

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. rer. nat. Thomas Hünig

**Analyse der Funktion und Lokalisation des
anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitglieds A1**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jonas Zeitz

aus Berlin

Würzburg, April 2009

Referent: Priv.-Doz. Dr. Ingolf Berberich

Korreferent: Prof. Dr. Michael Scheurlen

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 2009

Der Promovend ist Arzt

Für meinen Vater

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 DIE REZEPTOR-VERMITTELTE APOPTOSE	2
1.2 MITOCHONDRIEN UND APOPTOSE.....	2
1.3 DIE BCL-2 FAMILIE	3
1.4 DAS ANTI-APOPTOTISCHE BCL-2 FAMILIENMITGLIED A1	4
1.5 PROTEASOMALER ABBAU.....	5
1.6 LOKALISIERUNG INTRAZELLULÄRER PROTEINE	7
1.7 KONFOKALE MIKROSKOPIE.....	8
1.8 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	9
2. MATERIALIEN	11
2.1 ANTIBIOTIKA	11
2.2 ANTIKÖRPER.....	11
2.2.1 <i>Konfokale Mikroskopie</i>	11
2.3 FLUOROCROME	11
2.4 BAKTERIEN	11
2.5 CHEMIKALIEN	11
2.6 ENZYME	12
2.7 INHIBITOREN	12
2.8 FILMMATERIAL.....	13
2.9 KITS	13
2.10 MEDIEN.....	13
2.10.1 <i>Zellkulturmedien</i>	13
2.10.2 <i>Medien für Bakterien</i>	14
2.11 PUFFER UND LÖSUNGEN.....	14
2.12 ZELLINIEN	15
2.13 FLUORESZENZMIKROSKOPIE.....	16
2.14 KONFOKALE MIKROSKOPIE.....	16
2.15 PLASMIDE BZW. VEKTOREN.....	16
3.16 OLIGONUKLEOTIDE.....	18
3. METHODEN.....	19
3.1 ZELLULÄRE METHODEN	19
3.1.1 <i>Ermittlung der Zellzahl</i>	19
3.1.2 <i>Zellkulturen</i>	19
3.1.3 <i>Transfektion und Infektion</i>	20
3.1.4 <i>Anreicherung erfolgreich infizierter Zellen</i>	20
3.1.5 <i>Durchflusszytometrie</i>	21
3.2 DNA TECHNIKEN.....	21
3.2.1 <i>Polymerase Kettenreaktion (PCR)</i>	21

3.2.2	<i>Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen</i>	23
3.2.3	<i>Klonierungen</i>	24
3.2.4	<i>Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen</i>	25
3.2.5	<i>Großpräparation von Plasmid DNA</i>	26
3.2.6	<i>Sequenzierungs-Polymerase-Kettenreaktion</i>	26
3.3	KONFOKALE LASERMİKROSKOPIE	27
3.3.1	<i>Zellfärbungen</i>	28
4.	ERGEBNISSE	30
4.1	<i>A1 ist ein kurzlebige Protein</i>	30
4.2	<i>A1 wird durch Proteasomen abgebaut</i>	32
4.3	<i>Durch Modifikation des C-Terminus lässt sich die Stabilität von A1 verbessern</i>	33
4.4	<i>Die C-Terminus von A1 vermittelt keine Lokalisierung an zelluläre Membranen</i>	35
4.5	<i>Gesamt A1 zeigt eine Anreicherung im Zytosol</i>	40
5.	DISKUSSION	47
5.1	DER C-TERMINUS VON A1 IST FÜR DIE INSTABILITÄT VERANTWORTLICH	48
5.2	WELCHE ROLLE SPIELT DER PROTEASOMALE ABBAU VON A1?	49
5.3	DER C-TERMINUS VON A1 IST FÜR EINE LOKALISATION NICHT AUSREICHEND	51
5.4	GESAMT A1 REICHERT SICH IM ZYTOSOL AN	53
6.	ZUSAMMENFASSUNG	56
6.	SUMMARY	58
7.1	LITERATURVERZEICHNIS	60
7.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	64
7.3	ABBILDUNGS-/TABELLENVERZEICHNIS	66
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	66
	TABELLENVERZEICHNIS	67

1. Einleitung

In jedem multizellulären Organismus müssen Wachstum, Differenzierung und Alterung reguliert werden. Einen zentralen Mechanismus in diesem Zusammenhang stellt die Apoptose, eine Art des programmierten Zelltodes, dar (Hengartner, 2000). Die biologische Bedeutung der Apoptose wird bei verschiedensten Vorgängen wie dem Alterungsprozess, bei der Tumorentstehung und bei der Immunregulation deutlich. Schon während der embryonalen Entwicklung spielt die Apoptose eine entscheidende Rolle, sie ist essentiell für eine erfolgreiche Organogenese und für die Entstehung von komplexen multizellulären Geweben (Danial and Korsmeyer, 2004). Bei Säugetieren lässt sich Zelltod bereits während der Differenzierung der inneren Zellmasse in den Keimbläschen (Blastozysten) nachweisen (Penaloza et al., 2006; Spanos et al., 2002). In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass Apoptose während des Alterns in verschiedenen Zellpopulationen wie den Kardiomyozyten, Hepatozyten, Lymphozyten und im Zentralen Nervensystem zunimmt. Des Weiteren kann eine Dysregulation des programmierten Zelltodes unter anderem zu einem Verlust von physiologischen Funktionen und einer signifikanten Zunahme von Tumoren und degenerativen Erkrankungen beitragen, was z.B. zu der Alzheimer'schen Erkrankung und dem Morbus Parkinson führen kann. (Lee and Wei, 2007). Die Apoptose spielt auch eine entscheidende Rolle im Immunsystem. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in pro- und anti-apoptotischen Genen für Autoimmunerkrankungen, Immundefekte und Lymphomentstehung verantwortlich sein können (Thompson, 1995).

Verschiedene genetische Abweichungen und die zellulären Veränderungen der malignen Transformation führen in vielen Tumoren zu einer gestörten Apoptoserate. Diese Störung kann sich durch eine Hochregulation anti-apoptotischer oder eine Herunterregulation pro-apoptotischer Signale bemerkbar machen. Traditionelle Tumor-Therapeutika wie zytotoxische Medikamente und die Strahlentherapie manipulieren die Apoptose indirekt, indem sie Zellschäden induzieren und dadurch pro-apoptotische Signale erzeugen. Durch das bessere Verständnis der Apoptose wird mit neueren spezifischeren Therapieoptionen versucht, pro- und anti-apoptotische Stimuli direkt zu beeinflussen (Call et al., 2008).

Die morphologische Veränderungen der Apoptose wurden erstmals von Kerr 1972 beschrieben (Kerr et al., 1972). Während der Apoptose schrumpft die Zelle, Proteine werden degradiert und die Chromosomen werden fragmentiert. Es folgt dann die Bildung apoptotischer Vesikel, welche dann von phagozytierenden Zellen wie Makrophagen aufgenommen werden. Dadurch wird verhindert, dass Zytoplasma und Zellorganellen in den Extrazellularraum freigesetzt werden und dort eine Entzündungsreaktion hervorrufen, die das umliegende Gewebe schädigt (Platt et al., 1998).

1.1 Die Rezeptor-vermittelte Apoptose

Ein Mechanismus des programmierten Zelltodes stellt die Rezeptor-vermittelte, oder auch bekannt als extrinsische Apoptose, dar. Bei dieser wird durch die Kreuzvernetzung von sogenannten Todesrezeptoren, wie z.B. FAS oder TRAIL auf der Zelloberfläche eine intrazelluläre Enzymkaskade gestartet, welche zu den oben bereits erwähnten morphologischen Veränderungen und schließlich zum Tod der Zelle führt. Die beteiligten Enzyme bezeichnet man als Caspasen, die als inaktive Procaspasen in der Zelle vorliegen und durch Zusammenlagerung bzw. Spaltung aktiviert werden (Li and Yuan, 2008). Diese Apoptoseform findet man beispielsweise bei Immunantworten, bei der zytotoxische T-Zellen kranke oder befallene Zellen eliminieren (Li and Yuan, 2008).

1.2 Mitochondrien und Apoptose

Eine zweite Form des programmierten Zelltodes stellt der intrinsische Weg der Apoptose dar, bei dem die Mitochondrien eine Schlüsselfunktion spielen. Dabei werden apoptogene Faktoren wie Cytochrom c in das Zytoplasma freigesetzt, in dessen Folge dann die nachfolgende Apoptose aktiviert wird. In lebenden Zellen verhindern hauptsächlich anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie diese Veränderungen in den Mitochondrien (Zimmermann et al., 2001).

Während der Apoptose werden pro-apoptotische Bcl-2 Familienmitglieder aktiviert, erfahren eine Konformationsänderung, welche zu einer Freilegung der pro-apoptotischen BH3 Domäne führt. Noch nicht an Mitochondrien oder endoplasmatischem Retikulum (ER) lokalisierte Proteine translozieren hierdurch an die Mitochondrien. Dadurch werden dann Proteine aus dem Intermembranraum, inklusive Cytochrom c, freigesetzt. Nachdem Cytochrom c freigesetzt wurde, werden Caspasen aktiviert und die Zelle wird apoptotisch. Dies geschieht durch die Bildung eines „Apoptosoms“ (bestehend aus Cytochrom c, apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1), und Procaspase 9). Dieser Prozess ist abhängig von ATP und dATP. Apaf-1 ist ein zytosolisches Protein und bindet Cytochrom c. Durch die hierdurch bedingte Konformationsänderung kommt es zu einer Oligomerisierung von Apaf-1 Molekülen. Diese Struktur rekrutiert dann eine Initiator-Caspase (Procaspase-9). Im Vergleich zu anderen Caspasen wird Procaspase-9 nicht durch Spaltung aktiviert, sondern muss an Apaf-1 gebunden werden, um aktiviert zu werden. Das Apoptosom kann dann Procaspase-3 rekrutieren, welche darauf folgend durch die aktivierte Caspase-9 gespalten, aktiviert und dann wieder freigesetzt wird, um dann die Apoptose herbeizuführen.

1.3 Die Bcl-2 Familie

Bcl-2 wurde erstmals als ein „proto-onkogen“ in einem folliculären B-Zell Lymphom identifiziert (Pegoraro et al., 1984; Tsujimoto et al., 1984). Seit dem wurden rund 19 Bcl-2 Familienmitglieder in Säugetierzellen identifiziert. Diese besitzen mindestens eine von vier konservierten Motiven, die als Bcl-2 Homologie Domänen bezeichnet werden (BH1-BH4) (Adams and Cory, 1998). Die Bcl-2 Familienmitglieder können entsprechend ihrer Funktion und Struktur in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Zum einen in die anti-apoptotischen Mitglieder wie Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1 (Bfl-1) und Boo (Diva), welche alle anti-apoptotische Aktivitäten besitzen und mindestens BH1 und BH2 enthalten. Des Weiteren existieren pro-apoptotische Mitglieder wie Bax, Bak und Bok (Mtd), die eine Sequenzhomologie mit BH1, BH2 und BH3, aber nicht mit BH4 besitzen. Pro-apoptotische „BH3-only“ Mitglieder, zu welchen Bid, Bad, Bim, Bik, Blk, Hrk (DP5), Bnip3 und Noxa gehören, besitzen nur eine zentrale kurze BH3 Domäne. (Opferman and Korsmeyer, 2003) (siehe Abb. 1.1)

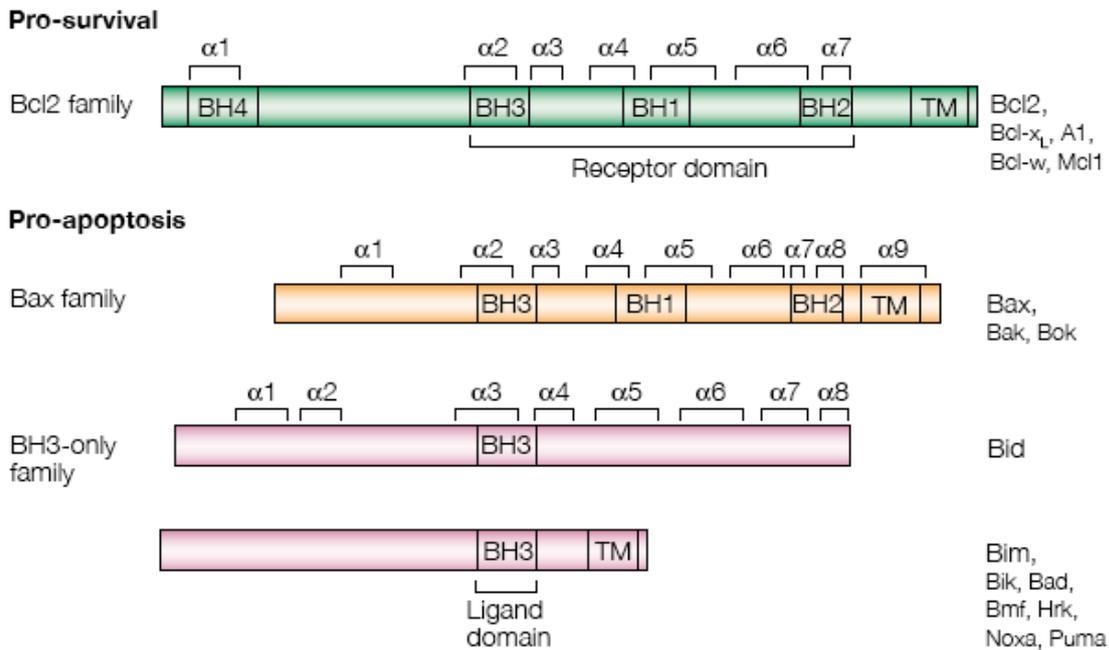


Abb. 1.1: Drei Subgruppen der Bcl-2 Familienmitglieder. Die bekannten α -helikalen Regionen sind markiert, als auch die vier Regionen (BH1-BH4) die zwischen den Familienmitgliedern hoch konserviert sind. Der überwiegende Teil der Mitglieder hat ein carboxy-terminales hydrophobes Ende. TM = Transmembrane Domäne. Modifiziert nach (Cory and Adams, 2002)

Subzelluläre Lokalisationsstudien konnten zeigen, dass die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L an der äußeren Mitochondrienmembran bzw. dem ER lokalisiert sind, während die pro-apoptotischen Familienmitglieder entweder im Zytosol oder an der Mitochondrienmembran liegen. Die Bindung anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 und Bcl-x_L an intrazelluläre Membranen wird durch eine hydrophobe Transmembrandomäne erreicht (Kaufmann et al., 2003).

1.4 Das anti-apoptotische Bcl-2 Familienmitglied A1

Das anti-apoptotische Protein A1 wurde erstmals 1993 im Rahmen von Untersuchungen zur Regulation der Genexpression durch GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) identifiziert (Lin et al., 1993). Eine Expression dieses Proteins ließ sich hauptsächlich in B- und T-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen nachweisen (Hatakeyama et al., 1998). In der Maus existieren 4 Gene die für A1 kodieren, welche als A1-a, A1-b, A1-c und A1-d bezeichnet werden. A1-c ist ein Pseudogen, aus welchem ein

verkürztes Protein resultiert. A1-a, A1-b und A1-d sind funktionelle Isoformen und zeigen bis zu 97% Homologie in ihrer Nukleotid- und 96% in ihrer Aminosäuresequenz. Das humane Homologon zum murinen A1 ist Bfl-1. Im humanen Genom kodiert nur ein Gen für Bfl-1.

Die genaue Funktion von A1 ist aktuell noch nicht genau bekannt. Arbeiten durch Bae et. al. konnten zeigen, dass Apoptose, die durch das pro-apoptotische Bcl-2 Familienmitglied Bad induziert wurde, durch eine Koexpression mit dem humanen A1 Homologon Bfl-1 verhindert werden konnte (Bae et al., 2001). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Bfl-1 Stimulus-abhängig über verschiedene Mechanismen anti-apoptotisch wirksam ist. Zum einen konnte Bfl-1 das verkürzte pro-apoptotische Bcl-2 Familienmitglied tBid binden, um eine weitere Aktivierung von weiteren pro-apoptotischen Proteinen zu verhindern. Des Weiteren wurde durch eine direkte Interaktion von Bfl-1 und Bak die von Bak vermittelte Apoptose verhindert (Simmons et al., 2008). Auch in Arbeiten durch Werner et al. konnte Bfl-1 das pro-apoptotische tBid binden (Werner et al., 2002).

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass A1 bzw. Bfl-1 die Apoptose durch Bindung pro-apoptotischer Proteine verhindern können.

Auch die genaue Lokalisation von A1 ist bis dato nicht bekannt. Das C-terminale Ende von A1 enthält geladene Aminosäuren, die die von einigen Bcl-2 Familienmitgliedern bekannte Transmembrandomäne unterbrechen. Es ist daher fraglich, ob der C-Terminus von A1 zur Lokalisation an intrazelluläre Membranen fungieren kann (Nguyen et al., 1993).

1.5 Proteasomaler Abbau

Eine entscheidende Rolle bei der Apoptose spielt das Verhältnis von pro- und anti-apoptotischen Proteinen. Durch den Verlust pro-apoptotischer Mitglieder kommt es zur Reduktion und durch einen Verlust von anti-apoptotischen Mitgliedern zu einem Anstieg der Apoptoserate. Eine Möglichkeit das Verhältnis der Proteinmengen zu regulieren ist der proteasomale Abbauweg. In Studien konnte gezeigt werden, dass

es im Zuge der Apoptose oftmals zu einer Zunahme von Enzymen kommt, die am proteasomalen Abbauweg beteiligt sind (Orlowski, 1999; Wojcik, 1999).

Viele kurzlebige Proteine werden über den bereits erwähnten proteasomalen Abbauweg degradiert. In diesem hoch-spezifischen Weg erhält ein Protein zunächst eine Markierung für den Abbau, welche durch die kovalente Verknüpfung von multiplen Ubiquitinmolekülen erreicht wird. In der Folge kommt es dann zu einem Abbau des markierten Proteins im 26S Proteasom. Die Konjugation mit Ubiquitin verläuft über drei Schritte. Zuerst wird Ubiquitin durch eine ATP-abhängige Reaktion durch das Ubiquitin aktivierende Enzym (E1) aktiviert, wodurch ein Komplex zwischen E1 und Ubiquitin entsteht. Nun transferiert ein E2-Enzym den aktivierten Ubiquitin Teil von E1 auf eine E3-Ligase. In manchen Fällen kann E2 Ubiquitin auch direkt an das Substrat anfügen. Die E3-Ligase ist in der Lage, zwischen dem Lysinrest des Substrates und dem Glycinrest im C-Terminus des Ubiquitin eine kovalente Isopeptidbindung herzustellen. Da es viele verschiedene E3-Ligasen gibt und fast jede ihr eigenes Substrat besitzt, ist dies ein sehr spezifischer Vorgang. Meist entsteht eine Multiubiquitinkette, da in der Regel mehrere Ubiquitinreste an ein Substrat gehängt werden. Diese Multiubiquitinkette fungiert nun als Signal, um das Substrat an das 26S Proteasom zu „lotsen“. Das Substrat wird dann zu kleinen Peptiden abgebaut (siehe Abb. 1.2).

Auch der proteasomale Abbau der anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine geschieht über das Ubiquitinsystem und die Proteasomen. Dies ist wichtig für die Regulation der Apoptose, da dieser Abbau das Verhältnis zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen verändern kann (Glickman and Ciechanover, 2002).

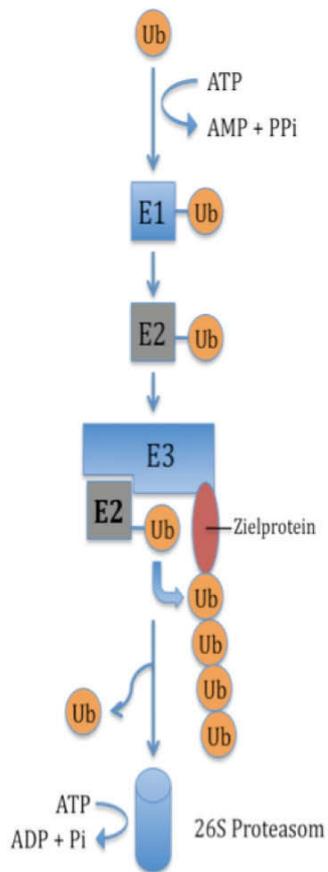


Abb. 1.2: Darstellung des proteasomalen Abbaus. Ub: Ubiquitin; E1: ubiquitin-activating enzyme; E2: ubiquitin-conjugating enzyme; E3: ubiquitin-protein ligase. Modifiziert nach (Ciechanover, 2005)

1.6 Lokalisierung intrazellulärer Proteine

Um die Prozesse die an der Apoptose beteiligt sind besser zu verstehen, sind Methoden zur Lokalisierung intrazellulärer Proteine von zentraler Bedeutung.

In Eukaryonten existieren viele verschiedene subzelluläre Strukturen. Der Großteil dieser Strukturen ist durch Membranen abgegrenzt. Viele Proteine sind an diese Membranen gebunden, um ihre physiologischen Funktionen auszutragen. Daher ist es von großer Bedeutung, die subzelluläre Lokalisation eines Proteins zu kennen.

Eine bewährte Methode, die Lokalisierung von Proteinen zu untersuchen ist die Markierung des zu untersuchenden Proteins mit „green fluorescent protein“ (GFP) und anschließender Bildgebung mittels konfokaler Lasermikroskopie. In der bis dato größten Studie zur Ermittlung der Lokalisation von Proteinen durch O’Shea et al. wurden 75% der Proteine in *Saccharomyces cerevisiae* an das C-terminale Ende von

GFP fusioniert und mittels ihrer endogenen Promotoren exprimiert. Durch Fluoreszenzmikroskopie konnten 70% dieser Proteine lokalisiert werden (Huh et al., 2003). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass diese zwar gut bei löslichen Proteinen anwendbar ist, es sich jedoch bei der Lokalisation von membranständigen Proteinen Schwierigkeiten ergeben können. Durch die Fusion mit GFP kann es zu einer Fehllokalisierung des Proteins in der Zelle kommen.

Eine weitere Möglichkeit ist daher die Lokalisierung von Proteinen mittels Antikörpern und anschließender konfokaler Mikroskopie. In einer aktuellen Studie durch Barbe et al. konnten 466 Proteine in drei humanen Zelllinien mittels monoklonaler spezifischer Antikörper und konfokaler Mikroskopie untersucht werden (Barbe et al., 2008; Sadowski et al., 2008). Diese Methode hat gegenüber der bereits beschriebenen Methoden der Markierung von Proteinen mit GFP den Vorteil, dass das Zielprotein in seiner Struktur nicht, oder nur unwesentlich, verändert werden muss. Jedoch müssen bei dieser Methode die spezifischen Antikörper die Zellmembran passieren. Dies setzt eine Fixierung der Zellen und eine anschließende Permeabilisierung der Zellmembran voraus, wodurch es zu einer Veränderung und Schädigung von Zellorganellen kommen kann.

1.7 Konfokale Mikroskopie

Bei der konfokalen Mikroskopie wird zur Anregung ein Laser benutzt. Der Laserstrahl wird von einem dichroitischen Spiegel reflektiert. Bei einem dichroitischen Spiegel wird Licht, das kürzer als eine bestimmte Wellenlänge ist, reflektiert. Licht, das länger als diese Wellenlänge ist, kann passieren. Das bedeutet im Fall eines konfokalen Mikroskops, dass das Licht des Laserstrahls von dem dichroitischen Spiegel reflektiert und anschließend auf die Probe geworfen wird. Das von der Probe emittierte Licht kann den Spiegel passieren und kann detektiert werden.

In der normalen Fluoreszenzmikroskopie emittiert nicht nur der sich im Brennpunkt der Linse befindliche Bereich der Probe Licht. Benachbarte Bereiche erhalten auch Licht und fluoreszieren. Dadurch entsteht ein Hintergrundrauschen. Um diesem Problem zu begegnen, wird in der konfokalen Mikroskopie eine Lochblende

verwendet. Dabei bildet der Brennpunkt der Linsen des Mikroskops ein Bild an der Stelle der Öffnung der Lochblende. Es werden somit nur die Bereiche abgebildet, die sich im Fokus der Linse befinden. Dadurch, dass das außerhalb des Brennpunkts der Linse befindliche Licht nicht abgebildet wird, lassen sich sehr dünne Bereiche der Probe darstellen. In der konfokalen Mikroskopie können sukzessive viele dünne Bereiche der Probe dargestellt werden, so dass ein dreidimensionales Bild der Probe erstellt werden kann (siehe Abb. 1.3).

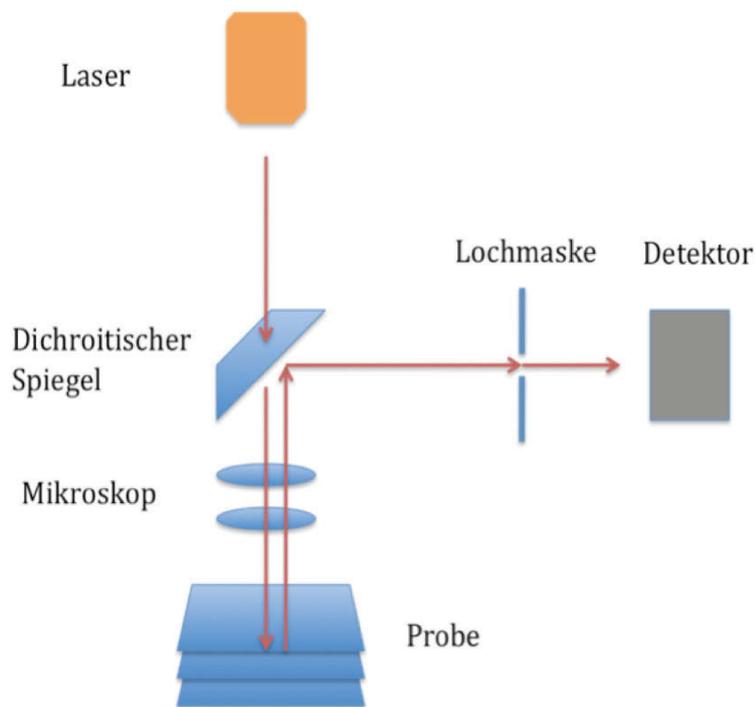


Abb. 1.3: Aufbau eines konfokalen Lasermikroskops.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Wie bereits dargestellt wurde, ist die Apoptose essentiell für die Entwicklung und Aufrechterhaltung multizellulärer Organismen. Bisher sind noch viele Einzelheiten dieses sehr komplexen Vorgangs nicht verstanden. Die pro- und anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie spielen dabei eine entscheidende Rolle. Der Mechanismus der anti-apoptotischen Wirkung und die Lokalisation von A1, einem anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitglied, ist bislang nicht geklärt. Um diese

Prozesse genauer zu verstehen, sind Methoden um intrazelluläre Proteine zu lokalisieren von entscheidender Bedeutung.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, Erkenntnisse über die Lokalisation und Funktion dieses Proteins zu sammeln. Da Kaufmann et al. bereits zeigen konnten, dass die C-terminalen Enden von Bcl-2 und Bcl-x_L an EGFP fusioniert suffizient eine Membranlokalisation hervorrufen können (Kaufmann et al., 2003,), haben wir die Funktion des C-terminalen Endes von A1 charakterisiert.

A1 wird hauptsächlich in Zellen des Immunsystems exprimiert. Die B-Zelle ist ein wichtiger Vertreter dieses hochspezialisierten Abwehrsystems unseres Körpers und hat in der Funktion als Plasma- und Gedächtniszelle die Aufgabe, unseren Körper gegen fremde Substanzen und Organismen durch Antikörperproduktion zu schützen. Die Apoptose spielt wiederum eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von B-Zellen. Störungen der Apoptose können zu Autoimmunität, Immundefizienzen, oder Krebs führen (Thompson, 1995). Viele Lymphome sind beispielsweise B-zellulären Ursprungs. Wir sehen daher die B-Zelle als ein geeignetes Modellsystem, um spezifische Vorgänge wie den programmierten Zelltod zu untersuchen. Daher führten wir unsere Experimente mit murinen B-Zell Lymphomzellen (WEHI 231) durch. Da WEHI 231 Zellen nicht adhären sind und sich aufgrund ihrer Größe schlecht in der konfokalen Mikroskopie untersuchen lassen, wurden die konfokalen Lokalisationsstudien in adhäsiven 293T Zellen, einer humanen embryonalen Nierenkarzinom-Zelllinie, durchgeführt.

Diese Arbeiten sollen dazu beitragen die biologische Bedeutung von A1 in der Apoptose zu charakterisieren.

Wir haben die Hoffnung, dass durch das bessere Verständnis der Apoptose und der beteiligten Proteine in Zukunft bessere Therapieoptionen entwickelt werden können, zum Beispiel durch die direkte Beeinflussung pro- und anti-apoptotischer Stimuli.

2. Materialien

2.1 Antibiotika

Ampicillin	AppliChem GmbH
Ciprofloxacin	Apotheke
Zeocin	Invitrogen®

2.2 Antikörper

2.2.1 Konfokale Mikroskopie

IgG, Gesamtmolekül, Esel, Maus, IgG (H+L), polyklonal, Cy5	Dianova
Mouse Anti-HA Monoclonal Antibody, Unconjugated, Clone 12CA5	Roche

2.3 Fluorochrome

MitoTracker® Red CMXRos	MolecularProbes
DAPI	Sigma

2.4 Bakterien

Top F	Arbeitsgruppe
-------	---------------

2.5 Chemikalien

Agarose	Roth
Calcium chloride	Sigma

EDTA	Roth
Fluoromount G	SouthernBiotech
Hydrogen peroxide	AppliChem GmbH
Poly-L-Lysin	Sigma
Temed	AppliChem GmbH
Tris	Roth
Tween 20	AppliChem GmbH
Trypan blue solution	Sigma
SDS (Sodium dodecylsulphate)	AppliChem GmbH

2.6 Enzyme

Ascl	MBI
BamHI	MBI
BfuA1	NEB
BglII	MBI
EcoRI	MBI
MfeI	MBI
NCOI	MBI
Pfu DNA Polymerase	Promega
SAP	NEB
T4 DNA Ligase	MBI

2.7 Inhibitoren

Cycloheximid	Sigma
Protease inhibitor cocktail	Sigma
Proteasome inhibitor II	Calbiochem

2.8 Filmmaterial

„x-ray RETINA XBA“ medizinischer Röntgenfilm	Fotochemische Werke GmbH
--	--------------------------

2.9 Kits

- DNA Aufreinigung:

UltraClean™15 DNA Purification Kit

MoBio Laboratories

- DNA Präparation:

Maxi preparation kit

Sigma

2.10 Medien

2.10.1 Zellkulturmedien

DMEM (Dulbeco's Modified Eagle medium)

Haus

Supplementiert mit:

Penicillin 0.025%	Apotheke
Streptomycin 0.025%	Apotheke
Fötalem Kälberserum (5%, hitzeinaktiviert 30 min bei 56°C)	Gibco

RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 medium

Haus

Supplementiert mit:

Glutamin 0.07%	Gibco
Penicillin 0.025%	Apotheke

Streptomycin 0.025%	Apotheke
FCS 5%	Gibco
nicht essentielle Aminosäuren (1:100)	Gibco
Natriumpyruvat (1:100)	Gibco
2-Mercaptoethanol (1:1000)	Gibco

2.10.2 Medien für Bakterien

LB Medium

2% LB broth (in H ₂ O)	Invitrogen [®]
-----------------------------------	-------------------------

Ampicillin-agar Platten

2% LB broth	Invitrogen [®]
1.5% Agar-agar	Roth
0.1% Ampicillin (50µg/ml)	AppliChem GmbH
ad H ₂ O	

2.11 Puffer und Lösungen

- **ATV:** Haus

NaCl	80g
KCl	4g
Glukose	10g
NaHCO ₃	5.8g
Trypsin (1:250)	5g
Versene	2g
H ₂ O	ad 1l

- **PBS** (Phosphatgepufferte Salzlösung):

Haus

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 1l

- **TAE** (50x) :

2M	Tris
2M	Acetate
100mM	EDTA
pH 7.8	Einstellen mit Salzsäure

- **TBS** (10x) :

0.5M	Tris
1.5M	NaOH
pH 7.5	Einstellen mit Salzsäure

2.12 Zelllinien

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

2.13 Fluoreszenzmikroskopie

Carl Zeiss Axiovert 200 M (angeschlossen an LSM 510 Meta)

Kamera DXM 1200 der Firma Nikon

2.14 Konfokale Mikroskopie

Carl Zeiss LSM510 konfokales Mikroskop

Software: ZEISS Laser Scanning Microscope LSM 510 Software 3.2 SP2

2.15 Plasmide bzw. Vektoren

Die cDNA der verschiedenen Konstrukte wurden in bicistronische, retrovirale Vektorplasmide kloniert. In dem 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 eine gekoppelte Expression von einem Markergenprodukt aus Antibiotikaresistenz 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 Enzephalomyokarditis Virus.

Im Folgenden ist die Aminosäuresequenz des C-Terminus des A1 Wildtyps gezeigt. Die Markierungen zeigen die Veränderungen des C-Terminus der Konstrukte *pIZ-EGFP-mA1/EEE* und *pIZ-EGFP-mA1/AAA* im Vergleich zum unveränderten A1 C-Terminus von *pIZ-EGFP-mA1*.

pIZ-EGFP-mA1: GGWEDGFIKKFEPK**S**GWL**T**F**L**Q**M**T**G**QIWEMLFLLK

EGFP-mA1/EEE: GGWEDGFIKKFEPK**E**GWL**E**F**L**Q**M****E**GQIWEMLFLLK

→ Austausch zu Glutaminsäuren (mimickt Phosphorylierung)

EGFP-mA1/AAA: GGWEDGFIKKFEPK**A**GWL**A**F**L**Q**M****A**GQIWEMLFLLK

→ Austausch zu Alanin (nicht mehr phosphorylierbar)

Abb.2.1: Aminosäuresequenz vom A1 C-Terminus der Maus. Die Markierungen stellen die Veränderungen in der Proteinsequenz vom A1 C-Terminus dar.

Nr.	Konstrukt	Vektor	Restriktionsenzyme	Fragment	Restriktionsenzyme	Template
1	pIZ-MCS-A1	pczCFG5 / IZ	BamHI / BspMI / SAP	C-term A1	BamHI / BspMI	+pEYZ/mC7Mut.A135a a
2	pIZ-EGFP-MCS-A1	pczCFG5 / MCS-A1	EcoRI / BamHI	EGFP	MfeI / BamHI	PCR von beliebigem p/EGZ/ mit Oligos 5EGFP/ATG(MfeI) + 3EGFP/EcoBam → A1
3	pIZ-EGFP-MCS-Bcl2	pIZ-EGFP-MCS-A1	BamHI / AscI	mBcl2 c-term	BglII / AscI	PCR von mBcl2 Konstrukt 5mBcl2cterm/GGWDA BglII(81) * 3mBcl2/Stop AscI(82)
4	pIZ-EGFP-mA1/EEE	pIZ-EGFP-MCS-A1	BamHI / AscI / SAP	mA1 Emut (=STT→EE)	BamHI / AscI	PCR von pEYZ-FmA1(STT→EEE) mit 5mA1/35aacterm + 3mA1STOP/AscI
5	pIZ-EGFP-mA1/AAA	pIZ-EGFP-MCS-A1	BamHI / AscI	mA1 Emut (=STT→AA)	BamHI / AscI	PCR von pEYZ-FmA1(STT→EEE) mit 5mA1/35aacterm + 3mA1STOP/AscI

Tab. 2.1: Darstellung der generierten Plasmide.

Nr.	Konstrukt	Testgen	Markergen
1	pIZ-EGFP-mBCL-x _L ct	enhanced green fluorescent protein / Bcl- x _L ct	enhanced green fluorescent protein/ Zeocin Resistenzprotein
2	pEGZ-HA-GATA3	Hämagglutinin / GATA3	enhanced green fluorescent protein/ Zeocin Resistenzprotein; chimaer
3	pEYZ-HA-mBCL-2	Hämagglutinin / Bcl-2	enhanced yellow fluorescent protein/ Zeocin Resistenzprotein; chimaer
4	pEGZ-HA-mA1	Hämagglutinin / A1	enhanced green fluorescent protein/ Zeocin Resistenzprotein; chimaer
5	pEGZ-HA-mA1-151	Hämagglutinin / A1-151	enhanced green fluorescent protein/ Zeocin Resistenzprotein; chimaer
6	pEGZ	enhanced green fluorescent protein	enhanced green fluorescent protein/ Zeocin Resistenzprotein
7	pEYZ	enhanced yellow fluorescent protein	enhanced yellow fluorescent protein/ Zeocin Resistenzprotein

Tab. 2.2: Darstellung weiterer verwendeter Plasmide.

3.16 Oligonukleotide

1	GCAGACCAATTGGCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC	5EGFP/ATG(MfeI) (70)
2	TCTCCCGGATCCACCACCTGAATTCCCTTGACAGCTCGTCCATGCC	3EGFP/EcoBam->A1 (71)
3	ACATCAGATCTCGGAGGCTGGGATGCCTT	5mBcl2cterm/GGWDA BgIII(81)
4	CTTAGTGGCGCGCCTCATCACTTGTGGCCCAGGTATGC	3mBcl2/Stop Ascl(82)
5	GGAAATGGATCCGGGAGGTTGGGAAGATGGCTTC	5mA1/35aacterm
6	ACACCGCGGCGCGCCGTGTTACTTGAGGAGAAAGAGC	3mA1STOP/Ascl

Tab. 2.3: Darstellung der Primer der generierten Plasmide.

3. Methoden

3.1 Zelluläre Methoden

Alle zellulären Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt

3.1.1 Ermittlung der Zellzahl

Um die Zellzahl zu ermitteln, wurden die Zellen 1:1 mit einer Trypanblau-Arbeitslösung (Stammlösung 1:5 in PBS verdünnt) verdünnt und in einer Neubauer-Kammer gezählt. Tote Zellen konnten von lebenden unterschieden werden, da diese das Trypan Blau nicht ausschließen. Die Anzahl der lebenden Zellen wurde in zwei Quadranten gezählt. Die Zellzahl wurde gemäß (Mittelwert gezählter Zellen/Quadrant) x Verdünnungsfaktor x 10^4 = Zellzahl/ml berechnet.

3.1.2 Zellkulturen

Die WEHI 231 Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in 50ml Kulturflaschen mit RPMI 1640 Medium kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen auf Zelldichten um 5×10^4 bis 6×10^5 verdünnt.

Adhärente 293T-Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ mit DMEM in 10 cm Petrischalen kultiviert. Alle zwei bis vier Tage wurden die Zellen mit ATV von der Oberfläche der Petrischalen abgelöst, in DMEM wieder aufgenommen und mit einer Verdünnung von 1:10 bis 1:20 verdünnt.

Für die mikroskopische Betrachtung der 293T-Zellen wurden Deckgläser in die Petrischalen platziert bevor die Zellsuspension in diese hineingegeben wurde. Um sterile Bedingungen zu schaffen, wurden die Deckgläser zuvor autoklaviert.

3.1.3 Transfektion und Infektion

Um retrovirale rekombinante Viruspartikel herzustellen, wurde das pHIT Verpackungssystem wie von Soneoka et al. beschreiben verwendet (Soneoka et al., 1995). Mit der Standard Kalziumphosphat Methode wurden 293T-Zellen transient mit dem Expressionskonstrukt für Gag/Pol (pHIT60) und Env (pHIT123 ecotrop bzw. pHIT456 amphotrop) des murinen Leukämie Virus, als auch mit den relevanten Konstrukten einschließlich pIZ/MCS als eine Kontrolle kotransfiziert. Nach 16 Stunden wurde ein Mediumwechsel mit frischem DMEM durchgeführt und die Transfektion wurde für weitere 24 Stunden inkubiert. Der infektiöse Überstand mit den viralen Partikeln wurde dann zur Infektion von WEHI 231 Zellen verwendet. Dazu wurde der virale Überstand steril filtriert (0,45µm) und mit 1×10^5 WEHI 231 Zellen in Falcon Röhrchen abgefüllt. Zusätzlich wurde 4-10 µg/ml Polybren hinzugegeben. Um hohe Infektionsraten zu erzielen, wurden die Proben für 2-3 Stunden zentrifugiert (2200rpm bei 32°C). Der Überstand wurde dann verworfen und die Zellen wurden in 12 Napfplatten für drei Tag mit 2ml RPMI Medium inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen wieder in Kultur genommen und der Erfolg der Infektion mittels Durchflusszytometrie überprüft.

Zur Infektion adhärenter 293T Zellen wurden 2×10^5 Zellen in Transfektionsschalen (Ø 40 mm) für zwei Tage mit den amphotropen, infektiösen Überständen inkubiert. Anschließend wurden die 293T Zellen einmalig mit MEM Medium gewaschen und wieder in Kultur genommen und der Erfolg mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie überprüft.

3.1.4 Anreicherung erfolgreich infizierter Zellen

Eine Anreicherung transduzierter Zellen wurde zum einen durch Antibiotika-Selektion erreicht. Dabei wurde dem Medium ein Antibiotikum entsprechend der transduzierten Resistenz in geeigneter Konzentration zugegeben (Zeocin: 250µg/ml). Die Zellen wurden in Anwesenheit des Antibiotikums für 2-7 Tage kultiviert.

Eine weitere Methode war die Sortierung mittels Durchflusszytometrie. Dabei ist es möglich die Zellen nach bestimmten Charakteristika wie der Fluoreszenz des transduzierten Markerproteins zu selektieren.

3.1.5 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie lassen sich Zellen die eine Farbfluoreszenz aufweisen nachweisen. Diese kommt entweder durch eine Färbung zustande, oder wird durch ein fluoreszierendes Protein nach einer Transfektion/Infektion erreicht. Ein FACS („fluorescece-activated cell sorter“) kann außer der Fluoreszenz auch die Zellgröße („forward scatter“) und die Granularität der Zelle („side scatter“) bestimmen. Die Durchflusszytometrie ist somit eine Methode mit der auch Anhaltspunkte über den Überlebenszustand und den Grad der Transduktion der Zellen gewonnen werden können.

Die FACS-Daten wurden mit der Cell Quest-Software für Apple MacOS ausgewertet.

3.2 DNA Techniken

3.2.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde verwendet, um spezifische DNA Sequenzen zu amplifizieren. Dies geschieht mithilfe von Primern die komplementär zum 5'- und 3'-Ende der DNA sind. Die Polymerase-Kettenreaktion besteht aus einer wiederholten Abfolge von Zyklen bestehend aus Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation. Zuerst wird die DNA durch eine hohe Temperatur (94-96°C) denaturiert. Darauf folgt eine Abkühlung bei der sich die Primer an die spezifisch zu amplifizierenden DNA-Fragmente anlagern. In einem dritten Schritt katalysiert bei 72°C eine Hitze-stabile DNA-Polymerase die Produktion neuer DNA Fragmente durch das hinzufügen neuer komplementärer Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTPs). Somit nimmt mit jedem Zyklus die Menge erhaltener DNA-Fragmente

exponentiell zu. Diese sind identisch zu dem Bereich der DNA zwischen den sich die zuvor gewählten 3'- und 5'-Primer angelagert haben.

Lösungen:

10x PCR-Puffer:

200mM Tris-HCl, 100mM KCl, 100mM (NH₄)₂SO₄, 20mM MgSO₄, 1mg/ml Nuklease-freies BSA, 1% Triton X-100

Ablauf der PCR:

In dieser Arbeit wurde die Polymerase-Kettenreaktion verwendet um cDNA zu amplifizieren. Die folgenden Reagenzien wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt:

50ng	DNA (Plasmid)
1.5µl	3' Oligonucleotid (25µM)
1.5µl	5' Oligonucleotid (25µM)
1.5µl	dNTP mix (10mM)
5µl	10x PCR Puffer (1x)
0.5µl	Pfu DNA Polymerase (1-2u)
ad 50µl	Wasser

Für die PCR wurde folgendes Ablaufschema verwendet:

Denaturierung	95°C 1min
Annealing	65°C 1min
Extension	72°C 2min

Dauer: 30 – 40 Zyklen

Finale Extension Haltezeit	72°C ∞ 10min
-------------------------------	--------------

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 des Primers.

3.2.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Lösungen:

10x DNA sample buffer: 50% Glycerin; 14mM EDTA pH 8.0; 0.25% (w/v) Bromphenol-Blau; 0.25% (w/v) Xylecyanol

TAE (50x): 2M Tris ; 2M Acetat ; 100mM EDTA ; pH 7.8 – Einstellen mit Acetat.

Allgemeine Bemerkungen:

In einem elektrischen Feld bewegen sich geladene Teilchen zu der Ihrer Ladung entgegengesetzten Seite, d.h. positive Teilchen bewegen sich Richtung der negativ geladenen Kathode und negative Teilchen bewegen sich zur positiv geladenen Anode. DNA Fragmente besitzen aufgrund negativ geladener Phosphatgruppen im Phosphodiesterückgrat eine negative Ladung. Daher bewegt sich DNA in einem elektrischen Feld Richtung Anode. Die amplifizierten PCR Produkte oder exzidierten Fragmente durch Restriktionsenzyme wurden mittels Gelelektrophorese, hauptsächlich mit 2% Agarose-Gel, aufgetrennt. Die DNA kann unter 265nm UV Licht sichtbar gemacht werden, da dem Gel hinzugefügtes Ethidiumbromid mit der DNA interkaliert, und daher DNA Fragmente fluoreszieren.

Vorbereitung und Verwendung der Agarosegele

Durch Erhitzung wurde Agarose zunächst in 1x TAE gelöst. Nun wurde 10mg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben (Roth; 1:10 000) und die Lösung wurde in eine Kammer überführt. Um Taschen für die Proben zu Formen, wurde ein Kamm verwendet. Die Proben wurden mit 1/10 5x Proben-Puffer gelöst und in die Taschen

geladen. Die Agarosegele wurden bei 80-100V laufen gelassen, anschließend wurden die Gele unter 265nm UV-Licht fotografiert.

Aufreinigung der DNA

Nach einem Verdau mit Restriktionsenzymen wurden die Vektor- und Fragmentbanden aus dem Agarosegel herausgeschnitten und mit einem Aufreinigungs-Kit (UltraClean™ 15 DNA purification kit) weiterbearbeitet. Hierzu wurde eine Iodidlösung den ausgeschnittenen Gelstücken hinzugefügt und bei 56°C erhitzt bis das Gel sich komplett gelöst hat. Nun wurde eine wässrige Lösung mit darin enthaltenen Perlen hinzugegeben, und das Probengefäß wurde für 5 Minuten geschwenkt. Die Proben wurden nun für 1 Minute zentrifugiert (13000rpm) und der Überstand wurde verworfen. Die Probe wurde dann mit einer ethanolhaltigen UltraWash Lösung gewaschen, der Überstand wurde wieder verworfen und die Perlen wurden für 5 Minuten trocknen gelassen. Nun wurde Wasser hinzugefügt und die Perlen wurden resuspendiert. Im Anschluss wurde die Probe bei 56°C für 5 Minuten erwärmt und dann zentrifugiert. Der nun die aufgereinigte DNA enthaltene Überstand wurde in ein sauberes Gefäß überführt.

3.2.3 Klonierungen

In einem ersten Schritt wurde der Vektor für die Klonierung vorbereitet. Dazu wurden Restriktionsenzyme gemäß den Schnittstellen („multiple cloning sites“ = MCS) des Vektors ausgewählt. Die Restriktionsreaktion wurde dann mittels eines präparativen Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt. Das gewünschte Fragment wurde ausgeschnitten und aufgereinigt.

Das für den Vektor vorgesehene DNA-Fragment konnte durch verschiedene Methoden gewonnen werden. Das DNA-Fragment wurde entweder mittels PCR amplifiziert oder es konnte aus einem bereits existierenden Plasmid ausgeschnitten werden. Die Fragmente wurden nach der Restriktionsreaktion wie die Vektoren aufgereinigt.

Die Aufreinigung der Vektoren und Fragmente erfolgte mittels des GENE CLEAN II KIT nach Angaben des Herstellers.

Für die nun folgende Ligation wurden aufgereinigter Vektor (v) und Fragment (f) in einem molaren Verhältnis von v:f = 1:3 eingesetzt. Die Ligation wurde mittels einer T4 DNA Ligase in Verbindung mit einem Ligationspuffer bei 16°C für 8-12 Stunden durchgeführt. Als Kontrolle wurde die Reaktion auch mit H₂O anstelle von Fragment durchgeführt. Nach 8-12 Stunden wurde das Ligationsprodukt in Bakterien (Top10F) transformiert. Dazu wurden 1.5µl Ligationsprodukt und 50µl der kompetenten *E. coli* Bakterien verwendet. Im Anschluss daran wurden die Bakterien für 30 Minuten auf Eis inkubiert gefolgt von einer Temperaturerhöhung auf 42°C für 30 Sekunden. Nach einer Abkühlung auf Eis für 1-2 Minuten wurden die Ansätze in 0,5ml LB Medium aufgenommen und für 1 Stunde bei 37°C mit 180U/min geschüttelt.

Die auf diese Weise gewonnenen Bakterienkulturen wurden dann auf ampicillinhaltigem (40µg/ml) Agar ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Das Verhältnis der Koloniezahlen auf den beiden Platten gab Aufschluss über den Erfolg der Ligation im Verhältnis zur Religation. Aus mutmaßlichen positiven (Vektor/Fragment exprimierenden) Kolonien wurde anschließend die DNA isoliert und mittels geeigneter Restriktion und Sequenzierung verifiziert (siehe unten).

3.2.4 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen

Lösungen:

Lösung I: 50mM Glukose, 10mM EDTA, 25mM Tris

Lösung II: 0,2N NaOH, 1% SDS

Lösung III: 3M Kaliumacetat, 2M Essigsäure

Die Bakterienkolonien von den LB-Agarplatten (mit 50µg/ml Ampicillin; 1:1000) wurden in 3ml LB/Ampicillin (50µg/ml) überführt und über Nacht bei 37°C bei 180U/min geschüttelt. Nach Zentrifugation bei 13000U/min für 1 Minute wurde das Pellet in Lösung I aufgenommen und durch Zugabe von Lösung II lysiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von Lösung III neutralisiert. Nach einer Zentrifugation mit 13000U/min für 10 Minuten wurde die DNA aus den Überständen

durch Zugabe von 100% Ethanol ausgefällt, sedimentiert und in Wasser aufgenommen.

3.2.5 Großpräparation von Plasmid DNA

Die Großpräparation von Plasmid DNA erfolgte mit Hilfe des „Genelute Plasmid Maxi-Prep Kit“ der Firma Sigma gemäß der mitgelieferten Vorschrift.

Dazu wurden die Bakterien nach der Transformation in 250ml LB-Medium (mit 50µg/ml Ampicillin) über Nacht angeimpft. Das „Genelute Plasmid Maxi-Prep Kit“, einschließlich Lösung I, II und III wurde für die größeren DNA Mengen verwendet. Dabei wurde der Überstand mit der darin enthaltenen DNA zusätzlich filtriert und über eine Säule laufen gelassen, um die DNA aufzubereiten und von RNAsen zu befreien. Für die Eluierung der DNA von der Säule wurde ein spezieller Elutionspuffer verwendet. Die DNA wurde durch Zugabe von 100% Ethanol ausgefällt, sedimentiert und in Wasser aufgenommen.

Bestimmung der DNA-Konzentration

Um die Konzentration der DNA zu messen, wurde ein Photometer verwendet. Die photometrischen Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 260nm mit einer 1:100 Verdünnung der DNA in H₂O in einer Mikroküvette. Die A₂₆₀-Einheit entspricht einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNA.

3.2.6 Sequenzierungs-Polymerase-Kettenreaktion

Um die verwendeten Konstrukte zu überprüfen, wurde eine Sequenzierungs-Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz in einem 0,5ml PCR-Reaktionsgefäß hergestellt. Die Menge der verwendeten DNA wurde entsprechend des Richtwertes (500ng bei 3kb) auf die reale Plasmidgröße umgerechnet:

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

Folgendes Programm wurde für die Reaktion verwendet:

98°C für 25 Sekunden

50°C für 8 Minuten

für 25 Zyklen. Anschließend erfolgte eine Abkühlung auf 4°C.

Reinigung und Analyse des DNA-Sequenzierungsansatzes

Um die DNA Fragmente nach der Sequenzierungsreaktion zu reinigen, wurden 150-250µl Sephadex-Beads („Sephadex™ G-50 DNA Grade Fine“, Amersham Biosciences) in einer gestopften Pipettenspitze verwendet. Die Spitze wurde anschließend in ein 2ml Reaktionsgefäß (in ein Loch im Deckel) überführt, um das Wasser zu entfernen, und bei 3000U/min für 3 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der komplette DNA-Ansatz auf die Säule gegeben und erneut bei 3000U/min für 3 Minuten zentrifugiert. Das Eluat wurde anschließend in 15µl Formamid-Puffer (TSR Puffer; Perkin Elmer) aufgenommen und in ein 200µl Cap überführt.

3.3 Konfokale Lasermikroskopie

Es wurde ein Carl Zeiss LSM510 konfokales Mikroskop verwendet. Die Bilder wurden mit der ZEISS Laser Scanning Microscope LSM 510 Software 3.2 SP2 aufgenommen.

3.3.1 Zellfärbungen

Beschichtung der Deckgläser mit Poly-L-Lysin

Die Deckgläser wurden zunächst autoklaviert. Dann wurden die Deckgläser flach nebeneinander liegend in eine Glaspetrischale überführt und soviel Poly-L-Lysin Lösung (100ng/ml; 0,22mol/l) zugegeben bis die Deckgläser vollständig bedeckt waren. Die Glaspetrischalen wurden dann über Nacht bei 4°C auf einen Schüttler platziert. Danach wurde das Poly-L-Lysin verworfen und die Deckgläser wurden 10x für jeweils 1 Minute mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Deckgläser mit 70% Ethanol gewaschen und im Trockenschrank trocknen gelassen. Die fertigen Deckgläser wurden in einem sterilen Gefäß aufbewahrt.

Anfärbung von 293T Zellen mit EGFP Fusionsproteinen

293T Zellen wurden mit „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) oder dem am C-terminalen Ende verändertem EGFP durch VSV pseudotypisiertem rekombinantem Retrovirus infiziert und auf sterilen Deckgläsern 24 Stunden vor der Färbung ausplatziert. Die Zellen wurden vor der Aufnahme mit 10nM Mitotracker CMXRos (Molecular Probes) für 30 Minuten in DMEM Zellkulturmedium gefärbt, um die Mitochondrien anzufärben. Daraufhin wurden die Zellen zweimalig DMEM gewaschen und direkt auf „microscopy slides“ für eine lebend Mikroskopie platziert.

Anfärbung von 293 T Zellen mit Gesamtprotein Fusionsproteinen

293T Zellen wurden mit dem Hämagglutinin-Epitop-markierten Fusionsproteinen (HAmBcl-2, HAmA1, HAmA1-151, HA-GATA3) und als Kontrollen mit den leeren Vektoren EGZ und EYZ durch VSV pseudotypisiertem rekombinantem Retrovirus infiziert und auf sterilen Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern 24 Stunden vor der Färbung ausplatziert. Zunächst wurden die Zellen mit 10nM Mitotracker CMXRos für 30 Minuten in DMEM Zellkulturmedium gegeben, um die Mitochondrien anzufärben. Im Anschluss daran wurden die Zellen zweimal für jeweils 2 Minuten mit DMEM gewaschen. Die Zellen wurden dann für 30 Minuten bei 37°C mit 4% Formaldehyd fixiert, und dann für die Permeabilisierung in 0,2% Triton X100 (in PBS) für 5 Minuten überführt. Nach der Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen jeweils für 2

Minuten 3x mit PBS gewaschen. Als nächster Schritt folgte eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Esel-Serum (3mg/ml; NDS = Normal donkey serum) für 20 Minuten und ein Waschschrift für 2 Minuten mit PBS. Im Anschluss daran wurde zunächst der primäre anti-HA-Antikörper (1µg/ml in PBS; Mouse Anti-HA Monoclonal Antibody, Unconjugated, Clone 12CA5) und dann der sekundäre Antikörper (3,5µg/ml in PBS; Cy5-conjugated AffiniPure Donkey, anti-mouse IgG) bei den Zellen angewendet. Jeweils nach der Verwendung des primären und sekundären Antikörpers wurden die Zellen 3x für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen. Als letzter Schritt wurden die Zellen mit Fluoromount G eingedeckt und mit einem Deckglas versehen. Das Fluormount G enthielt DAPI einer Konzentration von 1µg/ml, um die Zellkerne anzufärben. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ist eine DNA-spezifische Probe welche einen fluoreszierenden Komplex mit der DNA bildet, indem es sich mit A-T reichen Sequenzen der DNA verbindet (Kapusinski, 1995).

4. Ergebnisse

4.1 A1 ist ein kurzlebiges Protein

Um die Funktion des C-terminalen Endes von A1 näher zu untersuchen, wurden WEHI 231 Zellen mit den chimären Proteinen EGFP-A1ct und EGFP-Bcl-2ct mit VSV pseudotypisierten rekombinanten Retrovirus infiziert. Die Fluoreszenz der Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die chimären Proteine bestanden aus „green fluorescent protein“ (EGFP) und den C-terminalen Enden der anti-apoptotischen Proteine A1 und Bcl-2 (35 bzw. 47 Aminosäuren) (siehe Abb. 4.1). Als Kontrolle wurden WEHI 231 Zellen mit EGFP transduziert. Zellen die mit EGFP-A1ct transduziert waren, zeigten konstant einen niedrigeren durchschnittlichen Fluoreszenzindex als solche mit EGFP-Bcl-2ct (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei A1 um ein kurzlebiges Protein handelt.

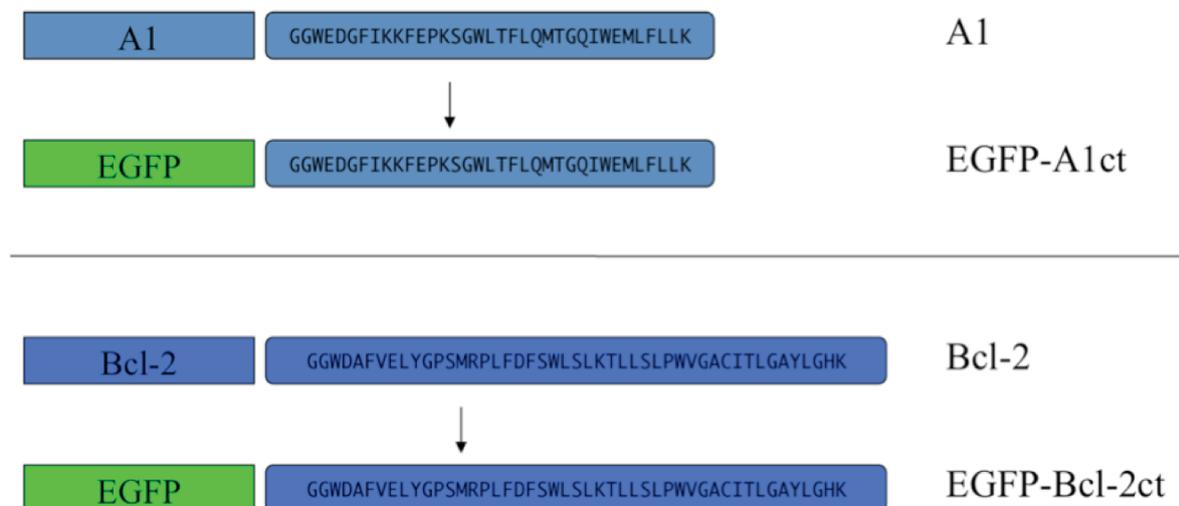


Abb. 4.1: Darstellung der anti-apoptotischen Proteine A1 und Bcl-2 und der chimären Proteine EGFP-A1ct und EGFP-Bcl-2ct nach Transferierung der C-terminalen Enden von A1 und Bcl-2 auf EGFP.

Um dieser Beobachtung weiter nach zu gehen, blockierten wir die *de novo* Proteinsynthese der WEHI 231 Zellen mit Cycloheximid (CHX; 10µg/ml). Cycloheximid ist ein Antibiotikum das von *Streptomyces griseus* produziert wird. Es

wirkt als Translationshemmer und unterbindet die Proteinbiosynthese bei Eukaryonten (Kerridge, 1958; Siegel and Sisler, 1963). In diesen Versuchen wurde der Unterschied noch deutlicher. Es zeigte sich eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz im Falle von EGFP-A1ct nach Behandlung mit CHX nach 30 Minuten und zwei Stunden, während die Fluoreszenzen von EGFP-Bcl-2ct und EGFP über den Beobachtungszeitraum stabil blieben (siehe Abb. 4.2).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der C-Terminus von A1 Proteine destabilisieren kann. Diese Instabilität lässt sich auf andere Proteine übertragen indem das C-terminale Ende von A1 an andere Proteine fusioniert wird. Diese Daten werden noch zusätzlich durch Experimente in unserer Arbeitsgruppe (Pelzer, 2004) gestützt, in denen das C-terminale Ende von A1 an Bcl-2 fusioniert wurde. Hieraus resultierte eine Destabilisierung von Bcl-2 (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse legen nahe, dass auch A1 selbst ein instabiles Protein ist.

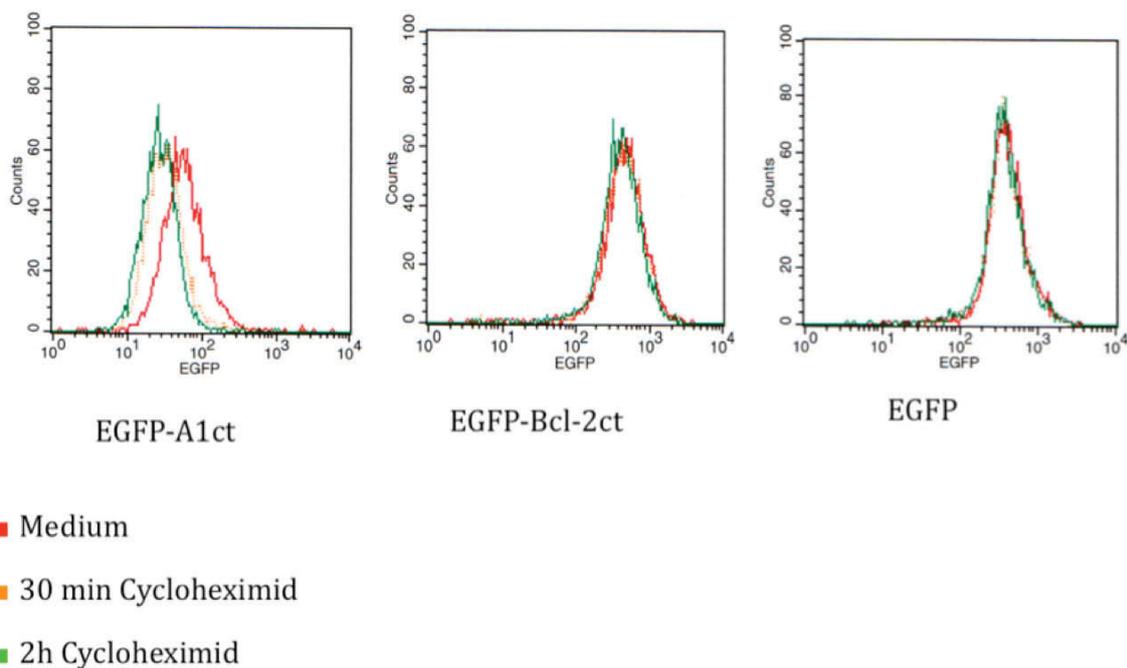


Abb. 4.2: EGFP-A1ct wird durch eine Behandlung mit Cycloheximid (CHX) destabilisiert. Eine Behandlung mit CHX hat keinen Einfluss auf die Stabilität von EGFP-Bcl-2ct und EGFP. WEHI 231 Zellen wurden mit den angegebenen Proteinen mit Hilfe von rekombinanten Retroviren transduziert und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

4.2 A1 wird durch Proteasomen abgebaut

Unsere Versuche konnten zeigen, dass der C-Terminus von A1 Proteine destabilisieren kann. Diese Instabilität konnte nach Hemmung der Proteinbiosynthese mit Cycloheximid direkt beobachtet werden. Wir fragten uns, ob dieser schnelle Umsatz des Fusionsproteins wie im Falle von anderen kurzlebigen Proteinen auch durch proteasomalen Abbau hervorgerufen wird. Wir behandelten daher WEHI 231 Zellen die mit EGFP-A1ct, EGFP-Bcl-2ct und EGFP transduziert wurden mit Proteasomen-Hemmer. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten und zwei Stunden mit „Proteasomen Inhibitor II“ inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Die Blockade der proteasomalen Aktivität konnte EGFP-A1ct effizient stabilisieren, während die Blockade keinen Einfluss auf die stabilen Spiegel von EGFP-Bcl-2ct hatte (siehe Abb. 4.3). Ähnliche Ergebnisse konnten wir durch die Verwendung eines zweiten Proteasomeninhibitors (MG-115) gewinnen (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse deuten an, dass A1 durch Proteasomen abgebaut wird.

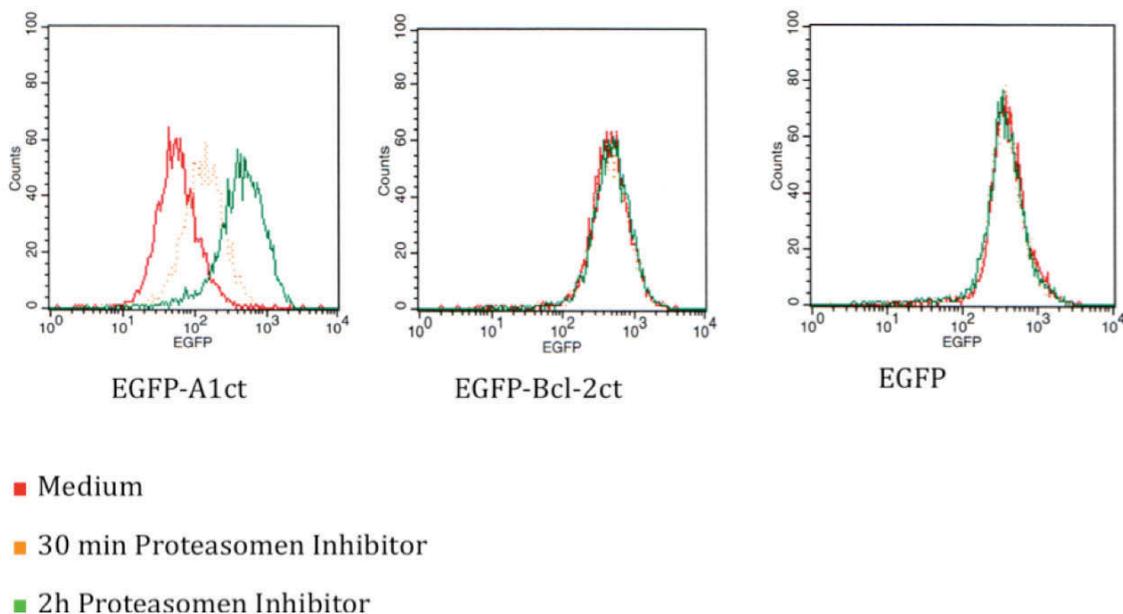


Abb. 4.3: EGFP-A1ct wird durch eine Behandlung mit Proteasomen Inhibitor („Proteasomen Inhibitor II“) stabilisiert. Eine Behandlung mit Proteasomen Inhibitor hat keinen Einfluss auf die Stabilität von EGFP-Bcl-2ct und EGFP. WEHI 231 Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert.

4.3 Durch Modifikation des C-Terminus lässt sich die Stabilität von A1 verbessern

Da der C-Terminus von A1 für die Instabilität des Proteins verantwortlich ist, gingen wir als nächstes der Frage nach, ob eine Modifikation des C-terminalen Endes von A1 seine Stabilität verändern kann. Dazu mutierten wir die Serinreste (S) und Threoninreste (T) des C-Terminus von A1 zu Glutamat (E) oder Alanin (A) (siehe Abb. 4.4). Anschließend klonierten wir Fusionsproteine aus EGFP und den mutierten C-Termini (EGFP-A1-EEEct und EGFP-A1-AAAct; siehe Abb. 4.4) und transduzierten diese in WEHI 231 Zellen.

Die Zellen wurden anschließend über 30 Minuten und zwei Stunden mit Cycloheximid behandelt und durchflusszytometrisch analysiert. Die EGFP-A1 EEE-Mutante zeigte eine verbesserte Stabilität nach 30 Minuten Behandlung mit Cycloheximid. Im Gegensatz dazu konnte die EGFP-A1 AAA-Mutante keine verbesserte Stabilität vorweisen. Als Kontrolle wurde das Fusionsprotein EGFP-A1ct mit dem Wildtyp C-Terminus von A1 verwendet (siehe Abb. 4.5).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass das C-terminale Ende von A1 für den proteasomalen Abbau des Proteins verantwortlich ist und die Nachahmung einer Phosphorylierung durch Glutamatreste zu einer Stabilitätszunahme führt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Versuchen unserer Arbeitsgruppe in denen gezeigt werden konnte, dass eine Mutation der S- und T-Reste im C-Terminus des Gesamtproteins A1 zu E in einer größeren Stabilität von A1 resultierten (Herold, 2005).

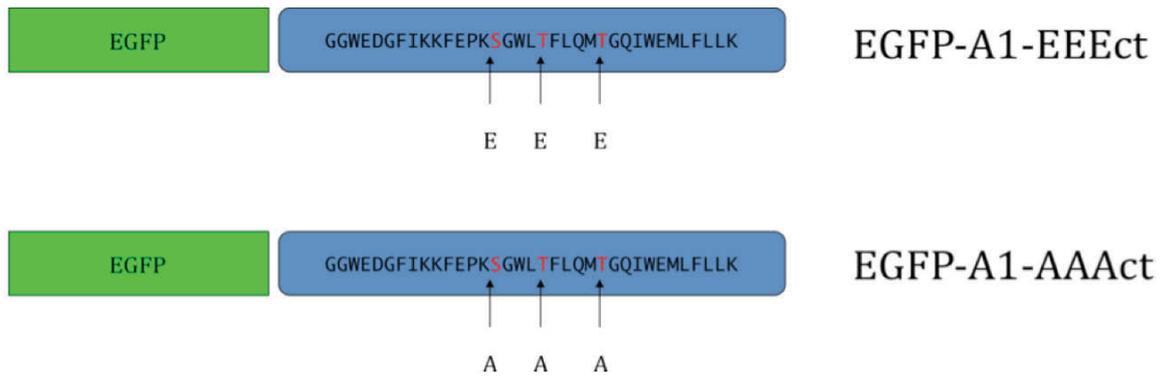


Abb. 4.4: Darstellung des Fusionsproteins EGFP-A1ct mit den veränderten Aminosäuren der mutierten Fusionsproteine EGFP-A1-EEEct und EGFP-A1-AAAct. (S=Serin, T=Threonin, E=Glutaminsäure, A=Alanin)

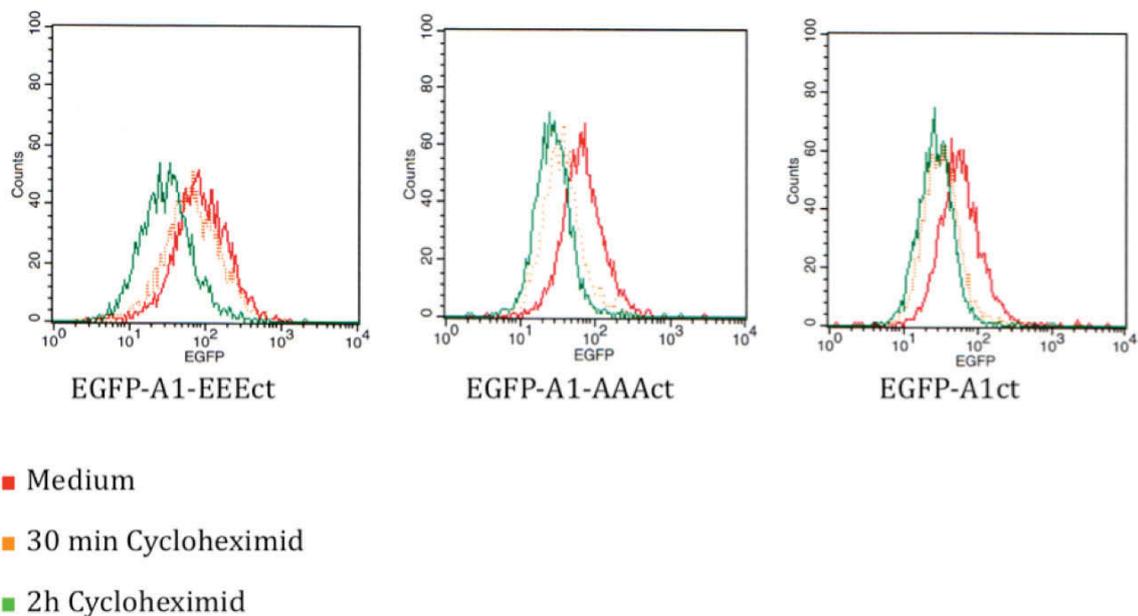


Abb. 4.5: EGFP-A1-EEEct, nicht jedoch EGFP-A1-AAAct, zeigt eine verbesserte Stabilität im Vergleich zu EGFP-A1ct nach einer Behandlung mit Cycloheximid (CHX). WEHI 231 Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Als nächstes untersuchten wir, wie sich eine Blockierung des proteasomalen Abbauweges auf die Stabilität von EGFP-A1-AAAct und EGFP-A1-EEEct in WEHI 231 Zellen auswirkt. Wir behandelten daher WEHI 231 Zellen mit „Proteasomen

Inhibitor II“ über 30 Minuten und 2 Stunden und untersuchten die Zellen anschließend mittels Durchflusszytometrie. Durch Hemmung des proteasomalen Abbaus konnten EGFP-A1-AAAct und EGFP-A1-EEEct effizient stabilisiert werden (siehe Abb. 4.6).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Mutation des C-terminalen Endes von A1 das Protein stabilisieren kann. Allerdings weist der Versuch mit dem Proteasomeninhibitor darauf hin, dass es sich nach wie vor um ein sehr kurzlebiges Protein handelt.

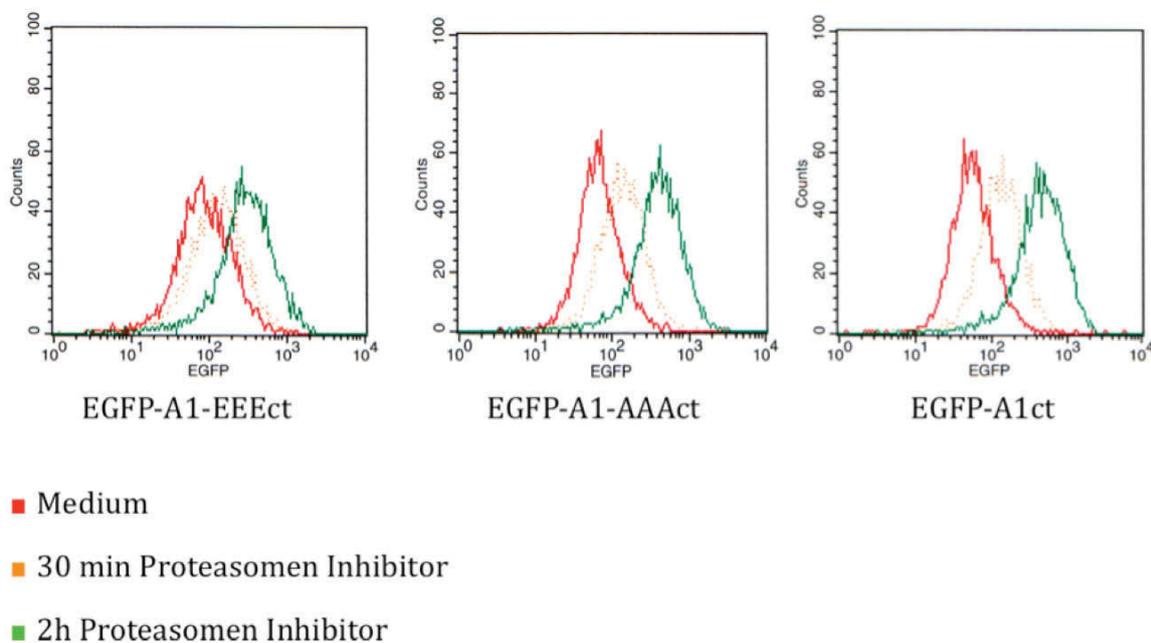


Abb. 4.6: EGFP-A1-EEEct und EGFP-A1-AAAct werden wie EGFP-A1ct durch eine Behandlung mit Proteasomen Inhibitor („Proteasomen Inhibitor II“) destabilisiert. WEHI 231 Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert.

4.4 Die C-Terminus von A1 vermittelt keine Lokalisierung an zelluläre Membranen

Die meisten Bcl-2 Familienmitglieder können an intrazelluläre Membranen durch hydrophobe Aminosäuresequenzen in ihrem C-terminalen Ende verankert werden (Schinzel et al., 2004). Die hydrophoben Aminosäuresequenzen sind jedoch am C-

terminalen Ende von A1 durch hydrophile Aminosäuren unterbrochen, die wahrscheinlich mit der Membranlokalisierung interferieren. Kaufmann et al. konnten zuvor zeigen, dass die C-Termini von Bcl-2 und Bcl-x_L an EGFP fusioniert suffizient eine Membranlokalisierung hervorrufen (Kaufmann et al., 2003).

Um direkt das Potential des C-terminalen Endes von A1 im Hinblick auf eine Lokalisierung an intrazelluläre Membranen zu überprüfen, haben wir mit rekombinanten Retroviren die Fusionsproteine EGFP-A1ct, EGFP-Bcl-2ct und EGFP-Bcl-x_Lct in 293T Zellen transduziert und analysierten die Verteilung der fluoreszierenden Proteine mittels konfokaler Mikroskopie. Bei 293T Zellen handelt es sich um eine embryonale Nierenstammzellreihe, die sich auf Grund ihrer Adhärenzeigenschaften besonders gut für konfokale Mikroskopie eignen. Die Mitochondrien wurden dem roten Fluoreszenzfarbstoff „MitoTracker® Red CMXRos“ und die Zellkerne mit DAPI angefärbt.

Das C-terminale Ende von A1 war nicht ausreichend um das chimäre Protein EGFP-A1ct an intrazelluläre Membranen zu lokalisieren. EGFP-A1ct war gleichmäßig innerhalb der Zelle verteilt (siehe Abb. 4.7). Im Kontrast dazu war EGFP-Bcl-2ct an verschiedenen intrazellulären Membranen zu finden, bei denen es sich vermutlich um die Kernmembran und das ER handelt (siehe Abb. 4.8). EGFP-Bcl-x_Lct hingegen war vorwiegend an mitochondrialen Membranen lokalisiert (siehe Abb. 4.9). Sowohl EGFP-Bcl-2ct als auch EGFP-Bcl-x_Lct waren nicht im Zellkern lokalisiert. 293T Zellen, die als Kontrolle mit EGFP transduziert wurden, zeigten keine Kolokalisation mit den Mitochondrien oder anderen membranösen Strukturen. EGFP war diffus im Zellkern und Zytoplasma nachweisbar (siehe Abb. 4.10).

Wie wir in unseren durchflusszytometrischen Analysen nachweisen konnten, zeigte A1 durch eine Modifikation des C-terminalen Endes eine verbesserte Stabilität in WEHI 231 Zellen. Um den Einfluss dieser Modifikationen auf die Verteilung der Fusionsproteine in der Zelle zu untersuchen, transduzierten wir die mutierten chimären Proteine EGFP-A1-EEEct und EGFP-A1-AAAct in 293T Zellen. Die Mitochondrien wurden dem roten Fluoreszenzfarbstoff „MitoTracker® Red CMXRos“ und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. EGFP-A1-EEEct und EGFP-A1-AAAct waren wie auch EGFP-A1ct und EGFP nicht an intrazellulären Membranen lokalisiert, und

waren sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu finden (siehe Abb. 4.11 und 4.12).

Hieraus schließen wir, dass das C-terminale Ende von A1 alleine keine Membranlokalisierungsfunktion besitzt. Die gleichmäßige Verteilung innerhalb der ganzen Zelle spricht dafür, dass dieser Teil des Proteins keine spezifische Lokalisation innerhalb der Zelle vermittelt.

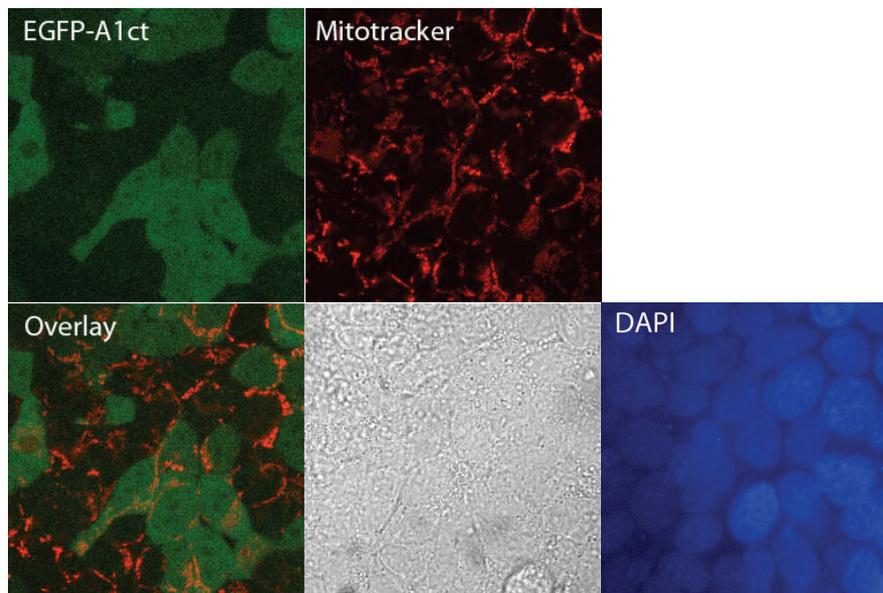


Abb. 4.7: Das Fusionsprotein EGFP-A1ct zeigt eine diffuse Verteilung. Konfokale Mikroskopie von 293T Zellen, die mit einem Fusionsprotein aus EGFP und dem C-Terminus von A1 Proteinen (EGFP-A1ct) transduziert wurden. Die Mitochondrien wurden mit MitoTracker® Red CMXRos gefärbt. Die gelbe Farbe zeigt eine Kolokalisation der anti-apoptischen Proteine mit den Mitochondrien. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

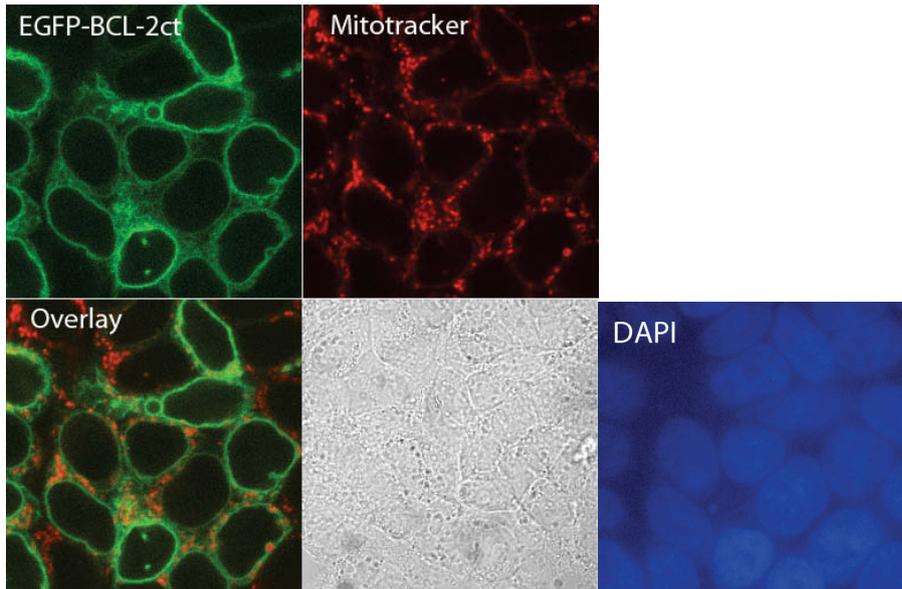


Abb. 4.8: Das Fusionsprotein EGFP-Bcl-2ct lokalisiert an intrazelluläre Strukturen wie Kernmembran und ER. Konfokale Mikroskopie von 293T Zellen, die mit einem Fusionsprotein aus EGFP und dem C-Terminus von Bcl-2 (EGFP-Bcl-2ct) transduziert wurden. Die Mitochondrien wurden mit MitoTracker® Red CMXRos gefärbt. Die gelbe Farbe zeigt eine Kolokalisation der anti-apoptotischen Proteine mit den Mitochondrien. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

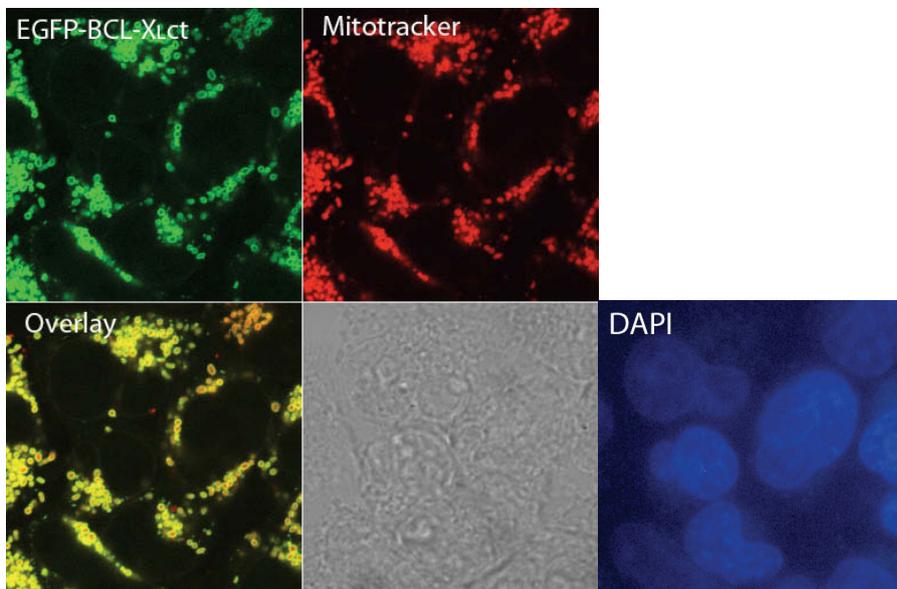


Abb. 4.9: Das Fusionsprotein EGFP-Bcl-x_Lct lokalisiert an die Mitochondrienmembran. Konfokale Mikroskopie von 293T Zellen, die mit einem Fusionsprotein aus EGFP und dem C-Terminus von Bcl-x_L (Bcl-x_Lct) transduziert wurden. Die Mitochondrien wurden mit MitoTracker® Red CMXRos gefärbt. Die gelbe Farbe zeigt eine Kolokalisation der anti-apoptotischen Proteine mit den Mitochondrien. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

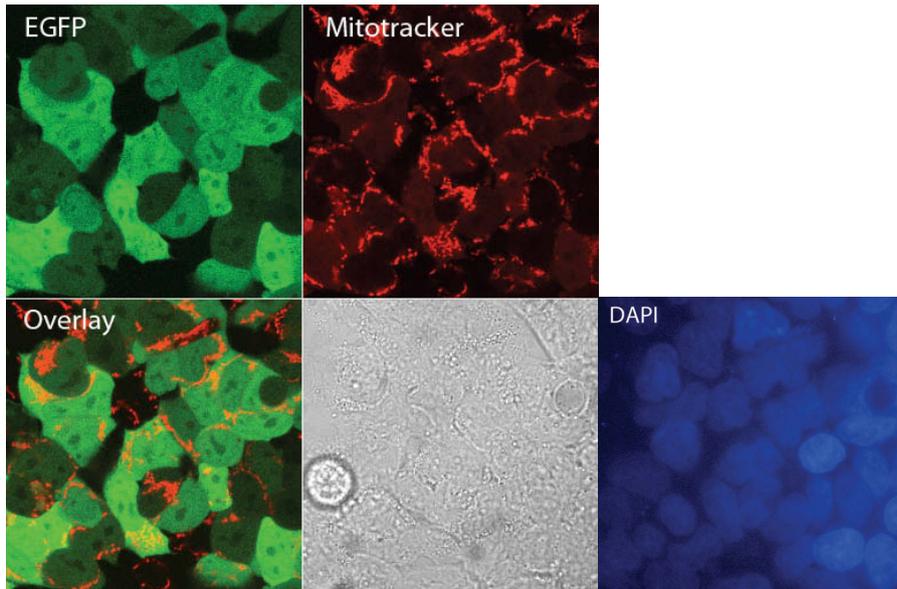


Abb. 4.10: Das Protein EGFP zeigt eine diffuse Verteilung. Konfokale Mikroskopie von 293T Zellen, die mit EGFP als Kontrolle transduziert wurden. Die Mitochondrien wurden mit MitoTracker® Red CMXRos gefärbt. Die gelbe Farbe zeigt eine Kolokalisation der anti-apoptotischen Proteine mit den Mitochondrien. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

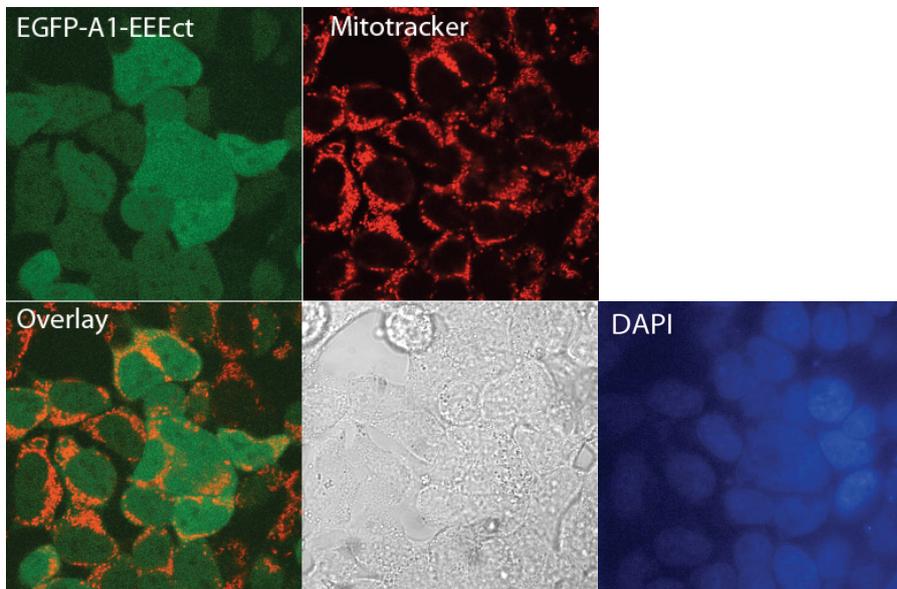


Abb. 4.11: Das Fusionsprotein EGFP-A1-EEEct zeigt eine diffuse Verteilung. Konfokale Mikroskopie von 293T Zellen, die mit einem Fusionsprotein aus EGFP und dem veränderten C-Terminus von A1 (EGFP-A1-EEEct) transduziert wurden. Die Mitochondrien wurden mit MitoTracker® Red CMXRos gefärbt. Die gelbe Farbe zeigt eine Kolokalisation der anti-apoptotischen Proteine mit den Mitochondrien. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

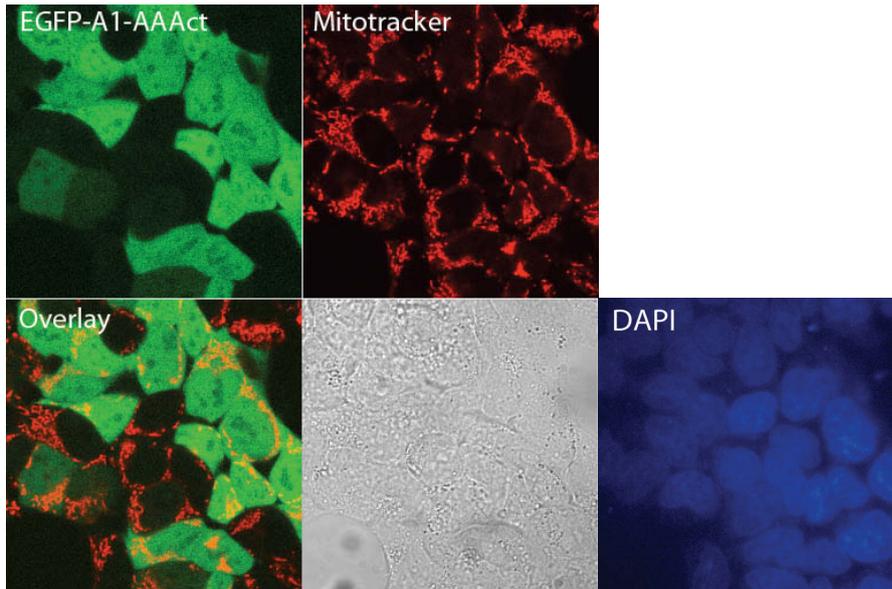


Abb. 4.12: Das Fusionsprotein EGFP-A1-AAAct zeigt eine diffuse Verteilung. Konfokale Mikroskopie von 293T Zellen, die mit einem Fusionsprotein aus EGFP und dem veränderten C-Terminus von A1 (EGFP-A1-AAAct) transduziert wurden. Die Mitochondrien wurden mit MitoTracker® Red CMXRos gefärbt. Die gelbe Farbe zeigt eine Kolokalisation der anti-apoptotischen Proteine mit den Mitochondrien. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

4.5 Gesamt A1 zeigt eine Anreicherung im Zytosol

Das C-terminale Ende von A1 vermittelt keine spezifische Lokalisierung innerhalb von 293T Zellen, wenn es an EGFP fusioniert wurde (siehe Abb. 4.7). Um zu untersuchen wie die Verteilung des Gesamtproteins A1 in der Zelle ist, stellten wir Fusionsproteine her, bei denen das Hämagglutinin-Epitop (HA) an das jeweilige Gesamtprotein fusioniert wurde. Die so entstandenen Fusionsproteine wurden mittels rekombinanter Retroviren in 293T Zellen transduziert. Zunächst wurden die Mitochondrien mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff „MitoTracker® Red CMXRos“ angefärbt. Die Zellen wurden dann fixiert, permeabilisiert und mit einem primären (Mouse Anti-HA Monoclonal Antibody, Clone 12CA5, Roche) und sekundären Antikörper (IgG, Gesamtmolekül, Eesel, Maus, IgG (H+L), polyklonal, Cy5; Dianova) markiert. Anschließend erfolgte eine Auswertung mittels konfokaler Mikroskopie. Zusätzlich wurden die Zellen mit DAPI angefärbt und die Zellen zur Darstellung der Zellkerne unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Wir verwendeten als

Kontrollen 293T Zellen, die mit dem Vektor EGZ und EYZ transduziert wurden. Als zu untersuchende Fusionsproteine wählten wir HAmA1, HAmA1-151, HAmBcl-2, HA-GATA3.

HAmA1 ist das wildtypische A1 Protein, an welches das HA-Epitop an das N-terminale Ende fusioniert wurde. Bei HAmA1-151 handelt es sich um eine Mutante von A1, bei der das C-terminale Ende um 21 Aminosäuren verkürzt wurde. In Versuchen in unserer Arbeitsgruppe (Herold et al., 2006) konnte gezeigt werden, dass das verkürzte A1 Protein eine verbesserte Stabilität im Vergleich zum Wildtyp A1 zeigt. HAmBcl-2 ist das anti-apoptotische Bcl-2 Protein an HA fusioniert. GATA3 ist ein Zinkfinger Transkriptionsfaktor, der in Vertebraten, insbesondere in hämatopoetischen Zellen, Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems, der Niere und in Trophoblasten der Plazenta exprimiert wird und im Zellkern lokalisiert ist (Yang et al., 1994).

In unseren Versuchen zeigte das Gesamtprotein A1 (HAmA1) keine spezifische Lokalisation an intrazellulären Membranen, es war wie auch das zuvor untersuchte Fusionsprotein EGFP-A1ct diffus sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu finden (siehe Abb. 4.13). Das um 21 Aminosäuren verkürzte A1 (HAmA1-151) zeigte das gleiche diffuse Verteilungsmuster wie das Wildtyp A1, jedoch war ein stärkeres Signal in den konfokalen Aufnahmen verglichen mit dem Wildtyp A1 sichtbar (siehe Abb. 4.14). Bcl-2 (HAmBcl-2) zeigte die in der Literatur und in unseren Vorversuchen mit EGFP-Bcl-2ct beschriebene Lokalisation an intrazellulären Membranen (siehe Abb. 4.15). GATA3 zeigte in unseren Versuchen eine Lokalisation im Zellkern (siehe Abb. 4.16). Jedoch stellte sich in den Kontrollfärbungen mit den reinen Vektoren EGZ und EYZ ein relativ starkes Hintergrundrauschen dar (siehe Abb. 4.17), wodurch die Lokalisation der relativ schwachen Signale von A1 (HAmA1) und dem verkürzten A1 (HAmA1-151) schwierig zu interpretieren ist.

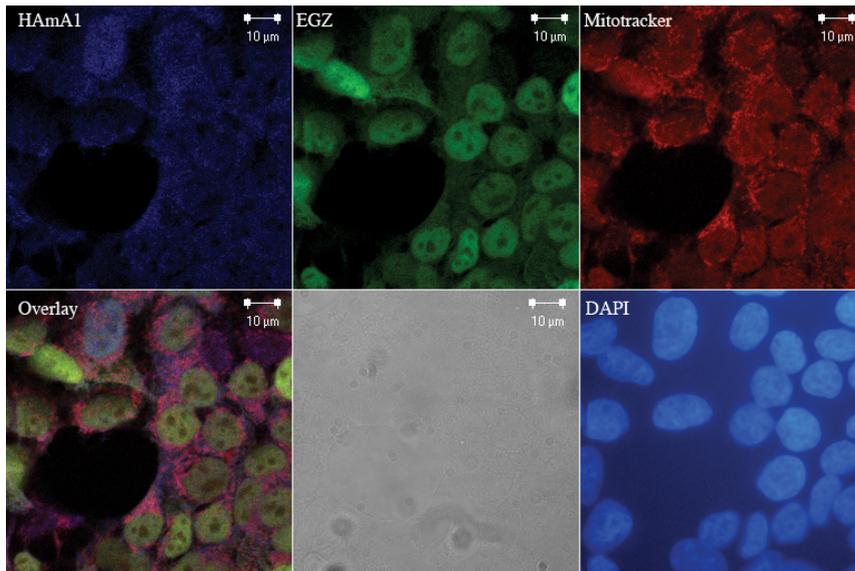


Abb. 4.13: Das anti-apoptotische Protein A1 zeigt eine diffuse Verteilung. Konfokale Mikroskopie von 293T Zellen, die mit einem Fusionsprotein aus Hämagglutinin (HA) und A1 (HAmA1) transduziert wurden. Die Zellen wurden mit einem primären anti-HA Antikörper und einem sekundären Cy5 Antikörper gefärbt. Die Mitochondrien wurden mit MitoTracker® Red CMXRos gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

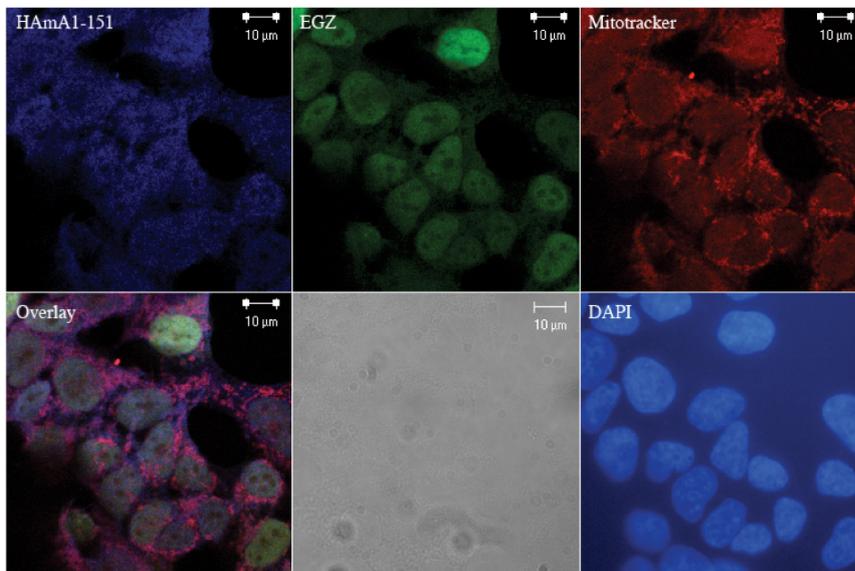


Abb. 4.14: Das um 21 Aminosäuren verkürzte anti-apoptotische Protein A1 zeigt eine diffuse Verteilung. Konfokale Mikroskopie von 293T Zellen, die mit einem Fusionsprotein aus Hämagglutinin (HA) und A1-151 (HAmA1-151) transduziert wurden. Die Zellen wurden mit einem primären anti-HA Antikörper und einem sekundären Cy5 Antikörper gefärbt. Die Mitochondrien wurden mit MitoTracker® Red CMXRos gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

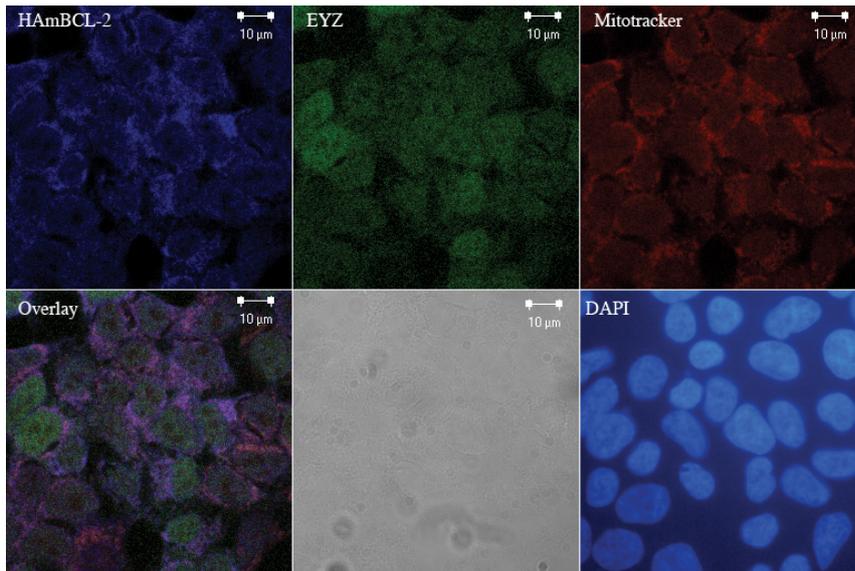


Abb. 4.15: Das anti-apoptotische Protein Bcl-2 lokalisiert an intrazelluläre Strukturen wie Kernmembran und Mitochondrien. Konfokale Mikroskopie von 293T Zellen, die mit einem Fusionsprotein Hämagglutinin (HA) und Bcl-2 (HAmBCL-2) transduziert wurden. Die Zellen wurden mit einem primären anti-HA Antikörper und einem sekundären Cy5 Antikörper gefärbt. Die Mitochondrien wurden mit MitoTracker® Red CMXRos gefärbt. Die violette Farbe zeigt eine Kolokalisation der anti-apoptotischen Proteine mit den Mitochondrien. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

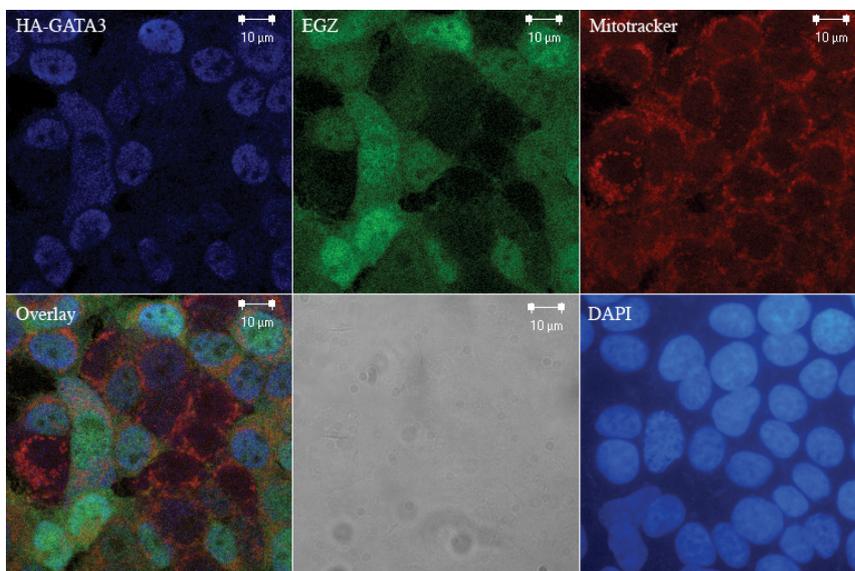


Abb. 4.16: Der Transkriptionsfaktor GATA3 zeigt eine Lokalisation im Zellkern. Konfokale Mikroskopie von 293T Zellen, die mit einem Fusionsprotein Hämagglutinin (HA) und GATA3 (HA-GATA3) transduziert wurden. Die Zellen wurden mit einem primären anti-HA Antikörper und einem sekundären Cy5 Antikörper gefärbt. Die Mitochondrien wurden mit MitoTracker® Red CMXRos gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

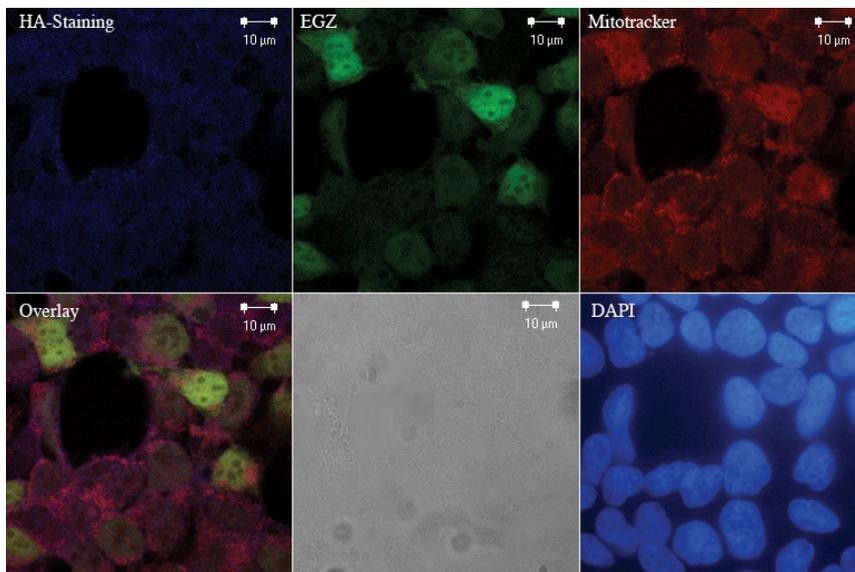
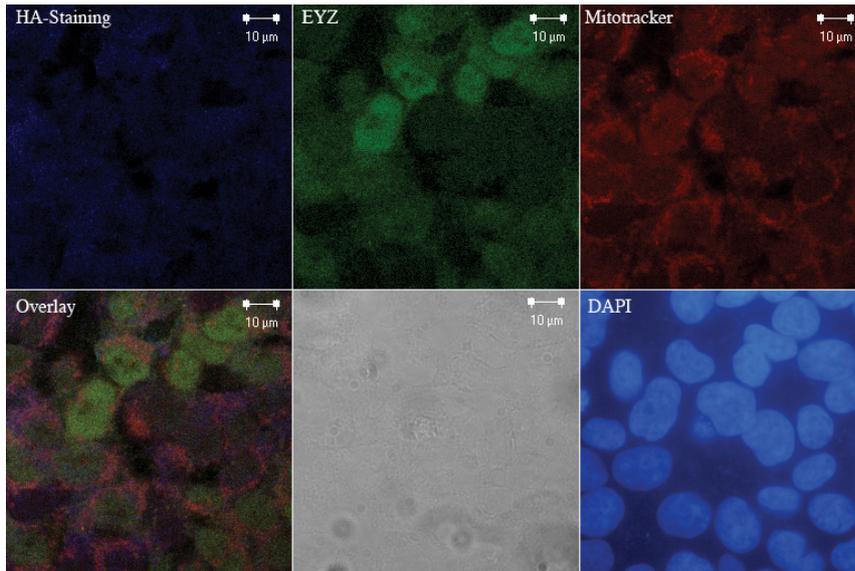


Abb. 4.17: Kontrollfärbungen mit den Vektoren EGZ und EYZ. Konfokale Mikroskopie von 293T Zellen, die mit EGZ oder EYZ transduziert wurden. Die Zellen wurden mit einem primären anti-HA Antikörper und einem sekundären Cy5 Antikörper gefärbt. Die Mitochondrien wurden mit MitoTracker® Red CMXRos gefärbt. Die violette Farbe zeigt eine Kolokalisation der anti-apoptotischen Proteine mit den Mitochondrien. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Da - wie bereits gezeigt wurde - A1 sehr instabil ist und durch den proteasomalen Abbauweg abgebaut wird, behandelten wir die Zellen vor der Anfärbung und Fixierung für 120 Minuten mit 10nmol Proteasomen Inhibitor (MG115). Unser Ziel war es, die Stabilität von HAmA1 und HAmA1-151 soweit zu erhöhen, dass eine bessere Lokalisierung durch ein stärkeres Signal bei der konfokalen Mikroskopie

möglich ist. Zusätzlich wurden die Zellen als Kontrolle mit 10µg/ml Cycloheximid behandelt.

Wie bereits in den Vorversuchen zeigte HAmA1 ohne Behandlung mit Proteasomen Inhibitor keine spezifische Verteilung in der Zelle (siehe Abb. 4.13 und Daten nicht gezeigt). Das stabilere verkürzte HAmA1-151 hatte ein stärkeres, jedoch auch unspezifisch verteiltes, Signal innerhalb der Zelle (siehe Abb. 4.14 und Daten nicht gezeigt). Jedoch zeigte sich nach einer Behandlung mit Proteasomen Inhibitor (MG 115) eine Anreicherung von HAmA1 und HAmA1-151 im Zytosol mit einer verstärkten Lokalisation an den Mitochondrien (siehe Abb. 4.18 und Abb. 4.19). Nach einer Behandlung mit CHX zeigte sich ein deutlich schwächeres Signal von HAmA1 und HAmA1-151 (Daten nicht gezeigt). HAmBCL-2 war weiterhin an intrazellulären Membranen zu finden (Daten nicht gezeigt). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass A1 unter bestimmten Bedingungen präferenziell im Zytosol zu finden ist und sich zudem an Mitochondrien anreichern kann.

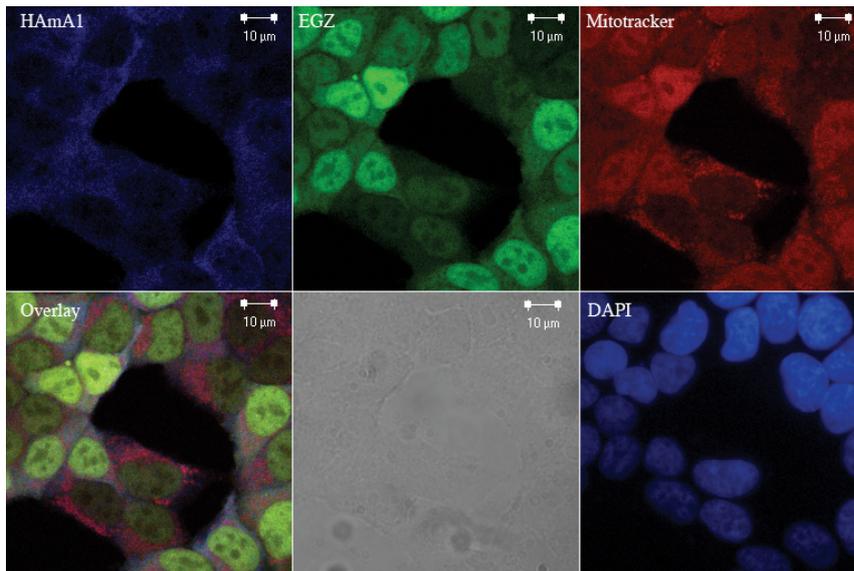


Abb. 4.18: Nach 2 Stunden Behandlung mit Proteasomen Inhibitor. Das anti-apoptotische Protein A1 lokalisiert an intrazelluläre Strukturen wie Kernmembran und Mitochondrien. Konfokale Mikroskopie von 293T Zellen, die mit einem Fusionsprotein Hämagglutinin (HA) und A1 (HAmA1) transduziert wurden. Die Zellen wurden mit einem primären anti-HA Antikörper und einem sekundären Cy5 Antikörper gefärbt. Die Mitochondrien wurden mit MitoTracker® Red CMXRos gefärbt. Die violette Farbe zeigt eine Kolokalisation der anti-apoptotischen Proteine mit den Mitochondrien. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

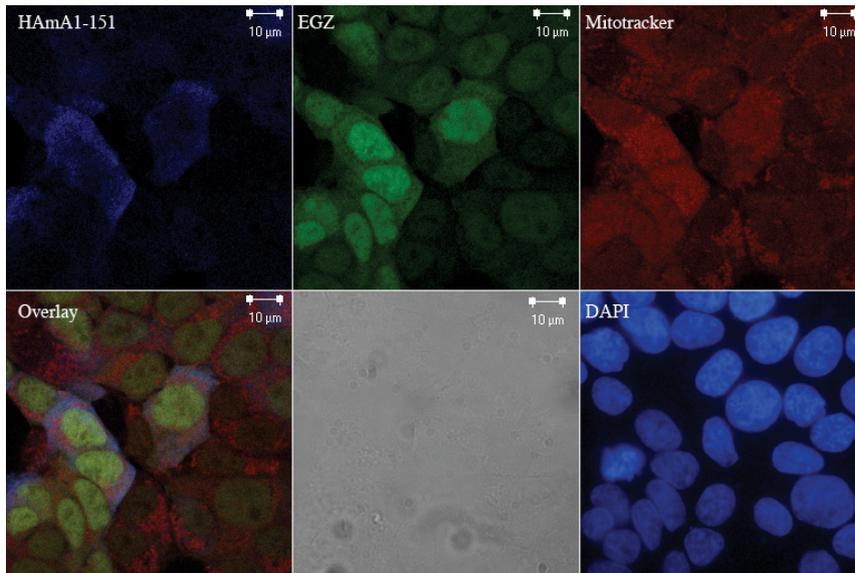


Abb. 4.19: Nach 2 Stunden Behandlung mit Proteasomen Inhibitor. Das um 21 Aminosäuren verkürzte anti-apoptotische Protein A1 lokalisiert an intrazelluläre Strukturen wie Kernmembran und Mitochondrien. Konfokale Mikroskopie von 293T Zellen, die mit einem Fusionsprotein Hämagglutinin (HA) und A1-151 (HAMA1-151) transduziert wurden. Die Zellen wurden mit einem primären anti-HA Antikörper und einem sekundären Cy5 Antikörper gefärbt. Die Mitochondrien wurden mit MitoTracker® Red CMXRos gefärbt. Die violette Farbe zeigt eine Kollokalisierung der anti-apoptotischen Proteine mit den Mitochondrien. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

5. Diskussion

Der programmierte Zelltod ist ein zentraler Mechanismus, der eine bedeutende Rolle bei Wachstum und Differenzierung von vielzelligen Organismen spielt. Die Apoptose kann durch zwei verschiedene Wege induziert werden.

Die Rezeptor-vermittelte Apoptose, über den extrinsischen Aktivierungsweg, erfolgt durch Bindung eines Liganden an einen Membranständigen Todesrezeptor.

Der zweite, intrinsische, Induktionsweg wird als Mitochondrien-abhängige Apoptose bezeichnet. Dabei kommt es zu Veränderungen an der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch im Verlauf pro-apoptotische Faktoren in das Zytosol freigesetzt werden. Die Permeabilisation der äußeren Mitochondrienmembran ist daher ein wichtiger Schritt beim Ablauf des programmierten Zelltodes. Dieser kritische Schritt wird hauptsächlich durch die Protein-Protein und Protein-Membran Interaktionen der verschiedenen Bcl-2 Familienmitglieder reguliert (Leber et al., 2007).

Zusätzlich ist das Verhältnis von pro- und anti-apoptotischen Proteinen für einen geregelten Ablauf der Apoptose von großer Bedeutung. Durch den Verlust pro-apoptotischer bzw. durch die Zunahme von anti-apoptotischen Mitgliedern kommt es zur Reduktion der Apoptoserate. Im umgekehrten Fall wird die Apoptose induziert oder der Prozess beschleunigt.

Die biologischen Funktionen der Bcl-2 Familienmitglieder sind dabei abhängig von ihrer zellulären Lokalisation. Besonders wichtig sind in dieser Hinsicht die äußere Mitochondrienmembran und das endoplasmatische Retikulum. Um an spezifische Zellorganellen lokalisieren zu können, besitzen viele Bcl-2 Proteine daher eine Transmembrandomäne in ihrem C-Terminus. (Kaufmann et al., 2003) (Ko et al., 2007)

Für das anti-apoptotische Bcl-2 Familienmitglied A1 ist keine spezifische Transmembrandomäne im C-terminalen Ende beschrieben. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der C-Terminus von A1 für sich alleine keine Fähigkeit besitzt, an spezifische intrazelluläre Membranen zu binden. Das Gesamtprotein A1

zeigte eine diffuse Verteilung innerhalb der Zelle, wobei sich nach einer Blockade des proteasomalen Abbauweges eine Verteilung zugunsten des Zytoplasmas mit Anreicherung an den Mitochondrien nachweisen ließ.

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass das C-terminale Ende von A1 für die Stabilität und für den proteasomalen Abbau des Proteins verantwortlich ist. Zusätzlich konnte die Instabilität durch Fusion der letzten 35 Aminosäuren von A1 mit EGFP auf EGFP übertragen werden. Interessanterweise wurde die Stabilität von A1 durch Mutation von Serin- und Threonin-Resten in Alanin-Reste im C-Terminus erhöht.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass der C-Terminus von A1 wichtige Funktionen wie die Stabilität vermittelt, jedoch alleine nicht ausreichend ist, um an spezifische intrazelluläre Membranen zu lokalisieren.

5.1 Der C-Terminus von A1 ist für die Instabilität verantwortlich

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus von A1 für die Instabilität und die dadurch bedingte Kurzlebigkeit des Proteins verantwortlich ist. Das in seiner ursprünglichen Form sehr stabile EGFP wird nach Fusion mit dem C-terminalen Ende von A1 deutlich destabilisiert (siehe Abb. 4.2).

Diese Ergebnisse werden durch Resultate unserer Arbeitsgruppe gestützt, in denen gezeigt werden konnte, dass durch das Anhängen des C-terminalen Endes von A1 an Bcl-2 und Caspase 3 auch eine Destabilisierung dieser Proteine erreicht werden konnte (Herold, 2005; Pelzer, 2004). Somit scheint der C-Terminus von A1 grundsätzlich ausreichend, um die Destabilisierung von Proteinen zu erreichen. Er fungiert als sogenanntes Degron.

Da wir mit unseren Ergebnissen zeigen konnten, dass A1 ein instabiles Protein ist, und dass der C-Terminus hierfür verantwortlich ist, fragten wir uns, welche Auswirkung eine Veränderung des C-terminalen Endes auf die Funktionalität von A1 hat.

Aus der Literatur ist bekannt, dass A1 in der Lage ist, Zellen vor Etoposid induzierter Apoptose zu schützen (Wang et al., 1999). In Versuchen unserer Arbeitsgruppe (Herold et al., 2006) zeigte sich, dass durch eine Mutation des C-Terminus von A1, bei der die C-terminalen Serin- und Threoninreste gegen Glutaminsäure ausgetauscht wurden, eine erhöhte Stabilität des Proteins zu beobachten war. Damit sollte eine Phosphorylierung des A1 C-Terminus nachgeahmt werden. Interessanterweise war das mutierte A1 jedoch nicht mehr in der Lage WEHI 231 Zellen vor Etoposid induzierter Apoptose zu schützen. Ähnliche Ergebnisse waren mit einer verkürzten Form von A1 (A1-151), bei der die letzten 21 Aminosäuren des C-Terminus entfernt wurden, zu erzielen. Dieses Protein zeigte eine noch deutlicher verbesserte Stabilität gegenüber Wildtyp A1, jedoch mit reduzierter anti-apoptotischer Funktion.

Aufgrund dieser Ergebnisse drängte sich als nächstes die Frage auf, ob ein mutierter C-Terminus von A1 an EGFP fusioniert einen Einfluss auf die Stabilität des chimären Proteins hat. In den im Rahmen dieser Arbeit mit EGFP-A1-EEEct durchgeführten durchflusszytomrischen Analysen zeigte das mutierte EGFP-A1-EEEct eine erhöhte Stabilität verglichen mit EGFP-A1ct (siehe Abb. 4.5).

Eine Frage die sich an diese Untersuchungen unmittelbar anschließt, betrifft den proteasomalen Abbau von A1 und welche Rolle das C-Terminale Ende von A1 dabei spielt.

5.2 Welche Rolle spielt der proteasomale Abbau von A1?

In unseren Versuchen konnte das chimäre Protein EGFP-A1ct durch eine Blockade des proteasomalen Abbaus mit *Proteasomen Inhibitor II* effizient stabilisiert werden (siehe Abb. 4.3). Hieraus lässt sich ableiten, dass A1 über die Proteasomen abgebaut wird und der C-Terminus von A1 diese proteasomale Degradation vermittelt. Dabei stellt sich die Frage, welchem Zweck dieser Abbauweg von A1 dient.

Der proteasomale Abbauweg spielt eine zentrale Rolle während des Zellzyklus, der Transkription, der Signaltransduktion und der Apoptose. Er ist der bedeutendste extra-lysosomale Abbauweg für intrazelluläre Proteine in Eukaryonten. Der

proteasomale Abbau von Proteinen spielt auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der Apoptose (Orlowski, 1999) (Jesenberger and Jentsch, 2002).

In Studien konnte gezeigt werden, dass die Proteasomen im Rahmen der Apoptose zwei grundsätzlich gegensätzliche Funktionen besitzen. Zum einen sind sie pro-apoptotisch wirksam in dem sie anti-apoptotische Proteine eliminieren. Dies geschieht besonders in frühen Stadien der Apoptose. In späteren Stadien des programmierten Zelltodes hat das Proteasom wiederum eine anti-apoptotische Funktion, indem die an der Apoptose entscheidend beteiligten Caspasen abgebaut werden (Sohn et al., 2006).

In diesem Zusammenhang könnte auch der proteasomale Abbau an der Regulation der Aktivität des anti-apoptotischen Proteins A1 beteiligt sein. Der proteasomale Abbau und die daraus resultierende Kurzlebigkeit von A1 könnten somit hohe Proteinspiegel von A1 verhindern und die Zelle dadurch schützen. Zusätzlich ergibt sich durch die Kurzlebigkeit eine bessere Steuerbarkeit der anti-apoptotischen Funktion von A1.

Weitere interessante Ergebnisse über den proteasomalen Abbau von A1 konnten in weiterführenden Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe gefunden werden. Es ist bekannt, dass Ubiquitin während des proteasomalen Abbaus kovalent an Lysinreste des Zielproteins über sogenannte E-Ligasen gebunden wird (siehe Abschnitt 1.5). Eine Mutation dieser Lysinreste kann bei kurzlebigen Proteinen zu einer verbesserten Stabilität führen (Pickart, 2001). Eine Mutation der vier Lysine des A1 C-Terminus zu Arginin hatte jedoch keinen Einfluss auf die Stabilität des Proteins. Somit scheinen die C-terminalen Lysine von A1 nicht für die Degradierung des Proteins notwendig zu sein. Diese Ergebnisse deuten, dass der C-Terminus von A1 als „Andockstation“ für bisher unbekannt E3-Ligasen fungieren könnte, um so die Polyubiquitinierung an entfernten Lysinresten innerhalb des Proteins zu vermitteln. Auch die gruppenweise Mutation aller 11 Lysine von A1 war nicht ausreichend, um eine signifikante Stabilisierung des Proteins zu erreichen (unpublished, Manuel Langer). Dies legt den Schluss nahe, dass vermutlich einige, wenn nicht sogar alle, 11 Lysine von A1 polyubiquitiniert werden können.

Nachdem wir diese spannenden Erkenntnisse über die Stabilität und den Abbau von A1 gewinnen konnten, beschäftigten wir uns als nächstes mit der Möglichkeit, A1 in der Zelle zu lokalisieren.

5.3 Der C-Terminus von A1 ist für eine Lokalisation nicht ausreichend

Neben den bereits beschriebenen BH-Regionen besitzen viele Bcl-2 Familienmitglieder eine C-terminale hydrophobe Domäne, welche die Membranlokalisation vermittelt. Bei Bcl-2 konnte eine Lokalisation an der äußeren Mitochondrienmembran gezeigt werden, und es wird angenommen, dass diese Lokalisation eine wichtige Rolle im Rahmen der Apoptose spielt, da es das anti-apoptotische Potential des Proteins beeinflusst (Green and Reed, 1998).

Im Gegensatz zu den anti-apoptischen Proteinen der Bcl-2 Familie wie Bcl-2 und Bcl-x_L, sind viele pro-apoptische Bcl-2 Familienmitglieder im Zytosol der Zelle zu finden und wandern erst bei Aktivierung an die mitochondriale Membran (Petros et al., 2004).

Über die genaue Lokalisation des in dieser Arbeit untersuchten anti-apoptischen Proteins A1 gibt es widersprüchliche Befunde. Unumstritten ist, dass die von anderen Bcl-2 Familienmitgliedern bekannte hydrophobe Transmembrandomäne im Fall von A1 durch geladene Aminosäuren unterbrochen ist (Kaufmann et al., 2003). Duriez et al. konnten mittels Elektronenmikroskopie eine vorwiegende Lokalisation an mitochondrialen Membranen nachweisen (Duriez et al., 2000). In Arbeiten durch Somogyi et al. hingegen wurde mittels subzellulärer Fraktionierung und Immunfluoreszenz-Mikroskopie eine Lokalisation im Zellkern angegeben (Somogyi et al., 2001).

Vor dem Hintergrund dieser widersprüchlichen Daten haben wir mittels konfokaler Lasermikroskopie die Lokalisierungseigenschaften des A1 C-Terminus untersucht.

In unseren Versuchen war das C-terminale Ende von A1 fusioniert an EGFP nicht in der Lage, das chimäre Protein EGFP-A1ct an bestimmte intrazelluläre Strukturen zu lokalisieren (siehe Abb. 4.7). Im Gegensatz dazu konnten die Fusionsproteine EGFP-

Bcl-x_Lct und EGFP-Bcl-2ct, die als Kontrolle verwendet wurden und wie in anderen Arbeiten gezeigt, an die Mitochondrienmembran (siehe Abb. 4.9) bzw. an intrazelluläre Membranen binden (siehe Abb. 4.8). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass das C-terminale Ende von A1 für sich alleine keine Lokalisationsfunktion besitzt.

In weiterführenden Experimenten in unserer Arbeitsgruppe wurde die Lokalisation von Bfl-1 näher untersucht (Rosendahl, 2009). Bfl-1 ist das humane Homologon zu dem murinen A1. Die Proteine sind zu 72% in ihrer Aminosäuresequenz identisch (Choi et al., 1995). Die Sequenz der C-terminalen Enden von A1 und Bfl-1 ist abgesehen von einigen wenigen Aminosäuren konserviert. jedoch finden sich am C-Terminus von Bfl-1 im Gegensatz zu A1 noch drei zusätzliche Aminosäuren (Glutamin, Tyrosin und Cystein).

In den Arbeiten von Alva Rosendahl konnte gezeigt werden, dass ein Fusionsprotein aus EGFP und dem C-terminalen Ende von Bfl-1 (EGFP-hBfl-1ct) eine Kolo-kalisation mit Mitochondrien und Kernmembran aufweist, woraus geschlossen wurde, dass das C-terminale Ende von Bfl-1 ausreichend ist, um eine Membranlokalisation zu vermitteln. Unterstützt wird diese Beobachtung durch Arbeiten von Yang et al., die zeigen, dass eine Übertragung des C-terminalen Endes von Bfl-1 auf EGFP eine mitochondriale Lokalisation vermittelt (Yang et al., 2005). Somit scheinen die leichten Unterschiede des C-terminalen Endes von A1 im Vergleich zu Bfl-1 schon ausreichend zu sein, um eine Lokalisationsfunktion des C-terminalen Endes von A1 zu verhindern. Da das gesamte A1 allerdings unter bestimmten Bedingungen aber an Mitochondrien zu finden war, scheinen Bereiche außerhalb des C-Terminus die Lokalisierung in der Zelle zu beeinflussen.

Unsere Lokalisationsstudien mittels konfokaler Mikroskopie beruhten auf einer Fusion der C-Termini der zu analysierenden Proteine mit EGFP. Die Markierung von Proteinen mit EGFP ist eine bewährte Methode, um intrazelluläre Proteine darzustellen (Sadowski et al., 2008). Bei GFP handelt es sich um ein 238 Aminosäuren großes Protein (Heim et al., 1995). Durch Verwendung eines Proteins dieser Größe ergeben sich jedoch auch Nachteile. EGFP kann aufgrund seiner Struktur und Größe eine korrekte Faltung der markierten Proteine verhindern, und so

eine Lokalisierung der chimären Proteine an intrazelluläre Membranen unterbinden. Jedoch konnten in unseren Versuchen die chimären Proteine EGFP-Bcl-2ct und EGFP-Bcl-x_Lct suffizient eine Lokalisierung an intrazelluläre Membranen vermitteln. Somit kann davon ausgegangen werden, dass EGFP nicht mit den Lokalisationseigenschaften der von uns untersuchten Proteine zu interferieren scheint.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das C-terminale Ende von A1 keine Lokalisierung an spezifische Membranen innerhalb der Zelle vermittelt. Es scheinen noch andere Bereiche des N-terminalen Endes für die Lokalisation wichtig zu sein. Daher beschäftigten sich unsere nächsten Versuche mit der Lokalisierung des Gesamtproteins A1.

5.4 Gesamt A1 reichert sich im Zytosol an

Um der Frage nach der Lokalisierung des Gesamtproteins A1 nachzugehen, versuchten wir A1 mittels Antikörpermarkierung in der konfokalen Mikroskopie nachzuweisen. Wie in Abbildung 4.13 zu ersehen ist, hatte das Gesamtprotein A1 keine spezifische Lokalisierung innerhalb von 293T Zellen gezeigt, es war diffus im Zytoplasma und Zellkern verteilt.

Bei den Anfärbungen mit anti-HA Antikörper war eine relativ starke unspezifische Färbung bei den Vektorkontrollen (EGZ und EYZ) als Hintergrundrauschen zu erkennen (siehe Abb. 4.17). Obwohl die Färbungen von A1 ein deutlich stärkeres Signal in der konfokalen Mikroskopie lieferten, ist dadurch bei den schwachen Signalen des kurzlebigen Proteins A1 eine genaue Lokalisation in der Zelle schwierig. Durch die Blockierung des proteasomalen Abbauweges konnte die Stabilität von A1 jedoch erhöht werden und eine Verteilung zugunsten des Zytoplasmas mit Anreicherung an den Mitochondrien nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.18).

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe, in denen nachgewiesen werden konnte, dass ein chimäres Protein bestehend aus

EGFP und wildtypischen Gesamtprotein A1 (EGFP-FmA1) an mitochondriale Membranen von 293T und HeLa Zellen binden konnte (Rosendahl, 2009). In diesen Versuchen wurden die Mitochondrien mit MitoTracker® CMX Ros angefärbt und die Zellen mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Auch ein Fusionsprotein aus dem humanen Homologen Bfl-1 und EGFP konnte in diesen Arbeiten an Mitochondrien lokalisieren.

Somit scheint sich A1 in der Zelle sowohl im Zytoplasma als auch an den Mitochondrien zu befinden. Doch wie liegt diese Lokalisation mit der Funktionalität von A1 zusammen? Ein möglicher Erklärungsversuch für diese zytoplasmatische als auch mitochondriale Distribution in der Zelle kann sein, dass A1 im Zytoplasma lokalisiert ist, und erst im Rahmen seiner anti-apoptotischen Aktivität an die Mitochondrien dirigiert wird.

In der Literatur ist eine Interaktion von A1 mit verschiedenen pro-apoptotischen Mitgliedern beschrieben (Chen et al., 2005) (Willis et al., 2007). In Arbeiten von Chen et al. konnte gezeigt werden, dass A1 und andere anti-apoptotische Proteine der Bcl-2 Familie die Fähigkeit besitzen, verschiedene pro-apoptotische Proteine wie Bim, Puma, Bad und Noxa zu binden. Die pro-apoptotischen Proteine binden dabei in eine hydrophobe Grube, die durch die BH1, BH2 und BH3 Domänen der pro-apoptotischen Proteine gebildet wird (Liu et al., 2003; Petros et al., 2000).

Die Interaktion von Bim und A1 wurde in unserer Arbeitsgruppe durch Marco Herold näher analysiert (Herold, 2005). In den Versuchen zeigte sich in Western Blot Analysen eine Verteilung von A1 sowohl an den Membranen als auch im Zytoplasma von 293T Zellen. Interessanterweise kam es bei gleichzeitiger Expression von A1 und Bim zu einer Umverteilung von A1 zugunsten der Membranen. Auch eine verkürzte Form von A1, bei der der A1 C-Terminus um 17 Aminosäuren verkürzt wurde, zeigte diese Umverteilung in Anwesenheit von Bim.

Diese Ergebnisse stützen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass A1 sowohl im Zytoplasma als auch an intrazellulären Membranen wie Mitochondrien lokalisiert ist. Diese Lokalisierungseigenschaften von A1 sind unabhängig vom C-terminalen Ende von A1.

In dieser Arbeit wurden zahlreiche Belege erbracht, die die Bedeutung des C-terminalen Endes für die Stabilität und für die Verteilung des Proteins in der Zelle unterstreichen. Sie alle stützen die Hypothese, dass dieser Teil des Proteins entscheidend zu seinem anti-apoptischen Potential beiträgt.

6. Zusammenfassung

In multizellulären Organismen ist die Apoptose, eine Art des programmierten Zelltods, ein hoch spezifischer, natürlicher Prozess um unerwünschte, überschüssige oder beschädigte Zellen auf einem geordneten, nicht entzündlichen, Weg zu beseitigen. Auch im menschlichen Körper werden täglich Milliarden an Zellen durch Apoptose abgebaut. Dadurch kann der Organismus die Zellzahl und Gewebegröße regulieren.

Eine Fehlregulation der Apoptose kann weitreichende Konsequenzen haben. Während es bei einer unzureichenden Apoptose zu Autoimmunität und Tumoren kommen kann, führt ein gesteigerter Zelltod zu Immunschwäche oder akuten und chronischen degenerativen Erkrankungen. Aus diesem Grund ist die Erforschung der genauen Regulation des programmierten Zelltods von großer Bedeutung.

Die Mitochondrien spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation des programmierten Zelltods. Während des Ablaufs der Apoptose kommt es zur Freisetzung von Mediatoren der Apoptose aus diesen Organellen. Diese Moleküle sind dann an der Aktivierung von Caspasen beteiligt, welche die Degradation von Proteinen und als Folge davon der DNA bewerkstelligen. Die Proteine der Bcl-2 Familie, zu der pro- und anti-apoptotische Mitglieder gehören, kontrollieren die Integrität der Mitochondrien hauptsächlich durch Protein-Protein und Protein-Membran Interaktionen. Viele anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie sind mittels einer C-terminalen Transmembrandomäne in der Lage an die äußere Mitochondrienmembran zu binden. A1, ein anti-apoptotisches Mitglied dieser Proteinfamilie, besitzt allerdings keine typische Transmembrandomäne. Die Funktion und Lokalisation des Proteins werden sehr kontrovers diskutiert. Daher ist das Ziel dieser Arbeit, die Lokalisation und Funktion von A1 zu analysieren. Um ein umfassendes Bild zu bekommen, wandten wir gentechnische Methoden zur Modifizierung des A1 C-Terminus an. Die intrazelluläre Lokalisation des Proteins wurde mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Die Bedeutung des proteasomalen Abbaus von A1 wurde schließlich durch Inhibitionsexperimente charakterisiert.

Durch eine Fusion des C-terminalen Endes von A1 mit dem „enhanced green fluorescent protein“ haben wir die Funktion und Lokalisierungseigenschaften des A1 C-terminus mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Mikroskopie untersucht. Wir konnten zeigen, dass das C-terminale Ende das so entstandene chimäre Protein deutlich destabilisieren konnte. Eine Blockade des proteasomalen Abbaus führte zu einer Stabilisierung des Fusionsproteins. Des Weiteren konnte in der konfokalen Mikroskopie eine diffuse Verteilung des chimären Proteins in 293T Zellen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das C-terminale Ende von A1 keine Lokalisation an spezifische intrazelluläre Organellen vermitteln kann, jedoch für die Instabilität und den proteasomalen Abbau des Proteins verantwortlich ist.

Eine Analyse der Lokalisation des Gesamtproteins A1 in 293T Zellen mittels konfokaler Mikroskopie konnte eine Verteilung von A1 zugunsten des Zytoplasmas mit Anreicherung an den Mitochondrien nachweisen. Obwohl das C-terminale Ende von A1 für sich keine spezifische intrazelluläre Lokalisation vermittelt, zeigte das Protein eine Kolokalisation an den Mitochondrien. Somit scheinen noch andere N-terminale Bereiche des Proteins an der Lokalisation von A1 beteiligt zu sein.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass der C-Terminus von A1 eine wichtige Rolle für die Stabilität des anti-apoptischen Bcl-2 Familienmitglieds spielt.

6. Summary

In multicellular organisms, apoptosis (one kind of programmed cell death) is a highly regulated natural process that can remove unwanted, redundant, or damaged cells in an orderly non-inflammatory way. In a typical human being, billions of cells undergo apoptosis every day. That way the organism can control the cell number and the size of a tissue.

A dysregulation of apoptosis can have extensive consequences. While insufficient apoptosis can manifest as autoimmunity or cancer, accelerated cell death can lead to immunodeficiency or acute and chronic degenerative diseases. Therefore, analysis of apoptosis is of great importance.

Mitochondria play a key role in the regulation of cell death. In the progress of apoptosis, mediators of apoptosis can be released from these organelles. These mediators then participate in the activation of caspases, enzymes that degrade proteins and as a consequence regulate the degradation of DNA. Proteins of the Bcl-2 family consisting of pro- and anti-apoptotic members, control the integrity of the mitochondria mainly by protein-protein and protein-membrane interactions. Many anti-apoptotic members of the Bcl-2 family are able to bind to the outer mitochondrial membrane by a C-terminal transmembrane domain. A1, an anti-apoptotic member of this protein family, lacks this typical transmembrane domain. Function and localization of this protein are discussed very controversially. Therefore, the aim of this thesis was to analyze the localization and function of A1. The intracellular distribution of various versions of genetically modified A1 proteins was analyzed by confocal microscopy. Eventually, the contribution of the proteasomal degradation pathway in regulating the amount of A1 inside cells was investigated by applying relevant inhibitors.

By fusing the C-terminal end of A1 to the enhanced green fluorescent protein, we analyzed the function and localization features of the A1 C-terminus by confocal microscopy and flow-cytometry. We could show that the C-terminal end of A1 made the chimeric protein very unstable. Treating the cells with a proteasomal inhibitor lead to a stabilization of the fusion protein. Furthermore the chimeric protein showed a

diffuse distribution in 293T cells. These results indicate that the C-terminus of A1 is not sufficient to mediate localization to special intracellular organelles, but is responsible for the instability and proteasomal degradation of the protein.

By analyzing the localization of the full length protein A1 in 293T cells by confocal microscopy we could demonstrate that A1 is mainly found in the cytosol with accumulation at the mitochondria. As the C-terminus of A1 by itself was not sufficient for specific intracellular targeting of the protein, other N-terminal regions of A1 seem to contribute in targeting the protein to these organelles.

Taken together, we could show that the C-terminus of A1 plays an important role for the stability of this anti-apoptotic Bcl-2 family member.

7.1 Literaturverzeichnis

Adams, J. M., and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.

Bae, J., Hsu, S. Y., Leo, C. P., Zell, K., and Hsueh, A. J. (2001). Underphosphorylated BAD interacts with diverse antiapoptotic Bcl-2 family proteins to regulate apoptosis. *Apoptosis* 6, 319-330.

Barbe, L., Lundberg, E., Oksvold, P., Stenius, A., Lewin, E., Bjorling, E., Asplund, A., Ponten, F., Brismar, H., Uhlen, M., and Andersson-Svahn, H. (2008). Toward a confocal subcellular atlas of the human proteome. *Mol Cell Proteomics* 7, 499-508.

Call, J. A., Eckhardt, S. G., and Camidge, D. R. (2008). Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. *Lancet Oncol* 9, 1002-1011.

Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., Colman, P. M., Day, C. L., Adams, J. M., and Huang, D. C. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17, 393-403.

Choi, S. S., Park, I. C., Yun, J. W., Sung, Y. C., Hong, S. I., and Shin, H. S. (1995). A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene* 11, 1693-1698.

Ciechanover, A. (2005). Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 79-87.

Cory, S., and Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.

Danial, N. N., and Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.

Duriez, P. J., Wong, F., Dorovini-Zis, K., Shahidi, R., and Karsan, A. (2000). A1 functions at the mitochondria to delay endothelial apoptosis in response to tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 275, 18099-18107.

Glickman, M. H., and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428.

Green, D. R., and Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.

Hatakeyama, S., Hamasaki, A., Negishi, I., Loh, D. Y., Sendo, F., and Nakayama, K. (1998). Multiple gene duplication and expression of mouse bcl-2-related genes, A1. *Int Immunol* 10, 631-637.

Heim, R., Cubitt, A. B., and Tsien, R. Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature* 373, 663-664.

Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.

Herold, M. (2005), Promotionsarbeit, Würzburg, 97078 Würzburg.

Herold, M. J., Zeitz, J., Pelzer, C., Kraus, C., Peters, A., Wohlleben, G., and Berberich, I. (2006). The stability and anti-apoptotic function of A1 are controlled by its C terminus. *J Biol Chem* 281, 13663-13671.

Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., and O'Shea, E. K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691.

Jesenberger, V., and Jentsch, S. (2002). Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 112-121.

Kapuscinski, J. (1995). DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem* 70, 220-233.

Kaufmann, T., Schlipf, S., Sanz, J., Neubert, K., Stein, R., and Borner, C. (2003). Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* 160, 53-64.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.

Kerridge, D. (1958). The effect of actidione and other antifungal agents on nucleic acid and protein synthesis in *Saccharomyces carlsbergensis*. *J Gen Microbiol* 19, 497-506.

Ko, J. K., Choi, K. H., Pan, Z., Lin, P., Weisleder, N., Kim, C. W., and Ma, J. (2007). The tail-anchoring domain of Bfl1 and HCCS1 targets mitochondrial membrane permeability to induce apoptosis. *J Cell Sci* 120, 2912-2923.

Leber, B., Lin, J., and Andrews, D. W. (2007). Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis* 12, 897-911.

Lee, H. C., and Wei, Y. H. (2007). Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* 232, 592-606.

Li, J., and Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27, 6194-6206.

Lin, E. Y., Orlofsky, A., Berger, M. S., and Prystowsky, M. B. (1993). Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J Immunol* 151, 1979-1988.

- Liu, X., Dai, S., Zhu, Y., Marrack, P., and Kappler, J. W. (2003). The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunity* 19, 341-352.
- Nguyen, M., Millar, D. G., Yong, V. W., Korsmeyer, S. J., and Shore, G. C. (1993). Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem* 268, 25265-25268.
- Opferman, J. T., and Korsmeyer, S. J. (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol* 4, 410-415.
- Orlowski, R. Z. (1999). The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 303-313.
- Pegoraro, L., Palumbo, A., Erikson, J., Falda, M., Giovanazzo, B., Emanuel, B. S., Rovera, G., Nowell, P. C., and Croce, C. M. (1984). 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* 81, 7166-7170.
- Pelzer, C. (2004), Diplomarbeit, Würzburg, 97078 Würzburg.
- Penaloza, C., Lin, L., Lockshin, R. A., and Zakeri, Z. (2006). Cell death in development: shaping the embryo. *Histochem Cell Biol* 126, 149-158.
- Petros, A. M., Nettesheim, D. G., Wang, Y., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Mack, J., Swift, K., Matayoshi, E. D., Zhang, H., Thompson, C. B., and Fesik, S. W. (2000). Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. *Protein Sci* 9, 2528-2534.
- Petros, A. M., Olejniczak, E. T., and Fesik, S. W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* 1644, 83-94.
- Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70, 503-533.
- Platt, N., da Silva, R. P., and Gordon, S. (1998). Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol* 8, 365-372.
- Rosendahl, A. (2009), Diplomarbeit, Würzburg, 97078 Würzburg.
- Sadowski, P. G., Groen, A. J., Dupree, P., and Lilley, K. S. (2008). Sub-cellular localization of membrane proteins. *Proteomics* 8, 3991-4011.
- Schinzl, A., Kaufmann, T., and Borner, C. (2004). Bcl-2 family members: integrators of survival and death signals in physiology and pathology [corrected]. *Biochim Biophys Acta* 1644, 95-105.
- Siegel, M. R., and Sisler, H. D. (1963). Inhibition of Protein Synthesis in Vitro by Cycloheximide. *Nature* 200, 675-676.
- Simmons, M. J., Fan, G., Zong, W. X., Degenhardt, K., White, E., and Gelinas, C. (2008). Bfl-1/A1 functions, similar to Mcl-1, as a selective tBid and Bak antagonist. *Oncogene* 27, 1421-1428.

Sohn, D., Totzke, G., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K., Levkau, B., and Janicke, R. U. (2006). The proteasome is required for rapid initiation of death receptor-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 26, 1967-1978.

Somogyi, R. D., Wu, Y., Orlofsky, A., and Prystowsky, M. B. (2001). Transient expression of the Bcl-2 family member, A1-a, results in nuclear localization and resistance to staurosporine-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 8, 785-793.

Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E. E., Griffiths, J. C., Romano, G., Kingsman, S. M., and Kingsman, A. J. (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res* 23, 628-633.

Spanos, S., Rice, S., Karagiannis, P., Taylor, D., Becker, D. L., Winston, R. M., and Hardy, K. (2002). Caspase activity and expression of cell death genes during development of human preimplantation embryos. *Reproduction* 124, 353-363.

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.

Tsujimoto, Y., Finger, L. R., Yunis, J., Nowell, P. C., and Croce, C. M. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226, 1097-1099.

Wang, C. Y., Guttridge, D. C., Mayo, M. W., and Baldwin, A. S., Jr. (1999). NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 19, 5923-5929.

Werner, A. B., de Vries, E., Tait, S. W., Bontjer, I., and Borst, J. (2002). Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit its collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax. *J Biol Chem* 277, 22781-22788.

Willis, S. N., Fletcher, J. I., Kaufmann, T., van Delft, M. F., Chen, L., Czabotar, P. E., Ierino, H., Lee, E. F., Fairlie, W. D., Bouillet, P., *et al.* (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315, 856-859.

Wojcik, C. (1999). Proteasomes in apoptosis: villains or guardians? *Cell Mol Life Sci* 56, 908-917.

Yang, W. S., Ko, J. K., Park, S. O., Choi, H. Y., Kim, Y. N., and Kim, C. W. (2005). C-terminal region of Bfl-1 induces cell death that accompanies caspase activation when fused with GFP. *J Cell Biochem* 94, 1234-1247.

Yang, Z., Gu, L., Romeo, P. H., Bories, D., Motohashi, H., Yamamoto, M., and Engel, J. D. (1994). Human GATA-3 trans-activation, DNA-binding, and nuclear localization activities are organized into distinct structural domains. *Mol Cell Biol* 14, 2201-2212.

Zimmermann, K. C., Bonzon, C., and Green, D. R. (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 92, 57-70.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CHX	Cycloheximid
CMV	Cytomegalivirus
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP's	Desoxyribonucleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGZ	enhanced green fluorescent/ zeozin protein
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
EYZ	enhanced yellow fluorescent/ zeozin protein
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer
FCS	fötales Kälberserum
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HA	Hämagglutinin
HEK	humanes embryonales Nierenzellkarzinom
Ig	Immunglobulin
IRES	internal ribosomal entry site
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	Long terminal repeat
MCS	Multiple Cloning Site
min	Minute(n)
PBS	phosphate buffered saline

RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ub	Ubiquitin

7.3 Abbildungs-/Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Drei Subgruppen der Bcl-2 Familienmitglieder.	4
Abb. 1.2: Darstellung des proteasomalen Abbaus.	7
Abb. 1.3: Aufbau eines konfokalen Lasermikroskops.	9
Abb.2.1: Aminosäuresequenz vom A1 C-Terminus der Maus.	17
Abb. 4.1: Darstellung der anti-apoptischen Proteine A1 und Bcl-2 und der chimären Proteine EGFP-A1ct und EGFP-Bcl-2ct.	30
Abb. 4.2: EGFP-A1ct wird durch eine Behandlung mit Cycloheximid (CHX) destabilisiert.	31
Abb. 4.3: EGFP-A1ct wird durch eine Behandlung mit Proteasomen Inhibitor („Proteasomen Inhibitor II“) stabilisiert.	32
Abb. 4.4: Darstellung des Fusionsproteins EGFP-A1ct mit den veränderten Aminosäuren der mutierten Fusionsproteine EGFP-A1-EEEct und EGFP-A1-AAAct.	34
Abb. 4.5: EGFP-A1-EEEct, nicht jedoch EGFP-A1-AAAct, zeigt eine verbesserte Stabilität im Vergleich zu EGFP-A1ct nach einer Behandlung mit Cycloheximid (CHX).	34
Abb. 4.6: EGFP-A1-EEEct und EGFP-A1-AAAct werden wie EGFP-A1ct durch eine Behandlung mit Proteasomen Inhibitor („Proteasomen Inhibitor II“) destabilisiert. WEHI 231 Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert.	35
Abb. 4.7: Das Fusionsprotein EGFP-A1ct zeigt eine diffuse Verteilung.	37
Abb. 4.8: Das Fusionsprotein EGFP-Bcl-2ct lokalisiert an intrazelluläre Strukturen wie Kernmembran und ER.	38
Abb. 4.9: Das Fusionsprotein EGFP-Bcl-x _L ct lokalisiert an die Mitochondrienmembran.	38
Abb. 4.10: Das Protein EGFP zeigt eine diffuse Verteilung.	39
Abb. 4.11: Das Fusionsprotein EGFP-A1-EEEct zeigt eine diffuse Verteilung.	39
Abb. 4.12: Das Fusionsprotein EGFP-A1-AAAct zeigt eine diffuse Verteilung.	40
Abb. 4.13: Das anti-apoptische Protein A1 zeigt eine diffuse Verteilung.	42
Abb. 4.14: Das um 21 Aminosäuren verkürzte anti-apoptische Protein A1 zeigt eine diffuse Verteilung.	42

Abb. 4.15: Das anti-apoptische Protein Bcl-2 lokalisiert an intrazelluläre Strukturen wie Kernmembran und Mitochondrien.	43
Abb. 4.16: Der Transkriptionsfaktor GATA3 zeigt eine Lokalisation im Zellkern.....	43
Abb. 4.17: Kontrollfärbungen mit den Vektoren EGZ und EYZ.....	44
Abb. 4.18: Nach 2 Stunden Behandlung mit Proteasomen Inhibitor. Das anti-apoptische Protein A1 lokalisiert an intrazelluläre Strukturen wie Kernmembran und Mitochondrien.....	45
Abb. 4.19: Nach 2 Stunden Behandlung mit Proteasomen Inhibitor. Das um 21 Aminosäuren verkürzte anti-apoptische Protein A1 lokalisiert an intrazelluläre Strukturen wie Kernmembran und Mitochondrien.....	46

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Darstellung der generierten Plasmide.....	17
Tab. 2.2: Darstellung weiterer verwendeter Plasmide.	18
Tab. 2.3: Darstellung der Primer der generierten Plasmide.....	18

Danksagung

Zum Gelingen einer Promotionsarbeit tragen viele Personen und Gegebenheiten bei. Während meines Studiums in Würzburg habe ich frühzeitig Kontakt zum Institut für Virologie und Immunbiologie von Professor Thomas Hünig bekommen. In dem sehr stimulierenden Umfeld des Graduiertenkollegs „Immunmodulation“ durfte ich meine Promotionsarbeit erstellen.

Zu besonderem Dank bin ich meinem unmittelbaren Betreuer Priv.-Doz. Dr. Ingolf Berberich verpflichtet, der mir das Thema gegeben hat und in allen Phasen meiner Arbeit immer für mich ansprechbar war.

Unmittelbar bei der Durchführung meiner Experimente habe ich von zahlreichen Personen wesentliche Unterstützung erhalten. Nennen möchte ich hier insbesondere die technischen Mitarbeiterinnen Chris Kraus und Andrea Peters. Bei der für meine Promotionsarbeit zentralen Methode der konfokalen Mikroskopie hat mich Dr. Harry Harms grundlegend unterstützt. Bei meiner täglichen Arbeit an der „bench“ und auch bei einer ersten Durchsicht meiner Arbeit war Dr. Marco Herold ein ganz wichtiger Ansprechpartner. Allen diesen Personen bin ich zu großem Dank verpflichtet.

Die vielfältige Unterstützung während meines Studiums und die erste Motivation zur Auseinandersetzung mit wissenschaftlichen Fragestellungen in meinem Elternhaus waren wesentliche Voraussetzungen für diese Arbeit. Hierfür danke ich meinen Eltern ganz besonders.

Lebenslauf

Jonas Zeitz

Luisenstrasse 33

CH-8005 Zürich

Geboren: 03.02.1979 in Berlin

Eltern:

Univ.-Prof. Dr. med. Martin Zeitz

Physiotherapeutin Margot Zeitz

Schulbildung:

1985-1987 Wheaton Woods Elementary School, Rockville Maryland USA

1987-1993 John F. Kennedy School, Berlin-Zehlendorf, Deutsch-
Amerikanische Gemeinschaftsschule

1993-1999 Christian von Mannlich Gymnasium, Naturwissenschaftlicher
Zweig, Homburg/Saar mit Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst:

Vom 02.08.1999 bis 30.06.2000, Klinik für Innere Medizin I der
Universitätskliniken des Saarlandes

Studium:

Wintersemester 2000/2001-2007: Studium der Humanmedizin an der Julius-
Maximilians-Universität Würzburg

23.11.2007 Abschluss des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung mit
Erlangung der Approbation als Arzt

Berufliche Tätigkeiten:

01.02.2008-31.07.2008: Wissenschaftlicher Assistent an der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg

seit 01.09.2008: Assistenzarzt an der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie, UniversitätsSpital Zürich