

**Der C-Terminus des antiapoptotischen Bcl-2
Familienmitgliedes A1 reguliert Stabilität und
Funktionalität des Proteins**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

vorgelegt von
Marco Herold

aus
Lülsfeld

Würzburg, 2005

Eingereicht am:

1. Gutachter: PD Dr. Berberich

2. Gutachter: Professor Dr. Krohne

1. Prüfer: PD Dr. Berberich

2. Prüfer: Professor Dr. Krohne

der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung:

Promotionsurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Ich habe in keinem früheren Verfahren einen akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

.....

Marco Herold

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 1.Mai 2001 bis 31.Januar 2005 am Institut für Virologie und Immunbiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Anleitung von PD Dr. Ingolf Berberich angefertigt.

Für meinen Vater

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank geht an Dr. Ingolf Berberich für die ausgezeichnete Betreuung, seine ständige Diskussionsbereitschaft, seine guten Ratschläge und seine stetige Hilfsbereitschaft, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Schimpl danke ich für die Unterstützung und für die ständige Diskussionsbereitschaft, die ebenfalls zu einem grossen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Chris Kraus und Andrea Peters verdanke ich sehr viel, da sie mich immer wieder bei meiner praktischen Arbeit unterstützt haben und mir auch ausserhalb des Labors immer zur Seite standen.

Bedanken möchte ich mich bei allen Doktoranden, Diplomanden und Praktikanten, die mich während dieser Zeit im Labor von Dr. Ingolf Berberich begleitet haben und mich wo es nur ging unterstützt haben.

Danke auch an Christian Linden für die vielen sortierten Zellen und das Labor von Dr. Thomas Kerkau für viele nette Stunden im Labor und ausserhalb.

Danken möchte ich auch meinen Bruder Axel Herold, seiner Frau Sabine Herold und seinen beiden Kindern Sarah und Elena für viel Hilfe außerhalb des Labors.

Ausserdem geht mein ganz besonderer Dank an meine Mutter und meinen Vater - dem ich diese Arbeit widmen möchte - da beide immer für mich da waren und mir die Möglichkeit gaben diese Doktorarbeit zu vollenden. Danke!!

1. Einleitung	3
1.1 Die B-Zellentwicklung	3
1.1.1 Die Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark	3
1.1.2 Die Reifung der B-Zelle in der Peripherie	4
1.2 Verschiedene Induktionswege der Apoptose	5
1.3 Die Rolle der Mitochondrien und der Bcl-2 Familie bei der Induktion von Apoptose	6
1.3.1 Induktion von Apoptose durch proapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie	7
1.3.2 Die antiapoptotische Bcl-2 Familie	8
1.3.4 Alternative Regulationsmechanismen der Bcl-2 Familienmitglieder	12
1.4 Das Ubiquitinsystem und die Proteasomen	14
1.5 Ziel der Arbeit	15
2 Material	16
2.1 Antibiotika	16
2.2 Antikörper	16
2.3 Bakterien	17
2.4 Chemikalien	17
2.5 Enzyme	18
2.6 Inhibitoren	18
2.7 Filmmaterial	18
2.8 Medien	18
2.8 Kits	19
2.9 Plasmide bzw. Vektoren	20
2.10 Oligonukleotide	24
2.11 Puffer und Lösungen	25
2.12 Radioaktivität	26
2.13 Zelllinien	26
3. Methoden	27
3.1 Zelluläre Methoden	27
3.1.1 Ermittlung der Zellzahl	27
3.1.2 Stimulation von WEHI 231 Zellen	27
3.1.3 Kultivierung der Zelllinien	27
3.1.4 Transfektion/Infektion	28
3.1.5 AnnexinV Färbung	29
3.1.6 Durchflußzytometrie	29
3.1.7 Herstellung von Milzzellsuspensionen	30
3.1.8 Isolation und Reinigung ruhender B-Lymphozyten	31
3.2 DNA-Techniken	32
3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
3.2.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	34
3.2.3 Klonierungen	35
3.2.4 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen	36
3.2.5 Großpräparation von Plasmid DNA	37
3.2.6 Bestimmung der DNA-Konzentration	37
3.2.7 Sequenzierung mittels Fluorochrom markierter Nukleotide	37
3.3 Proteinbiochemische Methoden	39
3.3.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Gesamtzellen	39

3.3.2	Auftrennung von Zytoplasma- und Membranfraktion	39
3.3.3	Immunpräzipitation.....	40
3.3.4	Pulse/ Chase	41
3.3.5	Herstellung und Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins	42
3.3.6	Herstellung eines A1 spezifischen Antikörpers.....	43
3.3.7	Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
3.3.8	Western Blotting	46
4.	Ergebnisse	48
4.1	Das antiapoptotische Bcl-2 Familienmitglied A1 verhindert BZR induzierte Caspase 9/ Caspase 7 Aktivierung.....	48
4.2	A1 liegt im Gegensatz zu seinen verwandten Vertretern hauptsächlich im Zytoplasma vor	49
4.3	A1 ist ein sehr instabiles Protein	50
4.4	Die kurze Halbwertszeit von A1 ist eine generelle Eigenschaft des Proteins, die auch humanes A1 (Bfl1) charakterisiert	52
4.5	Endogenes A1 ist ebenfalls ein sehr instabiles Protein	54
4.6	Die kurze Halbwertszeit von A1 ist auf ein anderes Protein übertragbar.....	55
4.7	A1 wird in Proteasomen abgebaut	56
4.8	Instabiles A1 wird an Lysinresten ubiquityliert.....	57
4.9	Wildtypisches A1 schützt WEHI 231 Zellen besser vor Apoptose als die stabilere, kürzere A1 Mutante	59
4.10	Nachahmung einer Phosphorylierung im C-Terminus von A1 führt zu erhöhter Proteinstabilität, aber zu einem verringerten antiapoptotischen Potential	62
4.11	Der A1 Wildtyp, die verkürzte A1 Mutante und die Glutaminsäuremutante von A1 binden das antiapoptotische Bim in gleichem Maße.....	64
4.12	A1 wird durch die gleichzeitige Expression von Bim stabilisiert.....	67
4.13	Bim reduziert die Ubiquitylierung des A1 Proteins.....	69
4.14	Die A1 Stabilität wird durch eine direkte Interaktion mit Bim vermittelt.....	70
5.	Diskussion	73
5.1	Die C-terminale A1 Sequenz enthält destabilisierende Elemente	73
5.2	Lysinabhängige Ubiquitylierung ist notwendig für die Instabilität und Stabilität des Proteins.....	75
5.3	Der C-Terminus verstärkt das antiapoptotische Potential von A1.....	77
5.4	Phosphorylierung erhöht die Stabilität, reduziert aber die Schutzfunktion von A1.....	78
5.5	Bim und A1 – ein Wechselspiel zweier Antagonisten.....	79
5.6	A1 kann nur über direkte Interaktion mit Bim stabilisiert werden	80
5.7	Wie schützt das antiapoptotische Bcl-2 Familienmitglied A1 die Zelle vor Apoptose?.....	81
6.	Zusammenfassung.....	84
7.	Summary	85
8.	Literaturverzeichnis.....	86
9.	Anhang	93

1. Einleitung

Um seine Integrität und Individualität zu erhalten, muss ein Organismus in der Lage sein, eindringende Krankheitserreger wie Viren, Bakterien und andere Parasiten als fremd zu erkennen und zu eliminieren. Diese Aufgabe wird von spezialisierten Zellen des Körpers verrichtet, die sich aus Vorläuferzellen des Knochenmarks, den so genannten hämatopoetischen Stammzellen entwickeln. In ihrer Gesamtheit werden diese Zellen als Immunsystem bezeichnet. Dieses Abwehrsystem besitzt die Fähigkeit, mit einer sofortigen, aber wenig spezifischen Reaktion gegen Eindringlinge vorzugehen (angeborene Immunantwort) oder aber mit einer verzögerten, jedoch sehr spezifischen und äußerst effektiven Reaktion, Fremdes zu bekämpfen (erworbene Immunantwort). Letztere (Antwort) zeichnet sich neben ihrer hohen Spezifität durch Gedächtnisbildung aus, d.h. sie führt häufig zu langanhaltender Immunität gegen das gleiche Pathogen.

Um das volle Spektrum sowohl von intra- als auch extrazellulär lokalisierten Fremdstoffen erkennen und bekämpfen zu können, kam es zu einer Spezialisierung im Immunsystem: Auf der einen Seite gibt es T-Zellen, die mit ihren Antigen-erkennenden Strukturen (T-Zellrezeptoren) Antigene im Kontext von MHC-Molekülen auf der Oberfläche anderer Zellen erkennen (zelluläre Immunität). Auf der anderen Seite gibt es B-Zellen, die mittels membranständiger Immunglobuline (B-Zellrezeptoren; BZR) lösliche und kohlenhydrathaltige Proteine detektieren und erkennen können. Dadurch kommt es zur Aktivierung der B-Zellen und schließlich zur Sekretion von Immunglobulinen entsprechender Spezifität.

1.1 Die B-Zellentwicklung [1]

1.1.1 Die Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark

B-Zellen entwickeln sich im Knochenmark. Die Entwicklung verläuft über verschiedene Stadien, die durch das Rearrangement der Gensegmente für die leichten und schweren Ketten der Immunglobuline, deren Oberflächenexpression sowie andere Markergene gekennzeichnet sind.

Auf dem Pro-B-Zell-Stadium werden die Gensegmente, die für den variablen Bereich der schweren Kette der Immunglobuline kodieren, rearrangiert. Dabei wird im frühen Pro-B-

Zell-Stadium ein D (Diversity)-Segment mit einem J (Joining)-Segment verknüpft. In einem weiteren Schritt wird dem DJ-Segment ein V-Segment vorgelagert. Alle diese Umlagerungen erfordern die Genprodukte RAG-1 und RAG-2.

Nach erfolgreicher VDJ-Verknüpfung erfolgt die Expression einer intakten schweren Kette (μ -Kette) zusammen mit $\kappa 5$ und VpreB1 (Pseudo leichte Kette) als Prä-B-Zellrezeptor auf der Zelloberfläche. Über diesen werden Signale in die Zelle gegeben, die zur Proliferation und zum Ende der Umlagerung im Genlocus der schweren Ketten führen. Nun beginnt das Rearrangement der Gene der leichten Kette. Hierbei wird ein V- mit einem J-Segment verknüpft, wobei wiederum die Aktivitäten der beiden Genprodukte für RAG-1 und RAG-2 notwendig sind. Ist auch dieses Rearrangement erfolgreich, exprimiert die Zelle ein intaktes Immunglobulin (IgM) auf der Oberfläche und wird als unreife B-Zelle bezeichnet. Da die Antigen-bindenden, variablen Teile durch zufällige Rekombinationsereignisse der V, D und J-Gensegmente entstehen, werden auch B-Zellklone generiert, deren Immunglobuline mit körpereigenen Strukturen reagieren. Deshalb entwickelten sich Kontrollmechanismen, durch die autoreaktive B-Zellen unschädlich gemacht werden.

Um dies zu erreichen, können die variablen Teile der schweren Ketten verändert werden („receptor editing“), die Zellen in einen nicht mehr reaktiven Zustand fallen („anergy“) oder durch den programmierten Zelltod (Apoptose) eliminiert werden (klonale Selektion).

1.1.2 Die Reifung der B-Zelle in der Peripherie

Nach Verlassen des Knochenmarks wandern die B-Zellen in die Milz und differenzieren zu reifen B-Zellen. Treffen diese Zellen auf ihr Antigen werden sie aktiviert. Ein Teil der B-Zellen differenziert direkt zu kurzlebigen Plasmazellen, d.h. zu Immunglobulin sezernierenden Zellen. Andere Zellen proliferieren sehr stark und bilden so genannte Keimzentren. Im Verlauf der Keimzentrumsreaktion kommt es zu somatischen Hypermutationen im variablen Teil der Immunglobuline und zum „class switch“, das heißt zu einer Änderung des Antikörperisotyps.

Selektionsprozesse im Keimzentrum sorgen dafür, dass nur solche B-Zellen überleben, die hochaffine und intakte Immunglobuline besitzen. Niedrigaffine B-Zellen hingegen oder B-Zellen, die aufgrund der somatischen Hypermutationen nur noch defekte Immunglobuline exprimieren, sterben durch Apoptose. Am Ende der Keimzentrumsreaktion entstehen langlebige Plasmazellen und Gedächtniszellen.

1.2 Verschiedene Induktionswege der Apoptose

Bei der klonalen Deletion und Generierung hochaffiner B-Zellen in den Keimzentren sterben viele B-Zellen durch Apoptose [2, 3]. Im Gegensatz zur Nekrose platzt die Zelle nicht, sondern stirbt in einem genau geregelten Prozess, der deshalb auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird [4]. Dabei schrumpft die Zelle, Proteine werden fragmentiert, die DNA wird in 200-300bp große Stücke degradiert und es erfolgt die Bildung apoptotischer Vesikel. Diese werden von Makrophagen aufgenommen und verdaut, um Entzündungsreaktionen zu vermeiden [5].

Die meisten morphologischen Veränderungen, die man in einem apoptotischen Prozeß beobachtet, werden durch Proteasen verursacht, die als Caspasen (Cysteinyln Aspartat Proteasen) bezeichnet werden [4, 6, 7]. Diese sind zwischen den Spezies hochkonserviert und besitzen ein Cystein in ihrem katalytischen Zentrum. Substrate werden immer nach einer Asparaginsäure gespalten. Die Substratspezifität der Proteasen wird durch vier Aminosäuren vor der Schnittstelle bestimmt.

In der Zelle gibt es zwei Hauptwege, Apoptose zu induzieren [8]. Beim Todesrezeptor-abhängigen Weg (extrinsischer Weg, Typ I) werden Caspasen direkt an einen Membranrezeptor rekrutiert und aktiviert. Ein Beispiel stellt die Induktion der Apoptose über den Todesrezeptor Fas (Apo-1, CD95) dar [9]. Nach Trimerisierung von Fas durch den Fas-Liganden, bildet sich an den cytoplasmatischen Teilen der Fas Moleküle ein Proteinkomplex. In diesem Komplex, der auch als DISC (Death-inducing signaling complex) bezeichnet wird, kommt es durch das Vorhandensein mehrerer Caspase 8 Moleküle [10] zur gegenseitigen Aktivierung. Diese wiederum aktivieren eine ganze Kaskade weiterer Caspasen, sogenannter Effektorcaspasen.

Eine alternative Möglichkeit der Apoptoseinduktion stellt der Mitochondrien-abhängige Weg dar (intrinsische Weg, Typ II) [11]. Dabei führt die Schädigung der Mitochondrien durch proapoptische Bcl-2 Familienmitglieder [12] (s.u.) zur Cytochrom C Freisetzung und dadurch zur Aktivierung der Initiatorcaspase dieses Weges, der Caspase 9. Wie im Typ I Weg kommt es dadurch zur Aktivierung von Effektorcaspasen und schließlich zum Zelltod durch Apoptose [13].

1.3 Die Rolle der Mitochondrien und der Bcl-2 Familie bei der Induktion von Apoptose

Mitochondrien spielen im Typ II Signalweg als Auslöser und im Typ I Weg als Verstärker eine zentrale Rolle in der Apoptosereaktion. Als Antwort auf bestimmte Todessignale (UV, Zytostatika) [14] kommt es nach Permeabilisierung der Mitochondrienmembran u.a. zur Freisetzung von Cytochrom C [15, 16], wodurch die Caspasekaskade [13] induziert und die Apoptose eingeleitet wird. Permeabilität und Integrität der Mitochondrien werden durch die Mitglieder der Bcl-2 Familie (Übersicht siehe Abb.1) reguliert [11].

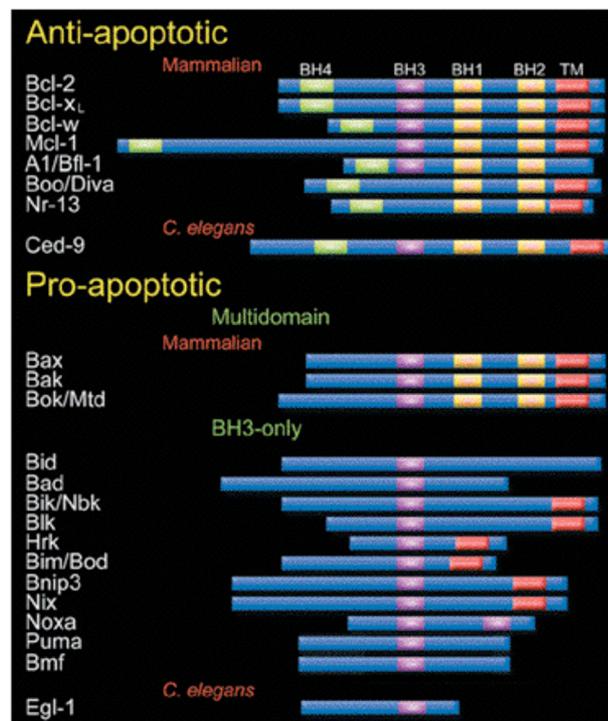


Abb.1 Übersicht über die Bcl-2 Familie [17].

Die Bcl-2 Familie umfasst sowohl anti- (z.B. Bcl-2, A1, Bcl-x) als auch proapoptotische Mitglieder (z.B. Bid, Bim, Bad, Bax, Bak). Die erst genannten schützen eine Zelle vor Apoptose während die anderen diese induzieren bzw. verstärken. Allen Mitgliedern gemeinsam ist die Sequenzhomologie in mindestens einer von max. 4 α -helikalen Domänen, die man als BH- (Bcl-2 Homology) Domäne bezeichnet. Fast alle antiapoptotischen Mitglieder besitzen die BH1, 2, 3 und 4 Domäne, wohingegen die

proapoptotischen Mitglieder entweder die BH1, 2 und 3 („Multi-Domain“) oder nur die BH3 („BH3-only“) Domäne besitzen [17].

1.3.1 Induktion von Apoptose durch proapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie

Die beiden „Multi-Domain“ Mitglieder Bax und Bak sind für die Apoptose einer Zelle unabdingbar. Der gleichzeitige Verlust beider Gene führt zu einem fast völligen Ausbleiben von Apoptose nach Induktion durch verschiedene intrinsische Todesstimuli [18]. Eine wichtige Aufgabe dieser beiden Bcl-2 Familienmitglieder ist es, die mitochondriale Integrität durch Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran zu zerstören [19]. Dies wird durch zwei verschiedene Mechanismen erreicht. Zum einen bilden Bax und Bak direkt Poren in der äußeren mitochondrialen Membran, zum anderen öffnen sie auch Kanäle wie VDAC (voltage dependent anion channel) in der Membran [20, 21]. Durch beide Prozesse verlieren die Mitochondrien ihr Membranpotential und es kommt zum Ausstrom von Cytochrom C [22].

Die „BH3-only“ Proteine (Bid, Bim, Bok, usw.) sind die Sensoren in der Zelle, die apoptotische Signale an die eigentlichen Effektoren Bax und Bak weiterleiten. Die Proteine dieser Gruppe werden durch unterschiedliche apoptotische Signale aktiviert. Die Aktivierung der „BH3-only“ Proteine erfolgt nicht nur auf transkriptioneller Ebene, sondern auch durch posttranslationale Modifikationen [23]. Bim liegt in der Zelle bereits vor und wird durch Bindung an den Dyneinmotorkomplex der Mikrotubuli an seiner proapoptotischen Funktion gehindert [24]. Nach Induktion der Apoptose, beispielsweise durch BZR Signale, wird Bim aus dem Dyneinkomplex freigesetzt [25, 26]. Dies ermöglicht es, Bim an die Mitochondrien zu lokalisieren und Bax und Bak zu aktivieren. Bid liegt ebenfalls als inaktives Protein in den Zellen vor und wird nach Fas Ligation durch Spaltung über Caspase 8 aktiviert [27, 28]. Durch diese Spaltung entsteht ein kurzes C-terminales Protein (tBid), welches ein Glycin als erste Aminosäure besitzt. Dieses wird myristiliert, wodurch tBid in die Mitochondrienmembran integrieren und Bax und Bak aktivieren kann [29, 30].

1.3.2 Die antiapoptotische Bcl-2 Familie

1.3.2.1 Allgemeiner Überblick

Das zuerst beschriebene Mitglied dieser Familie, Bcl-2, wurde aufgrund einer chromosomalen Translokation t(14; 18) in einem humanen folliculären B-Zelllymphom entdeckt [31, 32]. Die Überexpression des Bcl-2 Proteins fördert das Überleben von Lymphozyten bei vielen verschiedenen Todesstimuli wie z.B. dem Entzug von Cytokinen und Wachstumsfaktoren, DNA Schädigung oder oxidativem Stress [33-35]. Der Schutzeffekt wird durch Bindung und somit Neutralisation proapoptotischer Mitglieder erreicht. Bcl-2 kann die Apoptose sowohl durch (I) Binden von „BH3-only“ Proteinen wie Bim [36] als auch (II) Bindung von Bax und Bak verhindern [37]. Die Interaktion mit den „BH3-only“ oder Multidomain Proteinen wird durch die Wechselwirkung der BH3 α -Helix mit der hydrophoben Grube des Bcl-2 erreicht, die durch die BH1, BH2 und BH3 Domäne der antiapoptotischen Mitglieder zustande kommt [38]. Fast alle antiapoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder besitzen eine hydrophobe C-terminale Domäne, die es ihnen ermöglicht, in intrazelluläre Membranen, wie die äußere Mitochondrienmembran, das Endoplasmatische Retikulum (ER) und die Kernmembran zu integrieren. Bcl-2 lokalisiert vor allem an ER und Kernmembran, während Bcl-x und Bcl-w in erster Linie an Mitochondrien vorzufinden sind [39, 40]. Bcl-w integriert erst nach einem zytotoxischen Signal in die Membran [41]. Im Falle von Bcl-2 kommt es durch eine Deletion des C-Terminus zur Reduktion seiner antiapoptotischen Funktion, da das Protein durch den Verlust der mitochondrialen Ankersequenz nicht mehr an die Mitochondrien lokalisieren kann. Wird die Ankersequenz des Bcl-2 hingegen durch eine andere mitochondriale Leitsequenz ersetzt, so kann wieder eine Zunahme der antiapoptotischen Funktion beobachtet werden [42]. Somit ist Bcl-2 vor allem aufgrund der Membranlokalisation in der Lage, Zellen vor Apoptose zu schützen. Interessanterweise besitzt das ebenfalls antiapoptotische A1 keine hydrophobe Transmembrandomäne.

1.3.2.2 Das antiapoptotische Bcl-2 Familienmitglied A1

A1 wurde im Zuge einer Genexpressionsstudie von myeloiden Zellen identifiziert [43]. In humanen fetalen Leberzellen konnte das humane Homolog von A1, Bfl1, charakterisiert werden [44]. A1 wird vor allem in lymphatischen Zellen wie B- und T-Lymphozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen, Neutrophilen und Granulozyten exprimiert [45].

Während im humanen Genom nur ein Gen für Bfl1 codiert, gibt es in der Maus vier Genloci für A1. Dabei liefern nur drei Gene ein funktionelles Genprodukt (A1-a, -b, -d), während ein Locus ein Pseudogen repräsentiert (A1-c). Die drei funktionellen Isoformen von A1 sind sowohl auf DNA als auch auf Proteinebene hochkonserviert und weisen mehr als 96% Homologie auf [45]. Dass die Isoformen auch funktionell nahezu identisch sind, legen A1-a defiziente Mäuse nahe [46]. Hierbei führt der A1-a Knockout zu einem sehr milden Phänotyp, lediglich charakterisiert durch die Zunahme der spontanen Apoptoserate von peripheren Neutrophilen.

Der Mechanismus der antiapoptotischen Wirkung von A1 ist bislang nicht geklärt. Es wurde beschrieben, dass Bfl1 in der Lage ist, das proapoptotische Protein Bid zu binden [47]. Nach Bindung von Bid durch Bfl1 kann dieses zwar immer noch in seine aktive Form tBid gespalten werden, der Cytochrom C Ausstrom aus den Mitochondrien wird durch Bfl1 aber verhindert. In Bakterien konnte gezeigt werden, dass Apoptose die durch Bad [48], ein weiteres proapoptotisches Familienmitglied, induziert wird durch Koexpression von Bfl1 verhindert werden kann [49]. Dies deutet darauf hin, dass die antiapoptotische Wirkung von A1 durch Bindung und Neutralisation der proapoptotischen Familienmitglieder vermittelt werden könnte.

Hinsichtlich der Lokalisation von A1 gibt es unterschiedliche Ergebnisse [47, 50, 51]. Wie bereits erwähnt, trägt die Membranlokalisation der antiapoptotischen Familienmitglieder zur Schutzfunktion bei [40]. Obwohl A1 keine typischen Transmembrandomänen besitzt, die es effektiv an die Mitochondrien rekrutieren, ist es doch in der Lage, die Zellen vor Apoptose zu schützen. Da bisher kein Signal gefunden wurde, welches zu einer Umverteilung des A1 Proteins an intrazelluläre Membranen führt, bleibt die Frage offen, ob der geringe A1 Anteil an den Membranen oder der weitaus größere zytoplasmatische Anteil die Schutzfunktion vermittelt.

1.3.3 Die Rolle der Bcl-2 Familie im Immunsystem

Apoptose spielt bei vielen Entwicklungsprozessen eine Rolle. Auch im Immunsystem ist Apoptose essentiell. So können Störungen der Apoptose zu Immundefizienzen, Autoimmunität oder Krebs führen [52]. Ein Grund für die Veränderung der Apoptoserate ist oftmals ein Ungleichgewicht zwischen Bcl-2 Familienmitgliedern, wenn beispielsweise einzelne Mitglieder entweder zu stark oder überhaupt nicht exprimiert werden. In Mausmodellen kann eine solche Situation entweder durch Gendeletion oder Überexpression einzelner Mitglieder aus dieser Familie nachgeahmt werden.

Das Fehlen der „Multidomain“ Mitglieder Bax und Bak führt zu einer erhöhten Anzahl hämatopoetischer Vorläuferzellen und Lymphozyten, die in der Folge Gewebe wie Leber und Niere infiltrieren und zerstören [53, 54]. Thymozyten von letal bestrahlten Mäusen, die mit Knochenmark von Bax/ Bak defizienten Mäusen rekonstituiert wurden, werden im Thymus nicht mehr negativ selektioniert und sind resistent gegen T-Zellrezeptor induzierter Apoptose in der Peripherie [53].

Normalerweise erfolgt nach Induktion von Apoptose zuerst eine Aktivierung der „BH3-only“ Proteine, die Bax und Bak dann aktivieren. Da die einzelnen Mitglieder der „BH3-only“ Gruppe differenziell aktiviert werden - d.h. in verschiedenen Zelltypen wird durch verschiedene apoptotische Signale nur ein oder eine Gruppe von „BH3-only“ Proteinen aktiviert - führt der Knockout eines einzelnen „BH3-only“ Proteins zu meist sehr spezifischen und weit weniger drastischen Phänotypen als beim Knockout von Bax und Bak. Der Verlust von Bid hat beispielsweise mit zunehmendem Alter eine spontane myeloide Hyperplasie zur Folge. Ansonsten weisen diese Knockout Mäuse aber einen normalen Phänotyp auf [55]. Die Abwesenheit von Bim dagegen führt zu Defekten bei der negativen Selektion von Thymozyten und B-Lymphozyten, hat aber auf die Lebensfähigkeit der Tiere keinen Einfluss [25, 56].

Durch den Verlust proapoptotischer Mitglieder kommt es zur Reduktion der Apoptose. Im Gegensatz dazu führt der Verlust von antiapoptotischen Mitgliedern zu einem Anstieg der Apoptoserate. Dies wird beispielsweise an Bcl-2 defizienten Mäusen deutlich [57]: Die Lymphozytenentwicklung dieser Tiere ist zunächst normal; Milz und Thymus bilden sich allerdings mit zunehmendem Alter aufgrund verstärkter Apoptose zurück. Das Fehlen von Bcl-2 hat zwar keinen Einfluss auf die Embryonalentwicklung der Mäuse, führt aber zu einem verfrühten Wachstumsstopp und anschließendem Tod der Tiere. Bcl-x Defizienz hat im Gegensatz zur Bcl-2 Defizienz eine verminderte Lebensdauer von unreifen

Lymphozyten zur Folge [58]. Die Entwicklung Bcl-x defizienter Mäuse stoppt aber meist in der Embryonalentwicklung am Tag 13, aufgrund massiver Apoptose im sich entwickelnden Gehirn.

Weiterhin zeigen Überexpressionsstudien von Bcl-2 oder Bcl-x das Potential dieser antiapoptotischen Mitglieder im Immunsystem, da beide in der Lage sind unreife Thymozyten vor verschiedenen Todesstimuli wie Glukokortikoiden oder γ -Strahlung zu schützen [59, 60].

Da A1 hauptsächlich in Zellen des Immunsystems exprimiert wird, wurde dessen Bedeutung bisher auch für das Überleben dieser Zellen untersucht. A1 wird durch CD40 Stimulation von primären B-Zellen der Maus oder WEHI 231 Zellen verstärkt exprimiert [61]. Zudem führt die Transduktion von WEHI 231 Zellen mit A1 zu einem Schutz vor BZR induzierter Apoptose [62, 63]. Interessanterweise kommt es beim Übergang der unreifen zur reifen B-Zelle zu einer verstärkten A1 Synthese in Abhängigkeit von BZR Signalen [64]. Beim Übergang von unreifen zu reifen Stadien einer B-Zelle spielen außerdem Signale durch BAFF eine wichtige Rolle [65, 66]. Der Knockout von BAFF führt beispielsweise zum Stop der Reifung von B-Zellen. Weiterhin hat die Stimulation von B-Zellen durch BAFF unter anderem eine verstärkte Expression von A1 zur Folge, wodurch das Überleben der B-Zellen ebenfalls gefördert wird [67, 68].

In der weiteren Entwicklung der B-Zellen kommt es zur Ausbildung der Keimzentren, in denen sehr viele B-Zellen durch Apoptose eliminiert werden. Die Stimulation der B-Zellen im Keimzentrum über CD40 führt zu einer NF- κ B-abhängigen Expression von A1 [62], wodurch die Zellen resistent gegen BZR induzierter Apoptose werden und sich somit entweder zu Gedächtnis B-Zellen oder Plasmazellen weiterentwickeln können. Um sich zu einer Plasmazelle weiterentwickeln zu können, benötigt die B-Zelle den Transkriptionsfaktor Blimp1 [69, 70]. Interessanterweise, unterdrückt Blimp1 aber die Expression von A1, wodurch die Plasmazellen anfälliger für Apoptose werden [71]. Da A1 in vitro die Blimp1 induzierte Apoptose in WEHI 231 Zellen unterbinden kann, könnte A1 in der Tat eine Rolle in der Entstehung von Plasmazellen spielen. Dennoch konnte A1 bisher nicht in langlebigen Plasmazellen des Knochenmarks nachgewiesen werden [72].

In transgenen Mausmodellen konnte die Relevanz von A1 weiter bestätigt werden. Mäuse, die A1-a unter der Kontrolle des E μ -Enhancers verstärkt exprimieren, zeigen eine erhöhte Überlebensrate früher B-Zellen und Thymozyten [73]. Des Weiteren führt die Expression von A1 in T-Zellen zu einer Reduktion der Apoptose nach Stimulation der T-Zellen durch Concanavalin A (ConA) oder α -CD3/ α -CD28 [74].

1.3.4 Alternative Regulationsmechanismen der Bcl-2 Familienmitglieder

Wie bereits erwähnt, entscheidet das Verhältnis von pro- zu antiapoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern über das Überleben von Zellen. Da dieser Prozess genau reguliert sein muss, gibt es neben der transkriptionellen Kontrolle weitere Möglichkeiten zur Regulation von Bcl-2 Familienmitgliedern.

Die mRNA selbst kann durch alternatives Spleißen verändert werden. Bei den antiapoptotischen Mitgliedern Bcl-x [75] und Mcl-1 [76] entsteht durch diesen Vorgang ein kürzeres Protein, welches im Gegensatz zum gesamten Protein Apoptose induzieren kann. Beim humanen A1 Homolog Bfl1 wird durch einen alternativen Spleißprozess ebenfalls ein verkürztes Protein, Bfl1short (Bfl1S), generiert [77]. Dieses geht im Gegensatz zu seinem längeren Pendant in den Nukleus, wo es jedoch weiterhin antiapoptotisch wirkt.

Das proapoptotische murine Bim wird ebenfalls auf dieser Stufe reguliert. Durch alternatives Spleißen entstehen drei verschiedene Isoformen: Bim-Extralong (BimEL), Bim-Long (BimL) und Bim-Short (BimS) [78]. Alle drei Isoformen sind in der Lage Apoptose zu induzieren. BimS jedoch ist im Gegensatz zu den anderen beiden Isoformen nicht an den Dyneinkomplex der Mikrotubuli verankert und induziert somit direkt Apoptose [24, 78].

Nicht nur differentielle mRNA Prozessierung, sondern auch posttranslationelle Modifikationen am Protein haben einen Einfluss auf die Funktion der Proteine. So führt die Phosphorylierung von Bad durch die Kinase Akt/ PKB dazu, dass dieses mit Proteinen der 14-3-3 Familie interagiert und dadurch in seiner Konformation verändert wird. Die Folge ist eine weitere Phosphorylierung in der BH3-Domäne durch PKA, wodurch die Bindung zu Bcl-2 verhindert wird und somit Bad inaktiv ist [49].

Bcl-2 wird ebenfalls über Phosphorylierung in seiner Funktionalität verändert. Die Phosphorylierung bestimmter Serin/ Threoninreste durch JNK kann sowohl zu einer Zunahme [79] als auch einer Abnahme [80, 81] der antiapoptotischen Wirkung führen. Die Überexpression einer phosphorylierungsdefizienten Variante von Bcl-2 in humanen Jurkat T-Zellen und den murinen B-Zelllymphom WEHI 231 erhöht die Schutzfunktion von Bcl-2 gegenüber Fas bzw. Taxol induzierter Apoptose [81]. Der Verlust der Phosphorylierung erhöht insbesondere die Bindungsaffinität zu Bim [82] wodurch das Schutzpotential vergrößert wird. Zusätzlich verlängert die Phosphorylierung von Bcl-2 auch seine Halbwertszeit, so dass vermutlich schon dadurch sein antiapoptotisches Potential vergrößert wird [83-85].

Als weitere Möglichkeit der Modifikation von Proteinen wurde die Desaminierung von Asparaginsäureresten beschrieben. Bcl-x wird durch diese Veränderung daran gehindert „BH3-only“ Moleküle zu binden und zu neutralisieren [86]. In der Folge ist Bcl-x nicht mehr in der Lage die Zelle vor Apoptose zu schützen.

Da Caspasen zelluläre Proteine spalten, können sie nicht nur die Apoptose einleiten, sondern zudem amplifizieren. Eine Möglichkeit der Verstärkung besteht darin, bestimmte Bcl-2 Familienmitglieder in ihrer Funktion so zu verändern, dass es zu einer Funktionszunahme oder zu einem Verlust der einzelnen Mitglieder kommt. Obwohl BimEL bereits ein proapoptotisches Molekül ist, wird durch die Abspaltung von 14 Aminosäuren am N-Terminus des Proteins seine proapoptotische Funktion weiter verstärkt [87]. Grund für die Zunahme des proapoptotischen Potentials ist eine erhöhte Affinität zu Bcl-2, wodurch dessen Bindung an Bax/ Bak gestört wird. Die hieraus resultierende höhere Aktivität von Bax/ Bak hat einen verstärkten Zelltod zur Folge. BimEL ist aber nicht das einzige Bcl-2 Familienmitglied das durch Caspasen gespalten werden kann. Das antiapoptotische Mcl-1 wird durch eine Caspase-abhängige Spaltung ebenfalls in seiner Aktivität verändert. Das Spaltprodukt kann zwar noch an Bim binden, es aber nicht mehr in seiner proapoptotischen Funktion stören [88].

Eine Möglichkeit zur Regulation auf Ebene der Proteinmenge stellt der proteasomale Abbauweg dar. Erste Hinweise, dass der proteasomale Signalweg eine Rolle bei Apoptose spielt, stammen von Untersuchungen an der Motte *Manduca sexta*. Beim Absterben der intersegmentalen Muskeln wurde eine starke Zunahme an Ubiquitylierung festgestellt [89]. Später konnte vielfach gezeigt werden, dass es im Zuge der Apoptose oftmals zu einer Zunahme von Ubiquitin-konjugierten Proteinen und Ubiquitylierungsenzymen kommt [90, 91].

Bcl-2 wird ebenfalls über die Veränderung seiner Proteinstabilität reguliert [85]. Nach Induktion von Apoptose in Endothelzellen durch TNF- α wird Bcl-2 im proteasomalen Weg abgebaut. Vor der Degradation wird Bcl-2 durch Phosphatasen aus der MAPK-Phosphatase (= MKP) Familie dephosphoryliert, um anschliessend ubiquityliert und proteasomal degradiert werden zu können. In gesunden Zellen wird Bcl-2 hingegen durch ERK phosphoryliert, wodurch die proteasomale Degradation verhindert wird [92]. Diese Kinase kann auch das proapoptotische BimEL am Serinrest 69 phosphorylieren [93], wodurch dieses aber nicht stabilisiert sondern für den ubiquitinabhängigen Abbau im Proteasom markiert wird.

Weiterhin wird das antiapoptotisch wirkende Mcl-1 durch Proteindegradation reguliert. Es besitzt eine PEST Sequenz im N-Terminus und wird nach verschiedenen Phospho- bzw. Dephosphorylierungsereignissen im Proteasom abgebaut [94].

1.4 Das Ubiquitinsystem und die Proteasomen [95-97]

Die proteasomale Degradation der Bcl-2 Proteine ist ein wichtiger Mechanismus zur Regulation der Apoptose, da sich dadurch das Verhältnis von pro- und antiapoptotischen Proteinen verändern kann.

Die Polyubiquitylierung eines Proteins markiert dieses in der Regel für den proteasomalen Abbau. Ubiquitin liegt als nicht aktiviertes Protein frei in der Zelle vor und wird durch ein Ubiquitin aktivierendes Enzym (E1), ATP-abhängig aktiviert. E1 hydrolysiert ATP und bildet einen Komplex mit Ubiquitin. Danach wird das Ubiquitin auf eines von zahlreichen Ubiquitin-konjugierenden Enzyme (E2) übertragen. In manchen Fällen kann E2 das Ubiquitin direkt an sein Substrat hängen, meistens benötigt E2 allerdings ein weiteres Enzym, um das Ubiquitin zu übertragen. Dieses Enzym bezeichnet man als E3 Ligase. Es ist in der Lage zwischen dem Lysinrest des Substrates und dem Glycinrest im C-Terminus des Ubiquitin eine kovalente Isopeptidbindung zu katalysieren. Es gibt viele verschiedene E3 Ligasen; Fast jede von diesen besitzt ihr eigenes Substrat, wodurch die Übertragung des Ubiquitin spezifisch wird.

Meistens werden mehrere Ubiquitinreste an ein Lysin im Substrat gehängt, so dass eine Multiubiquitinkette entsteht. Dieser Prozess kann durch ein weiteres Enzym (E4) unterstützt werden. Nachdem ein Substrat mit einer oder mehreren Multiubiquitinketten versehen worden ist, wird es in einem Multienzymkomplex, dem Proteasom, degradiert (Übersicht siehe Abb.2).

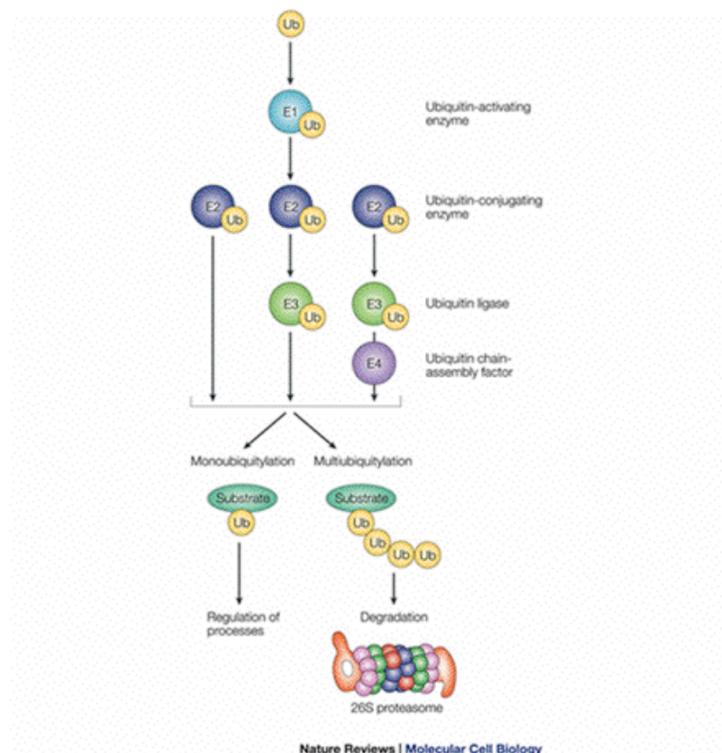


Abb.2 Ubiquitylierung und anschließende Degradation von Proteinen [98]

1.5 Ziel der Arbeit

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Analyse des antiapoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedes A1. Hintergrund ist die Beobachtung, dass die meisten antiapoptotischen Mitglieder aufgrund hydrophober Sequenzen in ihren C-Termini an intrazelluläre Membranen lokalisieren. Da A1 jedoch keine typischen hydrophoben Sequenzen im C-Terminus besitzt, wurde der Frage nachgegangen, welchen Einfluss der C-Terminus auf die Eigenschaft und Funktionalität von A1 hat.

2. Material

2.1 Antibiotika

- Ampicillin	Sigma
- G418	Calbiochem-Novabiochem
- Penicillin	Apotheke
- Streptomycin	Apotheke
- Zeocin	Invitrogen®

2.2 Antikörper

Stimulation

- anti-IgM (F(ab') ₂ anti-Maus IgM)	ICN
--	-----

Western Blots

- anti-Caspase 7 (Kaninchen, polyklonal)	New England Biolabs (NEB)
- anti-Caspase 9 (Kaninchen, polyklonal)	NEB
- anti-Flag (M1) (Maus, monoklonal)	Sigma
- anti-Cytochrom C (Maus, monoklonal)	Pharmingen
- anti-GFP (Kaninchen, polyklonal)	Clontech
- anti-Bcl-2 (C-2) (Maus, monoklonal)	Santa Cruz
- anti-ERK (C-14) (Kaninchen, polyklonal)	Santa Cruz
- anti-CD28 (JJ316) (Maus, monoklonal)	Haus
- anti-A1 (Kaninchen, polyklonal)	Arbeitskreis
- anti-GST (Kaninchen, polyklonal)	Arbeitskreis
- anti-Caspase 3 (Kaninchen, polyklonal)	NEB
- anti-HA (12CA5) (Maus, monoklonal)	Roche
- anti-Bim (Kaninchen, polyklonal)	Pharmingen

Material

- | | |
|---|---------|
| - anti-Bid (Ziege, polyklonal) | R&D |
| - anti-Maus (Peroxidase-konjugiertes Ziegen-IgG) | Jackson |
| - anti-Kaninchen (Peroxidase konjugiertes Esel IgG) | Dianova |
| - anti-Ziege (Peroxidase konjugiertes Esel IgG) | Dianova |

B-Zell-Reinigung

- | | |
|---|--------------|
| - Anti-Thy1.2 (13-4) (monoklonaler, IgM-Antikörper) | Arbeitskreis |
| - Anti-CD4 (monoklonaler, Ratte-IgM-Antikörper) | Arbeitskreis |
| - Anti-CD8 (monoklonaler, Ratte-IgM-Antikörper) | Arbeitskreis |

Durchflußzytometrie

- | | |
|------------------------------|------------|
| - Anti-B220 PE (Klon A3-6B2) | Gibco |
| - AnnexinV Cy5 | Pharmingen |

2.3 Bakterien

- | | |
|------------|--------------|
| - Top 10 F | Arbeitskreis |
| - Bl 21 | Stratagene |

2.4 Chemikalien

- | | |
|----------------------------|---------------|
| - Agarose | Roth |
| - EDTA | Roth |
| - Tris | Roth |
| - DMSO (Dimethyl Sulfoxid) | Sigma |
| - DTT | Sigma |
| - Trypanblau | Sigma |
| - Wasserstoffperoxid | AppliChemGmbH |
| - SDS | AppliChemGmbH |
| - TEMED | AppliChemGmbH |
| - Tween20 | AppliChemGmbH |

2.5 Enzyme

- BamH I	NEB
- Bgl II	MBI
- EcoR I	NEB
- Bpu 1102I	MBI
- Ssp I	MBI
- Eco91I	MBI
- Asc I	NEB
- Mun I	MBI
- Pfu DNA Polymerase	Promega
- DNA-Polymerase „Advantage™ Klen Taq Polymerase Mix“	CLONTECH
- T4 DNA Ligase	NEB
- SAP	MBI

2.6 Inhibitoren

- Cycloheximid	Sigma
- Etoposid	Calbiochem
- Proteasomeninhibitor II	Calbiochem
- Proteaseinhibitor P8340	Sigma

2.7 Filmmaterial

- „x-ray RETINA“ XBD, medizinischer Röntgenfilm	Fotochemische Werke GmbH
---	--------------------------

2.8 Medien

Zellen

RPMI+

RPMI 1640

Haus

supplementiert mit

Material

Glutamin (0,07%)	GibcoBRL
nicht essentielle Aminosäuren (1:100)	GibcoBRL
Natriumpyruvat (1:100)	GibcoBRL
Fötalem Kälberserum (5%, hitzeinaktiviert 30 min bei 56°C)	GibcoBRL
β-Mercaptoethanol (0,05 mM)	GibcoBRL
Penicillin (0,025%)	Apotheke
Streptomycin (0,025%)	Apotheke

<u>DMEM</u> (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Haus
supplementiert mit	
FCS (10%)	Seromed®
Penicillin (0,025%)	Apotheke
Streptomycin (0,025%)	Apotheke

Bakterien

LB-Medium (Fertigmedium: GibcoBRL)

Ampicillinplatten LB-Medium mit 1,5% Agar-Agar (Roth) + 50µg/ml Ampicillin

2.8 Kits

- DNA Präparation:

Kits für DNA Maxipräparation

Sigma

- DNA-Aufreinigung:

GENECLEAN® III Kit

Bio 101, Inc.

- Antikörper Aufreinigung

ImmunoPure Protein G IgG Orientation Kit

Pierce

2.9 Plasmide bzw. Vektoren

Die cDNAs für die verschiedenen Konstrukte wurden in bicistronische, retrovirale Vektorplasmide kloniert. Diese Vektoren enthalten zusätzlich, teilweise ein Flag- oder HA-Oligo am 5' bzw. 3' Ende der Multiple Cloning Site (MCS). In diesem Konstrukt ersetzt ein CMV enhancer die U3 Region im 5'LTR des zugrunde liegenden Murine Leukemia Virus (MuLV). In transduzierten Zielzellen sorgt eine IRES (Internal Ribosomal Entry Site) für die gekoppelte Expression von einem Markergenprodukt aus entweder chimärem Fluoreszenzprotein und Antibiotikaresistenz oder Fluoreszenzprotein alleine auf der einen Seite und Testgen auf der anderen Seite. Die Expression geschieht in Folge der reversen Transkription nun in Abhängigkeit von MuLV-LTR. Die IRES stammt vom Encephalomyocarditis Virus.

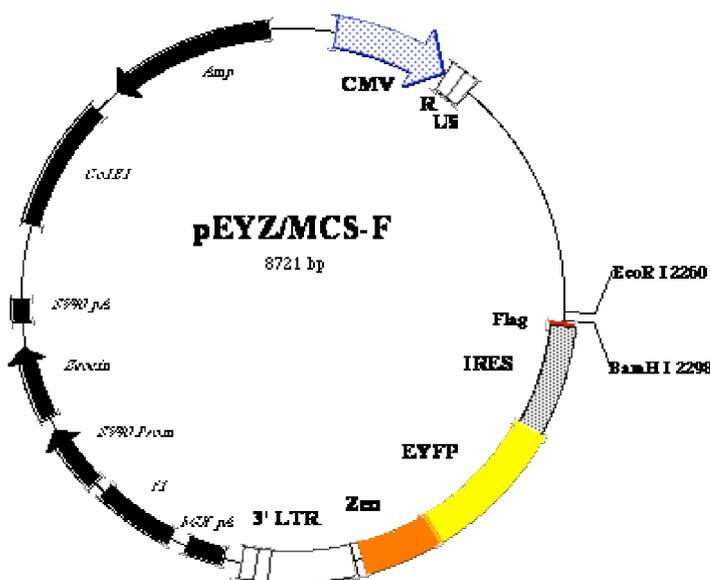


Abb.3 Retroviraler Bicistronischer Vektor mit einem Flag-Oligo am 3' Ende der MCS und dem chimärem Markergen aus Gelbfluoreszenz und Zeozinresistenz.

pHIT 60/ gag-pol

pHIT123/ env (ekotrop)

pHIT456/ env (amphotrop)

Kingsman Labor (Oxford)

Kingsman Labor

Kingsman Labor

Im Folgenden ist die Aminosäuresequenz des A1-a Wildtyps gezeigt und markiert welche Veränderungen vorgenommen wurden.

maeselmhihslaehylqyvlpafesapsqacrvlqrvafsvq**K**eve**K**nl**K**sylddfhvesidarii
fnqyme**K**efedgiinwgrivtifafggvll**K****K**lpqeialdvca**K**qvssfvaefimntgewirng
gwedgfi**K****K**fep**K**Sgw1↑**T**flqm**T**gqiwe**l**fl**K**

K = pEYZ/mA1K->A (1-11)

□ Austausch zu Alaninen

K = pEYZ/FmA1K->A (8-11)

□ Austausch zu Alaninen

X = pEYZ/FmA1E-Mut.

□ Austausch zu Glutaminsäure

↑ = pEYZ/FmA1trunc

oder pEYZ/mA1trunc

□ Abschneiden der Sequenz ab hier zur
Generierung der verkürzten A1 Mutante

Abb.4 Aminosäuresequenz vom A1 der Maus. Die Markierungen stellen die gemachten Veränderungen in der Proteinsequenz von A1 dar.

Nr.	Vektor*	Restriktion	Insert 1	Restriktion	Template1	Insert 2	Restriktion	Template2
1) pEYZ/FmA1trunc	pEYZ/FmA1wt	Bpu1102I/ BamHI	mA1trunc	Bpu1102I/ BamHI	PCR von pEYZ/FmA1 mit Primer #1 und #2			
2) pEYZ/FmA1E-Mut.	pEYZ/FmA1wt				PCR von pEYZ/FmA1 mit Primer #3 und #4			
3) pEYZ/FmA1K->A (8-11)	pEYZ/FmA1wt				PCR von pEYZ/FmA1 mit Primer #5 und #6; #1 und #7			
3) pEYZ/mA1wt	pEYZ/MCS	Eco91I/BamHI	Eco91I/NcoI Fragment	Eco91I/NcoI	pEYZ/MCS	mA1	NcoI/BamHI	pEYZ/FmA1wt
4) pEYZ/mA1trunc	pEYZ/mA1wt	Bpu1102I/BamHI	mA1trunc	Bpu1102I/BamHI	pEYZ/FmA1trunc			
5) pEYZ/mA1K->A (1-11)	pEYZ/mA1trunc	Bpu1102I/BamHI	mA1K->A (1-11)	Bpu1102I/BamHI	Mutationseinführung über PCR von pEYZ/FmA1K->A (8-11) mit Primer #1 und #7; #8 bis #15			
6) pEGZ/FhBf1	pEGZ/MCS	Eco91I/BamHI	Eco91I/NcoI Fragment	Eco91I/NcoI	pEYZ/FmA1	hBf1	NcoI/BamHI	PCR von humaner cDNA mit Primer #16 und #17
7) pEYZ/FmBcl-2	pEYZ/MCS	Eco91I/BamHI	Eco91I/NcoI Fragment	Eco91I/NcoI	pEYZ/FmA1	mBcl-2	NcoI/BamHI	PCR von muriner cDNA mit Primer #18 und #19
8) pEGN/mBidwt	pEGN/MCS	EcoRI/BamHI	mBidwt	EcoRI/BamHI	PCR von muriner cDNA mit Primer #20 und #21			
9) pEYZ/FmBimEL	pEYZ/Flag-MCS	EcoRI/BamHI	mBimEL	EcoRI/BamHI	PCR von muriner cDNA mit Primer #22 und #23			
10) pEGZ/HA-BimEL	pEGZ/HA-mA1wt	EcoRI/BamHI	mBimEL	EcoRI/BamHI	pEYZ/FmBimEL			
11) pEYZ/mBimEL-HA	pEYZ/mBlimp1-HA	EcoRI/BamHI	mBimEL	EcoRI/BamHI	pEYZ/FmBimEL			
12) pEGZ/HA-Ubi	pEGZ/HA-MCS	EcoRI/BamHI	Ubiquitin	MfeI/BamHI	PCR von muriner cDNA mit Primer #24 und #25			

13)pEYZ/mCasp3Mut.F**	pEYZ/mCasp7Mut.F	EcoRI->Klenow; BamHI	mCaspase3 Mutante	Sspl/BamHI	PCR zur Amplifikation und Einführung der Mutation mit Primer #26 bis #29			
14)pEYZ/mCasp3Mut.A1	pEYZ/mCasp7Mut.A1	Eco911/BamHI	mCaspase3 Mutante	Eco911/BamHI	pEYZ/mCaspase3Mut.Flag			
15)pEGN/mCasp9wtF	pEGN/MCS-Flag	EcoRI/BamHI	mCaspase9	EcoRI/BglII	PCR von muriner cDNA mit Primer #30 und #31			
16)pEGN/mCasp7wtF	pEGN/MCS-Flag	EcoRI/BamHI	mCaspase7	EcoRI/BamHI	PCR von muriner cDNA mit Primer #32 und #33			
17)pGEX2T/mA1trunc	pGex2T	BamHI	mA1trunc	BamHI	PCR von pEYZ/mA1trunc mit Primer #34 und #35			

* Bei Vektoren mit Insert wurde dieses durch die Restriktion im Zuge der Klonierung entfernt.

**Bei der Caspase 3 Mutante wurde das Cystein im aktiven Zentrum des Enzyms zu Serin mutiert.

Tabelle1: Darstellung aller für die Arbeit generierter Plasmide.

Weitere Plasmide:

pEGZ/hBcl-2
pEGN
pEYZ/MCS-FlagC
pEYZ/Flag-EcoRI-MCS
pEYZ/FmA1
pERed
pERed/FmA1
pERed/FmA1trunc
pEGZ/HA-MCS
pGEX2T

MSZ
Arbeitsgruppe
Arbeitsgruppe
Arbeitsgruppe
Arbeitsgruppe
Arbeitsgruppe
Arbeitsgruppe
Arbeitsgruppe
Pathologie
Pathologie; zur Herstellung des GST-A1trunc Proteins

Markergen:

Grünfluoreszenzprotein/Zeoizin; chimär
Grünfluoreszenzprotein/Neomycin; chimär
Gelbfluoreszenzprotein/Zeoicin; chimär
Gelbfluoreszenzprotein/Zeoicin; chimär
Gelbfluoreszenzprotein/Zeoicin; chimär
Rotfluoreszenzprotein
Rotfluoreszenzprotein
Rotfluoreszenzprotein
Grünfluoreszenzprotein/Zeoizin; chimär

2.10 Oligonukleotide

1	CGCGGATCCACCATGGCTGAGTCTGAGCTCATG	5mA1
2	aaggtcggatccTCAcagccagccAGAttgggttcaaacttctttatgaa	3A1/aa155S
3	gtttgaacccaaaGAGggctggctgGAAttCctgcagatgGAGggacagatctggg	5mA1(STT->EEE)
4	cccagatctgtccCTCcatctgcagGaaTTCagccagccCTCtttgggttcaaac	3mA1(STT->EEE)
5	gggaagatggctcataGCgGCgttCgaacctGCatctggctggctgac	5mA1mut3K
6	gtcagccagccagatGCgggttcGaacGCcGCtatgaagccatcttccc	3mA1mut3K
7	gatCGCGGATCCTCAttaTGCgaggagaaagagcatttcccag	3mA1(K172A)
8	GCCgaagttgaaGCCaatctgGCCcatacttgatgactttcacgt	5mA1/K->A123
9	GGCagattGGCttcaacttcGGCtgaacggagaaagcaactctt	3mA1/K->A123
10	agtgatggaaGCCgagtttgaagatggcatcattaac	5mA1/K->A4
11	ggaaacttgGGCgtaagcacatacatccagg	3mA1/K->A4
12	ctctcGCCGCCcttcacaagagcagattgcc	5mA1/K->A56
13	gtggaagGCCGGCgaggagaacacccccaaagg	3mA1/K->A56
14	atgtgcttacGCCcaagttccagtttggcag	5mA1/K->A7
15	cttcaaactcGGCttccatcacttggttgaatattatt	3mA1/K->A7
16	CAGACGAATTCgcgccaccATGGcagactgtgaattggatatatta	5hBf1/ATG
17	gacgcgatccgtgTCAacagtattgcttcaggagag	3hBf1/STOP
18	GCAGACGAATTCgcgccaccatggcgcaagccgggagaac	5mBcl2/Start
19	ggagtcagatctTTAgTCAcacttggtggcccaggtatgc	3mBcl2/Stop (Bgl II)
20	GCAGACGAATTCgcgccaccATGgactctgaggtcagc	5mBid/ATG
21	ggagtcggatccTTAgTCAgtccatctcgtttctaacc	3mBid/STOP
22	GCAGACGAATTCgcgccaccATGgccaagcaaccttctgatg	5mBimStart
23	gacgcgatccgtgTCAatgccttctccataccaga	3mBimStop
24	cgtcacCAATTGgATGCAGATCTTTGTGAAGACC	5mUbiquitin/ATG (MfeI)
25	atcctgGGATCcttaCTAACCACCCCGAAGTCTCAACAC	3mUbiquitin/Stop (BamHI)
26	gcagacAATATTgcgccaccATGgagaacaacaaaacctc	5mCasp3/ATG
27	ggagtcAATATTTCAcggatcccgGTGATAAAAGTACAGTTCTTTTCGT	3mCasp3/STOP
28	gaaacttctcatcattCAGGCCTcCCGGGTacggagctggac	5mCasp3/(C->S)
29	gtccagctccgtACCCCGGgAGGCCTGaatgatgaagagtttc	3mCasp3/(C->S)
30	GCAGACGAATTCgcgccaccATGGACGAGGCGGACCGG	5mCasp9/ATG
31	ggagtcgaattcTCAcagatctcgTGAAGTTTTAAAAACAGCTTTTTTC	3mCasp9/STOP
32	GCAGACGAATTCgcgccaccATGaccgatgatcaggactgtg	5mCasp7/ATG
33	ggagtcgaattcTCAcggatcccgACGGCTGAAGTACAGCTCTTTG	3mCasp7/STOP
34	ccgctggatccATGgctgagctctgagctcatg	5mA1/ATG->Gex2T
35	aaggtcggatccTCAcagatctcGagatttgggttcaaacttctttatg	3mA1/aa152

2.11 Puffer und Lösungen

ATV:

NaCl	80g
KCl	4g
Glucose	10g
NaHCO ₃	5,8g
Trypsin(1:250)	5g
Versene	2g
H ₂ O	ad 1l

PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung):

NaCl	8g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,15g
KH ₂ PO ₄	2g
CaCl ₂	1,67g
MgCl ₂	1g
BSA	0,1g
H ₂ O	ad 10l

TAE (50x):

2M	Tris-Base
2M	Essigsäure
100mM	EDTA
pH = 7,8 (einstellen mit Essigsäure)	

TBS (10x):

0,5M	Tris
1,5M	NaOH
pH = 7,5 (einstellen mit Salzsäure)	

Material

2.12 Radioaktivität

³⁵S-Methionin/ Cystein

Amersham

2.13 Zelllinien

- WEHI 231 (murines B-Zell-Lymphom, ATCC CRL 1702)
- 293T (humane embryonale Nieren Zelllinie, ATCC CCRL 11268)

3. Methoden

3.1 Zelluläre Methoden

Sämtliche zellulären Arbeiten wurden in einer Sterilbank durchgeführt.

3.1.1 Ermittlung der Zellzahl

Zur Ermittlung der Anzahl von Zellen wurden diese in einer Neubauer-Kammer gezählt. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit einer Trypanblau-Arbeitslösung (Stammlösung 1:5 in PBS verdünnt) im Verhältnis 1:1 verdünnt. Das Trypanblau wird von toten Zellen aufgenommen und ermöglicht es somit, diese von lebenden Zellen zu unterscheiden. 30 μ l der Zellverdünnung wurden anschließend unter das Deckgläschen einer Neubauer-Kammer pipettiert und die lebenden Zellen in 2-3 Quadranten gezählt. Die Zellzahl wurde gemäß $(\text{Mittelwert gezählter Zellen/Quadrant}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$ berechnet.

3.1.2 Stimulation von WEHI 231 Zellen

Es wurde mit dem BZR-quervernetzenden $\square\mu\text{F}(\text{ab}')_2$ -Fragment [5-7,5 μ g/ml Kultur] stimuliert. Die Zelldichte zu Beginn der Stimulation lag bei 1×10^5 bis 3×10^5 Zellen/ml.

3.1.3 Kultivierung der Zelllinien

WEHI 231 Zellen wurden in jeweils 5ml RPMI⁺ in 50 ml Kulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und alle zwei bis drei Tage 1:10 verdünnt (Zelldichten bewegten sich zwischen 5×10^4 und 6×10^5 Zellen/ml). Dem Medium infizierter, EGFP bzw. EYFP exprimierender Zellen wurde zu Beginn der Kultur G418 (1mg/ml) bzw. Zeocin (250 μ g/ml) zugesetzt. Diese Antibiotika wurden nach erfolgreicher Selektion abgesetzt

(mit fortlaufender Kultur ausverdünnt). Zum Erhalt größerer Zellkulturen wurden die Zellen in RPMI⁺ in 250ml Kulturflaschen ausgesät und bis zum Erreichen der erforderlichen Zelldichte im Brutschrank kultiviert.

293T-Zellen wurden in 25ml Petrischalen in 10-15ml DMEM im Brutschrank bei 25°C und 5% CO₂ kultiviert. Sie wurden alle drei bis vier Tage mit ATV von der Platte abgelöst und 1:10 bis 1:20 verdünnt.

3.1.4 Transfektion/Infektion

Rekombinante, replikationsdefekte retrovirale Partikel wurden unter Benutzung des pHIT Verpackungssystems wie von Soneoka et al. hergestellt [99].

293T Zellen wurden transient mit dem Expressionskonstrukt für Gag/Pol (pHIT60) und Env (pHIT123 ekotropisch bzw. pHIT456 amphotropisch) des Murinen Leukämie Virus (MuLV) kotransfiziert. Die Kotransfektion wurde zusammen entweder mit dem leeren Vektorplasmid oder dem Vektor mit der jeweiligen für das angegebene Protein kodierenden cDNA durchgeführt. Es wurde die Standard Calciumphosphat Methode verwendet (Ref.). Nach 16h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die viralen Überstände wurden 24 und 48 Stunden später abgenommen und filtriert (0,45µm). Zum Filtrat wurde Polybren (Sigma) zugegeben (Endkonzentration: □ 10µg/ml).

1x10⁵ bis 2x10⁵ WEHI 231 Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase wurden für 3-4 Stunden mit 5ml des ekotropen, infektiösen Überstandes inkubiert, mit RPMI⁺ gewaschen und wieder in Kultur genommen. Um hohe Infektionsraten zu erzielen wurden die Zellen während der Inkubation mit dem infektiösen Überstand zentrifugiert (3-4h bei 32°C mit 2200rpm).

3x10⁵ 293T Zellen wurden in 12 Napfplatten für 3 Tage mit den amphotropen, infektiösen Überständen inkubiert, einmal mit MEM Medium gewaschen und wieder in Kultur genommen.

Die Identifizierung EGFP bzw. EYFP-exprimierender, d.h. erfolgreich infizierter Zellen, erfolgte mittels Durchflußzytometrie.

3.1.4.1 Anreicherung erfolgreich infizierter Zellen

Eine Anreicherung transduzierten Zellen wurde wahlweise durch Sortierung oder Antibiotika-Selektion erreicht. Die Sortierung erfolgte mittels Durchflußzytometrie, basierend auf der Fluoreszenz des transduzierten Markerproteins. Im Falle der Antibiotika-Selektion wurde dem Medium ein der jeweils transduzierten Resistenz entsprechendes Antibiotikum in geeigneter Konzentration zugegeben (G418: 1mg/ml bzw. Zeocin: 250µg/ml). Die Zellen wurden in Anwesenheit des Antibiotikums für 2-7 Tage kultiviert. Anschließend wurde die Zellkultur normal fortgesetzt, was eine allmähliche Ausverdünnung des Antibiotikums zur Folge hatte.

3.1.5 AnnexinV Färbung

Lösungen:

10xAnnexinV Bindungspuffer PCR

0,1M HEPES pH = 7,4

1,4mM NaCl

25mM CaCl₂

in Wasser

FACS – Puffer

PBS ohne CaCl₂ und MgCl₂

Apoptotische Zellen können mit Hilfe dieser Färbung in der Durchflußzytometrie (vgl. 3.1.6) sichtbar gemacht werden. Nach der Induktion der Apoptose von 1×10^5 transduzierten WEHI 231 Zellen, wurden diese einmal im FACS – Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit AnnexinV gekoppelt mit dem Farbstoff Cychrom 5 im 1xBindungspuffer (1:100) für 15 min bei Raumtemperatur gefärbt. Danach wurden die gefärbten Zellen in der Durchflußzytometrie (vgl.3.1.6) analysiert.

3.1.6 Durchflußzytometrie

Zellen, die eine Farbfluoreszenz aufweisen, können mit Durchflußzytometrie untersucht werden. Die Fluoreszenz kann hierbei entweder von einer vorher durchgeführten Färbung

herrühren oder durch die Expression eines Fluoreszenzproteins, das durch Transfektion/Infektion in die Zelle eingeführt wurde, verursacht sein. Färbungen können sowohl intrazellulär sein, wie z.B. bei der Detektion von Radikalen durch Dihydroethidium (s.u.) als auch extrazelluläre Strukturen betreffen. Im letzteren Fall kann z.B. die Expression von Zelloberflächen-Molekülen durch die Verwendung spezifischer Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind, auf Einzellniveau untersucht werden.

Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch einen Laserstrahl im „Fluorescence Activated Cell Scan“ (FACSscan, Becton-Dickinson) angeregt und emittieren anschließend Licht charakteristischer Wellenlänge, welches von dem Gerät detektiert wird. Das verwendete Gerät ist in der Lage bis zu drei verschiedene Farbstoffe gleichzeitig zu detektieren. Zum Beispiel können die Farbstoffe Fluorescein-Isothiocyanat, Phycoerythrin und Red 670 zusammen bestimmt werden. Zusätzlich zu den drei Fluoreszenzen gibt das Laserlicht, welches direkt an die Zellen gestreut wird, Aufschluss über deren Größe („forward scatter“) und Granularität („side scatter“). Über diese Parameter können Anhaltspunkte des Überlebenszustandes der Zellen gewonnen werden.

Ausgewertet wurden die FACS-Daten mit der Cell Quest-Software für Apple-Macintosh.

3.1.7 Herstellung von Milzzellsuspensionen

Die Mäuse (C57Bl/6) wurden durch Genickbruch getötet, mit 70%igem Ethanol befeuchtet und auf die rechte Seite gelegt. Nach Öffnung der linken, lateralen Bauchdecke wurde die Milz, welche sich dorsal vom Magen befindet, steril entnommen, weitgehend von Fett- und Geweberesten befreit und in eiskaltem BSS aufbewahrt. Anschließend wurden die Milzen in einem sterilen Einmalsieb zerrieben, die Zellen durch wiederholtes Spülen mit BSS in ein 50ml Röhrchen überführt und 10 min auf Eis gehalten, damit größere Gewebetrümmer niedersinken. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt, zentrifugiert und das Sediment mit BSS gewaschen. Dazu wurde das Röhrchen mit BSS aufgefüllt und 10 min bei 1200 Upm (165g) zentrifugiert. Aus dem Zellsediment wurden anschließend die B-Lymphozyten isoliert.

3.1.8 Isolation und Reinigung ruhender B-Lymphozyten

3.1.8.1 Isolation von B-Lymphozyten aus Milzzellsuspensionen

T-Lymphozyten wurden durch Inkubation der Milzzellen mit monoklonalen Antikörpern gegen T-Zellepitope und anschließender Komplement-Lyse vollständig entfernt. Dazu wurden die sedimentierten Milzzellen (vgl. 3.1.6) in BSS (3,5ml/Milz) resuspendiert, welches die Antikörper Klon-C, 13-4, \square CD4, \square CD8 und AT83 aus Hybridomüberständen in einer für den jeweiligen Antikörper zuvor ermittelten Optimalkonzentration enthielt. Nach der 30minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit BSS gewaschen, in Meerschweichenserum (1:20 in BSS) als Komplementquelle aufgenommen und 45 min bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen erneut mit BSS gewaschen.

3.1.8.2 Anreicherung ruhender B-Lymphozyten durch Percollgradienten [100]

Diese Methode basiert auf der sich unterscheidenden Dichte von ruhenden und aktivierten B-Zellen. Ruhende B-Zellen sind vergleichsweise kleiner und kompakter – daher dichter – als aktivierte B-Zellen und können mittels Percoll-Dichtegradientenzentrifugation voneinander getrennt werden. Hierfür wurden die gewaschenen Zellen nach der Komplement-Behandlung in 10ml BSS aufgenommen, in Gradientenröhrchen überführt und nochmals abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Zellsediment in 2ml 80% (v/v in 0,9% NaCl) Percoll resuspendiert und vorsichtig mit jeweils 2ml der weiteren Percollstufen (70%, 65%, 60%, 50% v/v in 0,9% NaCl) sowie abschließend 2ml BSS überschichtet. Nach erfolgter Zentrifugation (20min, 4°C, 2000 Upm (400g), ohne Bremse) wurden die Zellen der Interphasen 70/65% Percoll sowie 65/60% Percoll abgenommen und zweimal mit BSS gewaschen, um Percollreste zu entfernen. Ein Percollgradient wurde maximal mit den Zellen aus vier Milzen beladen. Die Reinheit der B-Zell-Präparation wurde mit $1,5\text{-}3 \times 10^5$ Zellen im FACScan (vgl. 3.1.5) durch Färbungen gegen B220 kontrolliert.

3.2 DNA-Techniken

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.2.1.1 Allgemeine Bemerkungen

Die Polymerase-Kettenreaktion basiert auf der Verwendung einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase und erlaubt die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente, die durch die in der Reaktion verwendeten 5'- und 3'-Primer festgelegt sind. Die PCR besteht aus einer wiederholten Abfolge von Zyklen bestehend aus Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation. Nach der in der Regel bei 94-96°C statt findenden Denaturierung der DNA wird das Reaktionsgemisch bis zu derjenigen Temperatur abgekühlt, bei der die Primer spezifisch mit den zu amplifizierenden DNA-Fragmenten hybridisieren. Diese Temperatur, die für jedes Primerpaar getrennt bestimmt werden muß, hängt von der Länge der verwendeten Primer und ihrem Gehalt an den Basen A und T bzw. C und G ab. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf 72°C erhitzt, so dass die bei dieser Temperatur optimal aktive thermostabile DNA-Polymerase (Taq) in Gegenwart von Mg^{2+} die Primer unter Verwendung der cDNA als Matrize elongieren kann. Mit jedem solchen Zyklus verdoppeln sich theoretisch die Menge erhaltener DNA-Fragmente, so dass die Anzahl vorhandener Kopien exponentiell zunimmt.

Der entscheidende Schritt jeder PCR ist das spezifische Binden der Primer an die Matrize. Neben der Temperatur sind hierfür auch der pH-Wert der Lösung und die Magnesiumchloridkonzentration von entscheidender Bedeutung und können sich bei verschiedenen Primern unterscheiden. Die Optimalbedingungen müssen daher für jede PCR neu bestimmt werden.

3.2.1.2 PCR zur Amplifikation revers transkribierter RNA und Einführung von Mutationen

Lösungen: 10x PCR-Puffer: 500mM KCl, 100mM Tris/HCl pH9.0, 1% (v/v) Triton X-100, 15mM MgCl₂

In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aus revers transkribierter RNA, für chimäre, verkürzte und mutierte Konstrukte verwendet. Dafür wurden die nachfolgend aufgezählten Komponenten in 0,5ml PCR-Reaktionsgefäßen vereinigt:

3-5µl DNA
 3µl Pimermix (5'- und 3'- Primer je 25µM)
 5µl 10x PCR-Puffer
 0,5µl dNTP's (25mM)
 0,5µl Taq-Polymerase (1u/µl)
 ad 50µl Wasser

Folgendes Grundprogramm wurde verwendet:

94°C	62°C	72°C
1 min	1 min	2 min
40 Zyklen		

72°C	4°C
10 min	∞

Die „Annealing Temperature“ T_{An} wurde für die Primer mit $T_{An} = n(AT) \times 2^\circ C + n(GC) \times 4^\circ C$ angenähert. Es steht $n(AT)$ bzw. $n(GC)$ für die jeweilige Anzahl der entsprechenden Basen im Primer.

Die Einführung von Mutationen bei pEYZ/FmA1E-Mut. und pEYZ/FmA1K->A (8-11) erfolgte mit Hilfe des „QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene gemäß der mitgelieferten Vorschrift.

Die Einführung von Mutationen bei pEYZ/mCasp3Mut.F und pEYZ/mA1K->A (1-11) erfolgte nach folgendem Prinzip mit Hilfe der PCR:

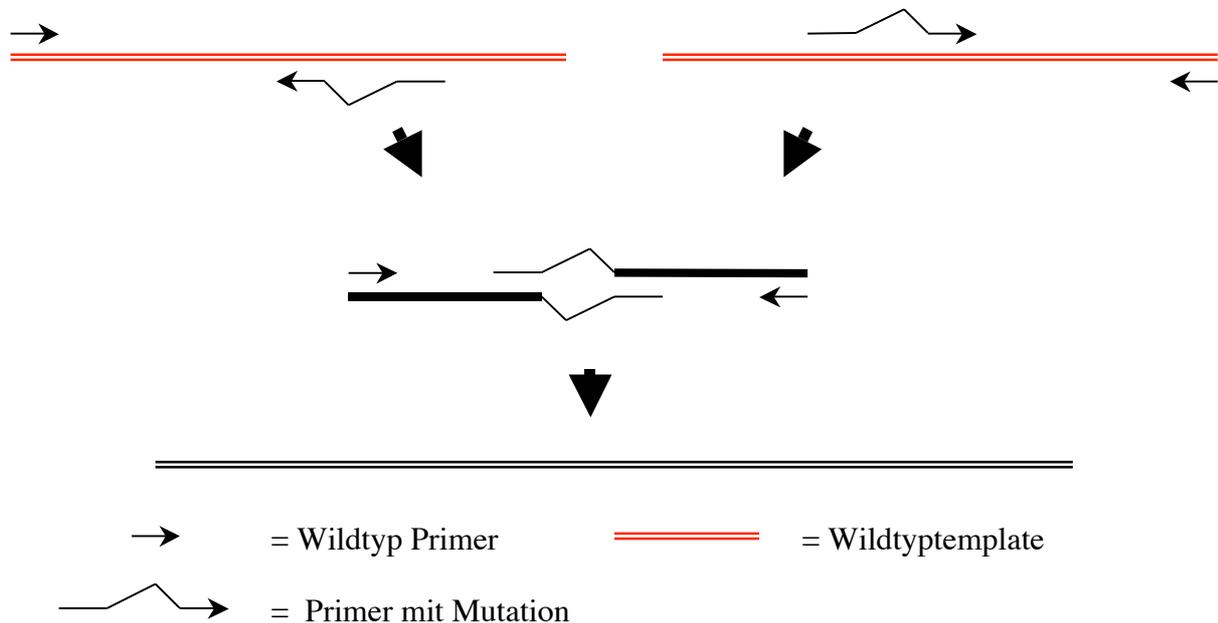


Abb.5 Schema zur Einführung von Mutationen mit Hilfe der PCR.

3.2.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

3.2.2.1 Allgemeine Bemerkungen

DNA-Fragmente (bzw. Nukleinsäuren im allgemeinen) sind aufgrund der negativen Ladungen ihrer Phosphatgruppen im Phosphodiesterückrat bei neutralem pH polyanionisch und bewegen sich in einem elektrischen Feld daher in Richtung Anode. In einer als Molekularsieb wirkenden Gelmatrix können sie entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden, wobei die Trennschärfe von der Porosität des Gels und damit von der Agarosekonzentration abhängig ist. 1%ige Agarosegele eignen sich für die Auftrennung von Nukleinsäuren im Bereich von 1-10kb, während für kleinere Fragmente im Bereich von 0,1-1kb 3%ige Agarosegele Verwendung finden. Nach erfolgter Auftrennung werden

die Nukleinsäuren aufgrund des zwischen die Basen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 265nm visualisiert. Durch den Vergleich von Nukleinsäure-Standards bekannter Größe lässt sich die Größe der Fragmente bestimmen. Hierbei gilt, dass die zurückgelegte Wegstrecke umgekehrt proportional zum Logarithmus der Basenpaare ist.

3.2.2.2 DNA-Agarosegele

Lösungen: 10x Probenpuffer: 50% Glycerin, 14mM EDTA pH 8.0, 0.25% (w/v)
Bromphenolblau, 0.25% (w/v) Xylencyanol

1x TAE 40mM Tris-Acetat, 10mM EDTA (50x TAE:242g
Tris, 57.1ml Eisessig, 100ml 0.5M EDTA pH 8.0, ad
1000 ml H₂O)

Der Agarosegehalt der verwendeten Gele wurde unter Berücksichtigung der Länge der zu untersuchenden Fragmente variiert. Verwendung fanden 1-3%ige Agarosegele. Die entsprechende Agarosemenge wurde eingewogen, in 1x TAE aufgekocht, nach dem Abkühlen auf ca. 50-60°C mit Ethidiumbromidlösung (10mg/ml in H₂O) versetzt (1:10000) und in einen vorbereiteten Gelschlitten mit Kamm gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde es in eine mit 1x TAE gefüllte Laufkammer eingesetzt und mit den Proben, die zuvor mit 1/10 Volumen 5x Probenpuffer versetzt wurden, beladen. Die Elektrophorese erfolgte spannungskonstant bei 80-100 Volt. Die DNA-Fragmente wurden anschließend unter UV-Licht visualisiert und im Bedarfsfall fotografiert.

3.2.3 Klonierungen

Zur Vorbereitung des Vektors wurden Restriktionsenzyme für entsprechende Schnittstellen in der „multiple cloning site“ (mcs) ausgewählt. Das Plasmid wurde damit gemäß den Angaben des jeweiligen Enzymherstellers behandelt. Die Restriktionsreaktion wurde durch Agaroseanalyse auf ihren Erfolg hin geprüft. Der Reaktionsansatz wurde dann elektrophoretisch über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt, das gewünschte Fragment

ausgeschnitten und eluiert. Elution bzw. Aufreinigung erfolgte unter Verwendung des GENE CLEAN III KIT (s.o.) nach den Angaben des Herstellers.

Das in den Vektor einzusetzende DNA-Fragment wurde entweder aus einem bereits existierenden Plasmid ausgeschnitten („Umklonierung“) oder mittels PCR amplifiziert.

Nach Restriktion wurden die Fragmente wie die Vektoren gereinigt.

Für die anschließende Ligation wurden geschnittenes Vektorplasmid und Fragment in einem molaren Verhältnis von eins zu drei eingesetzt und zusammen mit der T4 DNA Ligase (MBI) in Ligationspuffer (MBI) für 8-12 Stunden bei 16°C inkubiert. Begleitend wurde zur Kontrolle die gleiche Menge an Vektorplasmid ohne Fragment angesetzt.

Beide Ansätze wurden dann parallel in kompetente E.Coli Bakterien (Top10F⁺) transformiert. Hierzu wurden 50µl Suspension kompetenter Bakterien auf Eis mit 1,5µl aus einem 10µl Ligationsansatz versetzt und für 30 min inkubiert, dann 30 s lang auf 42°C gebracht und für 1-2 min auf Eis wieder abgekühlt. In der Folge wurden die Ansätze in 0,5ml LB Medium aufgenommen und für 1h bei 37°C mit 200 U/min geschüttelt. Die so gewonnenen Bakterienkulturen wurden dann auf ampicillinhaltigem (40µg/ml) Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Verhältnis der Koloniezahlen auf den beiden Platten gab Aufschluß über den Erfolg der Ligation im Verhältnis zur Religation. Aus mutmaßlichen positiven, d.h. Vektor/Fragment exprimierenden Kolonien wurde anschließend die DNA isoliert und mittels geeigneter Restriktion und Sequenzierung verifiziert (s.u.).

3.2.4 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen

Je 3ml LB/Ampicillin (40µg/ml) wurden mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (200 U/min). Die Bakterien wurden pelletiert, in 100µl Lösung 1 (50mM Glukose, 25mM Tris-HCl pH 8.0 und 10mM EDTA) aufgenommen und durch Zugabe von 200µl Lösung 2 (0,2N NaOH und 1% SDS) lysiert. Nach Zugabe von 150µl Lösung 3 (3M Kaliumacetat und 2M Essigsäure) erfolgte die Neutralisation. Die Lysate wurden dann zentrifugiert und die DNA aus den Überständen durch Zugabe von 2,5 Volumina Ethanol ausgefällt, sedimentiert und anschließend in Wasser oder TE pH=7,8 aufgenommen.

Restriktionsanalysen wurden mit entsprechenden Endonukleasen nach Angaben des jeweiligen Enzymherstellers durchgeführt. Die Richtigkeit der Klonierung wurde durch Sequenzierung des Vektors im Bereich des eingefügten Fragments überprüft.

3.2.5 Großpräparation von Plasmid DNA

Die Gewinnung größerer DNA-Mengen aus 250ml Bakterienkultur erfolgte mit Hilfe des „Genelute Plasmid Maxi-Prep Kit“ der Firma Sigma gemäß der mitgelieferten Vorschrift.

3.2.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA wurde fotometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm in einer Mikroküvette unter Verwendung einer adäquaten Verdünnung (1:100 in H₂O, 200µl Volumen) gemessen. Hierbei entspricht eine A₂₆₀-Einheit einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNA.

3.2.7 Sequenzierung mittels Fluorochrom markierter Nukleotide

Diese Methode der DNA-Sequenzierung basiert auf der Didesoxynukleotid-Methode nach Sanger (Ref.), erfordert aber keine getrennten, nukleotidspezifischen Einzelreaktion mehr, da der basenspezifische Strangabbruch durch Fluoreszenzfarbstoff-markierte Didesoxynukleotide erfolgt und die so entstandenen Fragmente daher anhand ihrer Farbe am 3'-Ende identifizierbar sind. Die eigentliche Sequenzierungsreaktion ist dabei eine lineare PCR, da nur ein Primer verwendet wird. Dieser wird matrizenabhängig in jedem Zyklus von der eingesetzten Polymerase elongiert, die sowohl unmarkierte Desoxyribonukleotide als auch markierte Didesoxynukleotide als Substrat akzeptiert. Nach der Sequenzierungs-PCR wird die DNA gereinigt und zur Analyse im Sequenziergerät in einem speziellen Puffer (TSR) aufgenommen. Im Sequenziergerät werden die Bruchstücke längenspezifisch aufgetrennt und die Farbmarkierung detektiert. Nach erfolgter Kapillarelektrophorese wird die Sequenz von der Software des Computers am Sequenziergerät als 4-Farbendiagramm ausgegeben, wobei jeder Base eine Farbe zugeordnet ist. Unter Optimalbedingungen können ca. 500 Basen gelesen werden.

3.2.7.1 Sequenzierungs-Polymerase-Kettenreaktion

Folgender Reaktionsansatz wurde in einem 0,5ml PCR-Reaktionsgefäß hergestellt, wobei die Menge einzusetzender DNA entsprechend des Richtwertes (500ng bei 3kb) auf die reale Plasmid-bzw.Fragmentgröße umgerechnet wurde:

500ng DNA in H₂O
1,5µl Primer (25µM)
2,5µl „Abi Prism Big Dye DNA Sequencing Kit“ (Perkin Elmer)
ad 10µl H₂O

Die Reaktion wurde für 25 Zyklen, bestehend aus 25s bei 98°C und 8min bei 50°C, im PCR-Gerät inkubiert und anschließend auf 4°C abgekühlt.

3.2.7.2 Reinigung und Analyse des DNA-Sequenzierungsansatzes

Die zu sequenzierende DNA wurde nach der PCR mit Hilfe von Sephadex-Beads („Sephadex™ G-50 DNA Grade Fine“, Amersham) gereinigt. 150-250µl der in Wasser gelösten Beads wurden in eine gestopfte Pipettenspitze überführt. Die Spitze wurde dann in ein 2ml Reaktionsgefäß, in ein Loch im Deckel, gesteckt und 3min bei 3000rpm zentrifugiert, um das Wasser zu entfernen. Danach wurde der komplette DNA-Ansatz auf die Säule gegeben und wiederum 3min bei 3000rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde in 15µl Formamid aufgenommen und in ein 200µl Cap überführt.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Gesamtzellen

Lösungen: 6x Probenpuffer (Laemmli): 14ml Puffer B (s.o.), 6ml Glycerin, 2g SDS
2,5mg Bromphenolblau, 1,85g DTT

In vitro stimulierte Zellen ($1-3 \times 10^5$) wurden sedimentiert (1min, 13000rpm). Das Medium wurde quantitativ abgesaugt und die sedimentierten Zellen dann in 25-50 μ l 6x Probenpuffer aufgenommen und für 8min bei 95°C lysiert. Bei höheren Zellzahlen (ca. 3×10^6) wurde der sehr viskose Extrakt sonifiziert und dann nochmals 5min bei 95°C inkubiert. Die Lysate wurden bei -20°C gelagert.

3.3.2 Auftrennung von Zytoplasma- und Membranfraktion

Lösungen: CLAMI Puffer (= „Cell lysis and mitochondria intact“)

250mM Sucrose

70mM KCl

in PBS

Direkt vor Benutzung wurden 200 μ g/ml Digitonin, 1:100 Proteaseinhibitor und 1:1000 DTT (1M) dazugegeben.

Für die Auftrennung in Zytoplasma- und Membranfraktion wurden 1×10^6 verschieden transduzierte WEHI 231 Zellen sedimentiert (1 min 14000 Upm). Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen in 50 μ l CLAMI Puffer aufgenommen. Nach einer 5minütigen Inkubation auf Eis, wurden die Ansätze bei 4°C für weitere 5 min zentrifugiert (14000 Upm). Die jeweiligen Überstände, welche die zytoplasmatische Fraktion darstellen, wurden in einem Verhältnis von 1:6 (v/v) mit 6xLaemmli gemischt. Das Membranpellet wurde in 60 μ l 2xLaemmli Puffer lysiert. Danach wurden alle Ansätze für 8 min bei 95°C erhitzt.

3.3.3 Immunpräzipitation

Lösungen:

NP-40 Puffer

150mM	KCl
1mM	EGTA
50mM	HEPES (pH = 7,5)
5mM	MgCl ₂

Direkt vor Benutzung wurde 0,2% NP-40 (100%), 5µg/ml Leupeptin, 1mM PMSF, 1mM Na₃VO₄ und 10mM NaF dazugegeben.

RIPA Puffer (= "Radioactive Immune Precipitation Assay")

97.5%	PBS
1%	NP-40 (100%)
0.5%	Natrium Deoxycholat
0.1%	SDS

Direkt vor Benutzung wurde 1:100 Proteaseinhibitor und 1:1000 DTT (1M) dazugegeben.

Um eine Bindung zwischen zwei Proteinen zu analysieren, wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Etwa 2×10^7 293T Zellen wurden sedimentiert, in 1ml NP-40 Puffer aufgenommen und für 15 min bei 4°C geschüttelt. Danach wurden die Ansätze für 15 min bei 4°C zentrifugiert (14000 Upm). Die Überstände wurden für 3-4 Std mit dem jeweiligen Antikörper, der gegen das entsprechende Protein gerichtet war inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Ansätze mit Protein G Beads (Protein G Sepharose 4 Fast Flow, Amersham Biosciences) für 1 Std bei 4°C versetzt, um die Immunkomplexe zu präzipitieren. Vor der Zugabe der Beads wurden diese in 10%iger BSA Lösung (m/v im Lysepuffer) für 2 Std bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen an die Beads zu verringern. Der Proteinkomplex, bestehend aus Beads, Antikörper und Protein, wurde abzentrifugiert und 3-mal mit dem Lysepuffer gewaschen, um unspezifische Bindungen zu verringern. Danach wurden die Proteinkomplexe in 45µl 6xLaemmli eluiert und für 8 min bei 95°C erhitzt. Zur Analyse der Ubiquitylierung wurde der RIPA Puffer verwendet. Das restliche Protokoll war identisch.

3.3.4 Pulse/ Chase

Zur Analyse der Proteinstabilität wurde ein Pulse/ Chase Experiment durchgeführt. Dafür wurden $5 \times 10^6 - 3 \times 10^7$ Zellen/ ml für 1,5 Std in RPMI Medium, welches kein Methionin oder Cystein beinhaltet, gehungert. Danach wurden die Zellen mit $30 \mu\text{Ci/ml } ^{35}\text{S}$ Methionin/ Cystein und 200pMol/ ml nicht radioaktivem Methionin und 100pMol/ ml nicht radioaktivem Cystein, in frischem Hungermedium, für 1,5 Std gepulst. Die Zugabe der nicht radioaktiven Aminosäuren hatte zur Folge, dass die Effizienz der radioaktiven Markierung erhöht wurde. Nach dem Pulsen wurden die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen. Ein Anteil der Zellen wurde sofort nach dem Waschen in RIPA Puffer lysiert (vgl.3.3.3). Dieser stellte den Medium Wert dar. Der restliche Anteil wurde in vollständiges, nicht radioaktives RPMI⁺ Medium überführt und für die jeweils angegebenen Zeitpunkte darin inkubiert (= Chase). Danach wurden die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen und ebenfalls in RIPA Puffer lysiert. In alle Lysate wurde dann der entsprechenden Antikörper für das zu analysierende Protein gegeben und eine Immunpräzipitation durchgeführt (vgl.3.3.3). Die Lysate wurden dann auf eine SDS-Page aufgetragen (vgl.3.3.7). Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel zunächst 30 min in Methanol/ Essigsäure (v/v, 10%/ 50%) fixiert und dann 30 min in Amplify Puffer (Amersham) inkubiert, um die radioaktive Strahlung des Schwefel zu verstärken. Danach wurde das Gel auf Whatman-Papiere gelegt, mit einer Frischhaltefolie bedeckt und in einem Trockner für 2 Std getrocknet. Das Programm des Trockners war so eingestellt, dass dieser langsam auf 80°C hochheizte und diese Temperatur für 2 Std hielt. Nach dem Trocknen wurde ein Röntgenfilm auf das Gel gelegt und für verschiedene Zeitpunkte bei minus 80°C inkubiert.

3.3.5 Herstellung und Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins

Lösungen:

Lysepuffer:

Triton X-100 Puffer

0,1% Triton X-100 (100%)
in PBS

Direkt vor Benutzung wurde 10mg/ml Hühnerei Lysozym, 1:100 Proteaseinhibitor und 1:1000 DTT (1M) dazugegeben.

Elutionspuffer:

50mM Tris pH = 8

5mM Glutathion

Fixierer:

10% Methanol

50% Essigsäure
in Wasser

Färbung: Coomassie-Brilliant-Blue

0,5% Coomassie Blue

10% Essigsäure

50% Methanol
in Wasser

Entfärber:

25% Ethanol

10% Essigsäure

Verwendeter Bakterienstamm: B121 (E.Coli)

Zunächst wurde eine 50ml Bakterienkultur, die mit dem Plasmid, welches für das GST-mA1trunc Protein codiert, transformiert war, über Nacht bei 37°C in TB/ Amp (= Ampizillin 50µg/ml) Medium bei 180 Upm geschüttelt. Am folgenden Tag wurden weitere 450ml TB/ Amp Medium zu den 50ml dazugegeben. Die Kultur wurde danach bis zu einer

Optischen Dichte von 0,5 – 1 bei 180 Upm und 37°C geschüttelt (ca. 1,5 Std). Danach wurde die Proteinexpression in der Bakterienkultur für 4 Std durch Zugabe von 1mM IPTG und schütteln bei 180 Upm und 25°C induziert. Darauf wurden die Bakterien bei 5000 Upm im GS3 Rotor sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 15 ml Triton X-100 Puffer aufgenommen und 5 – 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das Lysat auf Eis gestellt, sonifiziert (Duty 3, Output Control 6, ca. 30 sec 2-3 mal) und bei 13000 Upm im SS34 Rotor 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde im Kühlraum, mit vorher equilibrierten (im Triton X-100 Puffer), GST gekoppelten Beads (Amersham) für 2 Std. bei 4°C inkubiert, um das GST-mA1trunc Protein an die GST-Beads zu binden. Danach wurden die Beads bei 1500 Upm sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Beads wurden dann mit 4 ml Triton X-100 Puffer auf eine Säule geladen, mit weiteren 4 ml Triton X-100 Puffer gewaschen und anschließend mit 4 ml 50mM Tris pH = 8 für die Elution des Proteins equilibriert. Die folgende Elution des GST-mA1trunc Proteins von den GST gekoppelten Beads erfolgte in drei Fraktionen mit je 1ml Elutionspuffer. Von den drei Eluatfraktionen wurde je ein Aliquot auf ein SDS Gel (vgl.3.3.7) aufgetragen, um den Proteingehalt der einzelnen Fraktionen zu bestimmen. Dafür wurde das Gel für 30 min bei Raumtemperatur fixiert und dann mit Coomassie-Brilliant-Blue für weitere 30 min bei Raumtemperatur gefärbt. Nach dieser Prozedur wurde das Gel durch 3 bis 4maliges wechseln des Entfärbers gewaschen, wodurch die Proteinbanden im Gel sichtbar wurden. Zur weiteren Aufreinigung des Proteins wurden Centrex UF 0,5 30kDa Membranen von Schleicher und Schuell gemäß der mitgelieferten Vorschrift verwendet.

3.3.6 Herstellung eines A1 spezifischen Antikörpers

Zur Herstellung eines A1 spezifischem Antikörpers, wurde das aufgereinigte GST-A1trunc Protein an die Firma Coring Systems Diagnostix GmbH in Gernsheim geschickt. Nach mehreren Immunisierungen von Kaninchen, erhielten wir die Seren dieser Tiere, die zur weiteren Aufreinigung des A1 Antikörpers oder direkt als A1 Nachweis im Western Blot verwendet wurden.

Zur weiteren Aufreinigung des Antikörpers wurde der ImmunoPure Protein G IgG Orientation Kit (Pierce) gemäß der mitgelieferten Vorschrift verwendet.

3.3.7 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

3.3.7.1 Allgemeine Bemerkungen

Proteinproben wurden in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (ref.) entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Hierbei werden die Polypeptidketten zunächst durch das negativ geladene, zwischen aliphatische Aminosäurereste interkalierende Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) entfaltet, aus Assoziationen mit anderen Proteinen oder Lipiden freigesetzt und in Abhängigkeit ihrer Größe negativ geladen, wobei ihre ursprüngliche Nettoladung vernachlässigbar wird. Als Trägermatrix werden chemisch inerte, als Molekularsiebe wirkende Polyacrylamidgele, die durch Polymerisation von Acrylamid und dem quervernetzenden N,N'-Methylenbisacrylamid in Anwesenheit von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) hergestellt werden, verwendet. Das TEMED katalysiert hierbei die Bildung freier Radikale aus APS, welche dann die Polymerisation initiieren. Damit alle SDS-Proteinkomplexe gleichzeitig ins Trenngel gelangen, ist diesem ein Sammelgel vorgelagert. Hier sind bei pH 6,8 aufgrund des zwitterionischen Glycins und des negativ geladenen Chlorids zwei Pufferfronten vorhanden, zwischen denen sich ein die SDS-Proteinkomplexe konzentrierender Feldstärkegradient ausbildet.

3.3.7.2 Herstellung der Gele

Lösungen:

Puffer A:	1,5M Tris/HCl pH 8,8; 0,4% (w/v) SDS
Puffer B:	0,5M Tris/HCl pH 6,8; 0,4% (w/v) SDS
	30% (w/v) Acrylamid / 0,8% (w/v) Bisacrylamid in H ₂ O
	10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

Gelzusammensetzungen:

a, Trenngele (15ml):

Acrylamidkonzentration in %	10	12,5	15
Acrylamid/Bisacrylamid 30% / 0,8% (ml)	5	6,25	7,5
Puffer A (ml)	3,75	3,75	3,75
H ₂ O (ml)	6,25	5	3,75
10% Ammoniumperoxodisulfat (μ l)	150	150	150
TEMED (μ l)	25	25	25

b, Sammelgel (5ml): 650 μ l Acrylamid/Bisacrylamid 30% / 0,8%, 1,25ml Puffer B, 3ml H₂O, 50 μ l 10% Ammoniumperoxodisulfat, 5 μ l TEMED

Mit 70% Ethanol gereinigte Minigelplatten wurden mit den zugehörigen Abstandshalter zusammengesetzt und in eine Gießapparatur eingespannt. Anschließend wurde das Trenngel bis ca. 2,5cm unter den oberen Rand gegossen und zur Ausbildung einer geraden Polymerisationskante vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser sorgfältig entfernt, das Sammelgel gegossen und ein Kamm zur Erzeugung von Geltaschen luftblasenfrei eingesetzt. Nachdem das Sammelgel ebenfalls polymerisiert war, wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen und das Gel in die Vertikallaufkammer gespannt.

3.3.7.3 Durchführung der PAGE

Sowohl das obere als auch das untere Pufferreservoir der Vertikallaufkammer wurden mit 1x Laufpuffer gefüllt und im Bedarfsfall, zur Beseitigung von Luftblasen, die Geltaschen mit einer Spritze ausgespritzt. Die Proben wurden aufgetragen und stromkonstant bei 30mA aufgetrennt. Um eine nachfolgende Identifizierung der Proteinbanden zu ermöglichen, wurden neben den Proben 3 μ l der „Bench Mark™ Prestained Protein Ladder“ (GibcoBRL) aufgetragen, einem Gemisch von 10 Proteinen bekannten Molekulargewichts zwischen 10 und 200kDa.

3.3.8 Western Blotting

Mittels Western Blotting können bestimmte Proteine eines Gemisches spezifisch nachgewiesen werden. Dabei werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Blotmembran transferiert, damit sie für einen spezifischen Antikörper zugänglich werden. Dieser wird dann in einem zweiten Inkubationsschritt detektiert.

3.3.8.1 Transfer der Proteine auf Blotmembranen

Lösungen: Anodenpuffer: Roti-Blot A (Roth)
 Kathodenpuffer: Roti-Blot K (Roth)

Nach der SDS-PAGE wurde das Sammelgel abgetrennt und das (Trenn-)Gel kurz mit Wasser gespült. Die Blotmembran (Immobilon™-P, PVDF-Membran, MILLIPORE) und 5 Whatman-Papiere wurden auf Gelgröße zugeschnitten, die Membran kurz in 100% Methanol getaucht und direkt in Anodenpuffer überführt. Anschließend erfolgte der Aufbau des Transfers in einer Graphitkammer wie folgt:

Kathode

5 mit Kathodenpuffer getränkte Whatman-Papiere

Gel

Blotmembran

5 mit Anodenpuffer getränkte Whatman Papiere

Anode

Der Transfer erfolgte über 2 Stunden stromkonstant mit 70mA bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran kurz in 100% Methanol getaucht und zur Fixierung der Proteine auf der Membran luftgetrocknet.

3.3.8.2 Immunologische Detektion

Lösungen: - PBS/TWEEN oder: TBS/TWEEN: 0,1% Tween-20 (Aplichem) in PBS
bzw. TBS.

3 Blockpuffer: 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS/TWEEN
bzw. TBS/TWEEN

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt: Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran zunächst entweder über Nacht bei 4°C oder für 1,5-2 Stunden bei Raumtemperatur in Blockpuffer geschwenkt und dann entweder über Nacht bei 4°C oder 1,5-2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem ersten Antikörper in Blockpuffer inkubiert. Nach dem waschen der Membran (3x5min mit PBS/TWEEN bzw. TBS/TWEEN) erfolgte eine zweistündige mit einem zweiten, Peroxidase-konjugierten Antikörper in Blockpuffer. Anschließend wurde die Membran erneut wie oben beschrieben gewaschen und die Nachweisreaktion unter Verwendung des ECL-Systems (Amersham) durchgeführt.

3.3.8.3 Das ECL-System

Gebundene Antikörper-Peroxidase-Konjugate werden in der Dunkelkammer mit dem ECL-System nachgewiesen. Bei der von der Peroxidase katalysierten Reaktion wird Licht erzeugt und mit diesem ein Röntgenfilm belichtet.

Lösungen:

Lösung I

Amersham

Lösung II

Amersham

Die Lösungen I und II wurden zu gleichen Teilen gemischt und die Membran für 1min in dem Gemisch inkubiert. Anschließend wurde sie luftblasenfrei zwischen zwei Plastikfolien gelegt. Es erfolgten dann verschieden lange Belichtungen (1-30 min) eines Röntgenfilms in einer lichtdichten Kassette. Der Röntgenfilm wurde sofort entwickelt. Die auf der Blotmembran sichtbare Proteinleiter (s.o.) wurde auf den Röntgenfilm übertragen, um eine Zuordnung der Banden zu ermöglichen.

4. Ergebnisse

4.1 Das antiapoptotische Bcl-2 Familienmitglied A1 verhindert BZR induzierte Caspase 9/ Caspase 7 Aktivierung

Durch das zufällige Rearrangement der variablen Bereiche der schweren und leichten Kette bei der B-Zellentwicklung kommt es häufig zur Entstehung autoreaktiver B-Zellen. Die Eliminierung dieser Zellen erfolgt nach Autoantigenerkennung über programmierten Zelltod (Apoptose). Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass nach Kreuzvernetzung des BZR in WEHI 231 Zellen, einem Modellsystem für unreife B-Zellen, Caspase 9 aktiviert wird. Die Überexpression einer enzymatisch inaktiven Caspase 9 führte zur Inhibition BZR induzierter Apoptose. Dies deutete darauf hin, dass der Prozess über den intrinsischen Weg aktiviert wird. Diese Hypothese sollte im Rahmen dieser Arbeit weiter geprüft werden. Dafür wurde der Einfluss von A1 auf die BZR induzierte Apoptose untersucht. Wie in der Einleitung dargestellt, sollte ein antiapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie die Schädigung der Mitochondrien unterbinden. A1 wurde gewählt, weil es beim Übergang der B-Zellen vom unreifen zum reifen Stadium in seiner Expression stark erhöht wird und somit vermutlich eine entscheidende Bedeutung für die Regulation der Apoptose auf diesem Stadium hat [64].

Für die folgenden Untersuchungen wurden WEHI 231 Zellen mit rekombinanten Retroviren (rRV) transduziert, die für Flag markiertes A1 der Maus (FmA1) kodierten. Als Kontrollpopulation wurden Zellen verwendet, die nur den Selektionsmarker (EYZ) exprimierten. Beide Populationen wurden entweder mit Caspase 9 (Casp9) oder Caspase 7 (Casp7) supertransduziert. (Der Grund für eine zusätzliche Überexpression der beiden Caspasen ist die kaum nachweisbare Expression der endogenen Casp9 bzw. Casp7.) Da die Expression von A1 mit der Expression des gelbfluoreszierenden Proteins (EYFP) gekoppelt war, während Casp7 und Casp9 in Verbindung mit dem grünfluoreszierenden (EGFP) Protein exprimiert wurden, konnten doppelt transduzierte Populationen aufgrund ihrer grün/ gelb Färbung im FACS-Sorter angereichert werden (Die Kopplung erfolgte über eine bicistronische mRNA mit zwischengeschalteter IRES; siehe Material und Methoden.). Wie erwartet, kommt es nach Kreuzvernetzung des BZR in der Casp9/ EYZ

exprimierenden Kontrollpopulation zur Spaltung der Initiatorcaspase 9 und in der Casp7/ EYZ exprimierenden Kontrollpopulation zur Spaltung der Effektorcaspase 7 (Abb.6A, B). In den Populationen, die zusätzlich mit A1 transduziert waren, kam es zu keiner weiteren Induktion des Spaltproduktes der jeweiligen Caspasen (Abb.6A,B). Dies ist ein weiteres Indiz, dass BZR induzierte Apoptose über eine Schädigung der Mitochondrien, also den intrinsischen Weg vermittelt wird. Als Kontrolle für die Funktion von FmA1 wurden die Zellen mit Etoposid behandelt, da bekannt ist, dass dies die Aktivität der Topoisomerase II blockiert und in der Folge den Typ II d.h. den Weg der Apoptose über die Mitochondrien einleitet [101]. A1 konnte auch in diesem Fall die Caspase 9 Aktivierung unterdrücken (Abb.6A).

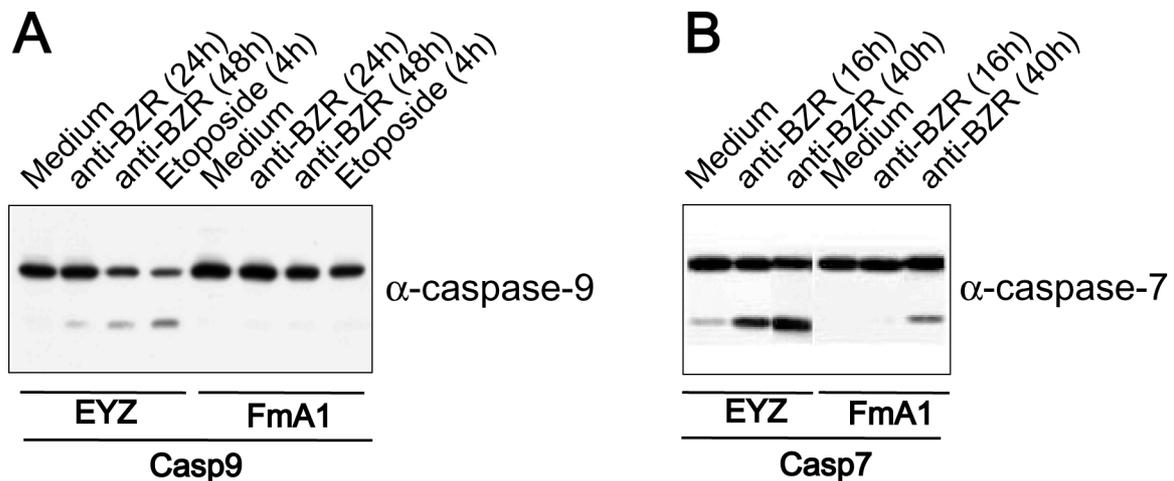


Abb.6 A1 verhindert die Spaltung von Casp7 und Casp9 nach BZR Stimulation. Entsprechend transduzierte WEHI 231 Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit anti-BZR (A,B) oder Etoposid (A) behandelt. Gesamtzelllysate wurden im Western Blot mit den Antikörpern wie angegeben detektiert.

4.2 A1 liegt im Gegensatz zu seinen verwandten Vertretern hauptsächlich im Zytoplasma vor

Kreuzvernetzung des BZR in WEHI 231 Zellen induziert eine Schädigung der Mitochondrien. Da A1 diesen Prozess unterbinden kann, sollte es wie die anderen Bcl-2

Familienmitglieder an bzw. über die Mitochondrien wirken. Bcl-2 besitzt hierfür eine hydrophobe Sequenz am C-Terminus, die eine Verankerung in die äußere Mitochondrienmembran erlaubt [42].

Um die Lokalisation von A1 zu analysieren, wurden WEHI 231 Zellen mit FmA1 oder ebenfalls Flag markiertem Bcl-2 der Maus (FmBcl-2) transduziert. Mit Hilfe eines speziellen Puffers (CALMI, siehe Material und Methoden), der ein sehr schwaches, niedrig dosiertes Detergenz enthält, wurden die Bestandteile der Zellen in zwei Fraktionen aufgeteilt: in einen Detergenz-resistenten Membrananteil und in einen Detergenz-sensitiven Zytoplasmaanteil. Bcl-2 befand sich wie erwartet Fast ausschließlich in der Membranfraktion wieder (Abb.7). A1 hingegen war Fast nur in der zytoplasmatischen Fraktion lokalisiert (Abb.7). Die Detektion mit einem Antikörper gegen Cytochrom C belegt die Reinheit der Membranfraktion (Abb.7).

Obwohl sich der Großteil von A1 im Zytoplasma also „nicht direkt am Ort des Geschehens“ befindet, ist A1 dennoch in der Lage, Zellen vor dem intrinsischen apoptotischen Signalweg zu schützen.

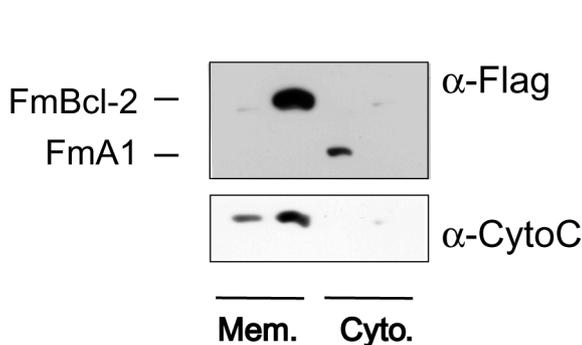


Abb.7 A1 ist hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert. Transduzierte WEHI 231 Zellen wurden in CALMI Puffer lysiert. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit den angegebenen Antikörpern. Mem. Membranfraktion; Cyto. = Cytoplasmafraktion

4.3 A1 ist ein sehr instabiles Protein

A1 ist in der Lage wie der Rest der antiapoptotischen Bcl-2 Familie den intrinsischen Apoptosesignalweg zu blockieren, obwohl es im Gegensatz zu seinen verwandten Vertretern nur in geringem Maße mit Membranen in der Zelle assoziiert ist. Für die unterschiedlichen Lokalisationen könnten Aminosäuresequenzen im C-terminalen Ende

des Proteins verantwortlich sein. Während Bcl-2 oder Bcl-x viele hydrophobe Aminosäuren in ihrem C-Terminus aufweisen, ist dies bei A1 deutlich weniger der Fall.

Hat der C-Terminus von A1 dennoch eine Bedeutung für die Funktion von A1? Um diese Frage zu beantworten wurde eine A1 Mutante generiert, bei der die letzten 17 Aminosäuren fehlten. Danach wurden FmA1 und die verkürzte A1 Mutante (FmA1trunc) in WEHI 231 Zellen überexprimiert. Es ist auffällig, dass FmA1trunc in sehr viel größerer Menge in der Zelle vorlag als FmA1 (Abb.8A), obwohl der „gekoppelt“ exprimierte Selektionsmarker (EYZ) in beiden Zellpopulationen vergleichbar exprimiert wurde.

Da FmA1 als auch FmA1trunc über den gleichen Translationsinitiationsbereich verfügten, war die Menge des Selektionsmarkers ein Maß für die Expressionsstärke des jeweiligen Gens. Diese war in beiden Fällen gleich (Abb.8A). Der Grund für die unterschiedliche Proteinmenge von FmA1 und FmA1trunc könnte also mit der Stabilität der Proteine zusammenhängen.

Für die Bestimmung der Proteinstabilität wurden beide A1 Varianten in einer WEHI 231 Zellpopulation koexprimiert. Mit Hilfe des Proteintranslationsinhibitors Cycloheximid (CHX) wurde die Halbwertszeit der Proteine analysiert. FmA1trunc besaß eine größere Stabilität als FmA1 (Abb.8B). Als Kontrolle ist in der Abb.8B noch humanes Bcl-2 (hBcl-2) zu sehen, welches ebenfalls in WEHI 231 Zellen überexprimiert wurde. Dieses besitzt eine längere Halbwertszeit als A1, weshalb die kurze Halbwertszeit von A1 ein besonderes Merkmal dieses Proteins und nicht der gesamten Bcl-2 Familie zu sein scheint.

Um einen toxischen Effekt von Cycloheximid auszuschließen, wurde die Halbwertszeit in einem unabhängigen Pulse/ Chase (siehe Material und Methoden) Experiment untersucht (Abb.8C). Hierfür wurden WEHI 231 Zellen, die FmA1 überexprimierten, radioaktiv markiert (Pulse) und anschließend in nicht radioaktivem Medium inkubiert (Chase). Auch dieser Versuch bestätigte die schnelle Umsatzrate des Proteins, da die Menge des radioaktiv markierten FmA1 mit zunehmender Dauer in nicht radioaktivem Medium schnell abnahm (Abb.8C). Ein Western Blot der A1 Präzipitate zeigte, dass die gesamte A1 Proteinmenge jedoch gleich blieb, wodurch ein Verlust des Proteins bei der Präzipitation ausgeschlossen werden konnte.

Diese Befunde weisen A1 als ein sehr instabiles Protein aus. Da eine C-terminal verkürzte A1 Mutante diese Instabilität nicht mehr besitzt, sollten bestimmte Sequenzen im A1 C-Terminus für dessen Instabilität verantwortlich sein.

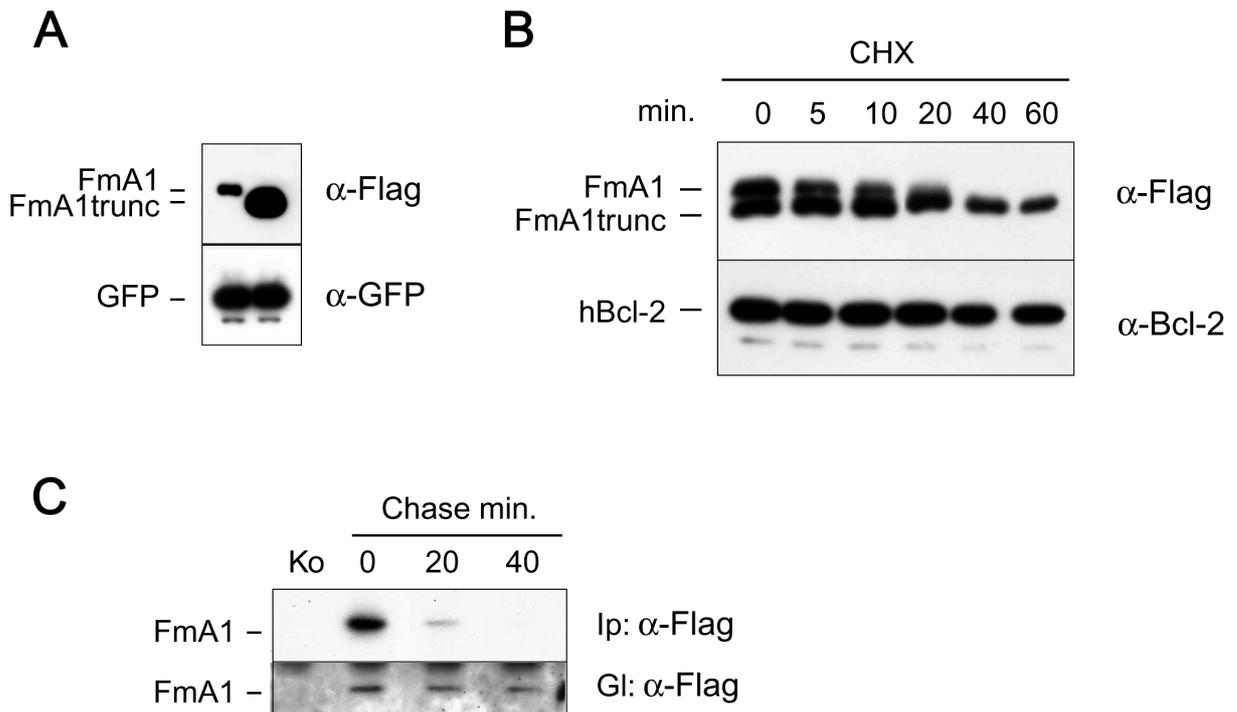


Abb.8 Eine verkürzte A1 Mutante (FmA1trunc) besitzt eine längere Halbwertszeit als das wildtypische A1. (A) Es wurden von FmA1, FmA1trunc transduzierten WEHI 231 Zellen Gesamtlysate hergestellt und mit den angegebenen Antikörpern im Western Blot detektiert. (B) FmA1+FmA1trunc oder hBcl-2 transduzierte WEHI 231 Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit CHX behandelt und die Gesamtlysate mit den entsprechenden Antikörpern im Western Blot analysiert. (C) FmA1 transduzierte WEHI 231 Zellen wurden nach dem Pulse/ Chase in RIPA-Puffer lysiert, FmA1 wurde mit 10µg/ml Flag Antikörper präzipitiert und im Autoradiogramm oder Western Blot mit dem entsprechenden Antikörper detektiert. Als Kontrollantikörper für die Präzipitation wurde anti-CD28 verwendet. Ip = Immunpräzipitation, Gl =Gesamtlysat Ko = Kontrolle

4.4 Die kurze Halbwertszeit von A1 ist eine generelle Eigenschaft des Proteins, die auch humanes A1 (Bfl1) charakterisiert

Wie in den bisherigen Untersuchungen gezeigt werden konnte, vermittelt das C-terminale Ende von A1 im Gegensatz zu den entsprechenden Bereichen anderer Bcl-2 Familienmitglieder keine Membranverankerung, sondern eine Destabilisierung des Proteins. Um die Allgemeingültigkeit der kurzen Halbwertszeit von FmA1 zu testen, wurden LPS stimulierte B-Zellen der Maus (Milz) mit FmA1 transduziert und danach die Stabilität des Proteins mit CHX untersucht. Die Halbwertszeit von FmA1 war in diesen Zellen ebenfalls sehr kurz (Abb.9A).

Weiterhin wurde die Stabilität von FmA1 in der humanen embryonalen Nierentumorzelllinie (HEK) 293T bestimmt. Es zeigte sich, dass FmA1 auch in HEK 293T Zellen eine kurze Halbwertszeit besitzt (Abb.9B).

Da sich A1 und dessen humanes Homolog Bfl1 nur um elf Aminosäuren im C-Terminus unterscheiden, liegt die Vermutung nahe, dass Bfl1 ebenfalls ein instabiles Protein ist. Um dies zu testen, wurde die humane B-Zelllinie Daudi mit Flag markiertem Bfl1 (FhBfl1) transduziert. Wie man in der Abb.9C sehen kann, besitzt auch das humane Homolog eine relativ kurze Halbwertszeit.

Zusammenfassend kann man sagen, dass A1 in verschiedenen Zelllinien (Maus und Mensch) und primären B-Zellen aus der Maus instabil ist, und dass humanes Bfl1 dieses Merkmal ebenfalls besitzt.

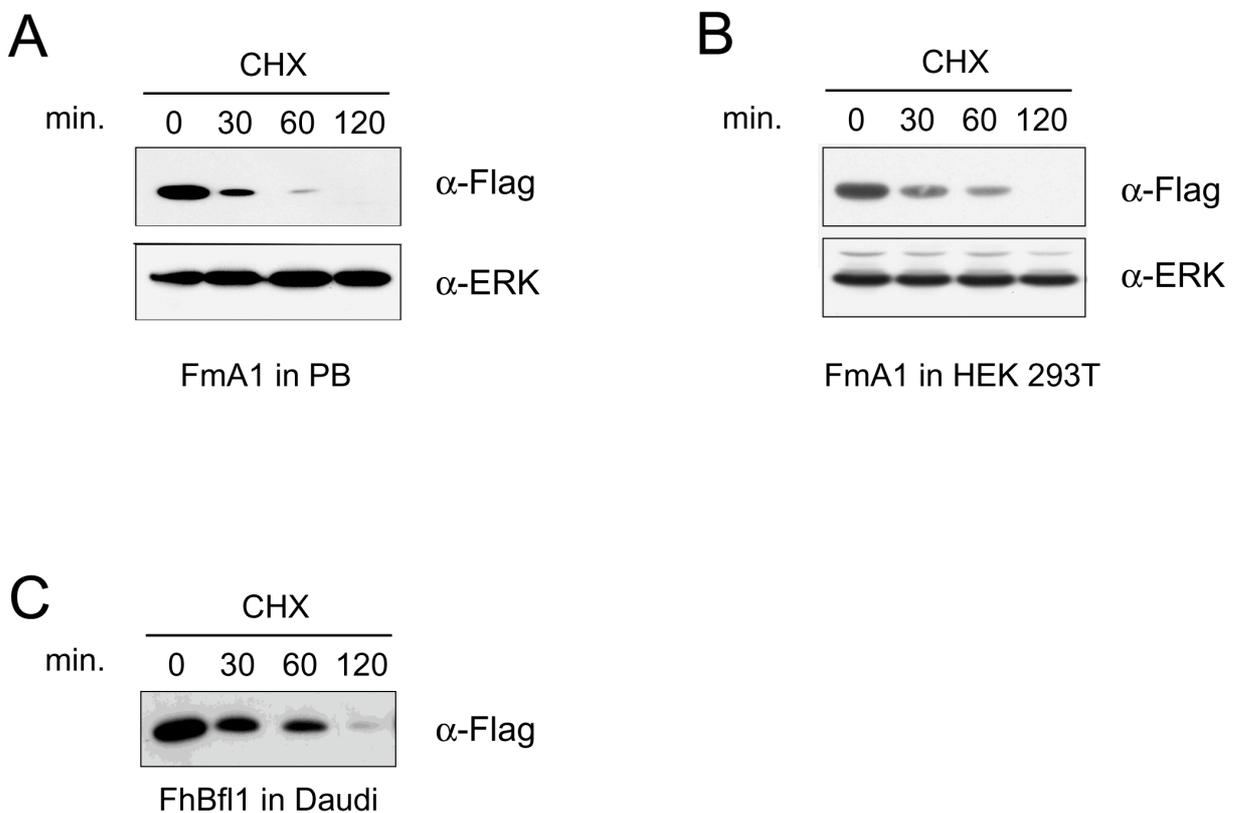


Abb.9 Murines A1 und das humane A1 Homolog Bfl1 sind kurzlebige Proteine. Es wurden 1×10^6 FmA1 (A, B) oder 3×10^5 FhBfl1 (C) transduzierte Zellen pro Ansatz verwendet. Die Konzentration des CHX betrug $10 \mu\text{g/ml}$; die angegebenen Zeitpunkte sind die Dauer der Stimulationen in Minuten. Die Ansätze wurden in je $35 \mu\text{l}$ (A, C) oder $100 \mu\text{l}$ (B) 2xLaemmli aufgekocht; je $10 \mu\text{l}$ auf ein Gel aufgetragen (A, B, C). Die Detektion erfolgte im Western Blot mit Flag spezifischem Antikörper (A, B, C) oder als Ladekontrolle mit ERK spezifischem Antikörper (A, B). PB = Primäre B-Zellen; 293T = HEK 293T Zellen

4.5 Endogenes A1 ist ebenfalls ein sehr instabiles Protein

Die bisherigen Untersuchungen zur Stabilität von A1 wurden an Flag markiertem, überexprimiertem Protein durchgeführt, da zu Beginn der Arbeit kein kommerzieller Antikörper bzw. polyklonales Antiserum mit Spezifität für A1 verfügbar war. Aus diesem Grunde ergaben sich folgende Fragen: 1) Beeinflusst Flag die Stabilität von A1, 2) verändert die hohe Expression von A1 die Stabilität des Proteins, und 3) welche Halbwertszeit besitzt endogenes A1?

Um diese Fragen beantworten zu können, wurde mit Hilfe eines Fusionsproteins aus Glutathion-S-Transferase (GST) -A1trunc ein polyklonales Antiserum gegen A1 hergestellt (siehe Material und Methoden). Die Reaktivität des Antikörpers wurde mit Lysaten von HEK 293T Zellen, die vorher mit den entsprechenden Expressionskonstrukten transfiziert wurden, im Western Blot getestet. Das Serum reagierte sowohl mit FhBfl1 als auch mit FmA1 (Abb.10A). Zudem detektierte das Serum auch nicht „geflaggtes“ A1 (Abb.10A). Als negative Kontrolle diente ein Lysat von HEK 293T Zellen, die vorher mit Flag markiertem Bcl-2 der Maus (FmBcl-2) transfiziert wurden. Hier war keine Reaktivität zu beobachten (Abb.10A). Die zusätzliche Bande, welche in allen vier Spuren des anti-A1 Nachweises zu sehen war, dürfte auf eine Reaktivität des polyklonalen Serums mit einer endogenen Glutathion-S-transferase zurückzuführen sein, da das Serum mit GST-A1trunc erzeugt wurde und eine Bande mit dem gleichen Molekulargewicht in einem \square -GST Western Blot detektiert wurde (Abb.10A).

Mit Hilfe dieses Serums wurde die Stabilität des endogenen A1 Proteins in einem Pulse/Chase Experiment untersucht. Endogenes A1 verhielt sich genau wie ektopisch überexprimiertes A1 (Abb.10B). Beide wiesen eine ähnliche Stabilität auf, so dass nach 30 Minuten nur noch etwa die Hälfte der anfänglichen Proteinmenge sichtbar war. Da das endogene A1 und das transduzierte A1, eine vergleichbare Halbwertszeit hatten, die der des Flag markierten Proteins entspricht (Daten nicht gezeigt), scheint die schnelle Umsatzrate des Proteins weder durch die Überexpression noch durch das Flag-Peptid bedingt zu sein, sondern eine inhärente Eigenschaft von A1 darzustellen.

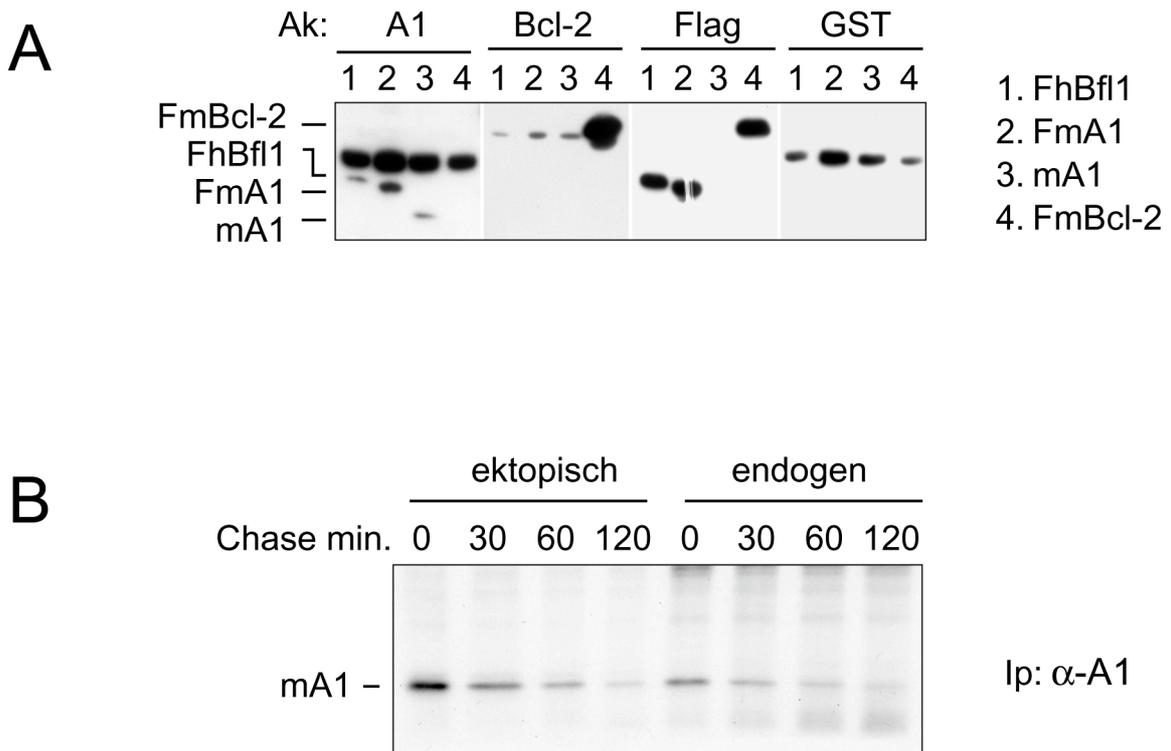


Abb.10 Endogenes A1 besitzt die gleiche Instabilität wie ektopisch exprimiertes A1.

(A) FhBfl1, FmA1, mA1, FmBcl-2 transfizierte HEK293T wurden zwei Tage nach Transfektion lysiert, Die Detektion erfolgte im Western Blot mit einem polyklonalem Antiserum gegen A1, Bcl-2 spezifischem Antikörper, Flag spezifischem Antikörper oder polyklonalem GST Antikörper. (B) mA1 transduzierte WEHI 231 Zellen oder WEHI 231 Wildtypzellen wurden nach dem Pulse/ Chase in RIPA-Puffer lysiert; die Präzipitation erfolgte mit 3 μ l polyklonalem A1 Antikörper. Die Präzipitate wurden in einem Autoradiogramm analysiert. Ak = Antikörper, min. = Minuten, Ip = Immunpräzipitation

4.6 Die kurze Halbwertszeit von A1 ist auf ein anderes Protein übertragbar

Das C-terminale Ende von A1 ist notwendig, um die Stabilität des Proteins zu verringern. Es stellt sich jedoch die Frage, ob es auch ausreichend ist. Hierzu wurden 35 Aminosäurereihen des A1 C-Terminus an das C-terminale Ende einer an sich stabilen, enzymatisch inaktiven Caspase 3 der Maus (mCasp3 Mut.-F) übertragen. Anstelle des kurzen Flag-Peptides wies diese danach am C-Terminus 35 Aminosäuren des A1 C-Terminus (mCasp3 Mut.-A1) auf. Nach Transduktion der WEHI 231 Zellen mit mCasp3 Mut.-F oder mCasp3Mut.-A1, wurden die Zellpopulationen wiederum mit CHX behandelt. Es zeigte sich, dass die Übertragung des A1 C-Terminus (Abb.11) zu einer starken

Verringerung der Proteinstabilität führte. Als Kontrolle diente endogenes ERK, dessen Menge durch die Behandlung des CHX unverändert blieb.

Durch die Stabilisierung von A1 bei Verlust von C-terminalen Aminosäureresten und die Übertragbarkeit der Instabilität mit dem A1 C-Terminus auf ein stabiles Protein, können die letzten 35 Aminosäurereste als notwendige (FmA1trunc) und hinreichende (mCasp3 Mut.-A1) Komponente für die kurze Halbwertszeit des Proteins betrachtet werden.

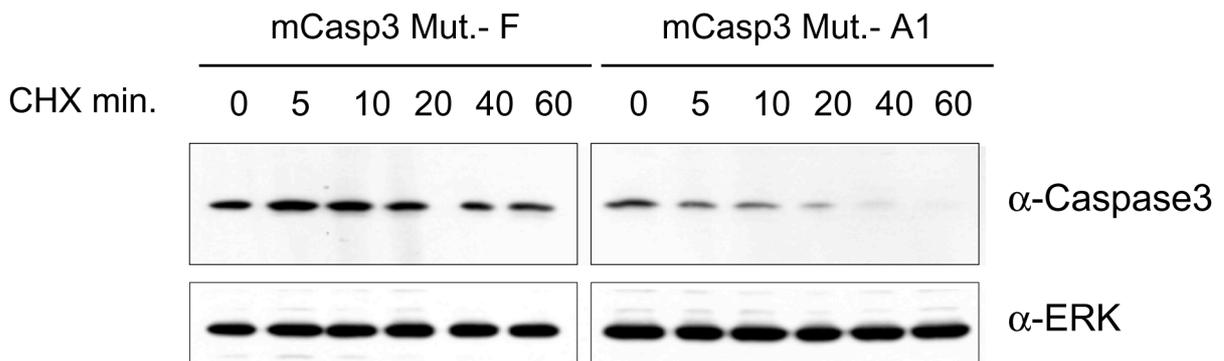


Abb.11 Die kurze Halbwertszeit des A1 kann mit 35 Aminosäureresten des A1 C-Terminus auf ein an sich stabiles Protein übertragen werden. Es wurden von mCasp3 Mut.-F oder mCasp3 Mut.-A1 transduzierte WEHI 231 Zellen nach Behandlung mit CHX für die angegebenen Zeitpunkte Gesamtzelllysate hergestellt und im Western Blot mit den entsprechenden Antikörpern detektiert.

4.7 A1 wird in Proteasomen abgebaut

Kurzlebige Proteine werden häufig über den proteasomalen Abbauweg degradiert [98]. Da es sich bei A1 um ein Protein mit sehr kurzer Halbwertszeit handelt, stellte sich die Frage, ob A1 ebenfalls über diesen Weg abgebaut wird.

Hierzu wurde die Stabilität von FmA1 mit CHX in An- bzw. Abwesenheit des *Proteasomeninhibitors II* bestimmt. Als eine interne Referenz wurde die FmA1 Population verwendet, die mit FmA1trunc kotransduziert war. Die Hemmung der proteasomalen Aktivität führte zu einer Stabilisierung von FmA1, so dass in Anwesenheit des *Proteasomeninhibitors II* die Halbwertszeit von FmA1 mit der von FmA1trunc vergleichbar wurde (Abb.12A).

Der Einfluss des Proteasomeninhibitors auf die Stabilität von A1 wurde unabhängig in einem Pulse/ Chase Experiment getestet (Abb.12B). Das Ergebnis bestätigte den

vorangegangenen Versuch, da in der Anwesenheit des *Proteasomeninhibitors II* der A1 Umsatz deutlich verringert bzw. ganz verhindert wurde.

Die Beobachtung, dass die Inhibition der Proteasomen mit Hilfe eines Proteasomeninhibitors zu einer Hemmung der A1 Degradation führt, zeigt dass das A1 Protein im Proteasom abgebaut wird.

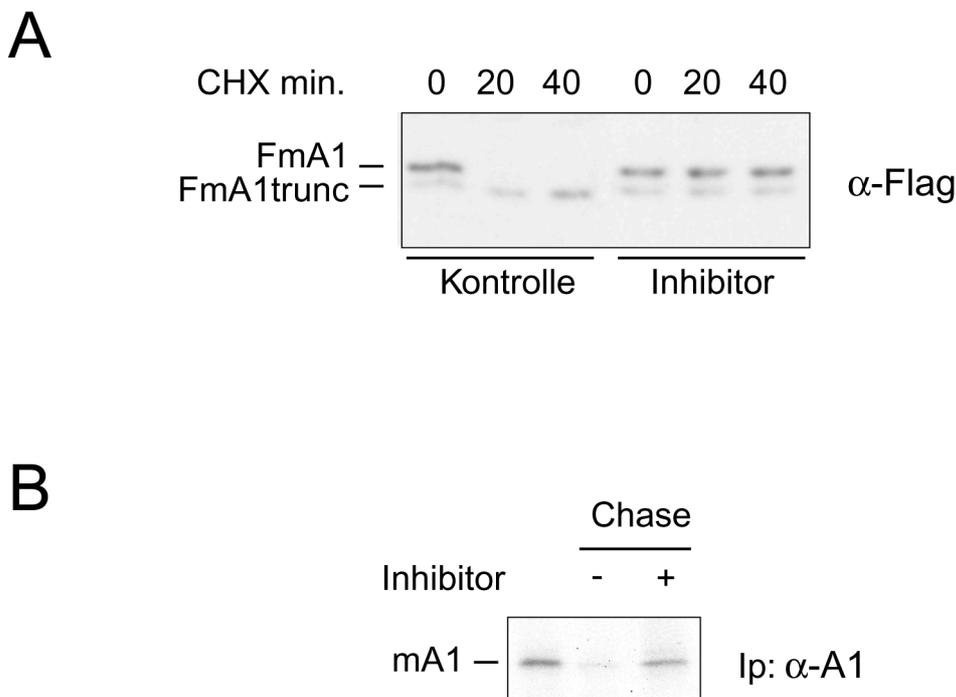


Abb.12 Die Degradation des A1 Proteins erfolgt über den proteasomalen Abbauweg. (A) Es wurden FmA1 + FmA1trunc transduzierte WEHI 231 für die angegebenen Zeitpunkte mit CHX in der An- bzw. Abwesenheit des *Proteasomeninhibitors II* ($10\mu\text{M}$) behandelt. Gesamtzellextrakte wurden im Western Blot mit einem Flag Spezifischem Antikörper analysiert. (B) mA1 transduzierte WEHI 231 Zellen wurden nach 2 Stunden Chase (- ohne/ + mit *Proteasomeninhibitor II* $10\mu\text{M}$) RIPA-Puffer lysiert; die Präzipitation erfolgte mit $3\mu\text{l}$ polyklonalem A1 Antikörper. Die präzipitierten Proteine sind hier in einem Autoradiogramm dargestellt. min. = Minuten, Ip = Immunpräzipitation

4.8 Instabiles A1 wird an Lysinresten ubiquityliert

Die bisherigen Ergebnisse sprechen dafür, dass das kurzlebige antiapoptotische Bcl-2 Familienmitglied A1 in Proteasomen degradiert wird. Viele proteasomal abzubauen Proteine werden vor ihrer Degradation kovalent mit Ubiquitin assoziiert [98]. Im Folgenden sollte die Frage beantwortet werden, ob A1 einem solchen Ubiquitylierungsprozess unterliegt.

Die Fragestellung wurde in transienten Transfektionen in HEK 293T Zellen untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit FmA1 und HA-Ubi kotransfiziert (HA ist ein Teil des Hämagglutininproteins des Influenzavirus und diente zur Markierung von Proteinen für den Nachweis im Western Blot.). Da A1 mit einem Flag-Peptid und Ubiquitin mit einem HA-Peptid versehen waren, konnte nach Immunpräzipitation mit einem Flag-spezifischem Antikörper eine mögliche Ubiquitylierung mit einem HA spezifischem Antikörper getestet werden. Um den Prozess der Ubiquitylierung zu verstärken, wurden die transfizierten Zellen eine Stunde vor der Lyse mit dem *Proteasomeninhibitor II* behandelt, welcher zwar eine Ubiquitylierung, nicht aber den Abbau von Proteinen zulässt. A1 wurde unter diesen Bedingungen sehr stark ubiquityliert (Abb.13A). Der Nachweis höhermolekularer Immunreaktivität („Schmier“) steht im Einklang mit einer Polyubiquitylierung des Proteins. Die Spezifität der Reaktion wurde dadurch belegt, dass sowohl FmA1 als auch HA-Ubi anwesend sein mussten, da bei Fehlen eines der beiden keine Ubiquitylierung sichtbar war. Wurde anstelle von FmA1 die verkürzte und somit auch stabilere Variante mit HA-Ubi kotransfiziert, war eine Ubiquitylierung kaum noch zu sehen (Abb.13A), obwohl FmA1trunc in vergleichbarer Höhe in den Zellen exprimiert wurde (Abb.13A).

Da die Ubiquitylierung von Proteinen, die für das Proteasom vorgesehen sind, meist an Lysinresten stattfindet [96], wurde in einem weiteren Experiment eine A1 Mutante ohne Lysin getestet. Wiederum wurden die verschiedenen A1 Proteine mit HA-Ubi in HEK 293T Zellen exprimiert. Um einen Einfluss der Flag-Peptide auf die Stärke der Ubiquitylierung auszuschließen, wurden in dieser Versuchsreihe unmarkierte Proteine verwendet. Die Immunpräzipitation erfolgte über A1-spezifisches Serum. Wie im Versuch zuvor wurde A1 trotz des fehlenden Flags sehr stark ubiquityliert (Abb.13B). Damit konnte eine unspezifische Ubiquitylierung des A1 aufgrund des Flag-Peptids, welches selbst zwei Lysine enthält, ausgeschlossen werden. Des Weiteren ist wiederum eine Reduktion der Ubiquitylierung der verkürzten A1 Mutante (mA1trunc) zu beobachten (Abb.13B). Bei der A1 Mutante, bei der alle Lysinereste zu Alaninenresten mutiert waren, war wie erwartet keine Ubiquitylierung nachweisbar, obwohl das Protein in etwa der gleichen Stärke exprimiert wurde (Abb.13B). Es konnte in diesem Zusammenhang auch eine Mono- bzw. Diubiquitylierung von mA1 und mA1trunc beobachtet werden (Abb.13B).

Da wildtypisches A1 durch den *Proteasomeninhibitor II* stabilisiert werden kann und an Lysinen ubiquityliert wird, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Degradation des Proteins durch die Proteasomen erfolgt.

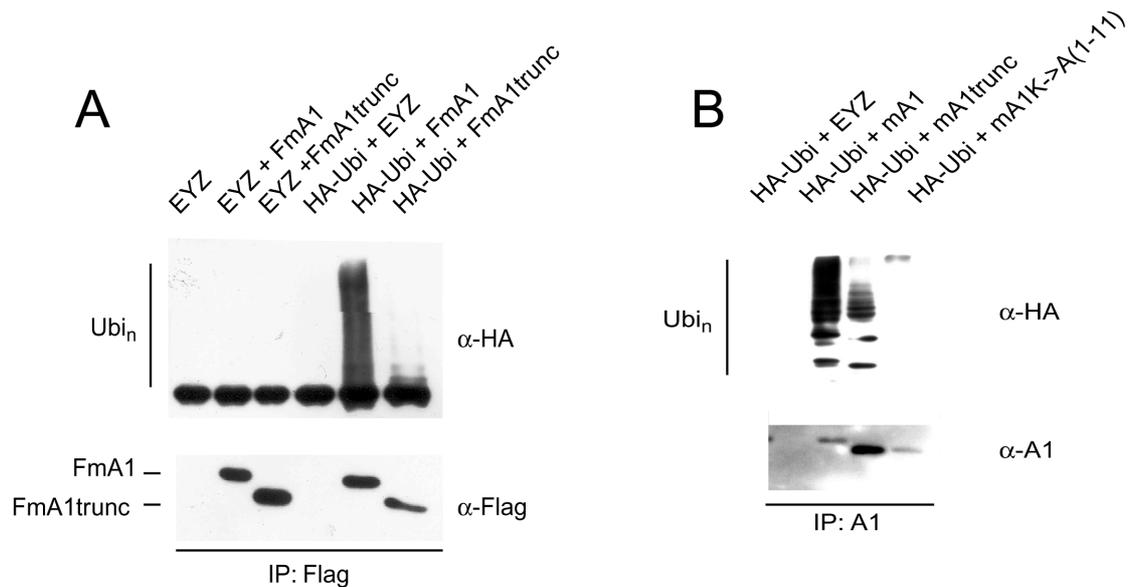


Abb.13 A1 wird in einem lysinabhängigen Prozess ubiquityliert. (A) Es wurden, mit den angegebenen Konstrukten transfizierte HEK 293T Zellen zwei Tage nach der Transfektion eine Stunde mit dem Proteasomeninhibitor II ($10\mu\text{M}$) behandelt und in RIPA-Puffer lysiert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit einem Flag ($10\mu\text{g}$) spezifischem Antikörper oder (B) mit dem polyklonalem A1 Antikörper ($3\mu\text{l}$). Die Präzipitate wurden im Western Blot mit einem HA und Flag (A) oder HA und A1 spezifischem Antikörper (B) detektiert. IP = Immunpräzipitation, Ubi_n = Polyubiquitin

4.9 Wildtypisches A1 schützt WEHI 231 Zellen besser vor Apoptose als die stabilere, kürzere A1 Mutante

Das C-terminale Ende von A1 ist für seine Destabilisierung notwendig. Es stellt sich jedoch die Frage, ob dieser Bereich auch Einfluss auf die antiapoptotische Funktion des A1 hat.

Zur Beantwortung dieser Frage, wurden WEHI 231 Zellen mit A1 oder A1trunc transduziert. Über eine Sortierung auf Basis der EGFP Expression wurden Zellpopulationen mit unterschiedlich hoher Kopienzahl an integrierten Viren angereichert (Abb.14A). Durch die Instabilität des A1 Proteins bedingt, wies die Population die den A1 Wildtyp exprimierten, trotz höherer Kopienzahl, im Vergleich zu den beiden Populationen mit der verkürzten A1 Version, eine niedrigere Expression auf (Abb.14B). Diese drei Populationen wurden im Folgenden zusammen mit einer Kontrollpopulation (EYZ)

verwendet, um das Schutzpotential von A1 und A1trunc in einem Überlebenstest zu vergleichen.

Bei diesem Test wurde über Etoposid in den Zellen Apoptose induziert. Nach Stimulation über Nacht in verschiedenen Konzentrationen, wurde das Ausmaß der Apoptose bestimmt. Als Maß für die Apoptose wurde die Exposition von Phosphatitylserin (PS) auf der Zelloberfläche bestimmt. PS ist in intakten Zellen in der inneren Lage der Zellmembran und wird nur nach Induktion der Apoptose über einen „Flip“ Mechanismus nach außen gebracht. PS kann über die Bindung von AnnexinV im FACS nachgewiesen werden. Viele Daten aus der Literatur belegen, dass AnnexinV Bindung ein früher Marker der Apoptose ist, so dass AnnexinV negative Zellen als nicht apoptotische Zellen betrachtet werden können [102].

Wie erwartet war ein sehr großer Teil der Zellen, die A1 überexprimierten, trotz Zugabe von Etoposid noch lebendig (Abb.14C). Überraschenderweise konnte die verkürzte A1 Mutante nur bei sehr hohen Proteinmengen die Apoptose verhindern (A1trunc-med). Expressieren die Zellen aber weniger Protein der verkürzten A1 Mutante (A1trunc-low), so werden diese Zellen bei hohen Etoposid Konzentrationen nicht mehr vor Apoptose geschützt (Abb.14C).

Zusammenfassend kann man sagen, dass der C-Terminus von A1 für die Schutzfunktion wichtig ist und die Abwesenheit dieses Moduls nur durch sehr hohe Proteinmengen kompensiert werden kann.

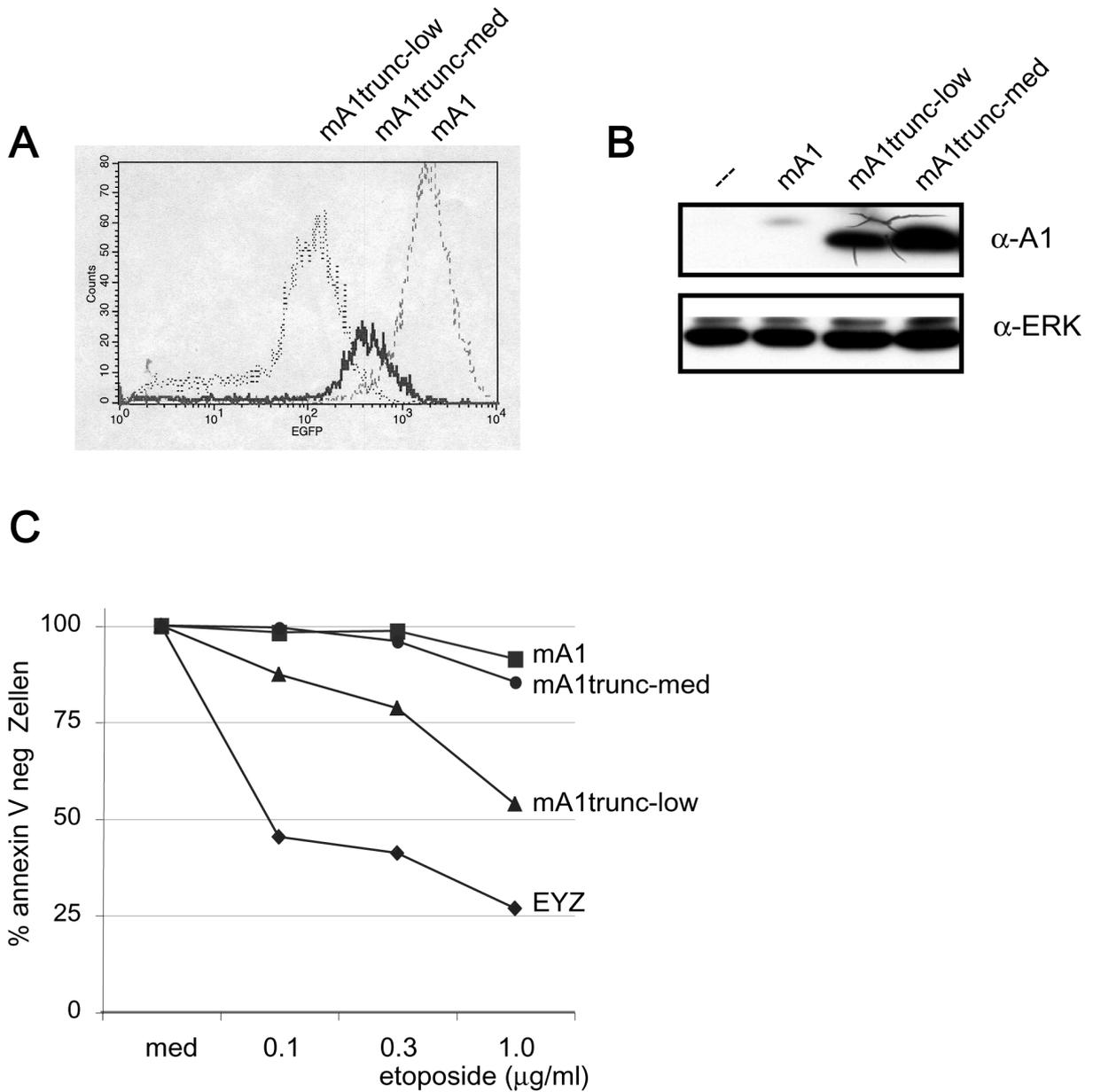


Abb.14 Der A1 Wildtyp schützt besser vor Apoptose als die kurze, stabilere A1 Mutante. (A) Transduzierte WEHI 231 Zellen wurden im FACS analysiert. Die Intensität der Grünfluoreszenz ist in einem Histogramm dargestellt. (B) Es wurden Gesamtzelllysate der transduzierten (wie angegeben) WEHI 231 Zellen im Western Blot mit dem polyklonalem A1 Antikörper und ERK analysiert. (C) Die Zellen aus (B) wurden nach Etoposid Zugabe und Inkubation über Nacht im FACS auf AnnexinV Bindung analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der AnnexinV negativen Zellen aus der Gesamtpopulation. Dieses Ergebnis wurde in zwei unabhängigen Versuchen bestätigt ■ = mA1, ◆ = EYZ, ▲ = mA1trunc-lo, ● = mA1trunc-med

4.10 Nachahmung einer Phosphorylierung im C-Terminus von A1 führt zu erhöhter Proteinstabilität, aber zu einem verringertem antiapoptotischem Potential

A1 wird über den proteasomalen Abbauweg degradiert. Auch Bcl-2 kann über diesen Weg abgebaut werden, wofür allerdings bestimmte Serin/ Threoninreste dephosphoryliert vorliegen müssen. Die Nachahmung einer Phosphorylierung durch den Ersatz von Serinen/ Threoninen durch negativ geladenen Asparaginsäuren (D) führt zu einem sehr stabilen Bcl-2 [85]. Da A1 im C-terminalen Ende ebenfalls Serin/ Threoninreste als potentielle Phosphorylierungsstellen besitzt, wurden diese in negativ geladene Glutaminsäurereste (E) mutiert (FmA1E-Mut.). Ähnlich wie im Falle von Bcl-2 wurde dadurch eine permanente Phosphorylierung der Serin/ Threoninreste nachgeahmt, allerdings mit dem Unterschied, dass Glutaminsäure anstelle von Asparaginsäure verwendet wurde, da jene Aminosäure aufgrund der zusätzlichen Methylgruppe die Phosphorylierung besser nachahmt.

CHX Behandlung von FmA1 bzw. FmA1E-Mut. transduzierten Zellen zeigte, dass FmA1E-Mut. deutlich stabiler war, als das wildtypische FmA1 (Abb.15A). Als Referenz wurde in diesen Zellen kotransduziertes, FmBcl-2 verwendet, das in beiden Populationen über den Beobachtungszeitraum von 2 Std. stabil war. Um auch in diesen Versuchen einen Artefakt durch CHX auszuschließen, wurden die Stabilität von FmA1 und der FmA1E-Mut. in einem Pulse/ Chase Experiment getestet. Wie in der Abbildung 15B zu sehen ist, verhielten sich der Wildtyp A1 und die A1E-Mut. genau wie nach CHX Behandlung. Dieses Ergebnis führt zu der Schlussfolgerung, dass eine nachgeahmte Phosphorylierung zu einem stabileren Protein führt.

Das antiapoptotische Potential der beiden Proteine wurde wiederum in einem Überlebenstest untersucht, bei dem die Zellen mit Etoposid behandelt wurden. Die Zellen, in denen FmA1 überexprimiert war, waren in hohem Maße vor Apoptose geschützt (Abb.15C). Überraschenderweise hatten FmA1E-Mut. transduzierte Zellen im Vergleich zu den „leeren“ Kontrollzellen (EYZ) keinen Überlebensvorteil (Abb.15C). Eine Proteinanalyse belegte, dass die Proteinmenge der beiden A1 Varianten gleich war (Abb.15D).

Dieser Versuch steht im Einklang mit der zuvor gemachten Beobachtung, dass das C-terminale Ende die antiapoptotische Funktionalität von A1 stark beeinflusst. Interessanterweise korreliert die Zunahme der Proteinstabilität in beiden Fällen mit einer Abnahme des antiapoptotischen Potentials.

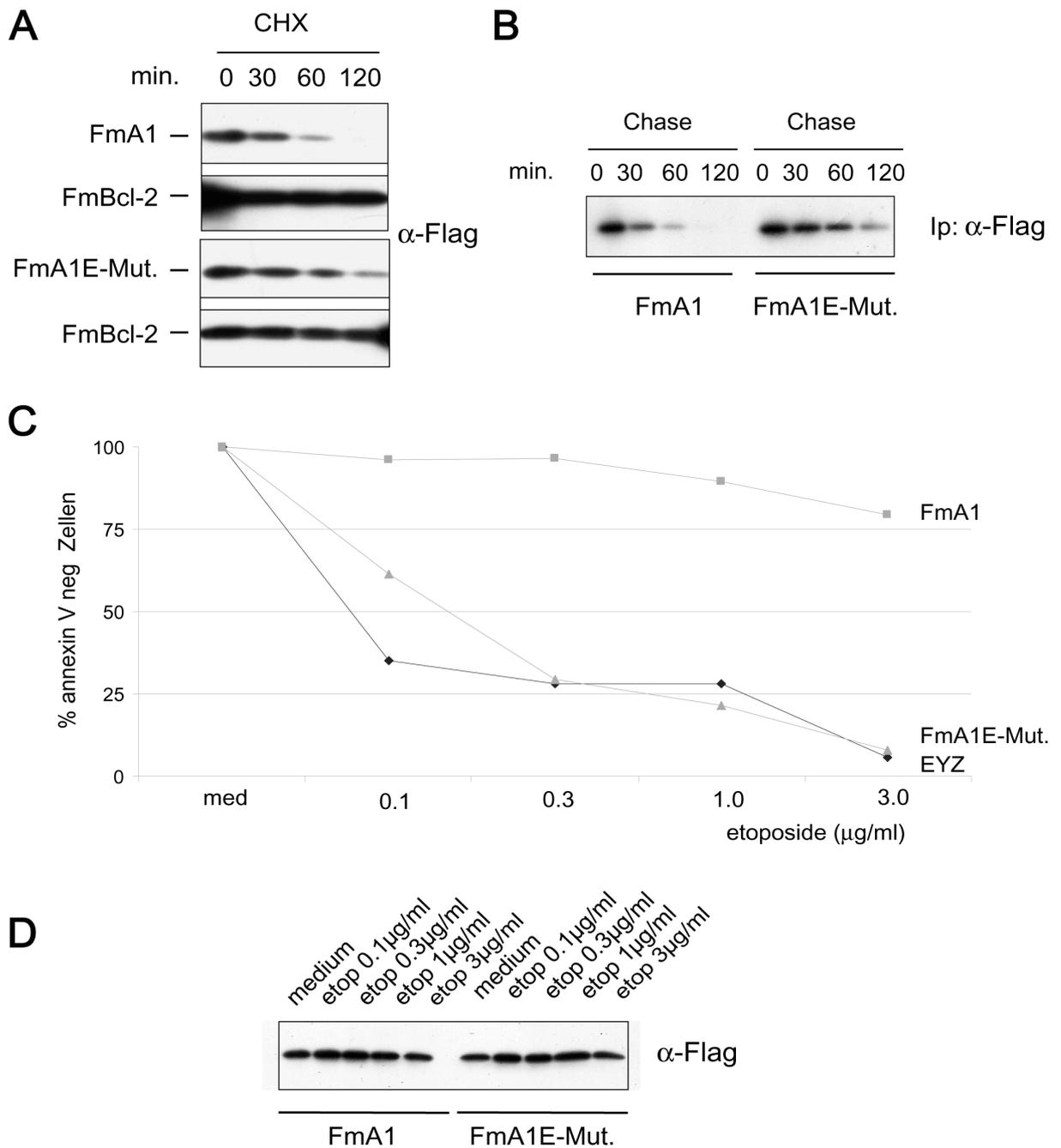


Abb.15 Nachahmung einer Phosphorylierung des C-Terminus von A1 führt zu Stabilität und Abnahme der Schutzfunktion. (A) Es wurden FmA1+ FmBcl-2 oder FmA1E-Mut. + FmBcl-2 transduzierte WEHI 231 Zellen für die angegebenen Zeitpunkte mit CHX behandelt. Gesamtzelllysate dieser Zellen wurden im Western Blot mit einem Flag spezifischem Antikörper detektiert. (B) FmA1 oder FmA1E-Mut. transduzierte WEHI 231 Zellen wurden nach dem Pulse/ Chase in RIPA-Puffer lysiert; die Präzipitation erfolgte mit 10µg Flag Antikörper. Die Präzipitate wurden in einem Autoradiogramm analysiert. (C) Dargestellt ist der prozentuale Anteil der AnnexinV negativen Zellen aus der Gesamtpopulation nach der FACS Analyse. Dieses Ergebnis wurde in drei unabhängigen Versuchen bestätigt. (D) FmA1 oder FmA1E-Mut. transduzierte WEHI 231 Zellen wurden mit der angegebenen Etoposid Konzentration über Nacht behandelt. Die Gesamtzelllysate wurden mit einem Flag spezifischem Antikörper im Western Blot analysiert. min. = Minuten, Ip = Immunpräzipitation; ▲ =EYZ, ■ = FmA1, = FmA1E-Mut.

4.11 Der A1 Wildtyp, die verkürzte A1 Mutante und die Glutaminsäuremutante von A1 binden das antiapoptotische Bim in gleichem Maße

Antiapoptotische Bcl-2 Familienmitglieder üben ihre Schutzfunktion vermutlich dadurch aus, dass sie durch Bindung proapoptotischer Familienmitglieder diese neutralisieren. Auch A1 könnte auf diese Weise wirken, da eine Interaktion mit verschiedenen proapoptotischen Mitgliedern gezeigt werden konnte [103]. Im Zusammenhang mit der verringerten Funktionalität der mutierten Varianten von A1 stellt sich daher die Frage, ob diese Proteine proapoptotische Bcl-2 Familienmitglieder noch effizient binden können.

Da A1 hauptsächlich in lymphatischen Zellen exprimiert wird, wurde für die weiteren Untersuchungen das proapoptotische Bcl-2 Familienmitglied Bim gewählt. In Knockout Studien mit Bim defizienten Mäusen hatte sich zuvor gezeigt, dass es eine wichtige Rolle sowohl im sich entwickelndem als auch im bereits bestehendem Immunsystem besitzt [104].

Zum Nachweis der Interaktion wurden HEK 293T Zellen mit Konstrukten kotransfiziert, die für Flag markierte antiapoptotische Proteine (FmA1, FmA1trunc, FmA1E-Mut. und FmBcl-2) bzw. HA markiertes BimEL (die längste der drei Bim Isoformen; EL = Extra Long) kodierte (HAMBimEL). Nach Präzipitation der antiapoptotischen Bcl-2 Proteine mit einem Flag Antikörper konnte die Interaktion durch den Nachweis von HAMBimEL mit einem anti-HA Antikörper im Western Blot gezeigt werden. Unter den verwendeten Versuchsbedingungen konnte HAMBimEL mit allen vier antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen in vergleichbarer Stärke interagieren (Abb.16A). Die Präzipitation war nicht auf eine Kreuzreaktion des Flag Antikörpers mit HAMBimEL zurückzuführen, da HAMBimEL in bloßer Anwesenheit von EYZ nicht präzipitiert wurde. Ferner schließt dieser Versuchsansatz auch aus, dass HAMBimEL direkt mit der Sephadexmatrix, die für diese Immunpräzipitation eingesetzt wurde, interagiert.

Aus diesen Ergebnis kann man schliessen, dass die verloren gegangene Schutzfunktion der beiden A1 Mutanten nicht durch eine fehlende Bindung mit dem antagonistischen, proapoptotischen Bim erklärt werden kann, da sowohl die C-terminal verkürzte als auch die Glutaminsäure mutierte Variante von A1 mit Bim interagieren können.

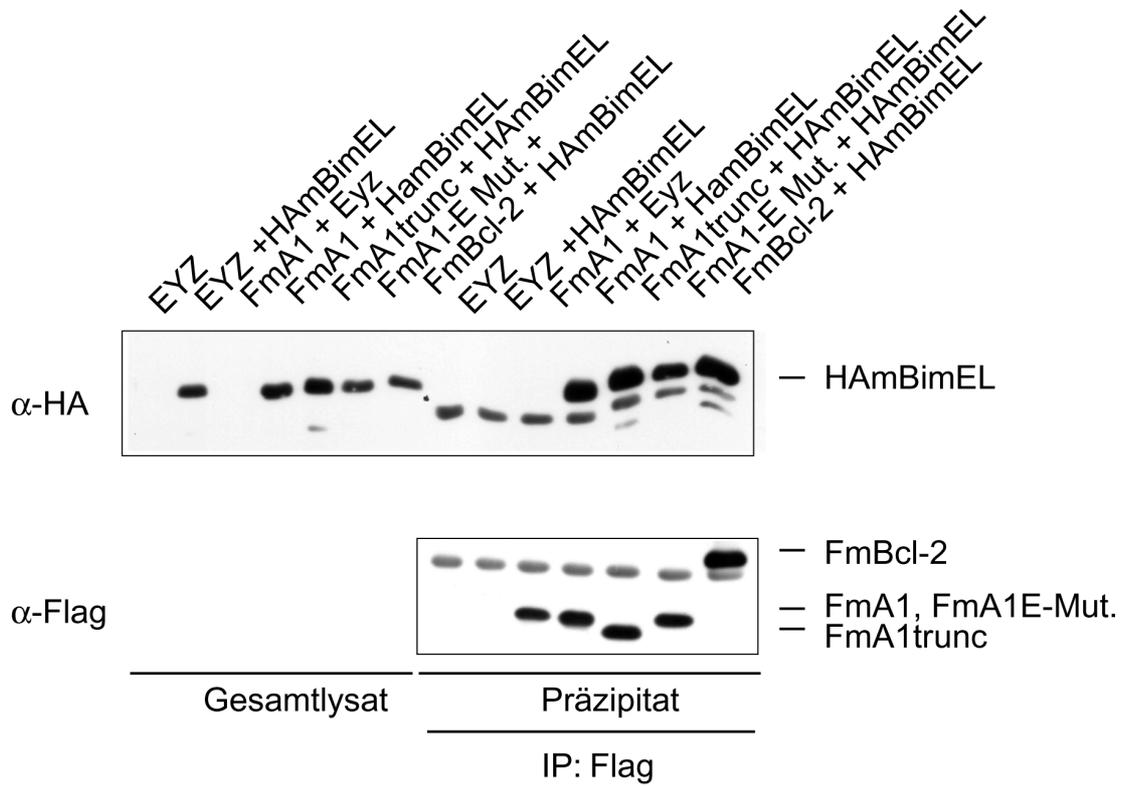
Da Bim, wie die meisten seiner proapoptotischen Verwandten, eine sehr ausgeprägte C-terminale Transmembrandomäne besitzt, kann es an intrazelluläre Membranen, wie

beispielsweise an die mitochondriale Membran, lokalisieren, um so Apoptose zu induzieren [78]. In diesem Fall, müsste A1 zur Erfüllung seiner Schutzfunktion aber ebenfalls verstärkt an die Membran rekrutiert werden oder die Membranlokalisierung von Bim verhindern.

Um dies zu testen, wurden kotransduzierte FmA1/ FmBimEL bzw. FmA1/ FmBcl-2 WEHI 231 Populationen verwendet. Zusätzlich wurden in diesem Ansatz Zellen verwendet, die anstelle von FmA1 die verkürzte Mutante, FmA1trunc, exprimierten. Nach der Auftrennung der Bestandteile der Zellen in eine Membran- und Zytoplasma Fraktion, wurde die Lokalisation der verschiedenen Proteine analysiert. Sowohl FmA1 als auch FmA1trunc wurden durch die Einschleusung von FmBimEL stärker in die membranreiche Fraktion rekrutiert (Abb.16B). Die gleichzeitige Expression von FmBcl-2 hatte keine Umverteilung der beiden A1 Proteine zur Folge.

Die Umverteilung von A1 Proteinen in Anwesenheit von Bim, legt den Schluss nahe, dass A1 nicht nur in transient transfizierten 293T Zellen mit Bim interagieren kann sondern auch in stabil transduzierten A1/ Bim WEHI 231 Zellen.

A



B

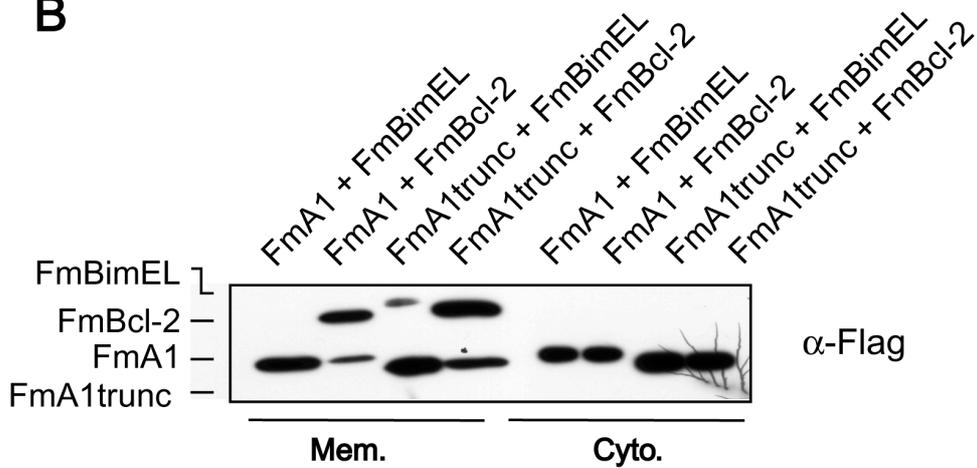


Abb.16 A1wt, A1trunc und A1E-Mut. können im gleichen Maße mit Bim interagieren. (A) Entsprechend transfizierte HEK 293T Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion in 0,5%igem NP40 Immunpräzitationspuffer lysiert. Die Immunpräzitation erfolgte mit einem Flag (10 μ g) spezifischem Antikörper. Die Proteine aus den Gesamtlysaten und Präzipitaten wurden mit den angegebenen Antikörpern im Western Blot detektiert. (B) FmBcl-2, FmA1+FmBimEL oder FmA1trunc+FmBcl-2, FmA1trunc+FmBimEL transduzierte WEHI 231 Zellen wurden in CALMI Puffer lysiert. Die Detektion der Fraktionen im Western Blot erfolgte mit einem Flag spezifischem Antikörper IP = Immunpräzitation; Mem. = Membranfraktion; Cyto. = Cytoplasmfraktion;

4.12 A1 wird durch die gleichzeitige Expression von Bim stabilisiert

Da das antiapoptotische A1 mit dem proapoptotischem Bcl-2 Familienmitglied Bim interagieren kann, stellte sich die Frage, ob Bim Einfluss auf A1 nimmt und dadurch möglicherweise dessen Halbwertszeit verändert. Um dies zu untersuchen, wurden WEHI 231 Zellen sowohl mit FmBimEL und wildtypischen FmA1 kotransduziert. Als Referenzpopulation wurden FmA1/FmBcl-2 Zellen eingesetzt, da von Vorversuchen bekannt war, dass Bcl-2 die Stabilität von A1 nicht verändert (Abb.15A).

Die Halbwertszeit von A1 wurde mit Hilfe von CHX bestimmt. Bei gleichzeitiger Expression von Bim in A1 überexprimierenden Zellen nimmt die Stabilität von A1 zu, so dass selbst nach 90 Minuten CHX Behandlung noch eine beträchtliche Menge von A1 nachweisbar war. A1 war in der Kontrollpopulation, wie in allen zuvor durchgeführten Experimenten, bereits nach 45 Minuten fast gänzlich verschwunden war (Abb.17A). Somit scheinen nicht alle BH3-Domäne enthaltende Proteine, sondern vielleicht nur „BH3-only“ Mitglieder der Bcl-2 Familie A1 stabilisieren zu können.

Es ist bekannt, dass Bim jedoch unter bestimmten Bedingungen ebenfalls ein potentielles Ziel für den proteasomalen Abbau darstellt [105], so dass die Stabilität von A1 in Anwesenheit von Bim auch einfach durch eine Überlastung der Proteasomen verursacht werden könnte.

Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde die A1/ Bim Zellpopulationen noch zusätzlich mit dem ebenfalls instabilen mCasp3Mut.-A1 Protein (Abb.11) transduziert und die Stabilität aller drei Proteine bestimmt. Das Ergebnis des Versuchs spricht gegen eine generelle „Verstopfung“ der Proteasomen, da mCasp3Mut.-A1 in A1/ Bim Zellen genau wie in A1/ EYZ Kontrollzellen sehr instabil war. A1 selbst wurde nur in den Kontrollzellen sehr schnell abgebaut, in Anwesenheit von Bim jedoch drastisch stabilisiert (Abb.17B). Des Weiteren kann man aus diesem Experiment folgern, dass die Zunahme der A1 Halbwertszeit von einer direkten Interaktion des A1 mit Bim abhängig zu sein scheint, weil die mCasp3Mut.-A1 aufgrund der fehlenden BH-Domänen wahrscheinlich nicht mit Bim interagieren kann.

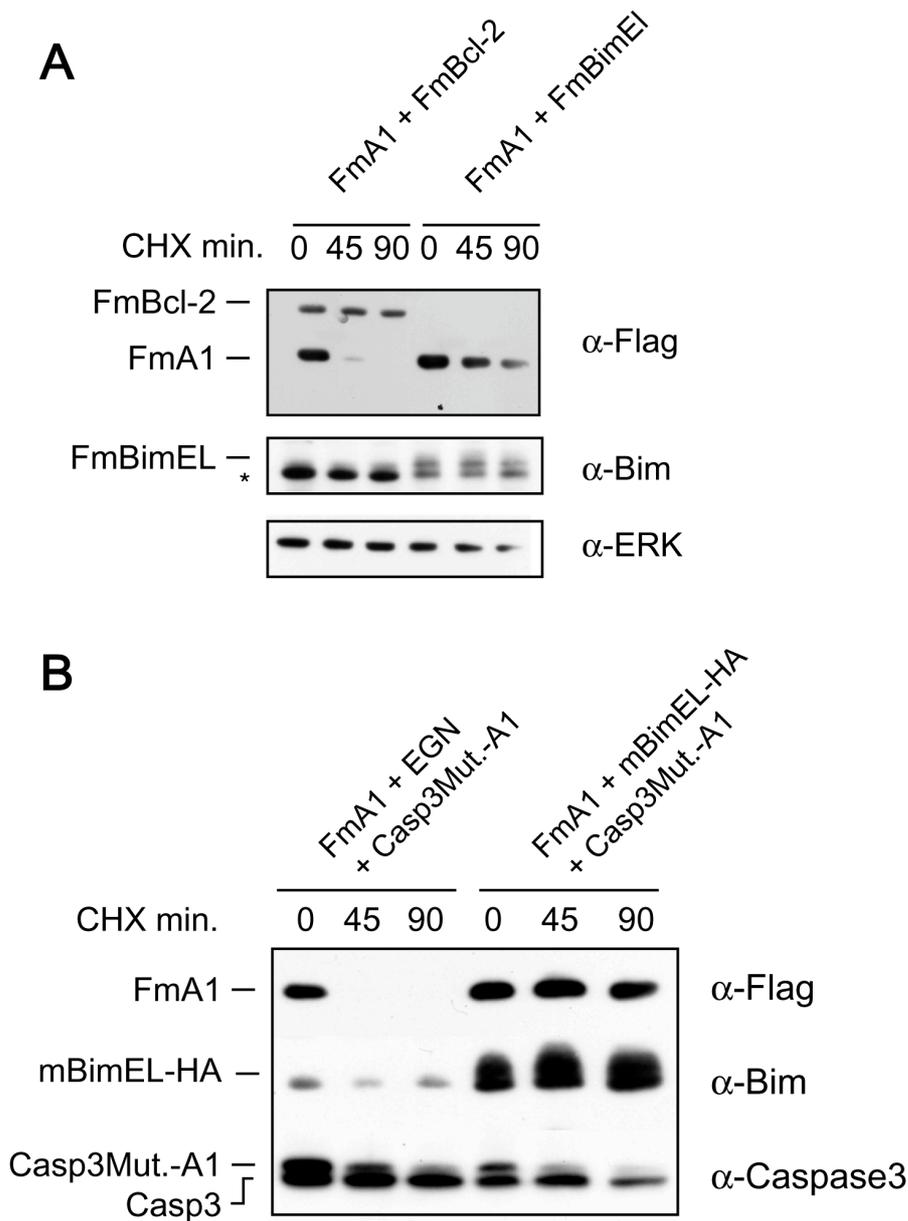


Abb.17 Die Überexpression von Bim führt zu Stabilisierung von A1. (A) FmA1+FmBcl-2 oder FmA1+FmBimEl transduzierte WEHI 231 Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit CHX behandelt. Die Detektion erfolgte mit einem Flag oder Bim spezifischen Antikörper im Western Blot. Als Ladekontrolle wurde derselbe Blot mit einem ERK spezifischen Antikörper nachdetektiert. (B) FmA1+Kontrollvektor (EGN)+Casp3Mut.-A1 oder FmA1+BimEL-HA+Casp3Mut.-HA transduzierte WEHI 231 Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit CHX behandelt. Die Detektion erfolgte mit einem Flag, Bim oder Caspase 3 spezifischem Antikörper. * = bei den ersten drei Spuren ist noch das FmBcl-2 Signal von der □-Flag Detektion zu sehen.

4.13 Bim reduziert die Ubiquitylierung des A1 Proteins

A1 wird in einem proteasomenabhängigen Prozess abgebaut, nachdem es polyubiquityliert wurde. Zudem ist der Abbau von A1 durch das proapoptotische Bcl-2 Familienmitglied Bim stark verlangsamt. Könnte Bim mit der Ubiquitylierung von A1 interferieren? Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Ubiquitylierung in An- bzw. Abwesenheit von Bim untersucht. Auch in diesem Experiment wurde A1 in Anwesenheit von Ubiquitin stark ubiquityliert (Abb.18). Exprimierten die Zellen jedoch zusätzlich zu A1 und Ubiquitin noch Bim, war die Ubiquitylierung von A1 fast völlig verschwunden (Abb.18). Die Reduktion war nicht durch eine verringerte A1 Expression bedingt, da das Protein auch in Anwesenheit von Bim in gleicher Menge nachweisbar war. Auch eine generelle Verringerung von Ubiquitin scheint nicht der Grund zu sein, da die Ubiquitinmengen in den Gesamtzelllysaten vergleichbar waren.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Bim die A1 Ubiquitylierung stört und dadurch möglicherweise die Stabilität des A1 Proteins fördert. Ob dieser Prozess durch ein „Masking“ der Lysine im A1 oder aber durch einen indirekten Mechanismus erreicht wird ist bisher unklar.

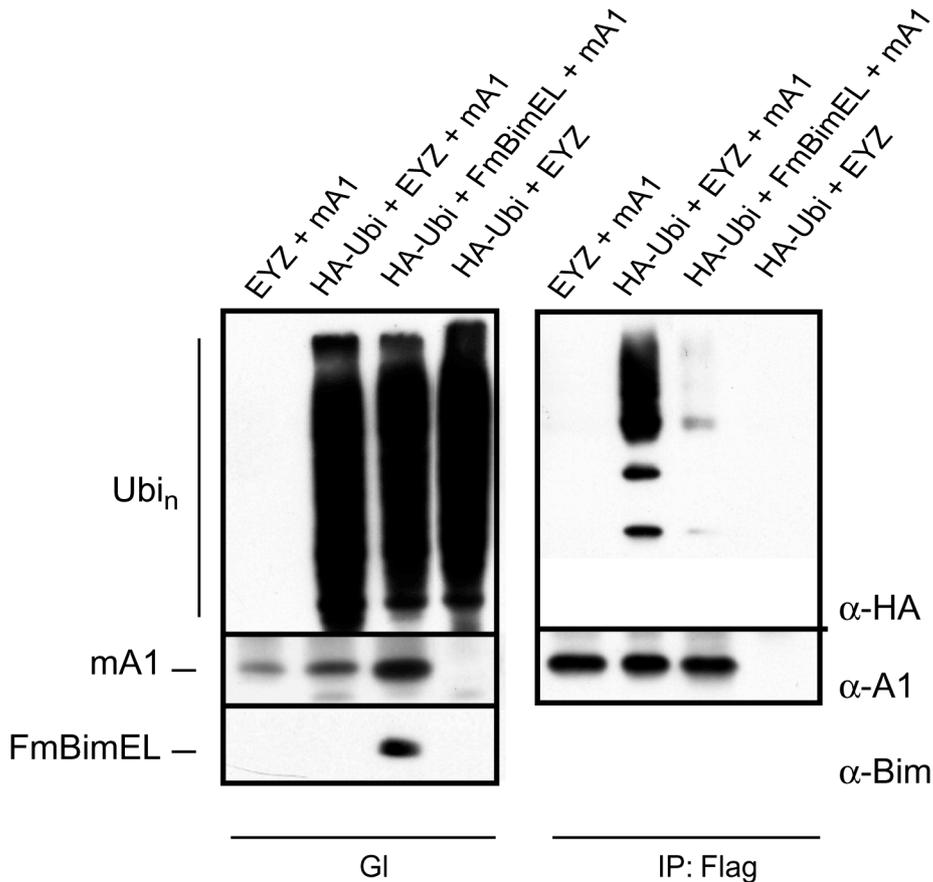


Abb.18 Bim verhindert die Ubiquitylierung von A1. Entsprechend transfizierte HEK 293T Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion eine Stunde mit dem Proteasomeninhibitor II ($10\mu\text{M}$) behandelt und in RIPA-Puffer lysiert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit dem polyklonalem A1 Antikörper ($3\mu\text{l}$). Die Detektion erfolgte mit einem HA, A1 und Bim spezifischen Antikörper im Western Blot. IP = Immunpräzipitation, Gf = Gesamtlisat, Ubi_n = Polyubiquitin

4.14 Die A1 Stabilität wird durch eine direkte Interaktion mit Bim vermittelt

Bim ist im Gegensatz zu Bcl-2 in der Lage, A1 durch eine Reduktion der Ubiquitylierung zu stabilisieren. Da die Stabilisierung durch Bim vermutlich durch direkte A1 Bindung vonstatten geht, wurde zusätzlich das proapoptotische Bcl-2 Familienmitglied Bid analysiert, da Werner et al. eine Interaktion zwischen Bid und humanem A1 (Bfl1) zeigen konnten [47].

Um den Einfluss von Bid auf die Stabilität von A1 zu testen, wurden WEHI 231 Zellen mit FmA1 und Bid (BidWt-F) kotransduziert. Wie zuvor gezeigt, war A1 in Zellen mit Bim stabil (Abb.19A). In der Zellpopulation, in der A1 zusammen mit Bid exprimiert wurde,

war jedoch keine Stabilisierung des A1 Proteins zu beobachten (Abb.19A). A1 verhielt sich genau wie in den mit CHX behandelten Vektorkontrollzellen (EYZ). Die fehlende Stabilisierung von A1 durch Bid kann nicht auf eine fehlende Expression von Bid zurückzuführen sein, da das Protein im Western Blot nachweisbar war (Abb19A,B).

Da Bid offenbar nicht in der Lage ist, die A1 Stabilität zu verändern, stellte sich die Frage, ob das Protein überhaupt mit FmA1 interagieren kann. Eine mögliche Interaktion der beiden Proteine wurde unter Bedingungen getestet, bei denen die FmA1/ Bim Bindung nachweisbar war, d.h. nach Kofransfektion der beiden Proteine in HEK 293T Zellen. Obwohl eine Interaktion von Bid mit Bfl1 beschrieben wurde [47], war unter den gewählten Immunpräzipitationsbedingungen keine Bindung von Bid und A1 zu beobachten. Somit zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass A1 durch „BH3-only“ Mitglieder nur dann stabilisiert werden kann, wenn die Proteine stark mit A1 Wechselwirken können und hierzu scheint nur Bim, nicht aber Bid, in der Lage zu sein.

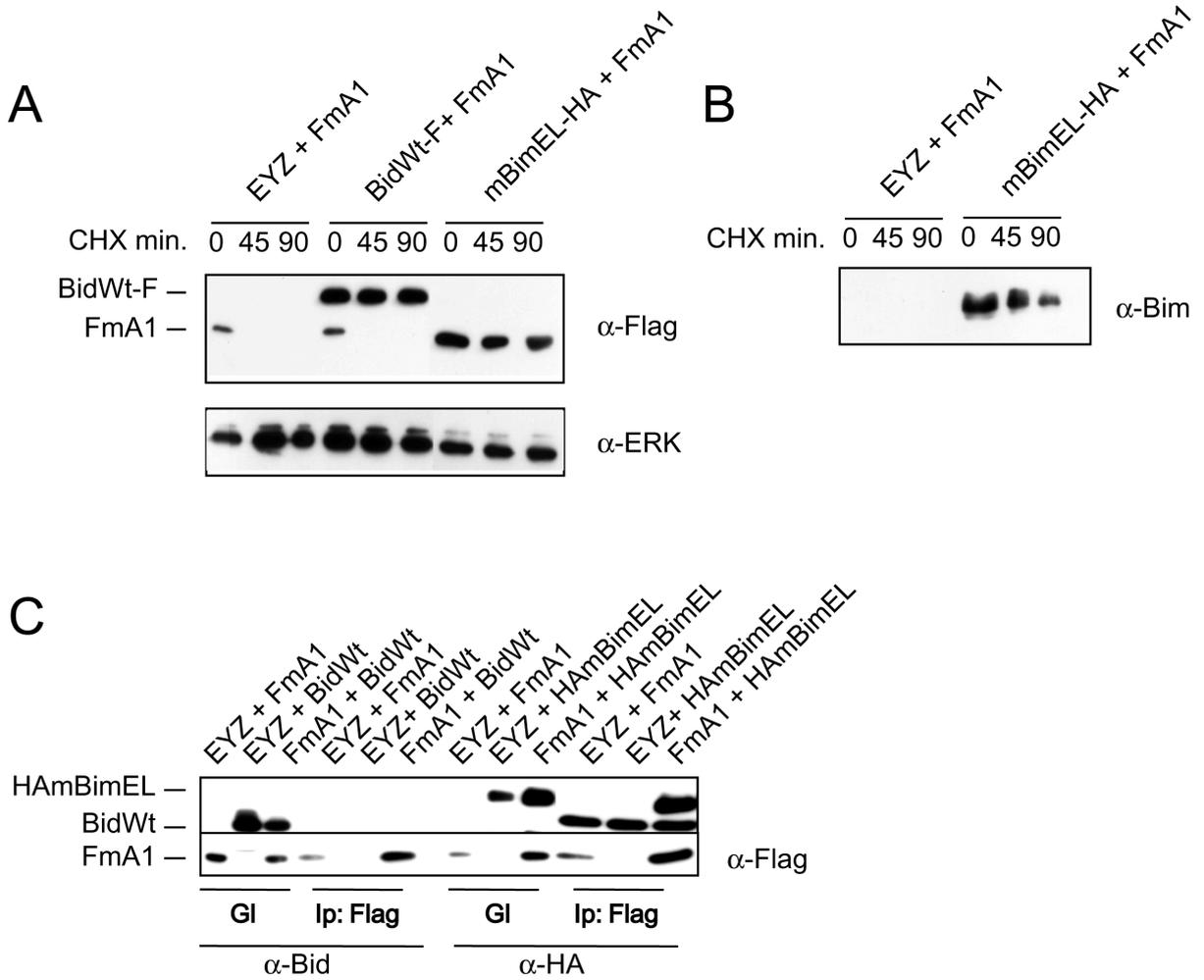


Abb.19 Bim und nicht Bid ist in der Lage die A1 Stabilität zu verlängern. (A) Eyz+FmA1, BidWt-F+FmA1 und BimEL-HA+FmA1 transduzierte WEHI 231 Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit CHX behandelt. Die Detektion erfolgte mit einem Flag oder ERK spezifischem Antikörper im Western Blot. (B) Die ersten drei Extrakte und die letzten drei Extrakte aus (A) wurden nochmals auf ein Gel aufgetragen und mit einem Bim spezifischem Antikörper detektiert. Entsprechend transfizierte HEK 293T Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion 0,2%igem NP40 Immunpräzipitationspuffer lysiert und mit einem HA, Bid und Flag spezifischen Antikörper im Western Blot detektiert. GI = Gesamtlysat, IP = Immunpräzipitation

5. Diskussion

Die Mitglieder der Bcl-2 Familie spielen bei der Apoptose eine zentrale Rolle, indem sie Einfluss auf die Integrität der Mitochondrien nehmen. Viele dieser Proteine sind dabei „direkt am Ort des Geschehens“, da sie über C-terminale hydrophobe Sequenzen unter anderem in der äußeren Mitochondrienmembran verankert sind. Obwohl A1 keinen Transmembranbereich im C-Terminus besitzt, kann es Zellen vor Apoptose schützen. Dieser Schutz erfolgt überraschenderweise in Abhängigkeit des C-Terminus, da eine C-terminale Deletionsmutante von A1 weit weniger effektiv vor Apoptose schützen kann als das wildtypische Protein (Abb.14). Eine weitere wichtige Funktion, die dem C-terminalen Ende von A1 zugeschrieben werden konnte, ist die Regulation der Proteinstabilität. So führt die Deletion des C-Terminus von A1 zu einem stabileren Protein (Abb.8). Ferner war die Übertragung des C-Terminus auch ausreichend, um die stabile enzymatisch inaktive Caspase 3 zu labilisieren (Abb.11). Alle Ergebnisse dieser Arbeit legen den Schluss nahe, dass Schutz und Destabilisierung über den C-Terminus von A1 reguliert werden.

5.1 Die C-terminale A1 Sequenz enthält destabilisierende Elemente

Obwohl A1 ein Mitglied der antiapoptotischen Bcl-2 Familie ist, enthält dessen C-Terminus keine typischen Aminosäuresequenzen zur Lokalisation an intrazelluläre Membranen, sondern Motive, die zu einer Destabilisierung des A1 führen. Dies konnte aufgrund einer Zunahme der Proteinstabilität durch Deletion der letzten 17 Aminosäuren von A1 gezeigt werden (Abb.8). Da die Instabilität von A1 nicht nur in WEHI 231 (Abb.8), sondern auch in primären B-Zellen der Maus und humanen 293T Zellen beobachtet wurde (Abb.9), scheint die schnelle Umsatzrate von A1 eine allgemeine Eigenschaft dieses Proteins zu sein. Zudem konnte für endogenes A1 die gleiche Halbwertszeit beobachtet werden (Abb.10), wodurch ein Artefakt durch die Überexpression oder der Flag-Markierung des Proteins ausgeschlossen werden konnte. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen Maus und Mensch, war es nicht überraschend, dass humanes A1 (Bfl1) ebenfalls eine kurze Halbwertszeit besitzt (Abb.9). Da A1 aber im direkten Vergleich zu Bfl1 ein instabileres Protein ist (Daten nicht gezeigt), könnte man vermuten, dass die geringfügigen Veränderungen in den

Aminosäuresequenzen zwischen A1 und Bfl1 zu einer kürzeren Halbwertszeit von A1 führen. Die unterschiedliche Proteinsequenz und damit verbundene Stabilitätsabnahme von A1 im Vergleich zu Bfl1 könnte eine Erklärung für die Entstehung der vier Genloci von A1 sein [45]. Es wäre denkbar, dass es im Laufe der Evolution zu Mutationen in der A1 Sequenz kam, wodurch die Stabilität des Proteins verringert wurde. Die kürzere Halbwertszeit würde zu einem partiellen Verlust der antiapoptotischen Funktion von A1 führen, die nur mit einer erhöhten Expressionsmenge von A1 kompensiert werden könnte. Nach dieser Theorie wäre es durch Veränderungen bestimmter Umweltbedingungen zur Selektion von Mäusen gekommen, die aufgrund der vermehrten A1 Gene erhöhte Mengen des Proteins exprimieren konnten. Jedoch ist nicht bekannt, ob diese A1 Genduplikationen ein Merkmal von Inzuchtstämmen ist, oder ob Wildmäuse diese Genduplikationen ebenfalls aufweisen.

Die Daten, welche mittels der verkürzten A1 Mutante gewonnen wurden, belegen die Notwendigkeit des kurzen C-Terminalen Proteinabschnitts für die Regulation der Stabilität von A1. Dabei ist die Funktion des C-Terminus nicht positionsabhängig - nach Anfügen der 35 Aminosäuren des A1 C-Terminus an den N-Terminus der verkürzten A1 Mutante ist auch dieses Protein sehr instabil (Daten nicht gezeigt). Selbst in nicht verwandten Proteinen fungiert dieser Teilbereich als Destabilisierungsmodul. So konnte durch Anhängen des A1 C-Terminus an enzymatisch inaktive Caspase 3 (Abb.11), GFP (J. Zeitz, Daten nicht publiziert) und Bcl-2 [106] eine Destabilisierung dieser Proteine beobachtet werden. Das instabile GFP wird in Zukunft sicherlich ein gutes Werkzeug darstellen, um nach etwaigen Stabilisierungssignalen für A1 zu suchen.

Bfl1 und A1 weisen im Vergleich zu Bcl-2 eine kurze Halbwertszeit auf. Welche Bedeutung könnte diese Instabilität haben? Möglicherweise dient dies dazu, zu hohe Proteinmengen von A1 in einer gesunden, nicht gefährdeten Zelle zu vermeiden, um einen negativen Einfluss z.B. auf die Proliferation wie bei Bcl-2 [107] zu vermeiden [74]. Bei diesem führt eine bestimmte Sequenz im N-Terminus („unstructured loop“) zur Inhibition der Proliferation [80, 83], was bei A1/ Bfl1 nicht zu beobachten ist. Gegen die Hypothese, dass stabiles A1 die Proliferation stören kann, spricht allerdings die Beobachtung, dass die Überexpression der kurzen, stabilen A1 Mutante (A1trunc) auch keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen hatte, obwohl sehr hohe Mengen dieses Proteins in den Zellen vorzufinden sind (Daten nicht gezeigt).

Ein weiterer Vorteil der Kurzlebigkeit von A1 ist eine sehr kurze Reaktionszeit auf pro- oder antiapoptotische Signale. Beispielsweise könnte die Induktion von Apoptose in A1-

abhängigen Zellen zu einer Reduktion der A1 Genexpression führen, wodurch das Protein aufgrund der kurzen Halbwertszeit binnen weniger Minuten degradiert wird und die Zelle stirbt. Umgekehrt könnte A1 durch ein bestimmtes Signal sehr schnell stabilisiert werden, so dass die entsprechende Zelle in kürzester Zeit inert gegen apoptotische Signale wäre. Das schnelle Verändern des intrazellulären Milieus könnte vor allem bei B-Zellen oder Lymphozyten im allgemeinen notwendig sein, da hier zu Beginn einer Immunantwort sehr viele spezifische Zellen benötigt werden, die das Antigen abwehren können (positive Selektion durch Stabilisierung von A1) und die zur Termination der Immunantwort wieder eliminiert werden müssen (negative Selektion durch Verlust von A1).

5.2 Lysinabhängige Ubiquitylierung ist notwendig für die Instabilität und Stabilität des Proteins

Mit Hilfe des *Proteasomeninhibitors II* konnte die Degradation von A1 verhindert werden (Abb.12). Dies deutet auf einen proteasomalen Mechanismus der Degradation hin. In den meisten Fällen erfolgt der proteasomale Abbau nach Polyubiquitylierung des Proteins [108]. Auch für A1 konnte eine Polyubiquitylierung beobachtet werden. Im Einklang mit der grösseren Stabilität der verkürzten A1 Mutante war sie hingegen kaum mehr vorhanden (Abb.13A). Da nach Mutation aller Lysine die Polyubiquitylierung verhindert wurde (Abb.13B), dürfte es sich bei der beobachteten Polyubiquitylierung um die „klassische“ Isopeptidbindung zwischen Ubiquitin und A1 handeln [98].

Überraschenderweise war zur Expression der Lysinmutante in transienten Transfektionen von 293T Zellen genauso viel DNA notwendig wie zur Expression des wildtypischen Proteins. Dies steht auf den ersten Blick im Gegensatz zu der Annahme, dass ein Ausbleiben der Ubiquitylierung zu einem stabileren Protein führt. Eine Erklärung hierfür könnte jedoch sein, dass der Austausch von elf Aminosäuren zu einer Konformationsänderung im Protein führt, wodurch eine schnelle lysin-unabhängige Degradation der A1 Mutante stattfindet. Wie wäre ein solcher Abbau ohne Lysinreste und somit ohne Ubiquitylierung denkbar? Die Möglichkeit, dass es aufgrund der fehlerhaften Konformation zu einer Degradation unabhängig von Ubiquitylierung und Proteasomen kommen kann, wurde vor kurzem für eine Mutante des Chaperons BiP gezeigt [109]. Dabei konnte die Degradation der BiP Mutante durch den Einsatz eines

Serinproteaseinhibitors, welcher die proteasomale Aktivität in der Zelle nicht beeinflusst, verhindert werden.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die fehlende Stabilität der A1-Lysinmutante wäre ein Ubiquitin-unabhängiger aber Proteasomen-abhängiger Abbauweg. Ein solcher Weg wurde beispielsweise für das Tumorsupressorprotein p53 beschrieben. Normalerweise wird p53 durch Mdm2 ubiquityliert, wodurch es im Proteasom abgebaut wird [110]. In einem zweiten Signalweg kann p53 aber auch unabhängig von Mdm2 und Ubiquitylierung im Proteasom abgebaut werden [111].

Neben der Polyubiquitylierung konnte in mA1 bzw. in mA1trunc eine Mono- oder Diubiquitylierung des Proteins beobachtet werden (Abb.13B). Diese Modifikation führt in der Regel nicht zur Degradation des Proteins, sondern zu einer Veränderung der Lokalisation, der Interaktion mit anderen Proteinen oder der Aktivität [112]. Eine fehlerhafte Lokalisation von A1 nach Mutation aller Lysine könnte für den schnellen Abbau der Lysinmutante verantwortlich sein. Sollte diese Vermutung zutreffen, würde die Modifikation durch Monoubiquitylierung eventuell die Lokalisation oder sogar die Aktivität von A1 beeinflussen.

Die Versuche machen deutlich, dass A1 sowohl einer Monoubiquitylierung als auch einer Polyubiquitylierung unterliegt und nach Polyubiquitylierung wahrscheinlich in den Proteasomen abgebaut wird. Beide Prozesse, Ubiquitylierung und Stabilisierung von A1, wurden nach Einsatz des *Proteasomeninhibitors II* beobachtet. Da die hier verwendete Konzentration des *Proteasomeninhibitors II* auch für die Untersuchungen der Stabilität für I \square B- \square verwendet wurde [113] und die Inhibition des Abbaus auch in niedrigeren Konzentrationen zu beobachten war (Daten nicht gezeigt) ist ein unspezifischer Einfluss des *Proteasomeninhibitors II* unwahrscheinlich. Durch den Einsatz eines alternativen Proteasomeninhibitors (MG115) konnte ebenfalls eine Stabilisierung des GFP-A1 beobachtet werden (J. Zeitz, nicht publiziert), was die Vermutung eines möglichen Abbaus des A1 Proteins über die Proteasomen stützt.

5.3 Der C-Terminus verstärkt das antiapoptotische Potential von A1

Die kurze, stabilere A1 Mutante (A1trunc) konnte die Zellen trotz sehr viel höherer Expression (Abb.14B) schlechter vor Etoposid-induzierter Apoptose schützen als der Wildtyp (Abb.14C). Da auch die Mutante in der Lage war, das „BH3-only“ Protein Bim zu binden (Abb.15A) erscheint eine generelle fehlerhafte Konformation des Proteins nicht gegeben. Da das humane Bfl1 durch Verkürzen des Proteins um 24 Aminosäurereste ebenfalls seine schützende Funktion verliert [114], ist es sehr wahrscheinlich, dass der C-Terminus dieser beiden antiapoptotischen Proteine nicht nur zur Destabilisierung, sondern auch zur antiapoptotischen Funktion der Proteine beiträgt. Diese könnte durch Bindung von für den Schutz benötigten Proteinen oder die Lokalisation von A1/ Bfl1 an Membranen begünstigt werden.

Bei Bcl-2 führte der Verlust der mitochondrialen Ankersequenz zu einer Abnahme der schützenden Funktion [42], weil die Lokalisation des Proteins an die Mitochondrien gestört ist. Obwohl A1 Fast gänzlich im Zytoplasma vorzufinden war (Abb.7), ist es auf Grundlage aller bisherigen Daten nicht auszuschließen, dass der geringe an Membranen lokalisierte Anteil des Proteins für die Schutzfunktion essentiell ist oder gar die Schutzfunktion ausübt. In der Tat ist die kurze A1 Mutante noch weniger an den Membranen vorzufinden als das wildtypische Protein (Daten nicht gezeigt). Die Notwendigkeit einer sehr hohen Proteinmenge der kurzen Mutante im Vergleich zum A1 Wildtyp für einen vergleichbaren Schutz könnte also dadurch bedingt sein, dass die kurze A1 Mutante weniger effektiv mit Membranen interagiert.

Alternativ ist es vorstellbar, dass durch das Abschneiden der letzten 35 Aminosäurereste eine Bindung zu bisher nicht bekannten Proteinen verloren geht. Dabei könnte es sich einerseits um Ubiquitinligasen oder Kinasen handeln, welche A1 modifizieren und somit eine potentielle Interaktion mit anderen Proteinen ermöglichen bzw. verhindern können. Andererseits wäre es denkbar, dass proapoptotische Bcl-2 Familienmitgliedern über diesen Bereich gebunden und somit neutralisiert werden. Dieses Modell wurde bereits für Bcl-w vorgeschlagen, da hier durch die Deletion der zehn Aminosäuren im C-Terminus ebenfalls die Schutzfunktion verloren geht [115]. Die Bindung eines „BH3-only“ Proteins würde im Fall von Bcl-w zu dessen Membraninsertion führen, wodurch die C-terminal gebundenen proapoptotischen Faktoren freigesetzt werden und danach Apoptose induzieren [40].

5.4 Phosphorylierung erhöht die Stabilität, reduziert aber die Schutzfunktion von A1

Der Abbau von A1 erfolgt nach Polyubiquitylierung im Proteasom in Abhängigkeit des C-Terminus. Bei genauerer Analyse der Aminosäuresequenz des C-Terminus von A1 (KSGWLT) kann man Homologien zum „destruction motif“ (DSGxxS) von Proteinen, wie I κ B- β , β -Catenin und Vpu des HIV-1 erkennen [116, 117], die ebenfalls im Proteasom abgebaut werden. Diese Proteine werden nur nach Phosphorylierung der beiden Serinreste im „destruction motif“ degradiert. Nach Mutation dieser Serinreste kann I κ B- β nicht mehr abgebaut werden [118]. Die Mutation der beiden korrespondierenden Aminosäuren des A1 zu Alaninresten veränderte allerdings die Stabilität des Proteins nicht (Daten nicht gezeigt), so dass der selbe Abbaumechanismus für A1 nicht in Frage kommt. Im Gegensatz dazu führte die Nachahmung der Phosphorylierung durch die Mutation aller Serine/ Threonine zu negativ geladenen Glutaminsäuren im C-Terminus von A1 zu einem Anstieg der Halbwertszeit (Abb.15A,B). Da Bcl-2 durch ERK Phosphorylierung stabilisiert werden kann [92], wurde versucht A1 über aktiviertes ERK zu phosphorylieren, wobei jedoch bisher keine Veränderung im A1 Protein beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Unabhängig davon ist vorstellbar, dass durch Einführung negativ geladener Aminosäurereste die C-terminale Sequenz von A1 so verändert wurde, dass beispielsweise die Bindung einer Ubiquitinligase gestört wird und somit ein stabileres Protein die Folge ist.

Obwohl A1 durch die Nachahmung der Phosphorylierung stabilisiert wurde, zeigte die Mutante keinen Schutz vor Etoposid induzierter Apoptose (Abb.15C). Da auch diese Mutante Bim noch binden konnte, kann eine Konformationsänderung beinahe ausgeschlossen werden (Abb.16A). Die Tatsache, dass diese Mutante wie die kurze A1 Version ebenfalls keinen Schutz vor Apoptose vermittelt, unterstreicht wie wichtig der C-Terminus für dieses Protein ist. Auch hier könnte reduzierte Membranlokalisation bzw. verminderte Bindung eines essentiellen Proteins eine Erklärung für den Verlust der Schutzfunktion sein.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Veränderungen im C-Terminus von A1 durch Verkürzen (A1trunc) oder Einführen negativer Ladungen (A1E-Mut.) zu einer Einschränkung bzw. zu einem völligen Verlust der antiapoptotischen Funktion führen.

5.5 Bim und A1 – ein Wechselspiel zweier Antagonisten

A1 und Bim können miteinander interagieren (Abb.16). Beide Proteine werden Proteasomenabhängig degradiert. Die Regulation ist jedoch entgegengesetzt: Bim liegt normalerweise als stabiles Protein in der Zelle vor und wird nach einem antiapoptotischem Signal an Serinresten phosphoryliert und ubiquitinabhängig im Proteasom abgebaut [93, 119]. Im Gegensatz dazu ist A1 instabil und wird erst nach einem Signal, das in dieser Arbeit durch die Überexpression von Bim nachgeahmt wurde, stabilisiert (Abb.17). Eine interessante Interpretationsmöglichkeit dieser Beobachtungen ist, dass ein schnellerer Abbau von Bim in Verbindung mit A1 dadurch ermöglicht wird, dass der C-Terminus von A1 die Plattform bildet, an der E3 Ligasen andocken, um danach Bim zu ubiquitylieren und für den Abbau zu markieren. Ein ähnlicher Mechanismus wurde für die Degradation des CD4 Rezeptors in HIV-1 infizierten T-Zellen bereits beschrieben. Hierbei bindet das virale Protein Vpu intrazellulär an den CD4 Rezeptor und wird in seinem „destruction motif“ phosphoryliert, wodurch E3 Ligasen binden und den Vpu:CD4 Komplex ubiquitylieren. Dieser Ubiquitylierung folgt der Abbau des Vpu:CD4 Komplexes im Proteasom [117, 120].

Die gleichzeitige Expression von A1 und Bcl-2 hatte keinen Einfluss auf die A1 Stabilität (Abb.17A). Außerdem führte die Expression der enzymatisch inaktiven Caspase 3 A1 in Bim/ A1 Zellen zu keiner sichtbaren Veränderung der enzymatisch inaktiven Caspase 3 A1 Stabilität (Abb.17B). Da sowohl A1 als auch Bcl-2 eine hydrophobe Grube ausbilden und enzymatisch inaktive Caspase 3 A1 keine hydrophobe Grube zur Bindung von Bim aufweist, kann vermutlich weder Bcl-2 mit A1 noch enzymatisch inaktive Caspase 3 A1 mit Bim interagieren. Aufgrund dieser Annahme kann man schliessen, dass die Stabilisierung von A1 durch Bim nur über eine direkte Interaktion vermittelt werden kann. Zudem kann durch die gleichbleibende Halbwertszeit der enzymatisch inaktiven Caspase 3 A1 in A1/ Bim Zellen ausgeschlossen werden, dass die Zunahme der A1 Stabilität durch Bim aufgrund grosser Proteinaggregate, wie häufiger in der Literatur beschrieben [121], zu einer „Überlastung“ der Proteasomen führt.

Wodurch könnte es in Anwesenheit von Bim zu einer Verlangsamung des proteasomalen Abbaus kommen? Einen Hinweis lieferte die Beobachtung, dass die Ubiquitylierung von A1 bei gleichzeitiger Bim Expression stark reduziert ist (Abb.18). Da beide Moleküle aneinander binden, könnten die für den Abbau von A1 notwendigen

Ubiquitylierungsstellen verdeckt sein. Alternativ könnte nach Interaktion mit Bim eine E3-Ubiquitinligasebindung verhindert bzw. erschwert werden.

Nicht nur die Stabilität des A1 Proteins wird durch eine vermehrte Bim Expression in der Zelle verändert, sondern auch dessen Lokalisation (Abb.16B). Es stellt sich die Frage, wie diese Umverteilung vonstatten geht. Für Bcl-w konnte nach Überexpression von Bim ebenfalls eine vermehrte Rekrutierung an die Membranen beobachtet werden [41], da erst durch Konformationsänderungen des Proteins der hydrophobe C-Terminus exponiert wurde und dadurch eine Lokalisation an Membranen ermöglicht wird. Da A1 aber keine typische C-terminale Transmembrandomäne besitzt und zudem die C-terminal verkürzte Mutante ebenfalls durch Bim an die Mitochondrien rekrutiert wird erscheint diese Erklärung eher unwahrscheinlich. Kürzlich konnte bei Bcl-2 aber gezeigt werden, dass die Zugabe der BH3-Domäne von Bim zu einer Konformationsänderung im N-terminalen Bereich führt, wodurch Bcl-2 über diesen Bereich in die Membranen des Endoplasmatischen Retikulum oder der Mitochondrien inserieren kann [122]. Diese Beobachtung könnte auch für die Rekrutierung von A1 zutreffen, da A1 mit Bim interagiert (Abb.16A) und sowohl mit als auch ohne den C-Terminus (mA1trunc) in Anwesenheit von Bim an die Membranen lokalisiert (Abb.16B).

Eine weitere Möglichkeit für die Umverteilung von A1 könnte die Rekrutierung von A1 über Bim an die Membranen sein, da Bim eine sehr starke Transmembrandomäne besitzt und A1 somit über eine direkte Interaktion einfach an die Membranen rekrutieren könnte. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits für Bfl1 gemacht, welches nach einem apoptotischen Signal und tBid Generierung ebenfalls stärker an Mitochondrien vorzufinden ist[47].

5.6 A1 kann nur über direkte Interaktion mit Bim stabilisiert werden

Obwohl Bid ebenso wie Bim ein „BH3-only“ Protein ist, hat es im Gegensatz zu Bim keinen Einfluss auf die Stabilität von A1 (Abb.19A). Die einfachste Erklärung für diesen Befund ist, dass A1 unter den gewählten Versuchsbedingungen zwar mit Bim, nicht aber mit Bid interagieren kann (Abb.19B). Der fehlenden Bindung von Bid an A1 stehen Ergebnisse von Werner et al. gegenüber, die zeigen, dass Bfl1 mit Bid interagieren kann

[47]. Ein Grund für diesen Unterschied könnte möglicherweise im Einsatz verschiedener Lysepuffer liegen.

Ein weiterer Grund für die fehlende A1 Bindung mit Bid könnten Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen dem murinen Bid im Vergleich zum humanen Bid sein. Insbesondere Unterschiede in den BH3-Domänen sind kritisch für die Interaktion zwischen pro- und antiapoptotischen Molekülen. Beispielsweise bindet Bad nur an A1, nachdem die Aminosäuresequenz in der BH3-Domäne von Bad an die Aminosäuresequenz der BH3-Domäne von Bim angeglichen wurde [123]. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass unterschiedliche Aminosäuresequenzen in entscheidenden Bindungsdomänen zwischen dem murinen A1 und dem humanen Bfl1 bzw. dem murinen Bid und dem humanen Bid Auswirkungen auf die Interaktion haben können.

Unabhängig davon, ob die verschiedenen Lysepuffer und/ oder die unterschiedlichen Aminosäuresequenzen zwischen den Spezies für die Beobachtung der fehlenden Bindung von A1 und Bid verantwortlich sind, deuten die Versuche mit Bim und Bid darauf hin, dass nur eine starke Interaktion zwischen A1 und seinem stabilisierenden Protein zu einer längeren Halbwertszeit von A1 führt.

5.7 Wie schützt das antiapoptotische Bcl-2 Familienmitglied A1 die Zelle vor Apoptose?

Eine interessante Frage ist, wie der antiapoptotische Effekt von A1 vermittelt wird. Die Vermutung liegt nahe, dass Schutz vor Apoptose und Stabilität des A1 Moleküls in Zusammenhang stehen, da beide Eigenschaften vom C-Terminus des A1 abhängen. Es wäre vorstellbar, dass die Bindung von A1 an proapoptotische Antagonisten wie Bim zu einer Degradation dieses Komplexes führt, wodurch die Zelle vor Bim induzierter Bax/ Bak Aktivierung geschützt wäre.

In der Tat konnte gezeigt werden, dass die Destabilisierung proapoptotischer Moleküle eine Möglichkeit zum Schutz vor Apoptose darstellt. So führt die Infektion von humanen Zellen mit Chlamydien zu einer proteasomalen Degradation von „BH3-only“ Molekülen wie Bim, Puma und Bad, wodurch die infizierte Zelle vor Apoptose geschützt ist [124]. Da die Infektion von Zellen mit Chlamydien zu einer Aktivierung von NF- κ B führt [125] und Bfl1 wie auch A1 unter der Kontrolle dieses Transkriptionsfaktors stehen [126], könnte die Degradation der proapoptotischen Proteine durch A1/ Bfl1 vermittelt sein. Im Einklang mit

dieser Vermutung steht die Beobachtung, dass die Stabilität von Bim in A1-transduzierten Zellen gering ist, obwohl Bim als stabiles Protein beschrieben wurde [93] (Abb.19B). Bei den Versuchen blieb jedoch offen, ob die beobachtete kurze Halbwertszeit von Bim durch A1 verursacht wurde oder ein generelles Phänomen in den WEHI 231 Zellen ist. Ein erster Hinweis der gegen diese Annahme spricht ist die Tatsache, dass die vermehrte Expression von Bim in der Kontrollpopulation der WEHI 231 Zellen zum Tod dieser Zellen führte (Daten nicht gezeigt). Bei einer sehr kurzen Halbwertszeit von Bim in den WEHI 231 Zellen würde man erwarten das die Zellen eine gewisse Menge des Bim Proteins tolerieren könnten und somit überlebensfähig wären.

Eine physische Interaktion von Bim und A1 konnte nachgewiesen werden, die zudem recht spezifisch zu sein scheint. Da Bim auch ein entscheidender Faktor für die Kontrolle des Überlebens von B-Zellen ist, könnte man vermuten, dass auch hier die antiapoptotische Funktion von A1 eine Rolle spielt. Beispielsweise führt der Verlust von Bim zu einem Anstieg von autoreaktiven B-Zellen in der Peripherie [25] und nach einem Modell von Cyster et al. werden autoreaktive B-Zellen durch ein Ausbleiben von Überlebenssignalen über BAFF und erhöhter Bim Expression aus dem peripheren B-Zellpool eliminiert [127]. Da A1 durch BAFF Signale induziert werden kann [67, 68], könnte die erhöhte Bim Proteinmenge durch die fehlende A1 Expression erklärt werden. Diese Vermutung würde wiederum mit dem vorher beschriebenen Modell übereinstimmen, bei dem die Interaktion von A1 und Bim eine Degradation des proapoptotischen Antagonisten zur Folge hätte.

Da Bim auch in B-Zellen des Keimzentrums erhöht vorliegt und ein potentieller Antagonist wie Bcl-2 in diesen Zellen kaum vorzufinden ist [128], stellt sich die Frage, wie diese Zellen vor der Apoptose geschützt werden können. Signale über CD40 fördern das Überleben der B-Zellen im Keimzentrum [129], möglicherweise durch die NF- κ B abhängige Expression von A1 und die daraus resultierende Degradation von Bim aufgrund der schnellen Umsatzrate des A1:Bim Komplexes. Die Kurzlebigkeit des A1 Proteins wäre zudem für die Selektion hochaffiner und die Eliminierung autoreaktiver B-Zellen im Keimzentrum von Vorteil. Zellen ohne CD40 Signal würden sehr schnell das A1 Protein verlieren und könnten somit rasch aus dem Pool der Keimzentrums B-Zellen eliminiert werden. Dadurch würde vermieden, dass B-Zellen, die autoreaktive Immunglobuline auf ihrer Oberfläche tragen weiter ausreifen können, da aufgrund des A1 Verlustes diese Zellen apoptotisch werden würden.

Zusammenfassend könnte man sich folgendes Szenario vorstellen: Der C-Terminus von A1 führt zu einer Destabilisierung des A1 Proteins. Diese Eigenschaft könnte durch

Bindung von Bim auf dieses übertragen werden. Da die Übertragung der Instabilität auf Bim die Zelle vor der Apoptose schützen kann, kann der C-Terminus von A1 aufgrund der destabilisierenden Elemente als das entscheidende Modul für die Schutzfunktion betrachtet werden.

6. Zusammenfassung

Die Stimulation von Lymphozyten durch alleinige Quervernetzung ihrer Antigenrezeptoren führt in Abhängigkeit von der Signalstärke zur Induktion von Apoptose. Dieser Prozess spielt im Rahmen der negativen Selektion von B-Zellen eine wichtige Rolle und kann am Beispiel von WEHI 231 Zellen, einer murinen Lymphomzelllinie modellhaft nachempfunden werden. Die Quervernetzung des B-Zellrezeptors (BZR) in WEHI 231 Zellen führt in Abhängigkeit von der Prozessierung der mitochondrialen Caspase 9 zu Apoptose. Dies kann durch Überexpression des antiapoptotischen Bcl-2 Familienmitglieds A1 verhindert werden. Interessanterweise besitzt A1 im Gegensatz zu fast allen anderen Bcl-2 Proteinen keinen C-terminalen Bereich, der das Protein in intrazelluläre Membranen wie Mitochondrien und Endoplasmatisches Retikulum verankert. Ob und gegebenenfalls welche Bedeutung das C-terminale Ende für das Protein und dessen Funktion hat wurde in dieser Arbeit untersucht. Eine C-terminale Deletionsmutante wies im Vergleich zum Wildtyp eine höhere Proteininstabilität auf. Die Fusion der letzten 35 Aminosäuren von A1 an eine enzymatisch inaktive Form von Caspase 3 führte zu einem sehr instabilen chimären Protein. Somit scheint der C-Terminus von A1 sowohl notwendig als auch hinreichend für die kurze Halbwertszeit des Proteins zu sein.

Die meisten kurzlebigen Proteine werden über den proteasomalen Signalweg degradiert. Dies scheint auch für A1 zu gelten, da seine Halbwertszeit durch den Einsatz eines Proteasomeninhibitors verlängert wurde. In Koexpressionsstudien konnte zudem eine Ubiquitylierung von A1 beobachtet werden, welche bei der stabileren A1 Mutante stark reduziert war. A1 ist jedoch nicht immer instabil. In Anwesenheit des „BH3-only“ Proteins Bim, das A1 direkt binden kann, wird die Halbwertszeit von A1 enorm erhöht. Die antiapoptotische Funktion von A1 scheint sich jedoch nicht nur auf die Neutralisation durch bloße Bindung zu beschränken, da die Deletionsmutante trotz vergleichbarer Interaktion mit Bim einen sehr viel geringeren Schutz gegen Etoposid vermittelter Apoptose verliert.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass das antiapoptotische Bcl-2 Familienmitglied A1 eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt und dass der C-Terminus nicht nur die Stabilität sondern auch die antiapoptotische Schutzfunktion für das Protein vermittelt.

7. Summary

The strong stimulation of lymphocytes through their antigen receptors leads to the induction of apoptosis unless a costimulatory signal is provided. This process plays an important role in the negative selection of B-lymphocytes and can be mimicked in the immature murine lymphoma cell line WEHI 231. Engagement of the B-cell receptor (BCR) on WEHI 231 cells leads to apoptosis via a pathway that requires the processing of mitochondria-dependent caspase 9. This can be prevented by overexpression of the antiapoptotic Bcl-2 family member A1. In contrast to most Bcl-2 proteins, A1 does not contain a C-terminal region which recruits it to intracellular membranes of the mitochondria or endoplasmic reticulum. The aim of this thesis was to investigate the function of the A1 C-terminus. Deleting the C-terminus increased the stability of A1 whereas fusing the last 35 amino acids of A1 onto an enzymatically-inactive caspase 3 mutant leads to a highly unstable chimeric protein. It therefore appears that the C-terminus is responsible for A1's short half-life.

Most short-lived proteins are degraded via the proteasomal pathway. It is likely A1 is also degraded via the proteasomal pathway, since its half-life was increased in the presence of a proteasomal inhibitor. Furthermore, coexpression studies showed a strong ubiquitylation of A1, which was greatly reduced in the stable truncated variant of A1. However, A1 is not always unstable. In the presence of the "BH3-only" protein Bim, a direct interaction partner of A1, the half-life of A1 was strongly increased. The antiapoptotic function of A1 can not just be mediated by the binding and neutralising of proapoptotic partners such as Bim because the C-terminal deletion mutant, which can also interact with Bim, fails to protect cells from etoposide-induced apoptosis.

Taken together these results show that the Bcl-2 family member A1 has a very short half life and that the C-terminus is not only responsible for its rapid turnover but also for the antiapoptotic function of the protein.

8. Literaturverzeichnis

1. Janeway C.A., W.M., Travers P., *Immunobiology: The Immunsystem in Health and Disease*. 5th ed. 2001: Garland Publishing.
2. Healy, J.I. and C.C. Goodnow, *Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 645-70.
3. Krammer, P.H., et al., *Regulation of apoptosis in the immune system*. Curr Opin Immunol, 1994. **6**(2): p. 279-89.
4. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
5. Platt, N., R.P. da Silva, and S. Gordon, *Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells*. Trends Cell Biol, 1998. **8**(9): p. 365-72.
6. Kidd, V.J., J.M. Lahti, and T. Teitz, *Proteolytic regulation of apoptosis*. Semin Cell Dev Biol, 2000. **11**(3): p. 191-201.
7. Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik, *Caspases: enemies within*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1312-6.
8. Scaffidi, C., et al., *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways*. Embo J, 1998. **17**(6): p. 1675-87.
9. Krammer, P.H., *CD95's deadly mission in the immune system*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 789-95.
10. Muzio, M., et al., *FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex*. Cell, 1996. **85**(6): p. 817-27.
11. Green, D.R. and J.C. Reed, *Mitochondria and apoptosis*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1309-12.
12. Gross, A., *BCL-2 proteins: regulators of the mitochondrial apoptotic program*. IUBMB Life, 2001. **52**(3-5): p. 231-6.
13. Slee, E.A., et al., *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, 1999. **144**(2): p. 281-92.
14. Newton, K. and A. Strasser, *Ionizing radiation and chemotherapeutic drugs induce apoptosis in lymphocytes in the absence of Fas or FADD/MORT1 signaling. Implications for cancer therapy*. J Exp Med, 2000. **191**(1): p. 195-200.
15. Skulachev, V.P., *Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades*. FEBS Lett, 1998. **423**(3): p. 275-80.
16. Bossy-Wetzal, E., D.D. Newmeyer, and D.R. Green, *Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization*. Embo J, 1998. **17**(1): p. 37-49.
17. Opferman, J.T. and S.J. Korsmeyer, *Apoptosis in the development and maintenance of the immune system*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 410-5.
18. Wei, M.C., et al., *Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death*. Science, 2001. **292**(5517): p. 727-30.
19. Green, D.R. and G. Kroemer, *The pathophysiology of mitochondrial cell death*. Science, 2004. **305**(5684): p. 626-9.
20. Vieira, H.L., et al., *Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator*. Cell Death Differ, 2000. **7**(12): p. 1146-54.

21. Tsujimoto, Y. and S. Shimizu, *VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins*. Cell Death Differ, 2000. **7**(12): p. 1174-81.
22. Crompton, M., *The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death*. Biochem J, 1999. **341** (Pt 2): p. 233-49.
23. Strasser, A., *The role of BH3-only proteins in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(3): p. 189-200.
24. Puthalakath, H., et al., *The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex*. Mol Cell, 1999. **3**(3): p. 287-96.
25. Enders, A., et al., *Loss of the pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim inhibits BCR stimulation-induced apoptosis and deletion of autoreactive B cells*. J Exp Med, 2003. **198**(7): p. 1119-26.
26. Lei, K. and R.J. Davis, *JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2432-7.
27. Luo, X., et al., *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. Cell, 1998. **94**(4): p. 481-90.
28. Li, H., et al., *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. Cell, 1998. **94**(4): p. 491-501.
29. Wei, M.C., et al., *tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c*. Genes Dev, 2000. **14**(16): p. 2060-71.
30. Zhai, D., et al., *Characterization of tBid-induced cytochrome c release from mitochondria and liposomes*. FEBS Lett, 2000. **472**(2-3): p. 293-6.
31. Pegoraro, L., et al., *A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(22): p. 7166-70.
32. Tsujimoto, Y., et al., *Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation*. Science, 1984. **226**(4678): p. 1097-9.
33. Hockenbery, D.M., et al., *Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis*. Cell, 1993. **75**(2): p. 241-51.
34. Kamesaki, S., et al., *bcl-2 protein inhibits etoposide-induced apoptosis through its effects on events subsequent to topoisomerase II-induced DNA strand breaks and their repair*. Cancer Res, 1993. **53**(18): p. 4251-6.
35. Baffy, G., et al., *Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production*. J Biol Chem, 1993. **268**(9): p. 6511-9.
36. Cheng, E.H., et al., *BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis*. Mol Cell, 2001. **8**(3): p. 705-11.
37. Yin, X.M., Z.N. Oltvai, and S.J. Korsmeyer, *BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax*. Nature, 1994. **369**(6478): p. 321-3.
38. Zha, H., et al., *Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2*. J Biol Chem, 1996. **271**(13): p. 7440-4.
39. Kaufmann, T., et al., *Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane*. J Cell Biol, 2003. **160**(1): p. 53-64.
40. Kaufmann, T., A. Schinzel, and C. Borner, *Bcl-w(edding) with mitochondria*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(1): p. 8-12.

41. Wilson-Annan, J., et al., *Proapoptotic BH3-only proteins trigger membrane integration of prosurvival Bcl-w and neutralize its activity*. J Cell Biol, 2003. **162**(5): p. 877-87.
42. Nguyen, M., et al., *Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-defective adenovirus*. J Biol Chem, 1994. **269**(24): p. 16521-4.
43. Lin, E.Y., et al., *Characterization of AI, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2*. J Immunol, 1993. **151**(4): p. 1979-88.
44. Choi, S.S., et al., *A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow*. Oncogene, 1995. **11**(9): p. 1693-8.
45. Hatakeyama, S., et al., *Multiple gene duplication and expression of mouse bcl-2-related genes, AI*. Int Immunol, 1998. **10**(5): p. 631-7.
46. Hamasaki, A., et al., *Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking AI-a, a subtype of the bcl-2-related AI gene*. J Exp Med, 1998. **188**(11): p. 1985-92.
47. Werner, A.B., et al., *Bcl-2 family member Bfl-1/AI sequesters truncated bid to inhibit its collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax*. J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 22781-8.
48. Yang, E., et al., *Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death*. Cell, 1995. **80**(2): p. 285-91.
49. Bae, J., et al., *Underphosphorylated BAD interacts with diverse antiapoptotic Bcl-2 family proteins to regulate apoptosis*. Apoptosis, 2001. **6**(5): p. 319-30.
50. Somogyi, R.D., et al., *Transient expression of the Bcl-2 family member, AI-a, results in nuclear localization and resistance to staurosporine-induced apoptosis*. Cell Death Differ, 2001. **8**(8): p. 785-93.
51. Duriez, P.J., et al., *AI functions at the mitochondria to delay endothelial apoptosis in response to tumor necrosis factor*. J Biol Chem, 2000. **275**(24): p. 18099-107.
52. Thompson, C.B., *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1456-62.
53. Rathmell, J.C., et al., *Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis*. Nat Immunol, 2002. **3**(10): p. 932-9.
54. Lindsten, T., et al., *The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues*. Mol Cell, 2000. **6**(6): p. 1389-99.
55. Zinkel, S.S., et al., *Proapoptotic BID is required for myeloid homeostasis and tumor suppression*. Genes Dev, 2003. **17**(2): p. 229-39.
56. Bouillet, P., et al., *BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes*. Nature, 2002. **415**(6874): p. 922-6.
57. Veis, D.J., et al., *Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair*. Cell, 1993. **75**(2): p. 229-40.
58. Motoyama, N., et al., *Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1506-10.
59. Sentman, C.L., et al., *bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes*. Cell, 1991. **67**(5): p. 879-88.
60. Strasser, A., et al., *Positive and negative selection of T cells in T-cell receptor transgenic mice expressing a bcl-2 transgene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(4): p. 1376-80.
61. Kuss, A.W., et al., *AI expression is stimulated by CD40 in B cells and rescues WEHI 231 cells from anti-IgM-induced cell death*. Eur J Immunol, 1999. **29**(10): p. 3077-88.

62. Craxton, A., et al., *The CD40-inducible Bcl-2 family member A1 protects B cells from antigen receptor-mediated apoptosis*. Cell Immunol, 2000. **200**(1): p. 56-62.
63. Herold, M.J., et al., *Mitochondria-dependent caspase-9 activation is necessary for antigen receptor-mediated effector caspase activation and apoptosis in WEHI 231 lymphoma cells*. J Immunol, 2002. **168**(8): p. 3902-9.
64. Tomayko, M.M. and M.P. Cancro, *Long-lived B cells are distinguished by elevated expression of A1*. J Immunol, 1998. **160**(1): p. 107-11.
65. Thompson, J.S., et al., *BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF*. Science, 2001. **293**(5537): p. 2108-11.
66. Schiemann, B., et al., *An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway*. Science, 2001. **293**(5537): p. 2111-4.
67. Hsu, B.L., et al., *Cutting edge: BLyS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators*. J Immunol, 2002. **168**(12): p. 5993-6.
68. Hatada, E.N., et al., *NF-kappa B1 p50 is required for BLyS attenuation of apoptosis but dispensable for processing of NF-kappa B2 p100 to p52 in quiescent mature B cells*. J Immunol, 2003. **171**(2): p. 761-8.
69. Turner, C.A., Jr., D.H. Mack, and M.M. Davis, *Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells*. Cell, 1994. **77**(2): p. 297-306.
70. Johnson, K., et al., *Regulatory events in early and late B-cell differentiation*. Mol Immunol, 2005. **42**(7): p. 749-61.
71. Knodel, M., et al., *Reversal of Blimp-1-mediated apoptosis by A1, a member of the Bcl-2 family*. Eur J Immunol, 1999. **29**(9): p. 2988-98.
72. Tarte, K., et al., *The Bcl-2 family member Bfl-1/A1 is strongly repressed in normal and malignant plasma cells but is a potent anti-apoptotic factor for myeloma cells*. Br J Haematol, 2004. **125**(3): p. 373-82.
73. Chuang, P.I., et al., *Perturbation of B-cell development in mice overexpressing the Bcl-2 homolog A1*. Blood, 2002. **99**(9): p. 3350-9.
74. Gonzalez, J., A. Orlofsky, and M.B. Prystowsky, *A1 is a growth-permissive antiapoptotic factor mediating postactivation survival in T cells*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2679-85.
75. Boise, L.H., et al., *bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death*. Cell, 1993. **74**(4): p. 597-608.
76. Bingle, C.D., et al., *Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 22136-46.
77. Ko, J.K., et al., *Bfl-1S, a novel alternative splice variant of Bfl-1, localizes in the nucleus via its C-terminus and prevents cell death*. Oncogene, 2003. **22**(16): p. 2457-65.
78. O'Connor, L., et al., *Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis*. Embo J, 1998. **17**(2): p. 384-95.
79. May, W.S., et al., *Interleukin-3 and bryostatin-1 mediate hyperphosphorylation of BCL2 alpha in association with suppression of apoptosis*. J Biol Chem, 1994. **269**(43): p. 26865-70.
80. Chang, B.S., et al., *Identification of a novel regulatory domain in Bcl-X(L) and Bcl-2*. Embo J, 1997. **16**(5): p. 968-77.
81. Yamamoto, K., H. Ichijo, and S.J. Korsmeyer, *BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(12): p. 8469-78.
82. Bassik, M.C., et al., *Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca(2+) homeostasis and apoptosis*. Embo J, 2004. **23**(5): p. 1207-16.

83. Deng, X., F. Gao, and W.S. May, Jr., *Bcl2 retards G1/S cell cycle transition by regulating intracellular ROS*. Blood, 2003. **102**(9): p. 3179-85.
84. Deng, X., et al., *Mono- and multisite phosphorylation enhances Bcl2's antiapoptotic function and inhibition of cell cycle entry functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(1): p. 153-8.
85. Dimmeler, S., et al., *Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway*. J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1815-22.
86. Deverman, B.E., et al., *Bcl-xL deamidation is a critical switch in the regulation of the response to DNA damage*. Cell, 2002. **111**(1): p. 51-62.
87. Chen, D. and Q. Zhou, *Caspase cleavage of BimEL triggers a positive feedback amplification of apoptotic signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(5): p. 1235-40.
88. Herrant, M., et al., *Cleavage of Mcl-1 by caspases impaired its ability to counteract Bim-induced apoptosis*. Oncogene, 2004. **23**(47): p. 7863-73.
89. Schwartz, L.M., et al., *Activation of polyubiquitin gene expression during developmentally programmed cell death*. Neuron, 1990. **5**(4): p. 411-9.
90. Orłowski, R.Z., *The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis*. Cell Death Differ, 1999. **6**(4): p. 303-13.
91. Wojcik, C., *Proteasomes in apoptosis: villains or guardians?* Cell Mol Life Sci, 1999. **56**(11-12): p. 908-17.
92. Breitschopf, K., et al., *Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(5): p. 1886-96.
93. Luciano, F., et al., *Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function*. Oncogene, 2003. **22**(43): p. 6785-93.
94. Domina, A.M., et al., *MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol*. Oncogene, 2004. **23**(31): p. 5301-15.
95. Weissman, A.M., *Themes and variations on ubiquitylation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(3): p. 169-78.
96. Pickart, C.M., *Mechanisms underlying ubiquitination*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 503-33.
97. Jentsch, S. and S. Schlenker, *Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome*. Cell, 1995. **82**(6): p. 881-4.
98. Jesenberger, V. and S. Jentsch, *Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(2): p. 112-21.
99. Soneoka, Y., et al., *A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(4): p. 628-33.
100. Defranco, A.L., et al., *Frequency of B lymphocytes responsive to anti-immunoglobulin*. J Exp Med, 1982. **155**(5): p. 1523-36.
101. Hande, K.R., *Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor*. Eur J Cancer, 1998. **34**(10): p. 1514-21.
102. van Engeland, M., et al., *Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure*. Cytometry, 1998. **31**(1): p. 1-9.
103. Chen, L., et al., *Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function*. Mol Cell, 2005. **17**(3): p. 393-403.

104. Strasser, A., et al., *The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **917**: p. 541-8.
105. Strasser, A. and M. Pellegrini, *T-lymphocyte death during shutdown of an immune response*. Trends Immunol, 2004. **25**(11): p. 610-5.
106. Pelzer, C., *Molekulare Analyse der Instabilität des Bcl-2 Familienmitglieds A1*. Diplomarbeit, 2004, Institut für Virologie und Immunbiologie Universität Würzburg.
107. Borner, C., *Diminished cell proliferation associated with the death-protective activity of Bcl-2*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 12695-8.
108. Driscoll, J. and A.L. Goldberg, *The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the 1500-kDa proteolytic complex which degrades ubiquitin-conjugated proteins*. J Biol Chem, 1990. **265**(9): p. 4789-92.
109. Donoso, G., V. Herzog, and A. Schmitz, *Misfolded BiP is degraded by a proteasome-independent endoplasmic-reticulum-associated degradation pathway*. Biochem J, 2005. **387**(Pt 3): p. 897-903.
110. Honda, R., H. Tanaka, and H. Yasuda, *Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53*. FEBS Lett, 1997. **420**(1): p. 25-7.
111. Asher, G., et al., *Mdm-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 13125-30.
112. Hicke, L., *Protein regulation by monoubiquitin*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(3): p. 195-201.
113. Schauer, S.L., R.E. Bellas, and G.E. Sonenshein, *Dominant signals leading to inhibitor kappaB protein degradation mediate CD40 ligand rescue of WEHI 231 immature B cells from receptor-mediated apoptosis*. J Immunol, 1998. **160**(9): p. 4398-405.
114. D'Sa-Eipper, C. and G. Chinnadurai, *Functional dissection of Bfl-1, a Bcl-2 homolog: anti-apoptosis, oncogene-cooperation and cell proliferation activities*. Oncogene, 1998. **16**(24): p. 3105-14.
115. Hinds, M.G., et al., *The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity*. Embo J, 2003. **22**(7): p. 1497-507.
116. Winston, J.T., et al., *The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro*. Genes Dev, 1999. **13**(3): p. 270-83.
117. Margottin, F., et al., *A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif*. Mol Cell, 1998. **1**(4): p. 565-74.
118. Traenckner, E.B., et al., *Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli*. Embo J, 1995. **14**(12): p. 2876-83.
119. Akiyama, T., et al., *Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim*. Embo J, 2003. **22**(24): p. 6653-64.
120. Schubert, U., et al., *CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway*. J Virol, 1998. **72**(3): p. 2280-8.
121. Bence, N.F., R.M. Sampat, and R.R. Kopito, *Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation*. Science, 2001. **292**(5521): p. 1552-5.
122. Kim, P.K., et al., *During apoptosis bcl-2 changes membrane topology at both the endoplasmic reticulum and mitochondria*. Mol Cell, 2004. **14**(4): p. 523-9.

123. Day, C.L., et al., *Solution structure of prosurvival Mcl-1 and characterization of its binding by proapoptotic BH3-only ligands*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 4738-44.
124. Fischer, S.F., et al., *Chlamydia inhibit host cell apoptosis by degradation of proapoptotic BH3-only proteins*. J Exp Med, 2004. **200**(7): p. 905-16.
125. Krull, M., et al., *Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with Chlamydia pneumoniae*. J Immunol, 1999. **162**(8): p. 4834-41.
126. Zong, W.X., et al., *The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis*. Genes Dev, 1999. **13**(4): p. 382-7.
127. Lesley, R., et al., *Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF*. Immunity, 2004. **20**(4): p. 441-53.
128. Yokoyama, T., et al., *The expression of Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak and Bim) in human lymphocytes*. Immunol Lett, 2002. **81**(2): p. 107-13.
129. Martinez-Valdez, H., et al., *Human germinal center B cells express the apoptosis-inducing genes Fas, c-myc, P53, and Bax but not the survival gene bcl-2*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 971-7.

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

□□ bzw. □□F(ab') ₂	F(ab') ₂ -Fragment eines Ziege-anti-Maus IgM Antikörpers
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSS	balancierte Salzlösung
BZR	B-Zellrezeptor
CHX	Cycloheximid
CMV	Cytomegalivirus
Cy	Cychrom
Cyto	Zytoplasmafraktion
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DISC	death inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP's	Desoxyribonucleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGZ	enhanced green fluorescent/ zeozin protein
EGN	enhanced green fluorescent/ neomycin protein
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ERK	Extrazellulär aktivierte Kinase
EtOH	Ethanol
EYZ	enhanced yellow fluorescent/ zeozin protein
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer
FCS	fötales Kälberserum
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Haemagglutinin
HEK	humanes embryonales Nierenzellkarzinom

Anhang

Ig	Immunglobulin
IRES	internal ribosomal entry site
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	Long terminal repeat
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MCS	Multiple Cloning Site
Mem	Membranfraktion
min	Minute(n)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered sialine
PE	Phycoerythrin
PKB	Proteinkinase B
PKA	Proteinkinase A
PS	Phosphatitylserin
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin

9.2 Eigene Publikation

Herold, M.J., et al., *Mitochondria-dependent caspase-9 activation is necessary for antigen receptor-mediated effector caspase activation and apoptosis in WEHI 231 lymphoma cells.* J Immunol, 2002. **168**(8): p. 3902-9.

9.3 Lebenslauf

Name	Marco Herold
Geburtstag	07.07.1976
Geburtsort	Werneck, Deutschland
Anschrift	Schiestlstrasse 48, 97080 Würzburg
Familienstand	ledig
Eltern	Franz Herold und Gertrude Herold, geb. Ludwar
Schulbildung	1982 – 1986 Grundschule Oberschwarzach/ Schallfeld 1986 – 1987 Teilhauptschule I Oberschwarzach 1987 – 1993 Gymnasium Gerolzhofen 1993 – 1996 Gymnasium Wiesentheid
Studium	1996 – 2001 Studium der Diplombiologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Schwerpunkte: Genetik, Zell – und Entwicklungsbiologie und Virologie und Immunbiologie) 2000 – 2001 Diplomarbeit am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg unter der Leitung von Professor Dr. Schimpl/ Dr. Ingolf Berberich mit dem Titel „ Die Rolle der Caspasen in der Antigenrezeptor-vermittelten Apoptose der WEHI 231-Zellen“ ab 2001 Promotion unter der Betreuung von PD Dr. Ingolf Berberich am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg mit dem Schwerpunkt „ Regulation der Apoptose in B-Lymphozyten“