60. MacCorkle RA, Freeman KW, Spencer DM (1998) Synthetic activation of caspases: artificial death switches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3655-3660
61. Marks AR (1996) Cellular functions of immunophilins. *Physiol Rev* 76:631-649
62. Marsden VS, O'Connor L, O'Reilly LA, Silke J, Metcalf D, Ekert PG, Huang DC, Cecconi F, Kuida K, Tomaselli KJ, Roy S, Nicholson DW, Vaux DL, Bouillet P, Adams JM, Strasser A (2002) Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* 419:634-637
63. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME (1997) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 16:2794-2804
64. Mizushima S, Nagata S (1990) pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res* 18:5322
65. Mullauer L, Gruber P, Sebinger D, Buch J, Wohlfart S, Chott A (2001) Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res* 488:211-231
66. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 85:817-827
67. Muzio M, Salvesen GS, Dixit VM (1997) FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J Biol Chem* 272:2952-2956
68. Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273:2926-2930
69. Nagata S (1996) Fas-mediated apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 406:119-124
70. Nagata S, Golstein P (1995) The Fas death factor. *Science* 267:1449-1456
71. Nicholson DW (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6:1028-1042
72. Nicholson DW (2000) From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 407:810-816
73. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139:271-279

74. Orlinick JR, Vaishnav A, Elkon KB, Chao MV (1997) Requirement of cysteine-rich repeats of the Fas receptor for binding by the Fas ligand. *J Biol Chem* 272:28889-28894
75. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM (1997) The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276:111-113
76. Reddien PW, Cameron S, Horvitz HR (2001) Phagocytosis promotes programmed cell death in *C. elegans*. *Nature* 412:198-202
77. Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS (2001) Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14250-14255
78. Riedl SJ, Fuentes-Prior P, Renatus M, Kairies N, Krapp S, Huber R, Salvesen GS, Bode W (2001) Structural basis for the activation of human procaspase-7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14790-14795
79. Robertson JD, Fadeel B, Zhivotovsky B, Orrenius S (2002) 'Centennial' Nobel Conference on apoptosis and human disease. *Cell Death Differ* 9:468-475
80. Rudin CM, Thompson CB (1997) Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev Med* 48:267-281
81. Salvesen GS, Dixit VM (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10964-10967
82. Sattler M, Liang H, Nettlesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW (1997) Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275:983-986
83. Savill J, Fadok V (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407:784-788
84. Schierle GS, Hansson O, Leist M, Nicotera P, Widner H, Brundin P (1999) Caspase inhibition reduces apoptosis and increases survival of nigral transplants. *Nat Med* 5:97-100
85. Schreiber SL (1991) Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 251:283-287
86. Shariat SF, Desai S, Song W, Khan T, Zhao J, Nguyen C, Foster BA, Greenberg N, Spencer DM, Slawin KM (2001) Adenovirus-mediated transfer of inducible caspases: a novel "death switch" gene therapeutic approach to prostate cancer. *Cancer Res* 61:2562-2571
87. Shi Y (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9:459-470
88. Shou W, Aghdasi B, Armstrong DL, Guo Q, Bao S, Charng MJ, Mathews LM, Schneider MD, Hamilton SL, Matzuk MM (1998) Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature* 391:489-492

89. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ (1999) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 144:281-292
90. Snyder SH, Sabatini DM (1995) Immunophilins and the nervous system. *Nat Med* 1:32-37
91. Spencer DM, Belshaw PJ, Chen L, Ho SN, Randazzo F, Crabtree GR, Schreiber SL (1996) Functional analysis of Fas signaling in vivo using synthetic inducers of dimerization. *Curr Biol* 6:839-847
92. Spencer DM, Wandless TJ, Schreiber SL, Crabtree GR (1993) Controlling signal transduction with synthetic ligands. *Science* 262:1019-1024
93. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (1998) Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1:949-957
94. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES (1996) Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14486-14491
95. Starling GC, Bajorath J, Emswiler J, Ledbetter JA, Aruffo A, Kiener PA (1997) Identification of amino acid residues important for ligand binding to Fas. *J Exp Med* 185:1487-1492
96. Sulston JE (1976) Post-embryonic development in the ventral cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 275:287-297
97. Sulston JE (2003) *Caenorhabditis elegans*: the cell lineage and beyond (Nobel lecture). *Chembiochem* 4:688-696
98. Sulston JE, Horvitz HR (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56:110-156
99. Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 100:64-119
100. Thomas LR, Henson A, Reed JC, Salsbury FR, Thorburn A (2004) Direct binding of Fas-associated death domain (FADD) to the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor DR5 is regulated by the death effector domain of FADD. *J Biol Chem* 279:32780-32785
101. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, . (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356:768-774
102. Vaux DL, Weissman IL, Kim SK (1992) Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 258:1955-1957

103. Veis DJ, Sentman CL, Bach EA, Korsmeyer SJ (1993) Expression of the Bcl-2 protein in murine and human thymocytes and in peripheral T lymphocytes. *J Immunol* 151:2546-2554
104. Vogt C. Untersuchungen über die Entwicklungsbiologie der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). 1842. Solothurn Switzerland, Jent und Gassmann.
105. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG, Rauch CT (1997) TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 16:5386-5397
106. Walczak H, Krammer PH (2000) The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 256:58-66
107. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP (1999) Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 17:331-367
108. Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FK, Dale J, Sneller M, Yao X, Puck JM, Straus SE, Lenardo MJ (1999) Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 98:47-58
109. Weil M, Jacobson MD, Coles HS, Davies TJ, Gardner RL, Raff KD, Raff MC (1996) Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol* 133:1053-1059
110. Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA, . (1994) Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 370:270-275
111. Wu YC, Stanfield GM, Horvitz HR (2000) NUC-1, a caenorhabditis elegans DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis. *Genes Dev* 14:536-548
112. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1973a) Cell death in the normal neonatal rat adrenal cortex. *J Pathol* 111:255-261
113. Wyllie AH, Kerr JF, Macaskill IA, Currie AR (1973b) Adrenocortical cell deletion: the role of ACTH. *J Pathol* 111:85-94
114. Yakovlev AG, Knoblach SM, Fan L, Fox GB, Goodnight R, Faden AI (1997) Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. *J Neurosci* 17:7415-7424
115. Yang X, Chang HY, Baltimore D (1998) Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol Cell* 1:319-325
116. Yuan J, Horvitz HR (1992) The Caenorhabditis elegans cell death gene ced-4 encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* 116:309-320

117. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75:641-652
118. Yuan JY, Horvitz HR (1990) The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death. *Dev Biol* 138:33-41
119. Zou H, Henzel WJ, 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

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Georg Häcker, der mir von Anfang an inspirierend, geduldig, engagiert und stets bei jeglichen Rückfragen helfend zur Seite stand. Heutzutage kann man leider nicht voraussetzen über die gesamte Zeit der Doktorarbeit so professionell und bedingungslos betreut zu werden. Hierfür nochmals meine tiefste Dankbarkeit.

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 danke ich für das wunderbare Arbeitsklima, wo immer Platz war für anregende fachbezogene wie auch private Gespräche. namentlich den Kolleginnen und Kollegen Anette Bauer, Svetla Chaneva, Silke Fischer, Christine Fürmann, Monika Gerhard, Thomas Harlander, Christina Hilpert, Susanne Kirschnek, Michael Knese, Georg Linsinger, Astrid Mack, Catharina Müller-Thomas, Marc Rehm, Julia Scheffel, Stefan Schliep, Claudia Schwarz, Barbara Seiffert, David Takramah und Juliane Vier.

Weiterhin möchte ich Dr. Carsten Kirschning für die gründliche Einarbeitung in die Transfektion mit Calciumphosphat und seine Hilfsbereitschaft danken, sowie allen anderen, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Darüberhinaus danke ich meinem Vater Matthias Anders, meiner Mutter Ramona Anders sowie meiner Schwester Claudia Anders, die mir allzeit das Vertrauen, die Kraft wie den Beistand geben meinen Zielen treu zu bleiben.

„Die Erfahrung der Unverbrüchlichkeit Ihres gegebenen Wortes, der Ausgewogenheit Ihrer höflichen Distanz, aus der allein sich gute Nähe in der Ferne entfalten kann, schützt mich auf rauhem Wege“ (Zitat nach R. Anders)