

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. rer. nat. Thomas Hünig

Analyse der Instabilität und Funktionalität des Anti- Apoptose-Proteins A1

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Manuel Langer
aus Wending

Würzburg, Oktober 2009

Referent: Privatdozent Dr. Ingolf Berberich
Koreferent: Professor Dr. med. Paul-Gerhardt Schlegel
Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2010

Der Promovend ist Arzt.

Für meine Tante Cornelia und meinen Onkel Herbert

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Grundlagen und Bedeutung der Apoptose	1
1.1.1 Medizinische Bedeutung der Apoptose	2
1.1.2 Molekularbiologische Grundlagen der Apoptose	3
1.2 Die Regulationsfunktion der Bcl-2-Familie bei der Apoptose	4
1.3 Das anti-apoptotische-Bcl-2-Familienmitglied A1	7
1.4 Der Ubiquitin-Proteasomen-Weg	9
1.4.1 Der Ubiquitin-Proteasomen-Weg bei der Apoptose	9
1.4.2 Die Ubiquitin-E3-Ligase(komplexe)	12
1.5 Ausgangspunkt und Ziel der Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Materialien	15
2.1.1 Antibiotika	15
2.1.2 Antikörper	15
2.1.3 Bakterien	15
2.1.4 Chemikalien	15
2.1.5 Enzyme	16
2.1.6 Filmmaterial	16
2.1.7 Inhibitoren	16
2.1.8 Kits	17
2.1.9 Medien	17
2.1.10 Oligonukleotide	18
2.1.11 Plasmide und Vektoren	18
2.1.12 Puffer und Lösungen	22
2.1.13 Zelllinien	23
2.2 Zelluläre Methoden	24
2.2.1 Ermittlung der Zellzahl	24
2.2.2 Kultivierung der Zelllinien	24
2.2.3 Transfektion/Transduktion	25
2.2.4 Durchflusszytometrie	26
2.2.5 Annexin V-Färbung	27
2.2.6 Kryokonservierung	28

2.3 DNA-Techniken	29
2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
2.3.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen ..	32
2.3.3 Klonierungen	33
2.3.4 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen	35
2.3.5 Sequenzierung mittels Fluorochrom-markierter Nukleotide	37
2.4 Proteinbiochemische Methoden	40
2.4.1 Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten	40
2.4.2 Immunpräzipitation	41
2.4.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)	41
2.4.4 Western-Blotting	44
3. Ergebnisse	48
3.1 Lysinmutationen von A1	48
3.1.1 Klonierung der K-A1-Mutanten	50
3.1.2 Nachweis der Proteinexpression der K-A1-Mutanten im Western-Blot ..	51
3.2 Das A1-Protein wird nicht an speziellen, sondern (fast) allen Lysinresten ubiquitinyliert	54
3.3 Die K-A1-Mutanten mit Ausnahme der K1-K5-Mutante weisen wie das wildtypische A1-Protein eine sehr geringe Stabilität auf ..	56
3.4 Die anti-apoptotische Funktion der K-A1-Mutanten	59
3.4.1 Bestimmung des Lebensgates mit Hilfe einer Annexin V-Färbung	59
3.4.2 Die K-A1-Mutanten zeigen in ihrer anti-apoptotischen Funktion keine signifikanten Unterschiede zum A1-Wildtyp	63
4. Diskussion	66
4.1 Eine bisher unbekannte Ubiquitin-E3-Ligase konjugiert Ubiquitin an (fast) alle Lysinreste des A1-Proteins	67
4.2 Der Verlust bestimmter Lysine bzw. Lysingruppen von A1 verändert seine Stabilität nicht	68
4.3 Der Verlust bestimmter Lysine bzw. Lysingruppen von A1 verändert seine anti-apoptotische Funktion nicht	70
5. Zusammenfassung	73
6. Summary	75
7. Literaturverzeichnis	76
8. Abkürzungsverzeichnis	87

1. Einleitung

1.1 Grundlagen und Bedeutung der Apoptose

Die physiologische Funktion der Apoptose garantiert das Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung und Zellelimination bei der Regulation der Gewebemöostase im Rahmen des normalen Gewebeumsatzes beispielsweise von Darmepithelien, während der Embryonalentwicklung und dem Alterungsprozess, zur Entfernung schädlicher Zellen wie Tumor- oder Virus-befallener Zellen und zur Entwicklung und Aufrechterhaltung des Immunsystems, z.B. bei der klonalen Deletion und Generierung hochaffiner B-Zellen in den Keimzentren. (Silbernagel/Lang 1998; Healy and Goodnow, 1998; Krammer et al., 1994).

Auf der anderen Seite ist eine pathologische Dysregulation der Apoptose an der Entstehung von Krankheiten wie Tumoren, viralen Infektionen wie z.B. infektiöse Mononukleose durch EBV (Epstein-Barr-Virus) oder HIV (Humanes Immundefizienz-Virus), neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson, degenerativen Erkrankungen wie Osteoporose, Autoimmunerkrankungen wie SLE (systemischer Lupus erythematodes), Immunschwächerkrankungen oder Transplantatabstoßungen beteiligt (Silbernagel/Lang 1998; Thompson et al., 1997).

Im Gegensatz zur Nekrose, die als pathologischer Vorgang z.B. im Gefolge von Gewebsverletzungen oder Nährstoffmangel zum Anschwellen und Platzen mit konsekutiver Entzündungsreaktion und Antikörperbildung meist mehrerer Zellen eines geschädigten Gewebes oder Organs führt, handelt es sich bei der Apoptose um einen so genannten programmierten Zelltod (Hengartner, 2000). Dabei werden gezielt einzelne Zellen in einem genau geregelten Programm abgetötet. Im Verlauf des Programms kommt es zu DNA-Kondensation und Endonukleasen-vermittelter DNA-Fragmentierung, zum Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials, zu Organelluntergang, zur Schrumpfung der Zelle und letztendlich zum Abschnüren von Membran-umschlossenen Zellvesikeln, so genannten Apoptosekörperchen, die dann durch Makrophagen ohne Entzündungsreaktion oder Antikörperbildung abgeräumt werden (Platt et al., 1998).

1.1.1 Medizinische Bedeutung der Apoptose

Die intensive Erforschung der molekularbiologischen Vorgänge bei der Apoptose wurde zu einem wichtigen Forschungsgegenstand in vielen Bereichen der Medizin. Dieses intensive Studium von Apoptosevorgängen führt derzeit jedoch zu einer heterogenen und kaum überschaubaren Fülle von Einzelbefunden, so dass noch kein vollständiges Bild des Gesamtprozesses vorliegt. Vor allem bei der Tumorentstehung steht die Apoptose im zentralen Blickpunkt der Forschung, denn es wird zunehmend deutlich, dass eine Dysregulation von Zellzyklus und Apoptose, die z.B. über das Tumorsuppressorgen p53 in Verbindung stehen, dabei von zentraler Bedeutung ist. Auch die Bcl-2-Familie (s.u.) ist an der Tumorentstehung beteiligt, so ist Bcl-2 beispielsweise in einigen Tumoren wie Lymphomen, v.a. dem follikulären Lymphom, Hirntumoren, dem kolorektalen oder dem nasopharyngealen Karzinom überexprimiert (Thompson et al., 1997). Darüber hinaus stellt eine Fehlregulation der Bcl-2-Proteine ein signifikantes Hindernis für die Zytostatikatherapie dar, wo maligne Klone mit beeinträchtigter Apoptose das Ansprechen auf Chemo- oder Strahlentherapie dämpfen (Reed, 1999). So korreliert z.B. die Bcl-2-Expression mit einem geringen Ansprechen auf die Chemotherapie bei der akuten myeloischen Leukämie (Campos et al., 1993) oder die Bcl-x_L-Expression mit einer ungünstigen Prognose beim Brustkrebs (Olopade et al., 1997).

Eine wesentliche Herausforderung für die Zukunft ist es, das molekularbiologische Wissen um die physiologischen und pathologischen Abläufe bei der Apoptose noch weiter voranzutreiben, um so noch gezieltere und effektivere therapeutische Strategien zu entwickeln. So könnte beispielsweise eine gezieltere Beeinflussung bzw. Modulation der Apoptose in der Tumorthherapie die Tumorzellen effektiver treffen und dadurch die systemische Toxizität der Chemotherapie verringert werden (Johnstone et al., 2002). Bisher wird die Apoptose-Modulation z.B. von Bcl-2, Ras, X-IAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) oder Mdm2 (murine double minute 2 oncogene) (Cunningham et al., 2001; Jansen et al., 2000; Sasaki et al., 2000; Tamm et al., 2001) bereits in ersten Ansätzen, aber noch nicht weitläufig in der klinischen Therapie eingesetzt. Diese Art der Therapie hat das Potential, einen Beitrag zur Verbesserung des Verlaufs vieler wichtiger und herausfordernder Erkrankungen zu leisten (Thompson et al., 1997).

1.1.2 Molekularbiologische Grundlagen der Apoptose

Zahlreiche externe und/oder interne Apoptosesignale wie z.B. Strahlung/Bestrahlung, Zytostatika, DNA-Schäden oder oxidativer Stress können Apoptose auslösen. Einmal initiiert, übermittelt meist eine konservierte Gruppe von Molekülen über eine Serie von Protein-Protein-Interaktionen bzw. Signalkaskaden das Apoptosesignal an die eigentlichen durchführenden Proteine des Apoptoseprogramms, den Caspasen. Daneben existiert noch eine nicht-Caspasen-vermittelte Apoptose, wo z.B. die Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors oder des Chemokinrezeptors CXCR4 ohne die typischen Charakteristika einer Caspasen-vermittelten Apoptose vermutlich über AIF (apoptosis-inducing factor) die Apoptose auslöst (Joza et al., 2001; Vlahakis et al., 2002; Kim et al., 2001).

Bei der Caspasen-vermittelten Apoptose erfolgt die Aktivierung dieser spezifischen Proteasen, die Cystein im aktiven Zentrum aufweisen und ihre Substrate immer nach einem Aspartat spalten (Cysteinaspartasen), in zwei Schritten in einem kaskadenartigen Prozess. Dabei werden zunächst die so genannten Initiator-Caspasen wie Caspase 8 und 9 in einem hochmolekularen Proteinkomplex aktiviert und aktivieren dann die so genannten Effektor-Caspasen wie Caspase 3, 6 und 7. Diese spalten und zerstören im Anschluss viele zelluläre Proteine (Hengartner et al., 2000; Kidd et al., 2000; Thornberry and Lazebnik, 1998). Die Induktion der Apoptose erfolgt dabei über zwei Hauptwege (Übersicht siehe Abb.1), den Todesrezeptor-Weg und den mitochondrialen Weg (Scaffidi et al., 1998).

Beim Todesrezeptor-abhängigen Weg (Typ I, extrinsischer Weg, „schneller“ Weg) wird über die Todesrezeptorliganden und Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie wie z.B. das CD95-(Apo-1, Fas)System das Todessignal ausgelöst. Dieses wird nach Trimerisierung von CD95-Rezeptoren durch die Ausbildung hochmolekularer Komplexe an der Innenseite der Zellmembran, dem DISC (death inducing signaling complex) initiiert, indem über Aktivierung der Initiator-Caspase 8 die Caspasenkaskade und damit das Apoptoseprogramm ausgelöst wird (Krammer, 2000; Muzio et al., 1996). Der andere Weg der Apoptoseinduktion ist der Mitochondrien-abhängige Weg (Typ II, intrinsischer Weg, „langsamer“ Weg) (Green and Reed, 1998). Dabei dienen die pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder als zentrale Regulatoren dieses Weges.

Die Schädigung der Mitochondrienintegrität durch deren pro-apoptotische Familienmitglieder führt dabei über Freisetzung von Cytochrom C zur Aktivierung der Initiator-Caspase 9 und damit zur Aktivierung der Caspasenkaskade wie beim Todesrezeptor-abhängigen Weg, oder über Freisetzung von AIF (apoptosis-inducing factor) zur Caspasen-unabhängigen Apoptose (Gross, 2001; Slee et al., 1999).

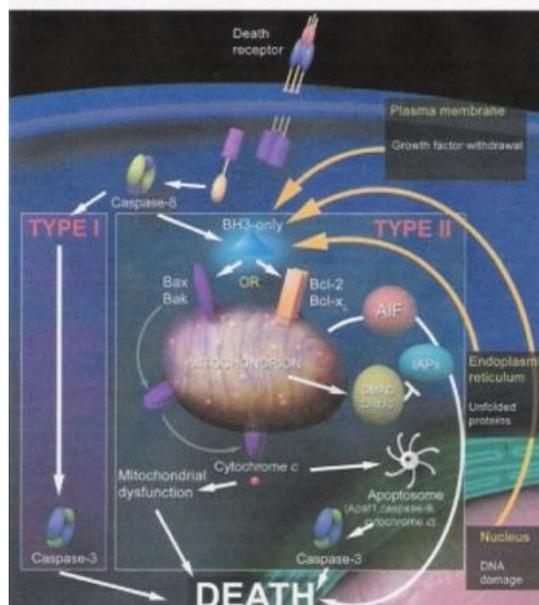


Abb.1 Übersicht über die Hauptwege der Apoptoseinduktion (Opferman and Korsmeyer, 2003).

1.2 Die Regulationsfunktion der Bcl-2-Familie bei der Apoptose

Die Bcl-2-Familie, die sowohl pro-apoptotische Mitglieder wie Bad, Bax, Bak, Bid oder Bim, als auch anti-apoptotische Mitglieder wie Bcl-2, Bcl-x_L, oder A1 (Übersicht siehe Abb.2) umfasst, hat beim Mitochondrien-abhängigen Weg der Apoptoseinduktion einen entscheidenden Einfluss darauf, ob und wie ein potentielles Apoptosesignal beantwortet wird. Überwiegen anti-apoptotische Faktoren wie Bcl-2 oder Bcl-x_L, wird das Apoptosesignal abgeschwächt bzw. bleibt unbeantwortet, überwiegen dagegen

aktivierte pro-apoptotische Mitglieder wie Bax oder Bak, kommt es zur Induktion bzw. Verstärkung der Apoptose.

Alle Mitglieder der Bcl-2-Familie zeichnen sich durch sog. „Bcl-2-Homologie-Domänen“ (BH1-BH4) aus, wobei jedes Familienmitglied zumindest eine BH-Region besitzt. Zusätzlich weisen einige Mitglieder auch hydrophobe Bereiche am C-terminalen Ende auf, worüber sie in intrazellulären Membranen verankert sind. Die anti-apoptotischen-Mitglieder wie Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w und A1 besitzen alle die Bcl-2-Homologie-Domänen BH1-BH4 (oder strukturelle Analoga). Die meisten dieser Proteine sitzen in den äußeren Membranen der Mitochondrien und den Membranen von endoplasmatischem Retikulum und Kern (Kaufmann et al., 2003; Kaufmann et al., 2004; Wilson-Annan et al., 2003). Eine Ausnahme bildet das A1-Protein, das hauptsächlich im Zytoplasma vorkommt (s.u.). Die pro-apoptotischen Mitglieder werden auf der Basis vorhandener BH-Bereiche in 2 Gruppen eingeteilt, zum einen die „Multidomain“-Mitglieder wie Bax, Bak, die Homologien in den Domänen BH1-BH3 aufweisen, zum anderen die „BH3-only“-Mitglieder wie Bim, Bid oder Bad, die nur die BH3-Domäne besitzen (Opferman and Korsmeyer, 2003).

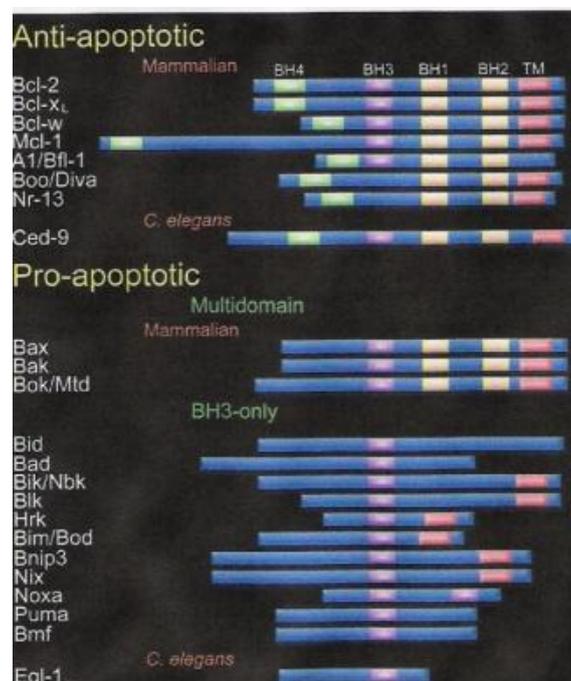


Abb.2 Übersicht über die Bcl-2-Familie (Opferman and Korsmeyer, 2003).

Der Mechanismus von Apoptoseinduktion bzw. Apoptoseverhinderung durch die Bcl-2-Familie ist bisher nicht vollständig geklärt. Folgendes Modell, das vor allem von Korsmeyer und seinen Mitarbeitern favorisiert wird, steht jedoch mit sehr vielen Ergebnissen in Einklang (Opferman and Korsmeyer, 2003).

Bei der Apoptoseinduktion dienen die „BH3-only“-Familienmitglieder, von denen sich viele bereits in inaktiviertem Zustand im Zytoplasma befinden, als Empfangsmodule bzw. Schadenssensoren. Auch können gewisse Todessignale wie UV-Strahlung oder Zytostatika (Newton and Strasser, 2000) die Expression bestimmter BH3-only-Proteine wie Puma und Noxa, induzieren. In beiden Fällen lösen die BH3-only-Proteine dann die Apoptose durch Aktivieren der „Multidomain“-Mitglieder Bax und Bak und/oder durch Neutralisieren der anti-apoptotischen Mitglieder aus. Nach der Aktivierung von Bax und Bak formen sie Homo-Oligomere mit der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch Porenkomplexe gebildet bzw. geöffnet werden (Vieira et al., 2000; Tsujimoto and Shimizu, 2000) und damit die Mitochondrienmembran permeabilisiert wird. Als Folge bricht das mitochondriale Transmembranpotential zusammen. Zusätzlich kommt es zur Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung als eines der frühen Ereignisse im Apoptoseprozess (Skulachev, 1998; Bossy-Wetzler et al., 1998; Green and Kroemer, 2004; Crompton, 1999). Frei werdendes Cytochrom C bildet das so genannte Apoptosom zusammen mit Apaf 1 (apoptotic peptidase activating factor 1) und Caspase 9. In diesem Komplex wird die Initiator-Caspase 9 aktiviert und das Apoptose-Programm, das letztlich zur irreversiblen Schädigung der Zellen führt, wird ausgeführt. Ebenso können die „BH3-only“-Familienmitglieder die Apoptose dadurch induzieren, dass sie anti-apoptotische Mitglieder durch direkte Bindung neutralisieren. Dadurch wird die Oligomerisierung von Bax und Bak nicht mehr verhindert und es kommt ebenfalls zu der durch die Cytochrom C-Freisetzung ausgelösten Apoptosekaskade. (Opferman and Korsmeyer, 2003).

Den Schutz vor Apoptose vermitteln die anti-apoptotischen Familienmitglieder wie Bcl-2, Bcl-w (Hinds et al., 2003) oder Bcl-x_L dadurch, dass sie die BH3- α -Helix der proapoptotischen Mitglieder über eine hydrophobe Tasche, die aus den BH1-BH3-Domänen gebildet wird, binden und dadurch neutralisieren (Zha et al., 1996). Dieser Mechanismus wurde zuerst für Bcl-2 beschrieben und wird zurzeit für alle anti-apoptotischen Familienmitglieder postuliert.

Bcl-2 wurde als erstes anti-apoptotische Familienmitglied aufgrund einer chromosomalen Translokation t(14;18) in einem humanen follikulären B-Zell-Lymphom entdeckt (Pegoraro et al., 1984; Tsujimoto et al., 1984). Seine Überexpression fördert das Überleben von Lymphozyten bei vielen verschiedenen Todesstimuli wie z.B. dem Entzug von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, DNA-Schädigung oder oxidativem Stress (Hockenbery et al., 1993; Kamesaki et al., 1993; Baffy et al., 1993). Bcl-2 kann die Apoptose sowohl durch Binden von „BH3-only“-Proteinen wie Bim (Cheng et al., 2001) als auch durch Bindung von Bax und Bak verhindern (Yin et al., 1994).

1.3 Das anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglied A1

A1 wurde ursprünglich als „immediate-early“-Gen hämatopoetischer Zellen der Maus beschrieben (Lin et al., 1993). Das humane Homolog wurde von Choi et al. isoliert und als Bfl-1 bezeichnet (Choi et al., 1995). Das A1-Protein wird in der Maus auf vier Genloci kodiert, während im humanen Genom nur ein Gen für Bfl-1 zu finden ist. Von den vier Genloci liefern jedoch nur drei Gene ein funktionelles Genprodukt (A1-a, A1-b und A1-d), ein Genlocus repräsentiert ein Pseudogen (A1-c). Die drei Isoformen sind auf Proteinebene nahezu identisch (Hatakeyama et al., 1998; Hamasaki et al., 1998).

Das A1-Protein wird besonders in hämatopoetischen Zellen wie B- und T-Lymphozyten, neutrophilen und anderen Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert (Orlofsky et al., 2002; Verschelde et al., 2003; Hatakeyama et al., 1998). So wurde eine starke Expression unter anderem in B-Zellen, T-Zellen und myeloiden Zellen nachgewiesen (Lin et al., 1993; Tomayko et al., 1998; Mandal et al., 2005).

A1 als anti-apoptotisches Bcl-2-Familienmitglied (Opferman and Korsmeyer, 2003) schützt wie Bcl-2 Zellen vor Apoptose, die durch TNF- α , p53 oder Apoptose-induzierende Chemikalien bzw. durch den Entzug von Wachstumsfaktoren ausgelöst werden kann und verlängert das Überleben einer myeloiden Zelllinie nach Entzug des relevanten Wachstumsfaktors (D`Sa-Eipper et al., 1996; Lin et al., 1996; Karsan et al., 1996). Dass A1 für das Überleben und die Funktion bestimmter Zellen essentiell ist,

zeigen A1-a-defiziente Mäuse, wo bereits die alleinige Defizienz dieser Isoform eine beschleunigte Apoptose in Neutrophilen bewirkt, das Überleben von Mastzellen in allergischen Reaktionen verkürzt (Xiang et al., 2001) und zur Sensibilisierung für BCR- (B-Zell-Rezeptor) vermittelte Apoptose in B-Zellen bei unveränderter Expression von Bcl-2, Bcl-x_L und Bcl-w führt (Grumont et al., 1999). Darüber hinaus verdeutlichen noch weitere Ergebnisse die wichtige Bedeutung von A1 in B-Zellen. So wurde gezeigt, dass A1 in primären B-Zellen der Maus oder den B-Zell-Lymphom-WEHI-231-Zellen unter der Kontrolle des Oberflächenmoleküls CD40 steht, welches das Überleben von B-Zellen entscheidend mitbestimmt (Kuss et al., 1999). Auch bewirkt eine Transduktion von WEHI-231-Zellen mit A1 einen Schutz vor BCR-induzierter Apoptose (Craxton et al., 2000; Herold et al., 2002). Zudem ist eine direkte Korrelation zwischen der A1-Menge und der Lebenserwartung von B-Zellen beim Übergang von der kurzlebigen unreifen zur langlebigen reifen B-Zelle beobachtbar (Tomayko et al., 1998). Auch in der weiteren Entwicklung von B-Zellen zu Plasmazellen könnte A1 eine bedeutende Rolle spielen, da in WEHI-231-Zellen die pro-apoptotische Aktivität des terminalen B-Zelldifferenzierungsfaktors Blimp-1 in Anwesenheit von A1 teilweise unterdrückt wird und es zu vermehrter Ig-Sekretion kommt (Knödel et al., 1999). Weiterhin scheint A1 auch eine äußerst wichtige Rolle in T-Zellen zu spielen. So wird A1 auf einem bestimmten Entwicklungsstadium der Zellen im Thymus verstärkt exprimiert. Andererseits beeinträchtigt der „knock-down“ von A1 durch RNAi das Überleben von Thymozyten (Mandal et al., 2005). Zusammengefasst legen diese Ergebnisse einen kausalen Zusammenhang zwischen A1 und dem Überleben von Zellen, speziell von B- und T-Zellen nahe.

Der genaue anti-apoptotische Wirkmechanismus von A1 ist bisher nicht geklärt. Einige Daten sprechen dafür, für A1 das gleiche gegenwärtige Bcl-2-Modell zu postulieren, wie es oben allgemein für die anti-apoptotischen Familienmitglieder beschrieben wurde, da A1 ebenso wie Bfl-1 (Werner et al., 2002; Yang et al., 1995; Bae et al., 2001) eine ganze Reihe pro-apoptotischer Proteine wie Bak, Bik, Bax (Holmgreen et al., 1999; Zhang et al., 2000; Werner et al., 2002; Chen et al., 2005) oder Bim (Herold, 2006) bindet, und die Domänen BH1, BH2 und BH3 (= hydrophober Bindungsbereich) essentiell für die anti-apoptotische Funktion von A1 sind (D'Sa-Eipper and Chinnadurai, 1998). Einige Daten der Forschungsgruppe von Ingolf Berberich und der

vorliegenden Arbeit sprechen jedoch für einen anderen anti-apoptotischen Mechanismus von A1 (s.u.).

Durch das anti-apoptotische Potential von A1 besteht die Gefahr, dass eine erhöhte A1-Expression ebenso wie eine erhöhte Bcl-2-Expression an der Entstehung bestimmter Tumoren beteiligt ist. Diese Möglichkeit wird durch den Nachweis einer erhöhten A1-Expression in bestimmten Tumoren des Menschen und der Maus gestützt (Choi et al., 1995; Mandal et al., 2005; Jung-Ha et al., 1998). Die von Herold et al. beschriebene extrem kurze Halbwertszeit von A1 könnte dadurch somit nützlich sein, das onkogene Potential von A1 besser unter Kontrolle zu haben (Herold, 2006).

1.4 Der Ubiquitin-Proteasomen-Weg

Obwohl es bislang hinsichtlich der Lokalisation von A1 unterschiedliche Ergebnisse gab (Duriez et al., 2000; Somogyi et al., 2001), konnte in Herold et al., 2006 gezeigt werden, dass das A1-Protein im Gegensatz zu den meisten anti-apoptotischen Vertretern auch stark im Zytoplasma vorkommt. Für die Ubiquitylierung und die proteasomale Degradation dient das C-terminale Ende von A1, das keine typische hydrophobe Transmembrandomäne wie die anderen Bcl-2-Familienmitglieder besitzt, der Hypothese nach nicht der Verankerung in Membranen, sondern bevorzugt (wenn nicht gar ausschließlich) dem Andocken einer Ubiquitin-E3-Ligase.

1.4.1 Der Ubiquitin-Proteasomen-Weg bei der Apoptose

Der Ubiquitin-Proteasomen-Weg ist der hauptsächliche nicht-lysosomale Weg für den intrazellulären Proteinabbau in Eukaryonten. Viele kurzlebige Proteine werden über diesen Weg abgebaut (Jesenberger and Jentsch, 2002; Weissman, 2001). In den letzten Jahren erhielt der Ubiquitin-Proteasomen-Weg eine zunehmende Aufmerksamkeit auch im Kontext der Apoptoseregulation, wo ihm mittlerweile eine wichtige Rolle zugesprochen wird, da wichtige Regulatoren der Apoptose wie die Proteine der Bcl-2-Familie, IAPs (inhibitors of apoptosis) und IKK (inhibitor of nuclear-factor- κ Bkinase) als Substrate dieses Weges identifiziert wurden (Jesenberger and Jentsch, 2002;

Orlowski, 1999; Wojcik, 1999). Bei der Bcl-2-Familie beeinflusst die Ubiquitylierung das Gleichgewicht zwischen den beiden Fraktionen der Familie. Auf der einen Seite führt der proteasomale Abbau von anti-apoptotischen Mitgliedern zum Anschalten der Apoptose-Maschinerie, z.B. ist der Abbau von Bcl-2 ein Schlüsselereignis bei der TNF- α -vermittelten Apoptose in Endothelzellen. Auf der anderen Seite kann der proteasomale Abbau von pro-apoptotischen Mitgliedern wie Bid die Zelle vor Selbstzerstörung bewahren (Breitschopf et al., 2000; Dimmeler et al., 1999).

Bevor ein Substrat vom Proteasom, einem hochmolekularen multikatalytischen Proteasekomplex zur Proteolyse von Proteinen in Oligopeptide, erkannt werden kann, muss es in der Regel mit verzweigten Ubiquitineinheiten an Lysinresten modifiziert werden (Weissman, 2001; Driscoll and Goldberg, 1990).

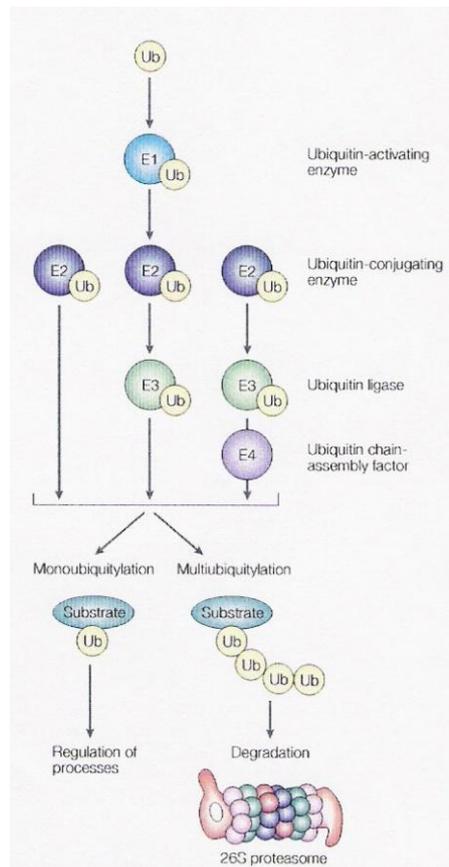


Abb.3 Schema von Ubiquitylierung und anschließender Degradation von Proteinen (Jesenberger and Jentsch, 2002).

Ubiquitin ist ein in der Evolution hochkonserviertes Protein aus 76 Aminosäuren, das in allen Eukaryonten vorkommt. An der Ubiquitinylierung sind mindestens drei Proteine bzw. Proteinkomplexe beteiligt. Als erstes wird in der Zelle freies Ubiquitin durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) ATP-abhängig aktiviert, indem es kovalent an E1 gebunden wird. Im nächsten Schritt wird das Ubiquitin an eines von über 30 verschiedenen Ubiquitin-konjugierenden Enzymen (E2) übertragen. Im letzten Schritt konjugieren so genannte Ubiquitin-Ligasen (E3) Ubiquitin kovalent über eine Isopeptidbindung an Lysinreste des Akzeptorproteins. Abschließend werden weitere Ubiquitinketten an Lysine bereits ligierter Ubiquitine geknüpft (Abb.3).

Die Markierung von Proteinen für den Abbau im Proteasom erfolgt normalerweise durch verzweigte Multiubiquitinylierung. Bei dieser Multiubiquitinylierung sind die Ubiquitinmoleküle durch das Lysin an der 48. Aminosäurestelle des Ubiquitins (K 48) verknüpft. Darüber hinaus zeigt sich zunehmend, dass die Ubiquitinylierung noch viele weitere zelluläre Funktionen wie intrazelluläres „targeting“, Endozytose, DNA-Reparatur, Transkriptionskontrolle, Zellproliferation und -differenzierung erfüllt (Jessenberger and Jentsch, 2002; Weissmann, 2001). Diese werden durch alternative Formen der Ubiquitinmodifikation, vor allem Mono- und Oligoubiquitinylierung, und auch Polyubiquitinylierung vermittelt. Neben der Form der Ubiquitinmodifikation spielt aber auch die Verbindung der Ubiquitinmoleküle untereinander eine Rolle, die neben der Verknüpfung über das Lysin an der 48. Aminosäurestelle des Ubiquitins auch über das Lysin an der 63. Aminosäurestelle des Ubiquitins (K 63) erfolgen kann. Einfluss auf die Funktion der Ubiquitinylierung hat somit sowohl welches Lysin des Ubiquitins als auch welches Lysin des Zielproteins ausgewählt wird. Dabei sind in manchen Fällen nur spezifische Lysine der Zielproteine Angriffspunkte der Ubiquitinylierung, in anderen Fällen besteht nur eine geringe Spezifität für die Lysine, d.h. die Ubiquitinylierung kann an verschiedenen Lysinen stattfinden. So sind z.B. bei $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$, einem Inhibitor des Transkriptionsfaktor $\text{NF-}\kappa\text{B}$, nur die spezifischen Lysine 21 und 22 von $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ Angriffspunkte der Ubiquitinylierung (Baldi et al., 1996). Auf der anderen Seite kann z.B. beim Transkriptionsfaktor c-Jun die Ubiquitinylierung an verschiedenen Lysinen stattfinden (Treier et a., 1994).

1.4.2 Die Ubiquitin-E3-Ligase(komplexe)

Die Art der Ubiquitin-Modifikation kommt durch das Zusammenspiel der Ubiquitin-konjugierenden Enzyme (E2) und der Ubiquitin-E3-Ligasen zustande. Sie bedingen den Aufbau der Ubiquitinketten und sind somit für die große Sensitivität der Substrat-Erkennung und die große Spezifität der zellulären Funktionen der Ubiquitinylierung verantwortlich. Von zentraler Bedeutung sind dabei v.a. die Ubiquitin-E3-Ligase(komplexe), die gleichzeitig Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2) und Substrat binden können. Die Ubiquitin-E3-Ligasen sind damit an der Regulation einer Vielzahl physiologischer Prozesse von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose beteiligt, sodass Störungen der Ubiquitin-E3-Ligasen bei entzündlichen Erkrankungen wie dem Morbus Parkinson, genetischen Erkrankungen wie dem Angelman-Syndrom oder dem Morbus Hippel-Lindau, oder vor allem auch in der Tumorentstehung eine Rolle spielen.

Im Laufe der Evolution erfolgte eine sehr große Diversifikation der (Substrat-erkennenden Komponenten der) Ubiquitin-E3-Ligasen, um eine große Anzahl verschiedener Substrate erkennen zu können. Deshalb stellt die Ubiquitin-E3-Ligasen-Familie eine sehr heterogene und umfangreiche Gruppe von Proteinen dar, und Schätzungen gehen davon aus, dass diese Familie die Anzahl der Kinasen (ca. 500) erreichen oder gar übersteigen könnte (Weissman et al., 2001). Eine mögliche Untergliederung der E3-Ligasen-Familie erfolgt auf der Basis zweier Domänen, der HECT-Domäne bzw. der RING-Finger-Domäne. Eine dieser beiden Domänen muss unbedingt anwesend sein, da dort der direkte Kontakt zwischen dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym und der Ubiquitin-E3-Ligase stattfindet (Zheng et al., 2000).

Die HECT-Domäne ist homolog zum E6-assoziierten Protein (E6-AP, ein Partnerprotein des E6-Proteins des humanen Papillomavirus) und besteht aus ca. 350 Aminosäuren am C-terminalen Ende. Diese Domäne enthält ein konserviertes Cystein, das mit Ubiquitin eine kovalente Thiol-Ester-Bindung eingeht. Darüber hinaus enthalten viele HECT-Ubiquitin-Ligasen sog. WW-Domänen. Es handelt sich dabei um Tryptophan-basierte Motive am amino-terminalen Ende. Diese formen eine hydrophobe Tasche und interagieren damit mit Prolin-reichen Sequenzen und bestimmten Sequenzen, die Phosphoserin und Phosphothreonin enthalten.

Die RING-Finger-Domänen sind Protein-Protein-Interaktionsmodule, deren Struktur über Bindung zweier Zink-Ionen in Cystein-reichen Bereichen gewährleistet wird. Die RING-Finger-E3-Ligasen werden dadurch unterteilt, ob sie aus einem einzigen Polypeptid bestehen oder aus mehreren Proteinen zusammengesetzt sind. Zur Gruppe der RING-Finger-E3-Ligasen, die aus einem einzigem Polypeptid bestehen, gehören z.B. BRCA1 (breastcancer 1, early onset tumor suppressorgene), Mdm2 (murine double minute 2 oncogene), c-Cbl (c-Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene) und IAPs (inhibitor of apoptosis), die alle auf unterschiedliche Weise in die Regulation von Überleben, Proliferation und Apoptose der Zelle eingreifen. Aus mehreren Proteinen zusammengesetzte RING-Finger-E3-Komplexe sind z.B. APC (anaphase-promoting complex, cyclosome) oder SCF-Komplexe (Skp1/Cullin/F-Box, Cullin-RING-Komplexe). APC ist unter anderem für die Ubiquitinylierung und damit den Abbau mitotischer Cycline verantwortlich, SCF-Komplexe kontrollieren z.B. die Ubiquitinylierung und damit die Degradation von IκBs, β-Catenin und CD4 (Liu, 2004; Petroski and Deshaies, 2005).

Wie bereits erwähnt scheinen Störungen von Ubiquitin-E3-Ligasen auch in der Tumorentstehung eine Rolle zu spielen. So gibt es Hinweise, dass die Überexpression bestimmter Ubiquitin-E3-Ligasen auf Transkriptionsebene mit der Tumorentstehung zusammenhängt. Mdm2, welches die Expression des Tumorsuppressorgens p53 negativ reguliert, ist in vielen Tumoren überexprimiert (Rayburn et al., 2005), auch eine verstärkte Expression von IAPs ist in Tumoren beschrieben (Nachmias et al., 2004). Weiterhin wird die Erhöhung des Expressionsniveaus von Skp2, der Substrat-erkennenden Einheit einer Cullin-RING-E3-Ligase, die unter anderem den Zellzyklusinhibitor p27Kip1 kontrolliert, mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht (Latres et al., 2001; Gstaiger et al., 2001). Ähnlich könnte auch erst durch die Identifikation der Ubiquitin-E3-Ligase und die weitere Aufklärung der Ubiquitinylierung von A1 eine abschließende Beurteilung des onkogenen Potentials von A1 möglich werden.

1.5 Ausgangspunkt und Ziel der Arbeit

Das Hauptinteresse der vorliegenden Arbeit galt der weiteren Charakterisierung der Ubiquitylierung des A1-Proteins. Als Ausgangspunkt dafür diente der Befund aus Herold et al., 2006, dass das A1-Protein ubiquityliert und damit für den Abbau in den Proteasomen markiert wird. Ein zentraler Befund dabei war, dass eine A1-Mutante ohne den C-Terminus kaum ubiquityliert wird. So schien es naheliegend, dass das Anhängen der Ubiquityketten an den 4 Lysinen des C-terminalen Endes von A1 (s.u.) stattfindet. Die Mutation dieser Lysine führte jedoch nicht zu einer Stabilisierung bzw. Hemmung der Ubiquitylierung von A1. Somit sind diese Lysine nicht für den Abbau bzw. die Instabilität notwendig und sind nicht oder nicht die einzigen Angriffspunkte für die Ubiquitylierung von A1. Auch eine systematische Mutation von Lysinen am N-terminalen Ende von A1 führte weder zu einer Stabilisierung noch zu einer Hemmung der Ubiquitylierung. Weiterhin kann durch Übertragung des C-Terminus von A1 auf andere Proteine wie beispielsweise das chimäre Protein aus Caspase-3 und dem C-terminalen Ende von A1 deren Ubiquitylierung induziert werden (Herold et al., 2006). Die Autoren von Herold et al. schlossen aus diesen Befunden, dass das C-terminale Ende von A1 eine bisher unbekannte Ubiquity-E3-Ligase bindet. Diese erkennt eine bestimmte Aminosäuresequenz im C-terminalen Ende von A1, konjugiert Ubiquity an A1 und markiert es dadurch für den proteasomalen Abbau.

Diese Befunde und die Hypothese zur Ubiquitylierung von A1 sollten weiter charakterisiert und untermauert werden. Die zentrale Frage der vorliegenden Arbeit war, an welchen Lysinen von A1 die Ubiquitylierung stattfindet, ob die Ubiquitylierung also nur an spezifischen Lysinen oder an verschiedenen bzw. (fast) allen Lysinen von A1 stattfinden kann. Dafür wurden verschiedene Mutanten des A1-Proteins (K-A1-Mutanten) kloniert, bei denen die insgesamt 11 Lysinreste von A1 gruppenweise gegen Argininreste ausgetauscht wurden (s.u.). Der Argininaustausch wurde gewählt, weil Arginin ebenfalls eine positiv geladene Aminosäure ist, wodurch die Gefahr von Faltungseffekten vermieden werden sollte. Diese Mutanten wurden auch auf ihre Stabilität hin untersucht und in einer weiteren Versuchsreihe wurde das anti-apoptotische Potential der einzelnen Mutanten analysiert.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Antibiotika

- | | |
|----------------|----------------|
| ▪ Ampicillin | AppliChem GmbH |
| ▪ Penicillin | Apotheke |
| ▪ Streptomycin | Apotheke |
| ▪ Zeocin | Invitrogen® |

2.1.2 Antikörper

Primäre Antikörper

- | | |
|---|---------------|
| ▪ anti-A1 (Kaninchen, polyklonal) | Arbeitsgruppe |
| ▪ anti-ERK (C-14) (Kaninchen, polyklonal) | Santa Cruz |
| ▪ anti-GFP (Kaninchen, polyklonal) | Clontech |
| ▪ anti-HA (12CA5) (Maus, monoklonal) | Roche |

Sekundäre Antikörper

- | | |
|---|---------|
| ▪ anti-Kaninchen (Peroxidase-konjugiertes Esel-IgG) | Jackson |
| ▪ anti-Maus (Peroxidase-konjugiertes Ziegen-IgG) | Jackson |

2.1.3 Bakterien

Top 10 F	Arbeitskreis
----------	--------------

2.1.4 Chemikalien

- | | |
|------------------|-------|
| ▪ Agarose | Roth |
| ▪ Calciumchlorid | Sigma |

▪ EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Roth
▪ DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
▪ DTT (Dithiothreitol)	Sigma
▪ SDS (Natriumdodecylsulfat)	AppliChem GmbH
▪ TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylendiamin)	AppliChem GmbH
▪ Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth
▪ Trypanblau	Sigma
▪ TWEEN 20	AppliChem GmbH
▪ Wasserstoffperoxid	AppliChem GmbH

2.1.5 Enzyme

▪ BamH I	MBI
▪ Eco81 I	MBI
▪ Eco91 I	MBI
▪ EcoR I	MBI
▪ Mfe I (= Mun I)	MBI
▪ Pfu-DNA-Polymerase	Promega
▪ PST I	MBI
▪ SAP	NEB
▪ T4-DNA-Ligase	MBI

2.1.6 Filmmaterial

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

2.1.7 Inhibitoren

▪ Cycloheximid (Chx)	Sigma
▪ Etoposid	Calbiochem
▪ Proteasomeninhibitor II	Calbiochem
▪ Proteaseinhibitor P8340	Sigma

2.1.8 Kits

DNA-Aufreinigung

UltraClean™ DNA Purification Kit

MoBio Laboratories

DNA-Präparation

Kit für DNA-Maxipräparation

Sigma

2.1.9 Medien

2.1.9.1 Medien für Zellkulturen

DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium)

Institut

supplementiert mit

FCS (hitzeinaktiviert 30min bei 56°C)

Gibco

Penicillin 0,025%

Apotheke

Streptomycin 0,025%

Apotheke

RPMI-(Roswell Park Memorial Institute)-1640-Medium

RPMI-1640-Medium

Institut

supplementiert mit

Glutamin (0,07%)

Gibco

nicht essentielle Aminosäuren (1:100)

Gibco

Natriumpyruvat (1:100)

Gibco

FCS 5%

Gibco

β-Mercaptoethanol (0,05mM, 1:1000)

Gibco

Penicillin (0,025%)

Apotheke

Streptomycin (0,025%)

Apotheke

2.1.9.2 Medien für Bakterien

LB-(Luria-Bertani-)Medium

Fertigmedium

Invitrogen®

Ampicillinplatten

2% LB-Medium

Invitrogen®

1,5% Agar-Agar

Roth

0,1% Ampicillin (50µg/ml)

AppliChem GmbH

ad H₂O

2.1.10 Oligonukleotide

5mA1/MfeI_ATG	GCAGACcAATTggcgccaccatggctgagtctgagctcatg	#53
3mA1/K → R123	GCGcagattGCGttcaacttcGCGctgaacggagaaagcaactctt	#134
5mA1/K → R123	CGCgaagttgaaCGCaatctgCGCtcatacttggatgactttcacgt	#133
3mA1/STOP (= 3mA1)	CGC GGATCCGTG TTA CTT GAG GAG AAA GAG	
3mA1/K → R4	ctcaaactcGCGttccatcacttggttgaatattatt	#136
5mA1/K → R4	agtgatggaaCGCgagtttgaagatggcatcattaac	#135
3mA1/K → R56	gtggaagGCGGCGgaggagaaacacccccaaagg	#138
5mA1/K → R56	ctctcCGCCGCttccacaagagcagattgcc	#137
3mA1/K → R7	ggaaacttgGCGgtaagcacatacatccagg	#140
5mA1/K → R7	atgtgcttacCGCcaagtttccagttttgtggcag	#139
3mA1/K → R11	gatCGCGGATCCTCAttacCtgaggagAAAgagcatttcccag	#92
CFI-PSI-Sequenzierungs- primer	5`CACGTGAAGGCTGCCGACC3`	
CFI-IRES-Sequenzierungs- primer	5`CTTCGGCCAGTAACGTTAGG3`	

2.1.11 Plasmide und Vektoren

Die cDNAs für die verschiedenen Konstrukte wurden in den bicistronischen, retroviralen Vektor pEYZ/MCS-Flag kloniert (Abb.4). Dieses Plasmid wurde aus dem retroviralen Vektor pczCFG2 hCD8 IEYZ erzeugt und enthält eine Sequenz am Ende

der Multiple Cloning Site (MCS), die für ein „Flag“-Peptid zum Proteinnachweis kodiert. Zusätzlich enthält der Vektor einen CMV-enhancer, der die U3-Region im 5`-LTR (long terminal repeat) des zugrunde liegenden Murine Leukaemia Virus (MuLV) ersetzt, und eine IRES (internal ribosomal entry site), die dem Enzephalomyokarditis-Virus entstammt (Lindemann et al., 1997). Diese Region ermöglicht die gekoppelte Expression des Zielgens zusammen mit einem chimären Markergenprodukt EYFP (enhanced yellow fluorescent protein und ein Zeocinresistenzgen). Die Expression in den transduzierten Zellen hängt ab von der Anwesenheit des MuLV-LTR.

Zur Herstellung der rekombinanten Retroviren wurde das von Soneoka et al., 1995 beschriebene pHIT-Verpackungssystem verwendet (siehe 2.2.3). pHIT60 kodiert dabei für die Strukturproteine und die Polymerase der Viruspartikel, pHIT123 trägt die Sequenzen für das Verpackungsprotein.

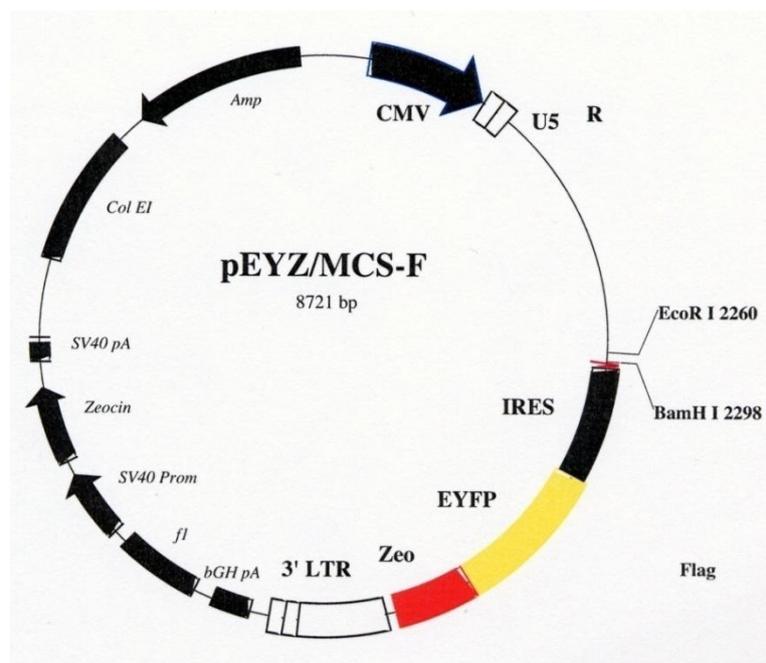


Abb.4 Retroviraler Bicistronischer Vektor mit Flag-Oligo am 3`-Ende der MCS und einem chimären Markergen aus Gelbfluoreszenz und Zeocinresistenz.

pHIT 60/gag-pol

Kingsman Labor (Oxford)

pHIT 123/env (ekotrop)

Kingsman Labor

Im Folgenden ist die Aminosäuresequenz des A1-a Wildtyps gezeigt und die vorgenommenen Veränderungen markiert (Abb.5):

maeselmhihslachylqyvlqvpafesapsqacrvlqrvafsvqK₁evK₁nlK₁sylddfhvesiditariifnqvme
K₂efedgiinwgrivtifafggvllK₃K₃lpqeialdvcaYK₄qvssfvafimnntgewirnggwedgfiK₅K₅fe
pK₅sgwltflqmtgqiwe mlflK₅

K = pEYZ/mA1 K → R → Austausch von Lysin zu Argininen

Abb.5 Aminosäuresequenz von A1 der Maus. Die Markierungen stellen die vorgenommenen Veränderungen in der Proteinsequenz von A1 dar.

Bei den nachfolgend genannten K-A1-Lysin-Mutanten wurde das in den Vektor einzusetzende DNA-Fragment entweder mittels PCR amplifiziert oder aus einem bereits existierenden Plasmid ausgeschnitten („Umklonierung“) (siehe 2.3.3).

2.1.11.1 K-A1-Mutanten

Bei den K-A1-Mutanten pEYZ/mA1-K1R, pEYZ/mA1-K2R, pEYZ/mA1-K3R, pEYZ/mA1-K4R und pEYZ/mA1-K1-K2R wurde die Mutation in A1 zunächst über 2 Polymerasekettenreaktionen aus pEYZ/mA1-2, bei pEYZ/mA1-K5R über 1 PCR aus pEYZ/mA1-K5 mithilfe von Oligonukleotidprimern (siehe 2.1.10) eingefügt. Anschließend wurden das DNA-Fragment und das Vektorplasmid pEYZ/MCS, in den das DNA-Fragment eingesetzt wurde, mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und mithilfe der T4-DNA-Ligase zusammengefügt. Die dabei verwendeten Plasmide pEYZ/mA1-2 und pEYZ/mA1-K5 waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden (Tab.1.1).

K- A1-Mutante	Primer (siehe 2.10.) für Mutations-einführung über PCR	Vektor	Restriktion	Insert	Restriktion
pEYZ/ mA1-K1R	1. PCR: 1a: #53 + #134 1b: #133 + #3mA1 2. PCR: #53 + #3mA1	pEYZ/ MCS	EcoR I/ BamH I	pEYZ/ mA1- K1R	Mfe I/ BamH I
pEYZ/ mA1-K2R	1. PCR: 1a: #53 + #136 1b: #135 + #3mA1 2. PCR: #53 + #3mA1	pEYZ/ MCS	EcoR I/ BamH I	pEYZ/ mA1- K2R	Mfe I/ BamH I
pEYZ/ mA1-K3R	1. PCR: 1a: #53 + #138 1b: #137 + #3mA1 2. PCR: #53 + #3mA1	pEYZ/ MCS	EcoR I/ BamH I	pEYZ/ mA1- K3R	Mfe I/ BamH I
pEYZ/ mA1-K4R	1. PCR: 1a: #53 + #140 1b: #139 + #3mA1 2. PCR: #53 + #3mA1	pEYZ/ MCS	EcoR I/ BamH I	pEYZ/ mA1- K4R	Mfe I/ BamH I
pEYZ/ mA1-K5R	PCR: #53 + #92	pEYZ/ MCS	EcoR I/ BamH I	pEYZ/ mA1- K5R	Mfe I/ BamH I
pEYZ/ mA1-K1- K2R	1. PCR: 1a: #53 + #136 1b: #135 + #3mA1 2. PCR: #53 + #3mA1	pEYZ/ MCS	EcoR I/ BamH I	pEYZ/ mA1- K1-K2R	Mfe I/ BamH I

Tabelle 1.1: Darstellung der für die Arbeit generierten Plasmide K1 bis K1-K2.

Um die K-A1-Mutanten pEYZ/mA1-K1-K5R, pEYZ/mA1-K2-K5R, pEYZ/mA1-K3-K5R, pEYZ/mA1-K4-K5R und pEYZ/mA1-K1-K2-K5R zu generieren, wurden die bereits klonierten Plasmide pEYZ/mA1-K1R, pEYZ/mA1-K2R, pEYZ/mA1-K3R, pEYZ/mA1-K4R, pEYZ/mA1-K1-K2R und das in der Arbeitsgruppe bereits bestehende Plasmid pEYZ/mA1-K5 durch Restriktionsendonukleasen geschnitten und mithilfe der T4-DNA-Ligase zusammengefügt (Tab.1.2).

K-A1-Mutante	Vektor	Restriktion	Fragment	Restriktion
pEYZ/mA1-K1-K5R	pEYZ/mA1-K5	Eco91 I/ EcoR I	pEYZ/ mA1-K1R	Eco91 I/ EcoR I
pEYZ/mA1-K2-K5R	pEYZ/mA1-K5	Eco91 I/ EcoR I	pEYZ/ mA1-K2R	Eco91 I/ EcoR I
pEYZ/mA1-K3-K5R	pEYZ/ mA1-K3R	EcoR I/ BamH I	pEYZ/mA1-K5	EcoR I/ BamH I
pEYZ/mA1-K4-K5R	pEYZ/ mA1-K4R	EcoR I/ BamH I	pEYZ/mA1-K5	EcoR I/ BamH I
pEYZ/mA1-K1-K2-K5R	pEYZ/mA1-K5	Eco91 I/ EcoR I	pEYZ/ mA1-K1-K2R	Eco91 I/ EcoR I

Tabelle 1.2: Darstellung der für die Arbeit generierten Plasmide K1-K5 bis K1-K2-K5.

2.1.11.2 Weitere Plasmide

	Arbeitsgruppe	Markergen
pEYZ/mA1-2	Arbeitsgruppe	Gelbfluoreszenzprotein/Zeocin; chimär
pEYZ/mA1-K5 (v1)	Arbeitsgruppe	Gelbfluoreszenzprotein/Zeocin; chimär
pEYZ/K11 (192)	Arbeitsgruppe	Gelbfluoreszenzprotein/Zeocin; chimär
pEGZ/HA-Ubi	Arbeitsgruppe	Grünfluoreszenzprotein/Zeocin; chimär

2.1.12 Puffer und Lösungen

ATV

NaCl	80g
KCl	4g
Glukose	10g
NaHCO ₃	5,8g
Trypsin (1:250)	5g

Versene	2g
H ₂ O	ad 1l

PBS

NaCl	80g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,15g
KH ₂ PO ₄	2g
CaCl ₂	1.67g
MgCl ₂	1g
BSA	0,1g
H ₂ O	ad 10l

TAE (50x)

2M	Tris-Base
2M	Essigsäure → Einstellen auf pH 7,8
100mM	EDTA
ad 1000ml	H ₂ O

TBS (10x)

1M	Tris pH 7,5 (Einstellen mit Salzsäure)
3M	NaOH
Mischen zu gleichen Teilen	

2.1.13 Zelllinien

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

2.2 Zelluläre Methoden

Sämtliche zellulären Arbeiten wurden in einer Sterilbank durchgeführt.

2.2.1 Ermittlung der Zellzahl

Zur Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellen in einer Neubauer-Kammer gezählt. Dafür wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit einer Trypanblau-Arbeitslösung (Stammlösung 1:5 in PBS verdünnt) im Verhältnis 1:1 verdünnt. Von toten Zellen wird das Trypanblau aufgrund von Membranschädigungen aufgenommen, wodurch man diese von lebenden Zellen unterscheiden kann. 30µl der Zellverdünnung wurden anschließend unter das Deckglas einer Neubauer-Kammer pipettiert und die lebenden Zellen in 2 Quadranten gezählt. Die Zellzahl wurde gemäß (Mittelwert gezählter Zellen/Quadrant) x Verdünnungsfaktor x 10^4 = Zellzahl/ml berechnet.

2.2.2 Kultivierung der Zelllinien

WEHI-231-Zellen wurden in jeweils 5ml RPMI-1640-Medium, das speziell für Hybridomzellen geeignet ist, in 50ml Kulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und alle 2-3 Tage 1:10 verdünnt. Die Zelldichten bewegten sich zwischen 5×10^4 und 6×10^5 Zellen/ml.

Dem Medium infizierter, EYFP-exprimierender Zellen wurde zu Beginn der Kultur das Antibiotika Zeocin (250µg/ml) zur Selektion zugesetzt. In dem EYFP-Plasmid ist ein Resistenzgen gegen Zeocin eingebaut, wodurch nur die Zellen überleben, in denen die Plasmide exprimiert werden. Nach erfolgreicher Selektion wurde das Antibiotikum wieder abgesetzt (mit fortlaufender Kultur ausverdünnt).

Um größere Zellkulturen zu erhalten, wurden die Zellen in RPMI-1640-Medium in 250ml Kulturflaschen ausgesät und solange im Brutschrank kultiviert, bis sie die erwünschte Zelldichte erreicht hatten.

Die 293-T-Zellen wurden in 25ml Petrischalen in 10-15ml DMEM im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und alle 3-4 Tage mit DMEM verdünnt. Zu diesem Zweck

wurden sie mit ATV von der Platte abgelöst, in DMEM resuspendiert und für 4min bei 1500rpm zentrifugiert. Anschließend wurden sie mit DMEM 1:10 bis 1:20 verdünnt und weiter kultiviert.

2.2.3 Transfektion/Transduktion

Unter Transfektion/Transduktion versteht man den Gentransfer bzw. die Übertragung von DNA mithilfe retroviraler Vektoren. Das retrovirale Gentransfersystem umfasst dabei zum einen den retroviralen Vektor und zum anderen eine Verpackungszell-Linie. Der retrovirale Vektor enthält eine Insertionsstelle für das übertragende Gen bzw. die zu übertragenden DNA (gen of interest), ein Verpackungssignal für die retroviralen Hüllproteine (gag, pol, env) und einen Selektionsmarker wie z.B. Zeocin, um anschließend nur die mit der übertragenen DNA infizierten Zielzellen anreichern zu können. Die Verpackungszell-Linie wird mit dem retroviralen Vektor transfiziert und dient so der Produktion der Virionen. Danach werden die Zielzellen mit diesen Virionen transduziert, integrieren die retrovirale RNA mit der übertragenen DNA in ihr Genom und exprimieren anschließend diese DNA als Proteine (Abb.6).

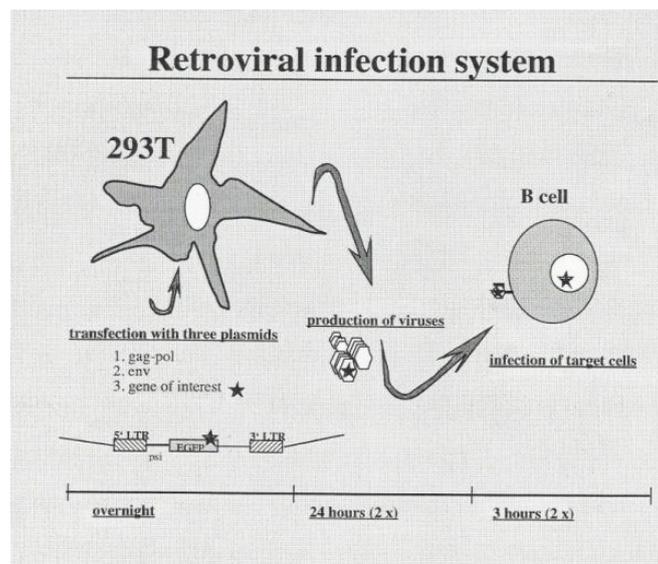


Abb.6 Schema des retroviralen Gentransfersystems.

In der vorliegenden Arbeit wurden die rekombinanten, replikationsdefekten retroviralen Partikel mithilfe des pHIT-Verpackungssystems wie von Soneoka et al., 1995 hergestellt.

Zunächst wurden 293-T-Zellen als Verpackungszell-Linie unter Verwendung der Standard-Calciumchlorid-Methode transient mit dem Expressionsprodukt für gag/pol (pHIT60) und env (pHIT123) des Murinen Leukämie Virus (MuLV) entweder mit dem Vektorplasmid pEYZ/MCS, der die jeweilige für das angegebene Konstrukt kodierende cDNA enthielt oder mit dem leeren Vektorplasmid als Kontrolle kotransfiziert. Nach 18h wurde ein Mediumwechsel mit DMEM durchgeführt und die transfizierten Zellen wurden für weitere 24h inkubiert. Die Effizienz der Transfektion wurde am nächsten Tag auf Basis der Grünfluoreszenz unter UV-Licht überprüft.

Mit den infektiösen Überständen, die die retroviralen Partikel enthielten, wurden WEHI-231-Zellen transduziert. Dafür wurden zunächst die viralen Überstände abgenommen und filtriert (0,45µm Filter), zum Filtrat wurde Polypren (Sigma) zugegeben (Endkonzentration $\leq 10\mu\text{g/ml}$). $1-2 \times 10^5$ WEHI-231-Zellen wurden dann in der logarithmischen Wachstumsphase für 3-4h mit 5ml des infektiösen Überstandes inkubiert. Um dabei hohe Infektionsraten zu erzielen, wurden die Zellen während der Inkubation zentrifugiert (3-4h bei 32°C mit 2200rpm). Anschließend wurden die Zellen mit RPMI-1640-Medium wieder in Kultur genommen. Nach 3-4 Tagen erfolgte mittels Durchflusszytometrie die Identifizierung der EYFP-exprimierenden, d.h. der erfolgreich infizierten Zellen.

Die Anreicherung erfolgreich infizierter Zellen wurde durch Antibiotika-Selektion mit Zeocin und durch Zellsortierung erreicht. Für die Antibiotika-Selektion wurde Zeocin (250µg/ml) dem Medium zugegeben. Die Anreicherung durch Zellsortierung erfolgte mittels Durchflusszytometrie, basierend auf der Fluoreszenz des transduzierten Markerproteins.

2.2.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Computer-gestützte Technik zur Erfassung, Quantifizierung und Sortierung von Einzelzellen, Chromosomen oder anderen

zellulären Strukturen wie z.B. Oberflächenrezeptoren anhand verschiedener physikalischer oder Fluoreszenz-assoziiierter Marker, wobei häufig die Fluoreszenz als Marker verwendet wird. Die Fluoreszenz kann hierbei entweder von einer vorher durchgeführten Färbung oder von der Expression eines Fluoreszenzproteins, das durch Transfektion/Transduktion in die Zellen eingebracht wurde, herrühren. Färbungen können sowohl intrazellulär sein, z.B. bei der Detektion von Radikalen durch Dihydroethidium, als auch extrazelluläre Strukturen betreffen, z.B. kann die Expression von Zelloberflächen-Molekülen durch die Verwendung spezifischer Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind, auf Einzelzellniveau untersucht werden.

Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch einen gebündelten Laserstrahl im „Fluorescence Activated Cell Scan“ (FACScan, Becton-Dickinson) angeregt und emittieren anschließend Licht charakteristischer Wellenlänge, das vom Gerät detektiert wird. Das verwendete Gerät ist in der Lage, bis zu 3 verschiedene Farbstoffe gleichzeitig zu detektieren, z.B. Fluorescein-Isothiocyanat, Phycoerythrin und Red 670.

Zusätzlich zu den Fluoreszenzen gibt das Laserlicht, das direkt durch die Zellen gestreut wird, Aufschluss über deren spezifische Größe („forward scatter“, FSC) und Granularität („side scatter“, SSC). Mithilfe dieser Parameter können Anhaltspunkte über den Überlebenszustand der Zellen oder das Ausmaß einer Transduktion gewonnen werden.

Die Auswertung der FACS-Daten erfolgt dann mit speziellen Computerprogrammen, im vorliegenden Fall mit der Cell Quest-Software für Apple-Macintosh.

2.2.5 Annexin V-Färbung

2.2.5.1 Lösungen

10x Annexin V-Bindungspuffer:

0,1M	HEPES pH = 7,4
1,4mM	NaCl
25mM	CaCl ₂
	in Wasser

FACS-Puffer:

PBS ohne CaCl_2 und MgCl_2

2.2.5.2 Durchführung der Annexin V-Färbung

Mithilfe der Annexin V-Färbung können apoptotische Zellen in der Durchflusszytometrie (vgl. 2.2.4) sichtbar gemacht werden. Phosphatidylserin findet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle. Während der Apoptose wird Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran transloziert. Da Annexin V sich nun an Phosphatidylserin bindet, können die apoptotischen Zellen anschließend durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

Nach Apoptoseinduktion von 1×10^5 transduzierten WEHI-231-Zellen durch Etoposid (s.u.) wurden diese 2x mit FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin V gekoppelt mit dem Farbstoff Cytochrom 5 in 1x Annexin V-Bindungspuffer (1:100) für 15min bei Raumtemperatur unter einer Alufolie gefärbt. Anschließend wurden die gefärbten Zellen in der Durchflusszytometrie analysiert.

2.2.6 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung von Zellkulturen ermöglicht eine Langzeitlagerung unter Erhalt ihrer spezifischen Merkmale und Eigenschaften. Wesentliches Ziel dabei ist, ungewollte Veränderungen, v.a. Differenzierung, Dedifferenzierung oder den Verlust von Synthesleistungen zu verhindern. In der vorliegenden Arbeit wurde diese durchgeführt, da sich die verschiedenen Experimente jeweils über mehrere Wochen erstreckten und sich im Rahmen der normalen Wachstumsphasen von Zellen in Kultur nach einiger Zeit irreversible degenerative Zellveränderungen einstellen bzw. Kontaminationen einschleichen können.

Die einzufrierenden Zellen wurden für die Kryokonservierung für 5min bei 1500rpm zentrifugiert und anschließend mit 1ml Einfriermedium, bestehend aus 90% FCS und 10% DMSO, in eine Kryoampulle übernommen. DMSO ist eine kryoprotektive Substanz, die eine Kristallwasserbildung und eine damit verbundenen Zellschädigung beim Einfriervorgang verhindert. Anschließend wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

2.3 DNA-Techniken

2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.3.1.1 Prinzip der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) imitiert die Replikation von Nukleinsäuren *in vitro*. Dabei wird ein einzelner kurzer DNA-Abschnitt viele Male kopiert und auf diese Weise vermehrt, sodass man dadurch aus einem einzigen Ausgangsmolekül viele Mio. Kopien herstellen kann. Die PCR basiert dabei auf der Verwendung einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase, die die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente (Matrizen-DNA, Template) erlaubt, die durch die in der Reaktion verwendeten 5'- und 3'-Primer festgelegt sind. Die PCR läuft ab in einer wiederholten Abfolge von Zyklen bestehend aus Denaturierung, Primeranlagerung (Primerhybridisierung, Primer-Annealing) und Elongation (Primer-Extension = Neusynthese einer Kopie des Genabschnittes) (Abb.7).

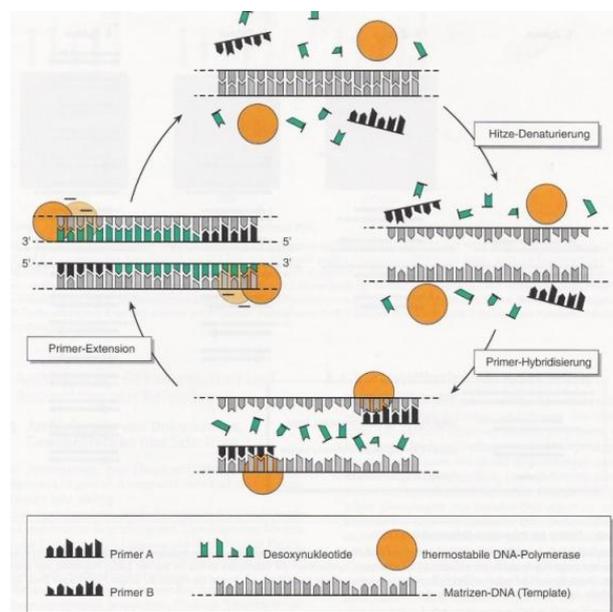


Abb.7 Schema eines PCR-Zyklus (Böcker, Denk, Heitz, 2001).

Für die PCR wurden zwei Oligonukleotide (Primer) gewählt, die je komplementär zum 5'- und 3'-Ende der DNA waren. Als erstes wurde die doppelsträngige DNA bei 94°C denaturiert. Danach wurde das Reaktionsgemisch bis zu derjenigen Temperatur abgekühlt, bei der die Primer spezifisch an die zu amplifizierenden DNA-Fragmente hybridisieren (Annealing). Diese Temperatur muss für jedes Primerpaar getrennt bestimmt werden, da sie von der Länge der verwendeten Primer und ihrem Gehalt an den Basen A und T bzw. C und G abhängt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch wieder auf 72°C erhitzt, sodass die bei dieser Temperatur optimal aktive thermostabile DNA-Polymerase die Primer unter Verwendung der cDNA als Matrize durch Anfügen von Desoxyribonukleotid-Triphosphaten (dNTPs) elongieren kann, die DNA-Polymerase synthetisiert also an den Primern beginnend neue Komplementärstränge und produziert so identische Kopien der verwendeten Matrizen-DNA. Die verwendete DNA-Polymerase hat zusätzlich eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität ("Proofreading") um Fehler bei der Synthese der Komplementärstränge zu verhindern. Bei jedem Zyklus verdoppelt sich theoretisch die Menge erhaltener DNA-Fragmente, sodass die Anzahl vorhandener Kopien exponentiell zunimmt.

2.3.1.2 Lösungen

10x PCR-Puffer:

200mM	Tris/HCl
100mM	KCl
100 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
20 mM	MgSO ₄
1 mg/ml	BSA
1%	(v/v) Triton X-100

2.3.1.3 Durchführung der PCR

Die PCR wurde in der vorliegenden Arbeit zur Amplifikation von cDNA-Fragmenten aus revers transkribierter RNA oder zur Einführung von Mutationen verwendet. Dafür wurden Reaktionsansätze mit folgenden Komponenten in 0,5ml PCR- Reaktionsgefäßen gebildet:

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

Folgendes Grundprogramm wurde verwendet:

Denaturing: 94°C	Annealing: 62°C	Extension: 72°C
1min	1min	2min
ca. 25 Zyklen		

Final Extension: 72°C	Soak: 4°C
10min	∞

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

Mithilfe der PCR wurden die Mutationen bei pEYZ/mA1-K → R nach dem folgenden Prinzip eingeführt (Abb.8):

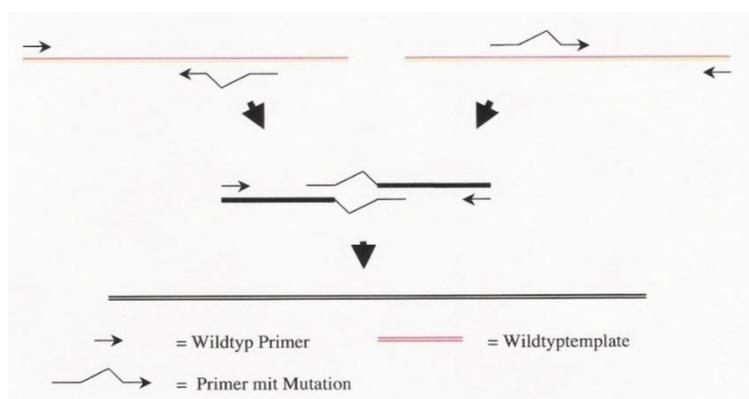


Abb.8 Schema zur Einführung von Mutationen mithilfe der PCR.

2.3.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

2.3.2.1 Prinzip der gelelektrophoretischen Auftrennung

DNA-Fragmente (bzw. Nukleinsäuren im Allgemeinen) sind aufgrund der negativen Ladungen ihrer Phosphatgruppen im Phosphodiesterückrat bei neutralem pH polyanionisch und bewegen sich daher in einem elektrischen Feld in Richtung Anode. Diese Fragmente können nun in einer als Molekularsieb fungierenden Gelmatrix nach ihrer Größe aufgetrennt werden, wobei die Trennschärfe von der Porosität des Gels und damit von der Agarosegelkonzentration abhängig ist. 1%ige Agarosegele eignen sich für die Auftrennung von Nukleinsäuren im Bereich von 1-10kb, während für kleinere Fragmente im Bereich von 0,1-1kb 3%ige Agarosegele zum Einsatz kommen. Bei der Auftrennung kann sich ein DNA-Fragment desto schneller durch das Gel bewegen, je kleiner es ist, da die zurückgelegte Wegstrecke eines DNA-Fragmentes umgekehrt proportional zum Logarithmus der Basenpaare ist.

Nach erfolgter Auftrennung können die Nukleinsäuren mittels des zwischen den Basen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid unter UV-Licht mit der Wellenlänge 265nm visualisiert werden. Durch den Vergleich mit Nukleinsäure-Standards bekannter Größe lässt sich die Größe der Fragmente dabei bestimmen.

2.3.2.2 Lösungen

10x Probenpuffer:

50%	Glycerin
14mM	EDTA pH 8,0
0,25% (w/v)	Bromphenolblau
0,25% (w/v)	Xylencyanol

1x TAE:

40mM	Tris-Acetat
10mM	EDTA

2.3.2.3 Durchführung der Gel-Elektrophorese

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

2.3.2.4 DNA-Elution nach der Gel-Elektrophorese

Nach der Gel-Elektrophorese wurde das DNA-Fragment und/oder der Vektor aus dem Gel unter UV-Licht ausgeschnitten und unter Verwendung des „UltraClean™ DNA purification kit“ (siehe 2.1.8) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel eluiert. Dafür wurde zuerst eine Natriumiodid-Lösung (Ultra SALT) zu den Gelstücken zugegeben und bei 55°C für ca. 5min erhitzt bis das Gel geschmolzen war. Dann wurde eine Lösung mit Siliziumkugeln (Ultra BIND) hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 5min inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 1min bei 14000rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde dann in 1ml Ultra WASH (NaCl/Tris/EDTA-Lösung mit Ethanol) resuspendiert und gewaschen. Nach erneutem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet zuletzt in H₂O resuspendiert, für 5min bei 55°C erhitzt, und nach Abzentrifugation für 1min bei 14000rpm wurde der Überstand mit der gereinigten DNA in ein neues Röhrchen übernommen.

2.3.3 Klonierungen

Klonierung bedeutet in der Gentechnologie den Einbau eines Gens oder DNA-Abschnitts in einen Klonierungsvektor und dessen anschließende Vermehrung in geeigneten Zellen. Als Klonierungsvektoren dienten in der vorliegenden Arbeit Plasmide (Abb.9).

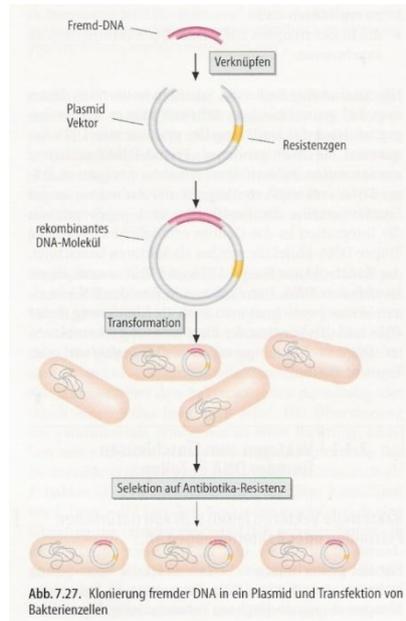


Abb.9 Schema der Abfolge der Klonierungsexperimente (Löffler, Petrides, 2003).

Zur Vorbereitung des Vektors pEYZ/MCS (siehe 2.1.11) wurden Restriktionsenzyme für entsprechende Schnittstellen in der „multiple cloning site“ (MCS) ausgewählt. Das Vektor-Plasmid wurde mit diesen Restriktionsendonukleasen gemäß den Angaben des jeweiligen Enzymherstellers behandelt, die durchgeführten Restriktionsreaktionen wurden durch Agarosegelelektrophorese-Analyse auf ihren Erfolg hin überprüft. Dafür wurde der Reaktionsansatz elektrophoretisch über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt, das gewünschte DNA-Fragment ausgeschnitten und eluiert (siehe 2.3.2).

Das in den Vektor einzusetzende DNA-Fragment wurde entweder mittels PCR amplifiziert oder aus einem bereits existierenden Plasmid ausgeschnitten („Umklonierung“). Diese DNA-Fragmente wurden dann ebenfalls mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten. Nach der Restriktion wurden die Fragmente in gleicher Weise wie die Vektoren eluiert.

Anschließend wurden das DNA-Fragment und das Vektorplasmid durch eine Ligation verknüpft, das DNA-Fragment wurde damit in das Vektorplasmid eingebaut und eine rekombinante DNA aus DNA-Fragment und Vektorplasmid erzeugt. Dafür wurden das geschnittene Vektorplasmid und das geschnittene DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt und zusammen mit der T4-DNA-Ligase in Ligationspuffer für 8-12h bei 16°C inkubiert. Die Ligase katalysiert dabei die Bildung

von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden. Zur Kontrolle der Ligationsreaktion wurde gleichzeitig die gleiche Menge an Vektorplasmid ohne Fragment angesetzt.

Um die rekombinante DNA nun in Wirtszellen einzubringen und dort zu vermehren, wurden beide Ligationsansätze nach der Ligation in kompetente E.coli-Bakterien (Top10F) transformiert. Dafür wurden 50µl Suspension kompetenter Bakterien mit 1,5µl aus dem 10µl Ligationsansatz versetzt und für 20min auf Eis inkubiert, anschließend 30s lang auf 42°C erhitzt und für 1-2min wieder auf Eis abgekühlt. Weiterhin wurden die Ansätze in 0,5ml LB-Medium aufgenommen und für 1h bei 37°C mit 180U/min geschüttelt. Die so gewonnenen Bakterienkulturen wurden dann auf Ampicillin-haltigem (40µg/ml) Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Das Antibiotika Ampicillin diente dabei zur Selektion der Bakterienklone mit der rekombinanten DNA, da das verwendete Vektorplasmid pEYZ/MCS (neben einer Zeocin-Resistenz) auch ein Ampicillin-Resistenzgen enthält. Dieses macht somit die Bakterien gegen das Antibiotika resistent, sodass nur die Bakterienklone mit der gewünschten DNA auf dem Ampicillin-haltigen Agar überleben und wachsen können. Das Verhältnis der über Nacht gewachsenen Koloniezahlen auf den beiden Agar-Platten gab Aufschluss über den Erfolg der Ligation im Verhältnis zur Religation.

Aus den mutmaßlich positiven, also Vektor- und Fragment-exprimierenden Kolonien wurde dann die DNA isoliert (siehe 2.3.4) und mittels geeigneter Kontroll-Restriktions-Analyse mit entsprechenden Endonukleasen (nach Angaben des jeweiligen Enzymherstellers) und Sequenzierung verifiziert (siehe 2.3.5).

2.3.4 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen

2.3.4.1 Prinzip der Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen

Die Isolation der rekombinanten DNA aus den Bakterienwirtszellen läuft nach folgendem Prinzip ab (Abb.10):

Zunächst wird eine Bakterienkultur herangezüchtet und geerntet. Die gewonnenen Bakterienzellen werden aufgebrochen, sodass ihr Inhalt frei wird. Anschließend wird dieser Zellextrakt so behandelt, dass alle Bestandteile außer der DNA entfernt werden.

Schließlich wird die DNA angereichert und die gewünschte Plasmid-DNA von der ebenfalls in den Zellen vorhandenen chromosomalen Bakterien-DNA abgetrennt. Die DNA-Konzentration kann anschließend photometrisch bestimmt werden.

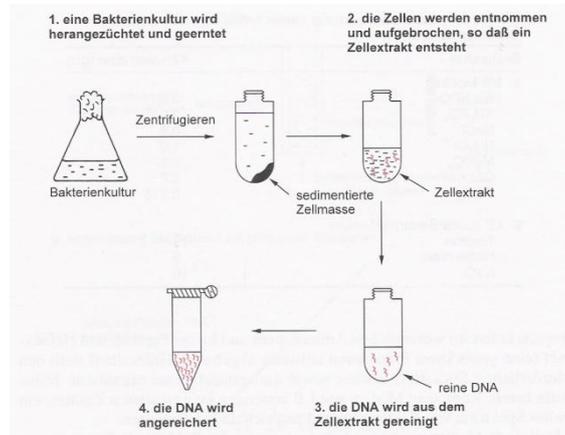


Abb.10 Schema der Reinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen (Brown, 2002).

2.3.4.2 Lösungen

Lösung I:

50mM Glukose, 25mM Tris-HCl pH 8.0 und 10mM EDTA

Lösung II:

0,2N NaOH, 1% SDS

Lösung III:

3M Kaliumacetat, 2M Essigsäure

2.3.4.3 Durchführung der Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen

Je 3ml LB-Medium mit Ampicillin (40µg/ml) wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln bei 180U/min vermehrt, wobei sich die E.coli-Bakterien ca. alle 30min teilten. Am nächsten Tag wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 1min bei 14000rpm pelletiert, in 100µl Lösung I resuspendiert und durch Zugabe von 200µl Lösung II lysiert. Durch Zugabe von 150µl Lösung III erfolgte die Neutralisation. Anschließend wurden die Lysate zum Reinigen für 10min

bei 14000rpm zentrifugiert und die DNA aus den Überständen durch Zugabe von 2,5 Volumina 100%igem Ethanol unter erneuter Zentrifugation ausgefällt, sedimentiert und anschließend in Wasser aufgenommen.

2.3.4.4 MAXI-Präparation von Plasmid-DNA

Die Gewinnung größerer DNA-Mengen erfolgte auf ähnliche Weise unter Verwendung des „Genelute Plasmid Maxi-Prep Kit“ der Firma Sigma gemäß der mitgelieferten Vorschrift. Dafür wurden die Bakterien in 250ml LB-Medium mit Ampicillin vermehrt. Nach Verwendung der Lösungen I, II und III wurde hier zusätzlich der Überstand mit der DNA durch eine Säule filtriert, um die DNA von RNAsen zu reinigen. Zur Elution der DNA von der Säule wurde ein spezieller Elutionspuffer verwendet. Zur Fällung der DNA wurden 500µl 3M Na-Acetat und 12,5ml 100% Ethanol zugegeben. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation für 15min bei 14000rpm sedimentiert, mit 5ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 10min bei 4000rpm zentrifugiert und zum Schluss in Wasser aufgenommen.

2.3.4.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

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

2.3.5 Sequenzierung mittels Fluorochrom-markierter Nukleotide

2.3.5.1 Prinzip der Sequenzierung mittels Fluorochrom-markierter Nukleotide

Die DNA-Sequenzierung mittels Fluorochrom-markierter Nukleotide basiert auf der Didesoxynukleotid-Methode nach Sanger (Stryer, 1996; Böcker, Denk, Heitz, 2001), erfordert dabei aber keine getrennten, nukleotidspezifischen Einzelreaktionen mehr, da der basenspezifische Strangabbruch durch (4) Fluoreszenzfarbstoff-markierte Didesoxynukleotide erfolgt und die so entstandenen Fragmente daher anhand ihrer Farbe am 3'-Ende identifizierbar sind (Abb.11).

Sequenz von der Software des Computers am Sequenzierungsgerät als 4-Farbendiagramm ausgegeben, wobei jeder Base eine Farbe zugeordnet ist. Unter Optimalbedingungen können so ca. 500 Basen gelesen werden.

2.3.5.2 Durchführung der Sequenzierungs-Polymerase-Kettenreaktion

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

ca. 1µg	DNA in H ₂ O
1µl	Primer (25µM): PSI und IRES (Oligonukleotidsequenz siehe 2.1.10)
2µl	„Abi Prism Big Dye DNA Sequencing Kit“ (Perkin Elmer)
ad H ₂ O auf 10µl	

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

2.3.5.3 Reinigung und Analyse des DNA-Sequenzierungsansatzes

Die Reinigung der zu sequenzierenden DNA nach der PCR erfolgte über eine Sephadex-Säule. Zur Herstellung der Säule wurden mit 150-250µl in Wasser gelöster Sephadex-Beads (SephadexTM G-50 DNA Grade Fine, Amersham Biosciences) in eine Pipettenspitze überführt. Die Sephadex-Säule wurde anschließend in ein 2ml Reaktionsgefäß durch eine Öffnung im Verschluss des Reaktionsgefäßes gesteckt und zweimalig für 3min bei 3000rpm zentrifugiert, um das Wasser zu entfernen. Danach wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt, der DNA-Sequenzierungsansatz auf die Sephadex-Säule gegeben und erneut für 3min bei 3000rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde anschließend in 15µl Formamid-Puffer, ein spezieller Sequenzierungs-Puffer (TSR-Puffer, Perkin Elmer), aufgenommen und zur Sequenzierung in ein 200µl Eppendorf-Cap überführt.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten

Lösungen

RIPA-Puffer („Radioactive Immune Precipitation Assay“):

97,5%	PBS
1%	NP-40 (100%)
0,5%	Natrium Deoxychololat (NOC)
0,1%	SDS

Zugabe von 1:100 Proteaseinhibitor und 1:1000 DTT (1M) direkt vor der Benutzung.

6x Laemmli-Probenpuffer:

14ml	Puffer B (siehe 2.4.3)
6ml	Glycerin
2g	SDS
2,5mg	Bromphenolblau
1,85g	DTT

Zur Herstellung der Gesamtzell-Proteinextrakte wurden *in vitro*-stimulierte Zellen ($1-5 \times 10^6$) zunächst in Eppendorf-Caps aufgenommen, durch Zentrifugation für 1min bei 14000rpm sedimentiert und das Medium quantitativ abgesaugt. Anschließend wurden die sedimentierten Zellen in 50 μ l RIPA-Puffer aufgenommen, für 5min bei 4°C geschüttelt und anschließend für 10-20min bei 4°C mit 14000rpm zentrifugiert. Danach wurde der RIPA-Proteinextrakt aus den zentrifugierten Eppendorf-Caps vorsichtig abpipettiert, in 10 μ l 6x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und für 8-10min bei 98°C lysiert. Nach erneuter Abzentrifugation wurde der Überstand mit den Gesamtzell-Lysaten bei -20°C gelagert.

2.4.2 Immunpräzipitation

Mittels Immunpräzipitation kann die Bindung zwischen 2 Proteinen analysiert werden, in der vorliegenden Arbeit wurde damit die Ubiquitinylierung der K-A1-Mutanten untersucht. Für die Präzipitation der Immunkomplexe wurde der gegen die K-A1-Mutanten gerichtete α -A1-Antikörper verwendet. Dieser spezifische A1-Antikörper war bereits in der Arbeitsgruppe hergestellt worden (Herold, 2005). Für die vorliegende Arbeit wurde der Antikörper aus dem aufgereinigten Serum in einem Verhältnis von 1:50 in 10% BSA aufgenommen.

Für die Immunpräzipitation wurden ca. 1×10^7 293-T-Zellen in Eppendorf-Caps überführt, durch Zentrifugation für 1min bei 14000rpm sedimentiert und das Medium wurde quantitativ abgesaugt. Anschließend wurden die sedimentierten Zellen in 200 μ l RIPA-Puffer aufgenommen, für 20min bei 4°C unter Rotation inkubiert und für 20min bei 4°C mit 13000rpm zentrifugiert. Danach wurde 150 μ l RIPA-Proteinextrakt aus den zentrifugierten Eppendorf-Caps entnommen und mit diesen zusammen mit 500 μ l RIPA-Puffer ein neuer Ansatz gebildet. Zu diesem Ansatz wurde 25 μ l α -A1-Antikörper gegeben und für 2h unter Rotation bei 4°C inkubiert.

Im Anschluss daran wurde der Ansatz mit Protein G-Beads (Protein G Sepharose 4 Fast Flow, Amersham Biosciences) für 1h bei 4°C versetzt, um die Immunkomplexe zu präzipitieren. Zur Vorbereitung der Protein G-Beads waren diese mit RIPA-Puffer gewaschen worden, um unspezifische Bindungen an die Beads zu verringern. Anschließend wurde der Proteinkomplex aus Protein G-Beads, Antikörper und Protein abzentrifugiert und 3mal mit dem RIPA-Lysepuffer gewaschen, um erneut unspezifische Bindungen zu verringern. Danach wurde der Überstand mit den Proteinkomplexen in 50 μ l 2x Laemmli- Puffer (6x Laemmli- Probenpuffer 1:3 mit PBS verdünnt) eluiert und für 8-10min bei 98°C erhitzt.

2.4.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)

2.4.3.1 Prinzip der SDS-PAGE

In einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970; Löffler, Petrides, 2003) können Proteinproben nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Man macht sich dabei zu Eigen, dass Proteine aufgrund ihrer Ladungen im elektrischen Feld wandern können.

In der SDS-PAGE werden die Polypeptidketten zunächst durch das negativ geladene, zwischen aliphatischen Aminosäureresten interkalierende Detergens SDS entfaltet, aus Assoziationen mit anderen Proteinen oder Lipiden freigesetzt und in Abhängigkeit ihrer Größe negativ geladen, wodurch ihre ursprüngliche Nettoladung vernachlässigbar wird. Als Trägermatrix dienen dabei chemisch inerte, als Molekularsieb wirkende Polyacrylamidgele, die durch Polymerisation von Acrylamid und dem quervernetzenden N,N'-Methylenbisacrylamid in Anwesenheit von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) hergestellt werden. Das TEMED katalysiert die Bildung freier Radikale aus APS, welche dann die Polymerisation initiieren. Die Porengröße des Polyacrylamidgels kann durch Variation des Vernetzungsgrades so eingestellt werden, dass sich eine optimale Auftrennung der Proteine ergibt.

Damit alle SDS-Proteinkomplexe hierbei gleichzeitig in das Trenngel gelangen, ist diesem ein Sammelgel vorgelagert. Hier sind bei pH 6,8 aufgrund des zwitterionischen Glycins und des negativ geladenen Chlorids zwei Pufferfronten vorhanden, zwischen denen sich ein die SDS-Proteinkomplexe konzentrierender Feldstärkegradient ausbildet. Bei der Elektrophorese wandern die durch das SDS negativ geladenen Proteine in Richtung Anode. Da die Proteine je nach Größe unterschiedlich schnell wandern- kleine Proteine wandern am schnellsten- werden sie somit nach ihrer Größe aufgetrennt.

2.4.3.2 Lösungen

Puffer A:

1,5M Tris/HCl pH 8,8, 0,4% (w/v) SDS

Puffer B:

0,5M Tris/HCl pH 6,8, 0,4% (w/v) SDS

Laufpuffer:

250 mM Tris, 2 M Glycine, 1% (w/v) SDS

Acrylamid-Mix:

30% (w/v) Acrylamid/0,8% (w/v) Bisacrylamid in H₂O AppliChem GmbH

Ammoniumperoxodisulfat (APS) 10%

Roth

TEMED

AppliChem GmbH

Bromphenolblau 2,5% in H₂O

2.4.3.3 Herstellung der Gele

Trenngel (15ml):

Acrylamidkonzentration (%)	10	12,5	15
Acrylamid-Mix (ml)	5	6,25	7,5
Puffer A (ml)	3,75	3,75	3,75
H ₂ O (ml)	6,25	5	3,75
10% Ammoniumperoxodisulfat (µl)	150	150	150
TEMED (µl)	25	25	25

Sammelgel (5ml):

650µl	Acrylamid-Mix
1,25ml	Puffer B
3ml	H ₂ O
50µl	10% Ammoniumperoxodisulfat
5µl	TEMED

Mit 70%igem Ethanol gereinigte Minigelplatten wurden mit den zugehörigen Abstandshaltern zusammengesetzt und in eine Gießapparatur eingespannt. Zunächst wurde das Trenngel bis ca. 2,5cm unter den oberen Rand gegossen und zur Ausbildung einer geraden Polymerisationskante vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser sorgfältig entfernt, das Sammelgel eingegossen und ein Kamm zur Erzeugung von Geldaschen luftblasenfrei eingesetzt.

Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in die Vertikallaufkammer eingespannt.

2.4.3.4 Durchführung der SDS-PAGE

Das obere und das untere Pufferreservoir der Vertikallaufkammer wurde mit 1x Laufpuffer gefüllt, und bei Bedarf wurden Luftblasen aus den Geltaschen mit einer Spritze entfernt. Anschließend wurden 10µl der Protein-Extrakte aufgetragen und stromkonstant bei 35mA elektrophoretisch aufgetrennt. Um dabei anschließend die Proteinbanden identifizieren und die Größe des Proteins schätzen zu können, wurden neben den Proben 4µl „Bench Mark™ Prestained Protein Ladder (GibcoBRL)“ aufgetragen, ein Gemisch aus 10 Proteinen bekannten Molekulargewichtes zwischen 10-200kDa.

2.4.4 Western-Blotting

2.4.4.1 Prinzip des Western-Blots

Mittels Western-Blotting kann man bestimmte Proteine eines Proteingemisches spezifisch nachweisen. Dafür werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Blotmembran (aus Nitrozellulose oder Nylon) transferiert, wo sie mit einem spezifischen, gegen das ge- bzw. untersuchte Protein gerichteten, primären Antikörper detektiert werden können. Dieser primäre Antikörper wird dann in einem zweiten Inkubationsschritt mit einem sekundären Anti-Immunglobulin-Antikörper detektiert. Dieser sekundäre Antikörper ist erstens gegen den primären Antikörper gerichtet und enthält zweitens ein sog. Marker-Molekül, z.B. einen fluoreszierenden Farbstoff oder Enzyme wie alkalische Phosphatase oder Meerrettichperoxidase. Durch dieses Marker-Molekül kann die immunologische Detektion z.B. auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden (Abb.12).

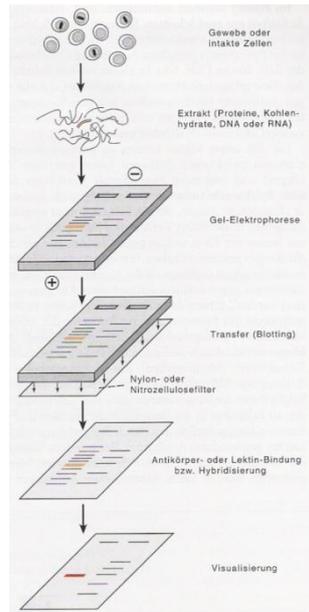


Abb.12 Schema des Western- Blots (Böcker, Denk, Heitz, 2001).

2.4.4.2 Lösungen

Anodenpuffer:

100 ml Roti-Blot A (Roth), 200 ml Methanol (AppliChem), 700 ml H₂O

Kathodenpuffer:

100 ml Roti-Blot K (Roth), 200 ml Methanol (AppliChem), 700 ml H₂O

1 x TBS/0,1 %TWEEN:

100 ml 10 x TBS, 0,1% TWEEN-20 (AppliChem), 900 ml H₂O

Blockpuffer aus Magermilch:

5% (w/v) Magermilchpulver in 1 xTBS/0,1% TWEEN

Blockpuffer aus Rinderserumalbumin:

10% (w/v)) BSA in 1x TBS/0,1% TWEEN

ECL-Lösung I:

Amersham Biosciences

ECL-Lösung II:

Amersham Biosciences

“Enhanced Luminogen Detection reagent”:

Lösung A/Lösung B 1:40, Amersham Biosciences

2.4.4.3 Transfer der Proteine auf die Blotmembranen

Zur Vorbereitung des Blottings wurden die Nylon-Blotmembran (ImmobilonTM-P, PVDF-Membran, Millipore) und 5 Whatman-Papiere auf Gelgröße zugeschnitten. Dann wurden je 5 Whatman-Papiere in Anodenpuffer und Kathodenpuffer und die Blotmembran kurz in 100% Methanol getaucht.

Nachdem die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt waren, wurde das Sammelgel abgetrennt und das (Trenn-)Gel kurz mit Wasser gespült.

Anschließend erfolgte der Aufbau der Blotting-Kammer wie folgt:

Kathode (-)

5 in Kathodenpuffer getränkte Whatman- Papiere

Gel

Blotmembran

5 in Anodenpuffer getränkte Whatman- Papiere

Anode (+)

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

2.4.4.4 Immunologische Detektion

Alle im Folgenden beschriebenen Schritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt:

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Blotmembran für 3-4h bei Raumtemperatur in Magermilch- oder BSA-Blockpuffer je nach verwendetem primären Antikörper geschwenkt und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper in Blockpuffer inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran

3x5-10min mit 1x TBS/0,1% TWEEN gewaschen und dann mit dem sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörper für 1-2h in Blockpuffer erneut inkubiert. Danach wurde die Membran erneut wie beschrieben gewaschen und die Nachweisreaktion unter Verwendung des ECL-Systems (Amersham) durchgeführt.

2.4.4.5 Das ECL-System

Mit dem ECL-(enhanced chemiluminescence)System werden gebundene Antikörper-Peroxidase-Konjugate in der Dunkelkammer nachgewiesen, indem in der von der Peroxidase katalysierten Reaktion Licht erzeugt wird, mit dem dann ein Röntgenfilm belichtet wird.

Die ECL-Lösungen I und II wurden zu jeweils 1ml gemischt und die Membran für 1min mit diesem Gemisch inkubiert. Teilweise wurde auch das "Enhanced Luminogen Detection reagent" verwendet. Danach wurde die Membran luftblasenfrei zwischen zwei Plastikfolien gelegt. In der Dunkelkammer erfolgten dann unterschiedlich lange Belichtungen eines Röntgenfilms (RETINA XBA, Fotochemische Werke GmbH) in einer lichtdichten Kassette, meist zwischen 1-10min. Dieser Röntgenfilm wurde nach der Belichtung sofort entwickelt. Um eine Zuordnung der Banden auf dem Röntgenfilm zu ermöglichen, wurde die auf der Blotmembran sichtbare Proteinleiter (siehe 3.3.4.3) auf den Röntgenfilm übertragen. Damit konnte das ge- bzw. untersuchte Protein identifiziert werden.

3. Ergebnisse

Wie viele kurzlebige Proteine wird auch das A1-Protein, das eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt, über den Ubiquitin-Proteasomen-Weg durch Ubiquitinylierung an Lysinresten markiert und anschließend in den Proteasomen degradiert (Herold et al., 2006). Die Hypothese unserer Forschungsgruppe besteht darin, dass das C-terminale Ende von A1 als Plattform für die Bindung einer bisher unbekanntes Ubiquitin-E3-Ligase dient. Diese bindet an eine bestimmte Aminosäuresequenz im C-terminalen Ende von A1, konjugiert Ubiquitin an Lysine von A1 und markiert es dadurch für den proteasomalen Abbau. Wie bereits erwähnt war die zentrale Frage der vorliegenden Arbeit, an welchen Lysinen von A1 die Ubiquitinylierung stattfindet. Dafür wurden verschiedene Mutanten des A1-Proteins (K-A1-Mutanten) kloniert, bei denen die insgesamt 11 Lysinreste von A1 (Abb.13) gruppenweise gegen Argininreste ausgetauscht wurden (s.u.). Die K-A1-Mutanten wurden dann auf ihre Ubiquitinylierbarkeit sowie ihre Stabilität und ihr anti-apoptisches Potential hin untersucht.

3.1 Lysinmutationen von A1

Im Folgenden werden die Mutanten des A1-Proteins zusammenfassend vorgestellt, bei denen die Lysinreste von A1 gruppenweise gegen Argininreste (K → R) ausgetauscht wurden (K-A1-Mutanten) (Abb.13). Der Austausch von Lysin gegen Arginin wurde gewählt, weil Arginin ebenfalls eine positiv geladene Aminosäure ist, wodurch die Gefahr von Faltungseffekten vermieden werden sollte (Abb.14).

132/1	162/11	
ATG gct gag tct gag ctc ATG CAT atc cac	tcc ctg gct gag cac tac ctt cag tat gtg	
M A E S E L M H I H S L A E H Y L Q Y V		
192/21	222/31	
cta cag gta ccc gcc ttt gag tcg gct cca	agc caa gca tgc aga gtg cta caa aga gtt	
L Q V P A F E S A P S Q A C R V L Q R V		
252/41	282/51	
gct ttc tcc gtt cag aag gaa gtt gaa aag	aat ctg aag tca tac ttg gat gac ttt cac	mA1- K1
A F S V Q K E V E K N L K S Y L D D F H		
312/61	342/71	
gtg gaa tcc ata gat acc gcc aga ata ata	ttc aac caa gtg atg gaa aaa gag ttt gaa	mA1- K2
V E S I D T A R I I F N Q V M E K E F E		
372/81	402/91	
gat ggc atc att aac tgg gga agg att gtg	act ata ttt gcc ttt ggg ggt gtt ctc ctc	mA1- K3
D G I I N W G R I V T I F A F G G V L L		
432/101	462/111	
aaa aaa ctt cca caa gag cag att gcc ctg	gat gta tgt gct tac aaa caa gtt tcc agt	mA1- K4
K K L P Q E Q I A L D V C A Y K Q V S S		
492/121	522/131	
ttt gtg gca gaa ttc ata atg aat aac aca	gga gaa tgg ata cgg cag aat gga ggt tgg	mA1- K5
F V A E F I M N N T G E W I R Q N G G W		
552/141	582/151	
gaa gat ggc ttc ata aag aag ttt gaa ccc	aaa tct ggc tgg ctg act ttt ctg cag atg	
E D G F I K K F E P K S G W L T F L Q M		
612/161	642/171	
aca gga cAG ATC Tgg gaa atg ctc ttt ctc	ctc aag taa	
T G Q I W E M L F L L K *		

Abb.13 Basen- und Aminosäuresequenz von A1. Die farbige markierten Bereiche zeigen die vorgenommenen Veränderungen bei den K-A1-Mutanten.

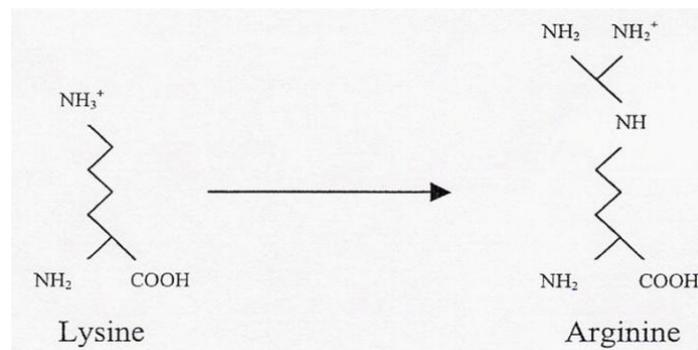


Abb.14 Schematische Darstellung der ausgetauschten Aminosäuren Lysin und Arginin.

In einem ersten Schritt wurden die Mutanten mA1-K1, mA1-K2, mA1-K3, mA1-K4 und mA1-K5 kloniert, die Lage der mutierten Lysine ist in Abb.13 farblich kodiert dargestellt.

Als nächstes wurde die Mutante mA1-K1-K2 kloniert. Da die dreidimensionale Struktur von A1 bisher nicht bekannt ist, wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Berberich in Zusammenarbeit mit Schleinkofer und Schultz (Institut für Bioinformatik, Würzburg) das A1-Molekül auf der Basis von Bcl-x_L modelliert (nicht veröffentlichte Daten). Nach diesem Modell liegen die 4 Lysine der mA1-K1- und mA1-K2-Mutationen an den Rändern der hydrophoben BH3-bindenden Grube von A1. Da das A1-Protein nach Bindung von Bim stabilisiert wird und Bim in dieser hydrophoben Grube bindet (Herold, 2005), ist es vorstellbar, dass nach Bindung von Bim an A1 diese Lysine verdeckt werden und so nicht mehr durch die Ubiquitin-E3-Ligase ubiquitinyliert werden können, sodass das Protein nicht mehr für den proteasomalen Abbau markiert werden kann.

Als letztes wurden die Mutanten mA1-K1-K5, mA1-K2-K5, mA1-K3-K5, mA1-K4-K5 und mA1-K1-K2-K5 kloniert. Diese Mutanten kombinieren die Mutationen mA1-K1, mA1-K2, mA1-K3, mA1-K4 und mA1-K1-K2 mit der mA1-K5-Mutation als Mutation im C-Terminus. Obwohl in Herold et al., 2006 gezeigt wurde, dass die letzten 4 Lysine im C-Terminus, die die Mutation mA1-K5 darstellen, für die Instabilität des Proteins nicht notwendig sind, schließen diese Untersuchungen nicht aus, dass diese Lysine hinreichend für die Destabilisierung sind.

3.1.1 Klonierung der K-A1-Mutanten

Um den entsprechenden Aminosäureaustausch für die verschiedenen K-A1-Mutanten zu erzeugen, wurden jeweils in einer 1. PCR aus einer A1-Wildtyp-DNA mithilfe von Oligonukleotidprimern, die die relevanten Mutationen für die verschiedenen K-A1-Mutanten enthielten, cDNA-Fragmente synthetisiert, die die jeweilige Mutation in ihrem 3'- bzw. 5'-Ende trugen. In einer 2. PCR wurden diese beiden Fragmente fusioniert. Das K-A1-Fragment und der Klonierungsvektor pEYZ/MCS wurde mit den unter 2.1.11 beschriebenen Restriktionsendonukleasen geschnitten und mittels der T4-

DNA-Ligase verknüpft (siehe 2.1.11), wodurch die K-A1-Mutanten in den Klonierungsvektor eingebaut wurden. Der Klonierungsvektor pEYZ/MCS (Abb.4) ist ein retroviraler bicistronischer Vektor, und enthält eine „multiple cloning side“ (MCS) und ein chimäres Markergen aus Gelbfluoreszenz und Zeocinresistenz zur Selektion (Kuss et al., 1999). Die Korrektheit der Mutationen wurde durch eine Sequenzierung der rekombinanten DNA überprüft. Exemplarisch zeigt Abb.15 einen Ausschnitt der DNA-Sequenzierung der mA1-K2-Mutante im Vergleich mit dem A1-Wildtyp.

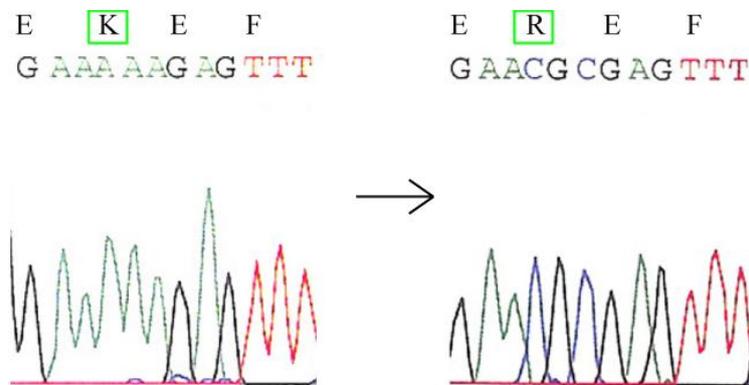


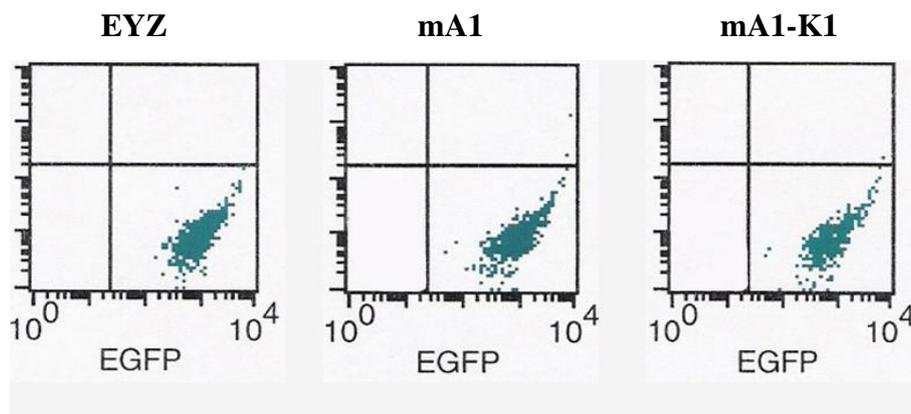
Abb.15 Ausschnitt aus der DNA-Sequenzierung von A1-Wildtyp (links) und mA1-K2 (rechts). E = Glutamat, K = Lysin, R = Arginin, F = Phenylalanin; Nukleotidbasen: A = Adenin, T = Thymin, C = Cytosin, G = Guanin.

3.1.2 Nachweis der Proteinexpression der K-A1-Mutanten im Western-Blot

Zum Nachweis der Proteinexpression der K-A1-Mutanten wurden WEHI-231-Zellen mit den entsprechenden Proteinen über retroviralen Gentransfer transduziert. Die notwendigen rekombinanten Retroviren wurden in 293-T-Zellen hergestellt (siehe 2.2.3). Transduzierte WEHI-231-Zellen wurden mit Zeocin und mithilfe des Zellsorters auf Basis der EGFP-Expression angereichert. Die Reinheit der selektionierten Populationen wurde im FACS überprüft, da die Stärke der Gelb-Fluoreszenz ein Maß für die Zahl der integrierten rekombinanten Proviren darstellt. Dies zeigt Abb.16A exemplarisch für den Klonierungsvektor pEYZ/MCS, den A1-Wildtyp (mA1) und die Mutante mA1-K1.

Zum Nachweis der Proteinexpression der K-A1-Mutanten wurden aus den infizierten WEHI-231-Zellen RIPA-Extrakte hergestellt und im Western-Blot mit dem α -A1-Antikörper detektiert. Die gleichmäßige Beladung der Gele, d.h. die Ladekontrolle, wurde mit der Nachdetektion mit dem α -ERK- und α -GFP-Antikörper überprüft. Trotz gleichmäßiger Beladung der Gele und vergleichbarer Expressionsstärke auf mRNA-Ebene zeigten sich unterschiedliche Proteinmengen zwischen dem A1-Wildtyp und den verschiedenen K-A1-Mutanten (Abb.16B+C). Im Vergleich zum A1-Wildtyp waren nur die Proteinmengen der mA1-K2-, der mA1-K3- und der mA1-K4-K5-Mutante vergleichbar groß, alle anderen Proteinmengen der K-A1-Mutanten waren geringer als die des A1-Wildtyps. Dies deutet darauf hin, dass keine der A1-Mutanten aufgrund der eingeführten Mutation stabiler wurde.

A



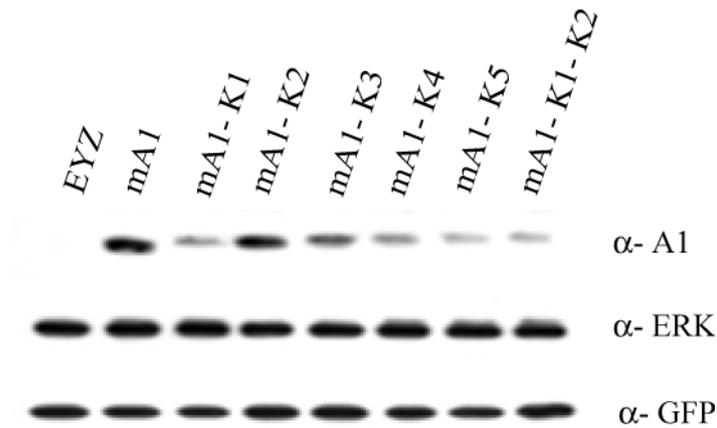
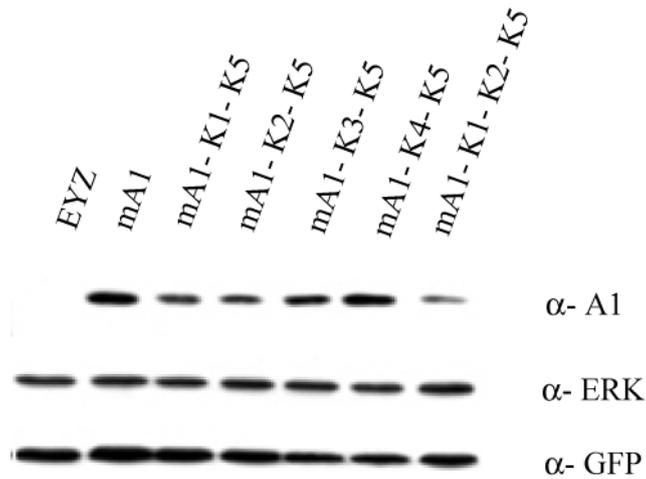
B**C**

Abb.16 Expressionsstärke der K-A1-Mutanten: A1-Wildtyp und seine Mutanten werden unterschiedlich stark exprimiert. (A) FACS-Analyse der Infektionsrate der WEHI-231-Zellen mit den K-A1-Mutanten nach Zellsortung; exemplarisch für EYZ, mA1 und die Mutante mA1-K1 dargestellt. (B+C) Western-Blot von RIPA-Zell-Lysaten mit 1×10^6 WEHI-231-Zellen, detektiert mit α -A1 zum K-A1-Mutanten-Nachweis, mit α -ERK zur Ladekontrolle und mit α -GFP zur Kontrolle der im FACS analysierten Gelbfluoreszenz der pEYZ/mA1-K-Mutanten.

3.2 Das A1-Protein wird nicht an speziellen, sondern (fast) allen Lysinresten ubiquitinyliert

Die Ubiquitinylierung aller K-A1-Mutanten wurde nach transienten Transfektionen in 293-T-Zellen untersucht. Dafür wurden die Zellen mit den Plasmiden, die für die K-A1-Mutanten und für HA-markiertes Ubiquitin kodierten, kotransfiziert (HA-Ubi; HA ist Teil des Hämagglutininproteins des Influenzavirus und dient zur Markierung von Proteinen zum Nachweis im Western-Blot). Nach der Immunpräzipitation mit dem α -A1-Antikörper wurde der Ubiquitinylierungsgrad der K-A1-Mutanten im Westernblot nach Detektion mit dem α -HA-Antikörper untersucht. Die Detektion mit dem α -A1-Antikörper wies die K-A1-Mutanten in den Zellen nach.

Die einzelnen K-A1-Mutanten zeigten im Ergebnis keine signifikanten Unterschiede in der Ubiquitinylierung (Abb.17), auch hatten die Lysinmutationen im C-Terminus (K5-Mutationen) keinen Einfluss auf die Stärke oder das Muster der Ubiquitinylierung. Die in der Abbildung ersichtlichen geringen Unterschiede in der Polyubiquitinylierung ergaben sich aus der nicht völlig gleichen Expression der K-A1-Mutanten in den Zellen. Eine Erklärung für das beobachtete Ergebnis ist, dass die Ubiquitin-E3-Ligase, die für das Anhängen des Ubiquitins verantwortlich ist, Ubiquitinketten an unterschiedliche Lysinreste eines A1-Proteins „anhängt“.

Um die Spezifität der Reaktion zu belegen, wurden als Kontrollen der „leere“ Vektor EYZ in Kombination mit dem HA-Ubi-Expressionsvektor bzw. der Expressionvektor für mA1 alleine (ko)transfiziert; bei Fehlen von mA1 bzw. den K-A1-Mutanten oder bei Fehlen von HA-Ubi kam es zu keinem Signal bei der Detektion mit dem HA-Antikörper. Zusätzlich wurde eine in der Arbeitsgruppe hergestellte Mutante (mA1-K11) verwendet, bei der alle Lysine zu Argininen ausgetauscht waren, so dass keine Ubiquitinylierungsreaktion stattfinden konnte (Abb.17).

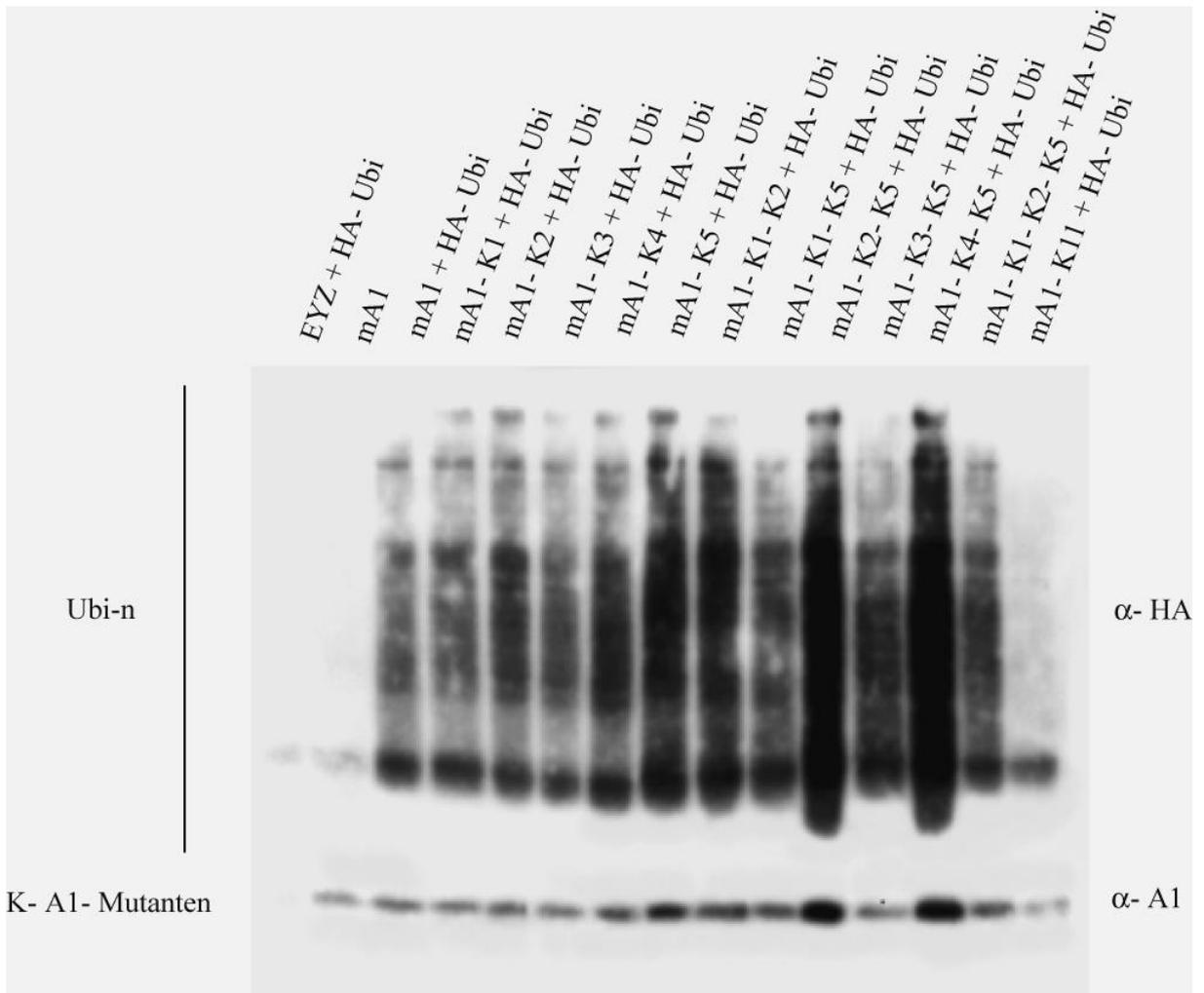


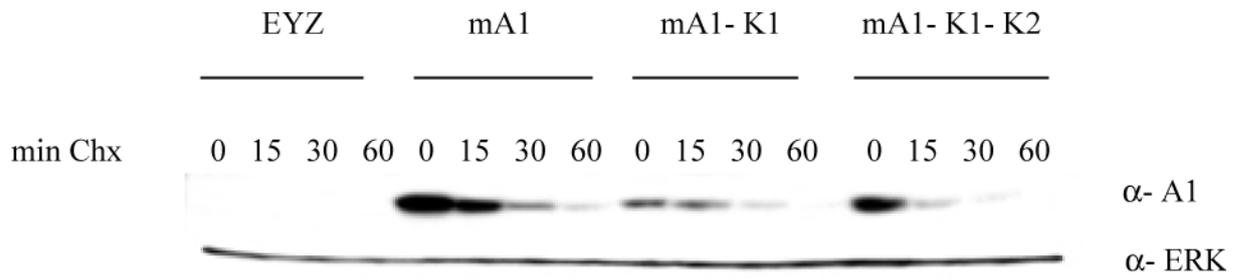
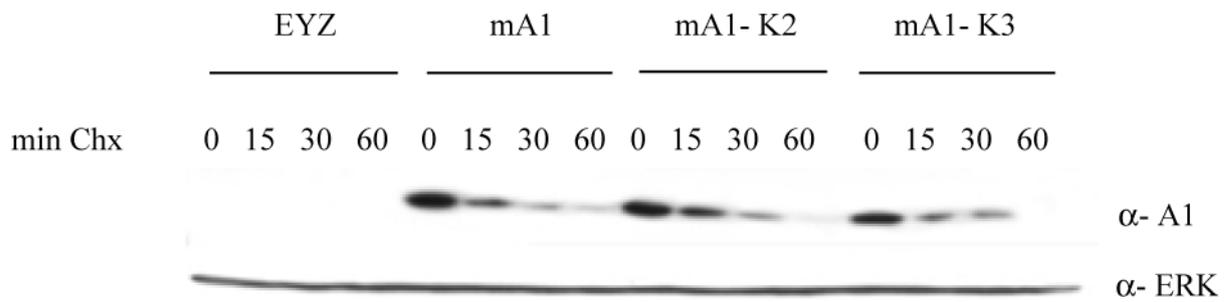
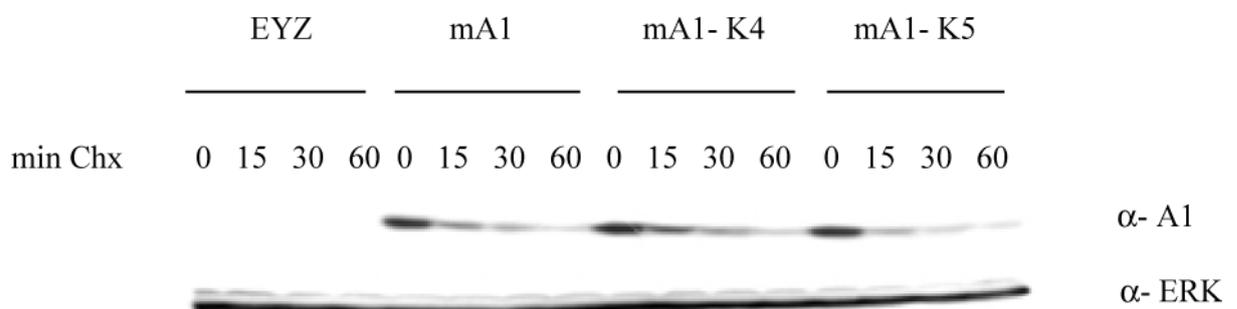
Abb.17 Die K-A1-Mutanten zeigen trotz der verschiedenen Lysin-Mutationen keine Unterschiede in der Ubiquitinylierung. Mit den K-A1-Mutanten und HA-Ubi kotransfizierte 293-T-Zellen wurden nach 2 Tagen in RIPA-Puffer lysiert. Die anschließende Immunpräzipitation erfolgte mit dem α-A1-Antikörper (25µl). Nach der SDS-PAGE mit einem 10µl-Ansatz erfolgte die Detektion im Western-Blot dann mit α-HA und α-A1. Ubi-n = Polyubiquitinylierung.

3.3 Die K-A1-Mutanten mit Ausnahme der K1-K5-Mutante weisen wie das wildtypische A1-Protein eine sehr geringe Stabilität auf

Die sehr kurze Halbwertszeit von A1 wird über den C-Terminus reguliert (Herold et al, 2006). Als Markierung für den proteasomalen Abbau werden verzweigte Ubiquitin-ketten an Lysine angehängt. Im folgenden Versuch sollte geklärt werden, ob durch Mutation bestimmter Lysine die Stabilität des veränderten Proteins im Vergleich zum wildtypischen A1-Protein verändert ist.

Für das Experiment wurden die K-A1-Mutanten, wie oben bereits ausführlicher beschrieben, mittels retroviralem Gentransfer in WEHI-231-Zellen exprimiert. Transduzierte Zellen wurden mit Zeocin selektioniert bzw. auf Basis der EGFP-Expression sortiert. Zur Bestimmung der Proteinstabilität wurde Cycloheximid (Chx) verwendet. Cycloheximid ist ein Inhibitor der Proteintranslation. Nach Behandlung der Zellen mit Chx werden somit keine Proteine in der Zelle mehr synthetisiert, sodass dadurch die Stabilität von Proteinen in der Zelle untersucht werden kann. Die Halbwertszeiten der K-A1-Mutanten wurden nach Chx-Behandlung bis zu einer Stunde bestimmt, indem RIPA-Extrakte der Zellen hergestellt wurden, die mithilfe des α -A1-Antiserums im Western-Blot analysiert wurden. Als Ladekontrolle, dass in jedem Ansatz eine vergleichbare Menge von Zellen analysiert wurde, diente das sehr stabile ERK-Protein.

Fast alle mutanten Proteine wiesen wie das wildtypische Protein eine sehr geringe Stabilität auf. Die Ausnahme bildete die K1-K5-Mutante, die im Vergleich zu A1 stabilisiert war (Abb.18D). Interessanterweise wies die K1-K2-K5-Mutante hingegen eine dem wildtypischen Protein vergleichbare Halbwertszeit auf (Abb.18D). Dies könnte darauf hin deuten, dass die Lysine an den „K1- und K5-Positionen“ eine dominante Rolle für die Degradierung des Proteins spielen. Das Lysin an der „K2-Position“ erscheint hingegen für eine Stabilisierung des Proteins notwendig. Diese Aussage wird dadurch unterstützt, dass alle Proteine, in denen die K2-Position verändert wurde, weniger stabil waren als die vergleichbaren Proteine, die an dieser Position ein Lysin trugen (Abb. 18A, B+D).

A**B****C**

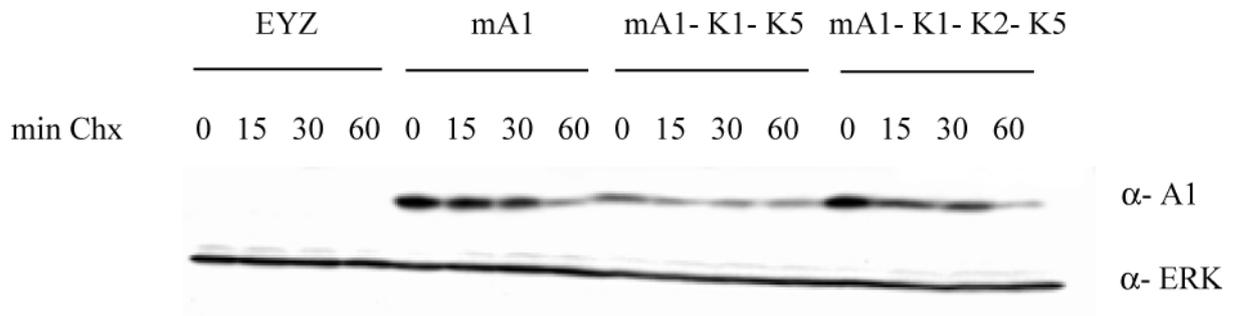
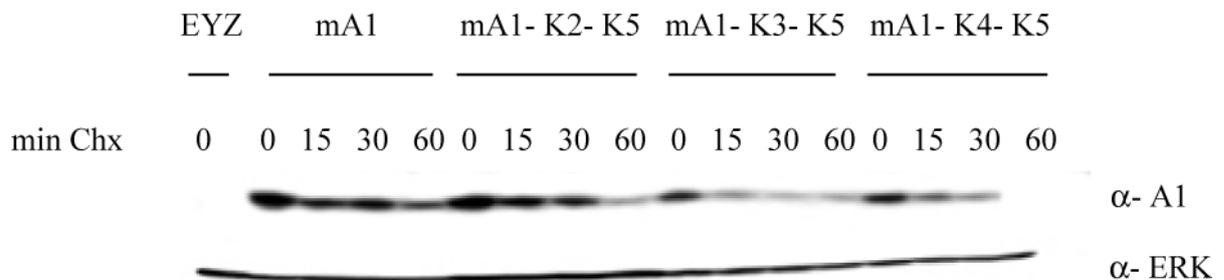
D**E**

Abb.18 (A-E) Die K-A1-Mutanten mit Ausnahme der K1-K5-Mutante weisen wie das wildtypische A1 eine sehr geringe Stabilität auf. Je 5×10^6 mit den K-A1-Mutanten transduzierte WEHI-231-Zellen wurden mit Chx ($10 \mu\text{g/ml}$) für die angegebene Dauer behandelt. RIPA-Gesamtlysate wurden in einer SDS-PAGE analysiert. Die Detektion im Western-Blot erfolgte mit α -A1 zum Nachweis der K-A1-Mutanten und mit α -ERK als Ladekontrolle.

3.4 Die anti-apoptotische Funktion der K-A1-Mutanten

In Herold et al., 2006 wurde das A1-Protein auf seine anti-apoptotische Funktion untersucht. Ein C-terminal verkürztes A1-Protein schützte WEHI-231-Zellen schlechter vor Apoptose nach Gabe von Etoposid als das wildtypische A1-Protein. Etoposid, das auch als Zytostatikum in der Onkologie verwendet wird, induziert Apoptose dadurch, dass es mit der Topoisomerase II interagiert und dadurch Strangbrüche zurückbleiben.

Für die folgenden Versuchsreihen wurden WEHI-231-Populationen erzeugt, die mit EYZ als Negativkontrolle, A1-Wildtyp als Positivkontrolle und den verschiedenen K-A1-Mutanten transduziert waren. Diese Zellen wurden mit ansteigenden Etoposid-Konzentrationen (0; 0,1; 0,3; 1; 3 µg/ml) behandelt. Das Zellüberleben der mit den K-A1-Mutanten infizierten WEHI-231-Zellen wurde dadurch gemessen, dass die Anzahl der überlebenden Zellen anhand ihrer spezifischen Größe (FSC) und ihrer Granularität (SSC) in der Durchflusszytometrie bestimmt wurden.

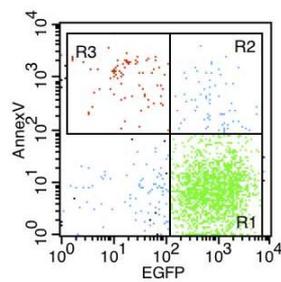
3.4.1 Bestimmung des Lebengates mit Hilfe einer Annexin V-Färbung

Vor Testung der K-A1-Mutanten wurde das Etoposid-Experiment mit dem A1-Wildtyp und dem EYZ-Marker (Kontrollpopulation) in der Annexin V-Färbung durchgeführt. Dadurch sollte gezeigt werden, dass die Darstellung des Zellüberlebens durch Messung von FSC und SSC in der Durchflusszytometrie ebenso aussagekräftig ist, und die überlebenden Zellen korrekt angezeigt werden. Mithilfe der Annexin V-Färbung können apoptotische Zellen in der Durchflusszytometrie sichtbar gemacht werden. Phosphatidylserin findet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle. Während der Apoptose wird Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran transloziert. Durch die Bindung des Annexin V an Phosphatidylserin können die apoptotischen Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Somit können Annexin V-negative Zellen als überlebende, nicht-apoptotische Zellen angesehen werden (Van Engeland et al., 1998).

Abb.19 zeigt nun exemplarisch für die Etoposidkonzentrationen 0 µg/ml und 1 µg/ml das Zellüberleben anhand der Annexin V-Färbung (Annexin V-negative Zellen) und anhand

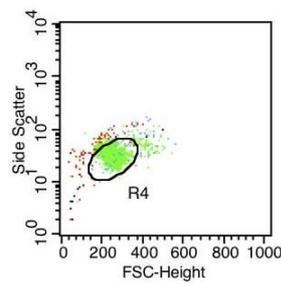
der FSC/SSC-Messung in der Durchflusszytometrie. Die Zuordnung der Populationen in den zwei Darstellungen ist farblich gekennzeichnet. Es zeigte sich, dass die Anzahl der Ereignisse in R1, also die Anzahl Annexin-negativer Zellen, der Anzahl der Ereignisse in R4, also den als lebend-definierten Zellen auf der Basis von FSC/SSC, vergleichbar war.

A



Region	% Total
R1	88.25
R2	3.27
R3	3.80
R4	86.29

Etoposid 0 µg/ml



B

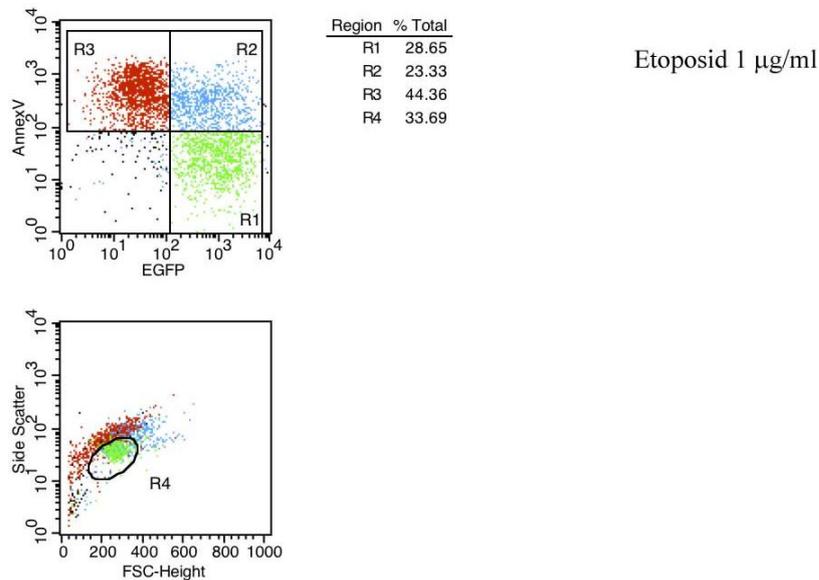


Abb.19 FACS-Analyse des Etoposidversuches in der Annexin V-Färbung (die Annexin V-negativen Zellen stellen die nicht-apoptotischen Zellen dar) und in der FSC/SSC-Messung. (A) Exemplarische Darstellung von EYZ bei der Etoposid-Konzentration $0\mu\text{g/ml}$ (= Medium-Wert) (B) Exemplarische Darstellung von EYZ bei der Etoposid-Konzentration $1\mu\text{g/ml}$.

Das Zellüberleben in der Annexin V-Färbung wurde für den A1-Wildtyp (mA1) und die Kontrollpopulation mit dem EYZ-Marker mit ansteigenden Etoposidkonzentrationen (0 ; $0,1$; $0,3$; 1 ; $3\mu\text{g/ml}$) getestet (Abb.20A). Im Vergleich mit dem Zellüberleben in der FSC/SSC-Messung (Abb.20B) ergab sich, dass bei der Behandlung der Zellen mit der höchsten Etoposidkonzentration für 18 Stunden von den Zellen mit dem A1-Wildtyp noch ca. 60% der Zellen in der Annexin V-Färbung und ca. 65% der Zellen in der FSC/SSC-Messung am Leben waren, während es nur noch weniger als 20% der Kontrollzellen mit dem EYZ-Marker sowohl in der in der Annexin V-Färbung als auch in der FSC/SSC-Messung waren (Abb.20).

Aus dem Vergleich der Werte für den A1-Wildtyp und den EYZ-Marker wird ersichtlich, dass sich die Annexin V-Messung und die FSC/SSC-Messung im Bezug auf die überlebenden, also nicht-apoptotischen Zellen entsprechen. Somit konnte zur Auswertung des Überlebens der einzelnen K-A1-Mutanten die einfachere Auswertung über den FSC/SSC-Wert herangezogen werden.

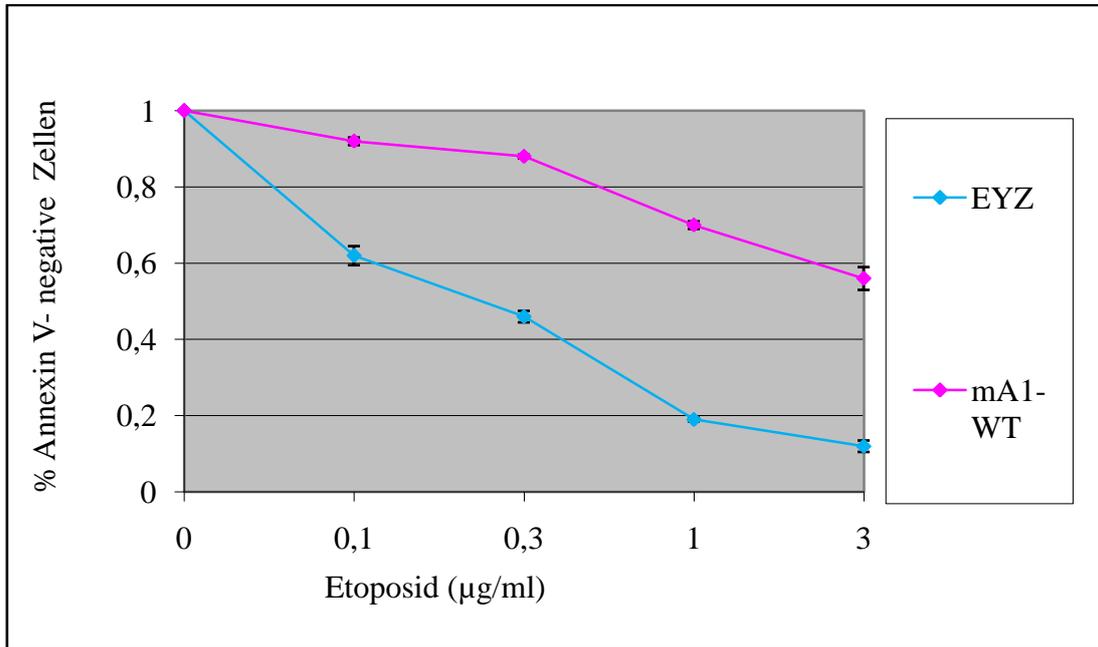
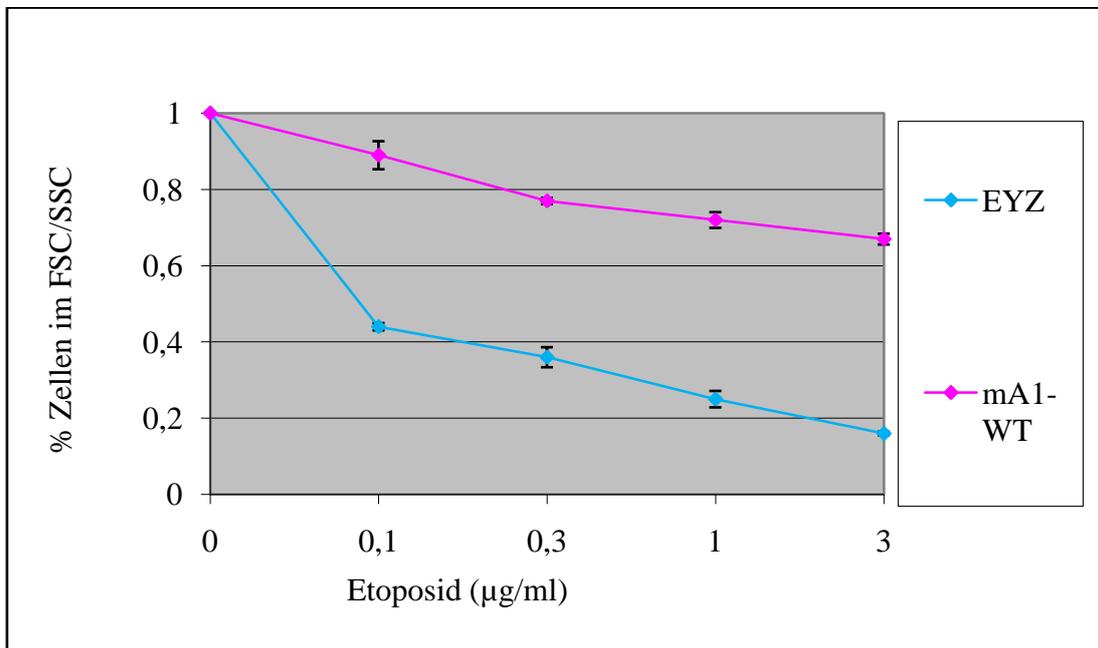
A**B**

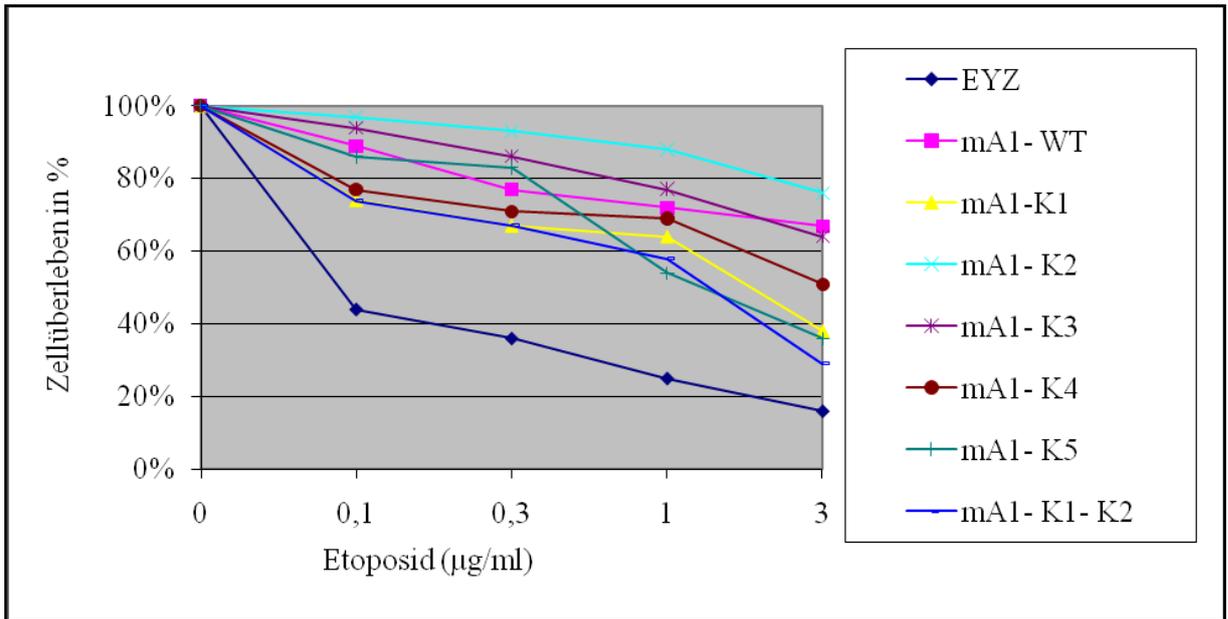
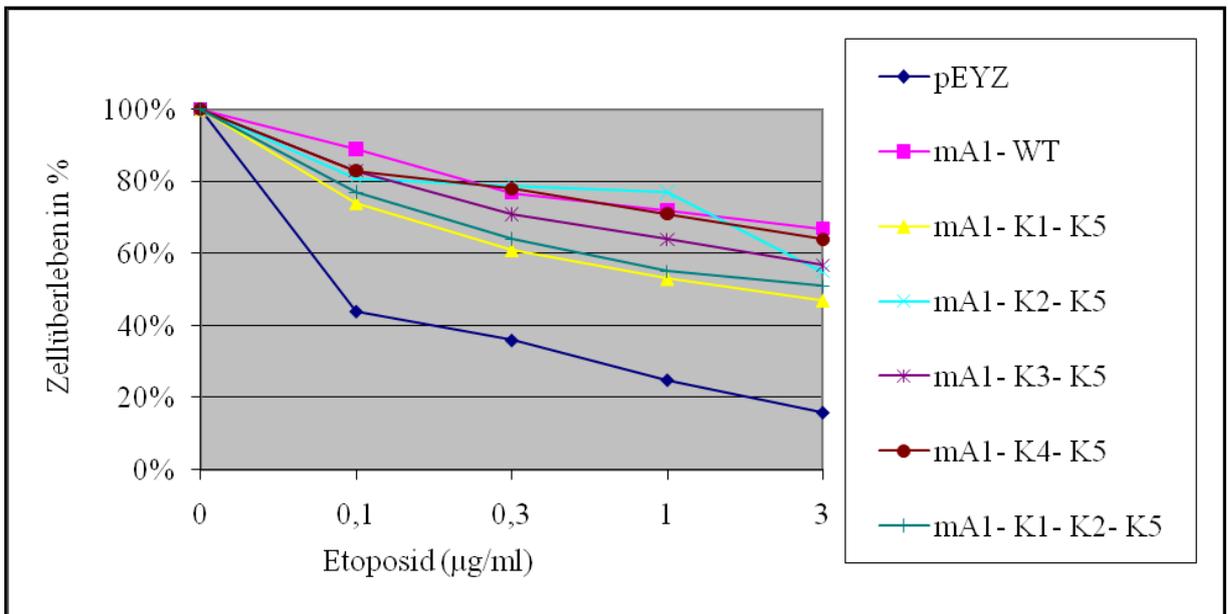
Abb.20 Auswertung des Etoposidversuches in der Annexin V-Färbung und der FSC/SSC-Messung. (A) Auswertung der in 2 unabhängigen Versuchen erhobenen Mittelwerte der Annexin V-Färbung. (B) Auswertung der im Etoposidexperiment mit den K-A1-Mutanten erhobenen Mittelwerte von EYZ und mA1 im FSC/SSC-Test.

3.4.2 Die K-A1-Mutanten zeigen in ihrer anti-apoptotischen Funktion keine signifikanten Unterschiede zum A1-Wildtyp

Um das anti-apoptotische Potential der K-A1-Mutanten zu untersuchen, wurden sie mit Etoposid behandelt und ihr Zellüberleben anhand der FSC/SSC-Messung im FACS analysiert.

Die Ergebnisse sind in Abb.21 graphisch dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden auf die Angabe der Standardabweichung in den Graphen verzichtet. Diese Werte sind jedoch in der anschließenden Tabelle mit aufgenommen. Die K-A1-Mutanten mA1-K2, mA1-K3 und mA1-K4-K5 wiesen eine etwa gleiche Expression wie der A1-Wildtyp in den Zellen auf (Abb. 16B+C) und schützten die Zellen entsprechend vor Etoposid-induzierter Apoptose wie der A1-Wildtyp. Die K-A1-Mutanten mA1-K1, mA1-K1-K2, mA1-K4, mA1-K5, mA1-K1-K5, mA1-K1-K2-K5, mA1-K2-K5 und mA1-K3-K5 schützten alle schlechter als der A1-Wildtyp. Allerdings wurden diese Proteine in den Zellen weniger stark exprimiert (vgl. Abb.16B+C).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keine signifikanten Unterschiede in der anti-apoptotischen Funktion zwischen den einzelnen K-A1-Mutanten und dem wildtypischen A1-Protein beobachtet wurden. Die Mutation bestimmter Lysine und damit der Verlust von Ubiquitinylierungsstellen bei den verschiedenen K-A1-Mutanten scheint somit keinen Einfluss auf die anti-apoptotische Funktion des A1-Proteins zu haben.

A**B**

C

Etoposidkonzentration		Zellüberleben von EYZ, A1- Wildtyp und K- A1- Mutanten												
		EYZ	A1-WT	mA1-K1	mA1-K2	mA1-K3	mA1-K4	mA1-K5	mA1-K1-K2	mA1-K1-K5	mA1-K2-K5	mA1-K3-K5	mA1-K4-K5	mA1-K1-K2-K5
0,1 µg/ ml	1. Versuch	43%	93%	77%	98%	93%	72%	81%	62%	75%	80%	81%	81%	80%
	2. Versuch	45%	89%	68%	98%	93%	79%	91%	77%	75%	86%	85%	84%	70%
	3. Versuch	45%	84%	76%	99%	95%	81%	85%	82%	73%	76%	82%	84%	81%
	Mittelwert	44%	89%	74%	98%	94%	77%	86%	74%	74%	81%	83%	83%	77%
	Standard-abweichung	1,0%	3,7%	4,0%	0,5%	0,9%	3,9%	4,1%	8,5%	0,9%	4,1%	1,7%	1,4%	5,0%
0,3 µg/ ml	1. Versuch:	32%	77%	71%	93%	81%	70%	81%	62%	65%	83%	72%	75%	67%
	2. Versuch	38%	76%	71%	94%	90%	68%	84%	69%	64%	78%	70%	78%	64%
	3. Versuch	37%	78%	59%	91%	88%	76%	84%	71%	55%	77%	70%	81%	60%
	Mittelwert	36%	77%	67%	93%	86%	71%	83%	67%	61%	79%	71%	78%	64%
	Standard-abweichung	2,6%	0,8%	5,7%	1,2%	3,9%	3,4%	1,4%	3,9%	4,5%	2,6%	1,7%	2,5%	2,9%
1 µg/ ml	1. Versuch	28%	75%	60%	88%	73%	68%	52%	55%	60%	81%	65%	69%	63%
	2. Versuch	23%	72%	65%	90%	82%	70%	49%	60%	56%	73%	62%	70%	57%
	3. Versuch	24%	70%	68%	87%	77%	68%	60%	59%	50%	76%	65%	75%	45%
	Mittelwert	25%	72%	64%	88%	77%	69%	54%	58%	53%	77%	64%	71%	55%
	Standard-abweichung	2,2%	2,1%	3,3%	1,2%	3,7%	0,9%	4,6%	2,2%	4,1%	3,3%	1,4%	2,6%	7,5%
3 µg/ ml	1. Versuch	17%	65%	36%	65%	75%	51%	32%	27%	58%	53%	62%	62%	62%
	2. Versuch	16%	68%	46%	81%	63%	45%	36%	29%	43%	62%	56%	61%	50%
	3. Versuch	16%	68%	32%	82%	55%	56%	40%	30%	41%	50%	54%	69%	40%
	Mittelwert	16%	67%	38%	76%	64%	51%	36%	29%	47%	55%	57%	64%	51%
	Standard-abweichung	0,5%	1,4%	5,9%	7,8%	8,2%	4,5%	3,3%	1,3%	7,6%	5,1%	3,4%	3,6%	9,0%

Abb.21 Die K-A1-Mutanten zeigen in ihrer anti-apoptotischen Funktion keine signifikanten Unterschiede zum A1-Wildtyp; (A+B) FACS-Analyse von WEHI-231-Zellen, die mit den aufgeführten K-A1-Mutanten, mit EYZ und mA1-WT transfiziert wurden. Nach Behandlung mit ansteigenden Etoposid-Konzentrationen (0 bis 3µg/ml) für 18h wurde das Zellüberleben anhand des Überlebens der Zellen auf der Basis des FSC/SSC im FACS gemessen. Die Diagramme zeigen die Auswertung der in mehrfach wiederholten Etoposidexperimenten erhobenen Mittelwerte der K-A1-Mutanten; der Übersicht halber wurden die Standardabweichungen weggelassen (C). In der Tabelle 21 C sind die Einzelwerte alle drei Versuche inklusive der Mittelwerte und der Standardabweichungen aufgelistet.

4. Diskussion

A1 wird polyubiquitinyliert und dadurch für den Abbau durch die Proteasomen markiert. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass das A1-Protein für den proteasomalen Degradationsweg nicht nur an einzelnen, ganz spezifischen Lysinen ubiquitinyliert werden kann, sondern dass unterschiedliche Lysine ubiquitinyliert werden. Dies folgt aus den Befunden, dass keine offensichtlichen Unterschiede in dem Ubiquitinylierungsmuster der einzelnen K-A1-Mutanten zu beobachten waren (Abb.17). Weiterhin wiesen fast alle K-A1-Mutanten wie das wildtypische A1-Protein eine vergleichbare sehr geringe Stabilität auf. Eine Ausnahme bildete nur die K1-K5-Mutante, die im Vergleich zum A1-Protein stabilisiert war (Abb.18A-E). Bei der anti-apoptotischen Funktion, d.h. beim Schutz vor Etoposid-induzierter Apoptose, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen K-A1-Mutanten (Abb.21A+B). Somit scheint der Verlust einzelner Ubiquitinylierungsstellen bestimmter K-A1-Mutanten keinen signifikanten Einfluss sowohl auf die Stabilität als auch auf die anti-apoptotische Funktion des A1-Proteins zu haben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit ergänzen die von Herold et al., 2006 aufgestellte Hypothese, dass der C-Terminus des A1-Proteins Schutz und Destabilisierung des Proteins reguliert. Nach dieser Hypothese dient das C-terminale Ende des Proteins nicht wie bei den anderen Familienmitgliedern der Bcl-2-Gruppe der Verankerung an intrazellulären Membranen, sondern der Rekrutierung von Ubiquitin-E3-Ligasen. Eine vermeintliche, bisher unbekannte Ubiquitin-E3-Ligase, die für das Anhängen des Ubiquitins verantwortlich ist, bindet an eine spezifische Aminosäuresequenz im C-terminalen Ende des A1-Proteins. Anschließend werden dann von ihr Ubiquitineinheiten an Lysinreste von A1 konjugiert und das A1-Protein dadurch für den proteasomalen Abbau markiert.

4.1 Eine bisher unbekannte Ubiquitin-E3-Ligase konjugiert Ubiquitin an (fast) alle Lysinreste des A1- Proteins

Das A1-Protein wird nach Polyubiquitinylierung über den Ubiquitin-Proteasomen-Weg abgebaut (Herold et al., 2006). Ebenso wird auch das humane Ortholog von A1, Bfl-1, polubiquitinyliert und schnell abgebaut (Kucharczak et al., 2005). Für die Ubiquitinylierung und den proteasomalen Abbau von A1 ist sein C-Terminus sehr wichtig, denn eine A1-Mutante ohne den C-Terminus wird sehr viel schwächer ubiquitinyliert. Auch kann durch Übertragung des C-Terminus von A1 auf andere Proteine wie z.B. EGFP deren proteasomaler Abbau induziert werden (Herold et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, an welchen Lysinen von A1 die Ubiquitinylierung stattfindet bzw. ob die Ubiquitinylierung nur an wenigen spezifischen Lysinen oder eher „ungezielt“ an (fast) allen Lysinen von A1 stattfinden kann. Denn wie in der Einleitung bereits beschrieben- können beim Ubiquitin-Proteasomen-Weg entweder nur spezifische Lysine der Proteine Ziele der Ubiquitinylierung sein wie z.B. beim I κ B- α (Baldi et al., 1996) oder die Ubiquitinylierung kann (unspezifisch) an verschiedenen Lysinen stattfinden wie beispielsweise beim Transkriptionsfaktor c-Jun (Treier et al., 1994).

Im Ergebnis zeigten die einzelnen K-A1-Mutanten keine signifikanten Unterschiede in der Ubiquitinylierung (Abb.17). Nach Bindung der Ubiquitin-E3-Ligase im C-Terminus von A1 werden somit Ubiquitinketten an unterschiedliche bzw. (fast) alle Lysinreste und nicht an spezifische Lysinreste des A1-Proteins konjugiert. Auch wenn die Untersuchungen hier die Möglichkeit, dass z.B. nur drei ganz bestimmte Lysine ubiquitinyliert werden, formal nicht ganz ausschließen können, sprechen sie doch eher dafür, dass eine ganze Reihe von Lysinen durch Anhängen von Ubiquitinketten modifiziert werden kann. Auch hatten im Speziellen die Lysinmutationen im C-Terminus von A1 (K5-Mutationen) keinen Einfluss auf die Stärke oder das Muster der Ubiquitinylierung (Abb.17). Dass diese Lysine im C-Terminus von A1 nicht für den Abbau bzw. die Instabilität notwendig, und nicht oder nicht die einzigen Angriffspunkte für die Ubiquitinylierung sind, wird auch durch ein unverändertes Ubiquitinylierungsmuster eines chimären Proteins aus einer enzymatisch inaktiven Caspase 3 und dem C-Terminus von A1 ohne und mit Lysinmutationen im C-Terminus von A1, und durch

eine unveränderte Stabilität verschiedener Proteinen mit Lysin-Mutationen im C-Terminus von A1 gezeigt (Herold et al., 2006, s.u.). Dies steht auch im Einklang damit, dass die Mutation analoger Lysinreste im C-Terminus von Bfl-1 nicht ausreichend ist, die Ubiquitinylierung des Proteins komplett zu verhindern oder das Protein stark zu stabilisieren (Kucharczak et al., 2005).

4.2 Der Verlust bestimmter Lysine bzw. Lysingruppen von A1 verändert seine Stabilität nicht

Das A1-Protein besitzt eine für die Bcl-2-Familie überraschend kurze Halbwertszeit von ca. 15min. Für diesen raschen Abbau des Proteins ist sein C-terminales Ende verantwortlich, denn eine um das C-terminale Ende verkürzte Mutante hat eine Halbwertszeit von ca. 1h und ist somit sehr viel stabiler als das wildtypische Protein. Analog besitzt auch das humane Bfl-1 eine ähnlich kurze Halbwertszeit (Herold et al., 2006). Dieser Befund steht im Einklang damit, dass die beiden C-terminalen Bereiche beider Proteine stark konserviert sind. Die Hypothese, dass der C-Terminus von A1 als Destabilisierungsmodul oder Degron fungiert (Varshavsky, 1991) wurde weiterhin dadurch untermauert, dass die Übertragung des C-Terminus von A1 auf eine enzymatisch inaktive Caspase 3, auf EGFP und auch auf Bcl-2 diese Proteine ebenfalls destabilisiert (Herold et al., 2006). Dabei sind- wie bereits erwähnt- nicht die Lysine im C-Terminus von A1 für den Abbau bzw. die Instabilität notwendig. Denn Lysinmutationen im C-Terminus von A1 selbst und auch in chimären Proteinen, in denen der mutierte C-Terminus von A1 an Caspase-3 und Bcl-2 angehängt wurde, hatten keinen Einfluss auf die Stabilität dieser Proteine. Die für die Destabilisierung notwendige Aminosäuresequenz befindet sich in den letzten 20 Aminosäuren am C-terminalen Ende des A1-Proteins, denn sukzessiv C-terminal verkürzte A1-Mutanten wurden zunehmend stabiler im Vergleich zum A1-Wildtyp. So kann man zusammenfassend sagen, dass das C-terminale Ende von A1 ein eigenständiges Destabilisierungsmotiv innerhalb der letzten 20 Aminosäuren besitzt, das ausreicht, um selbst nicht verwandte Proteine zu destabilisieren (Herold et al., 2006; Pelzer, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wiesen fast alle K-A1-Mutanten keine größere Stabilität, sondern eine vergleichbare oder eine eher kürzere Halbwertszeit als der A1-Wildtyp auf (Abb.18A-E). Eine Ausnahme machte die K1-K5-Mutante, die im Vergleich zu A1 stabilisiert war. Die K1-K2-K5-Mutante wiederum wies interessanterweise eine dem wildtypischen Protein vergleichbare Halbwertszeit auf. Dies könnte daraufhin deuten, dass die Lysine an den „K1- und K5-Positionen“ eine dominante Rolle für die Degradierung des Proteins spielen. Das Lysin an der „K2-Position“ erscheint hingegen für eine gewisse Stabilität des Proteins notwendig. Alle Proteine, in denen die K2-Position (zusätzlich zu anderen Lysin-Positionen) verändert wurde, waren weniger stabil als die vergleichbaren Proteine, die an dieser Position ein Lysin trugen (Abb.18A+D). Insgesamt ist aber weder der Verlust einzelner Lysine bzw. Lysingruppen noch der der letzten 4 Lysine im C-Terminus ausreichend, um das Protein merklich zu stabilisieren. Es müssen nicht einige wenige Lysine, auch nicht die Lysine im C-Terminus des A1-Proteins notwendigerweise ubiquitinyliert werden, um A1 zu destabilisieren, sondern die Ubiquitinylierung ganz unterschiedlicher Lysine markiert das Protein für den proteasomalen Abbau.

Sicherlich gibt es noch alternative Erklärungsmöglichkeiten für die geringe Stabilität der K-A1-Mutanten. So könnte es bei den K-A1-Mutanten, speziell bei der K2-Mutation, durch das Einbringen der Mutationen zu einer Konformationsänderung bzw. zu falschen Faltungen des A1-Proteins gekommen sein, was zu einem schnellen Ubiquitin-unabhängigen Abbau führen würde, wie es beispielsweise für eine Mutante des Chaperons BiP gezeigt wurde, wo es aufgrund der fehlerhaften Konformation zu einer Ubiquitin-unabhängigen Degradation kam (Donoso et al., 2005). Eine weitere alternative Erklärungsmöglichkeit wäre ein Ubiquitin-unabhängiger, aber Proteasomen-abhängiger Abbauweg, wie er beispielsweise für das Tumorsuppressorprotein p53 beschrieben wurde (Asher et al., 2002). Gegen die schnelle Ubiquitin-unabhängige Degradation spricht allerdings, dass alle mutanten Proteine immer noch ubiquitinyliert werden (Abb.17). Auch könnte durch die K2-Mutation eine Sumoylierungsstelle entfallen. Dies könnte zur größeren Instabilität beitragen. Da die Sequenz um die „K2-Position“ aber nicht einer Konsensussequenz für eine Sumoylierung entspricht, erscheint diese zweite Erklärung eher unwahrscheinlich.

Insgesamt erscheint jedoch durch die Übereinstimmung der aufgeführten Ergebnisse die Ubiquitin-E3-Ligasen-Hypothese als die wahrscheinlichste Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Instabilität der K-A1-Mutanten. Diese Hypothese wird durch ein weiteres Ergebnis aus Herold et al., 2006 sogar noch erweitert. Dort konnte gezeigt werden, dass das A1-Protein in der Anwesenheit des pro-apoptotischen Bcl-„BH3-only“-Proteins Bim stark stabilisiert wird, ähnlich wie zwischen dem anti-apoptotischen Mcl-1 und dem pro-apoptotischen „BH3-only“-Protein PUMA (Mei et al., 2005). Mögliche Erklärungen dafür sind, dass entweder Bim eine ständig am C-Terminus von A1 gebundene Ubiquitin-E3-Ligase aus ihrer Bindung verdrängt bzw. deren Bindung nicht zulässt, oder dass Bim nach Bindung in der hydrophoben Tasche von A1 kritische Lysinreste von A1 maskiert und damit die Anheftung von Ubiquitinketten verhindert, wodurch A1 dann nicht mehr über den Ubiquitin-Proteasomen-Weg abgebaut werden kann. Obwohl die exakten molekularbiologischen Details zur Untermauerung dieses Mechanismus fehlen, scheint dieses Modell eine plausible Erklärung für die genannten Ergebnisse, auch der der vorliegenden Arbeit, zu sein.

4.3 Der Verlust bestimmter Lysine bzw. Lysingruppen von A1 verändert seine anti-apoptotische Funktion nicht

Das gegenwärtige Modell zum Schutz vor Apoptose besagt- wie in der Einleitung bereits ausführlich dargelegt-, dass die anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder, also auch das A1-Protein, die pro-apoptotischen Mitglieder mittels einer hydrophoben Tasche binden, dadurch die pro-apoptotischen Mitglieder neutralisieren und somit Zellen vor Apoptose schützen.

Im Hinblick auf diese anti-apoptotische Funktion von A1 wurde gezeigt, dass die um den C-Terminus verkürzte A1-Mutante einerseits stabiler wurde, andererseits aber auch schlechter vor Apoptose schützte. Der Einfluss des C-Terminus auf das anti-apoptotische Signal wurde auch bei einer weiteren Mutante von A1, bei der drei Punktmutationen die Sequenz des C-Terminus veränderten, beobachtet. Diese verminderte anti-apoptotische Funktion war nicht auf eine schlechtere Interaktion mit pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern zurückzuführen, da sowohl die um den C-

Terminus verkürzte A1-Mutante als auch die Punktmutante Bim genauso gut wie der A1-Wildtyp binden konnten (Herold et al., 2006). Diese Ergebnisse im Bezug auf den C-Terminus von A1 steht jedoch im Konflikt mit Daten von Kucharczak et al., 2005. Dort wird gezeigt, dass das um den C-Terminus verkürzte Bfl-1-Protein keinen Einfluss auf das Zellüberleben hat. Die Diskrepanz ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass die beiden Proteine aus Mensch und Maus unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegen. Alternativ könnte die Tatsache, dass das Bfl-1-Protein als chimäres Protein zusammen mit EGFP exprimiert wurde, einen Einfluss auf die Funktion von Bfl-1 haben.

In der vorliegenden Arbeit schützten alle K-A1-Mutanten vor Apoptose, es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der anti-apoptotischen Funktion zwischen den einzelnen K-A1-Mutanten zeigten (Abb.21). Dass der Verlust einiger potentieller Ubiquitylierungsstellen bestimmter K-A1-Mutanten keinen signifikanten Einfluss auf die anti-apoptotischen Funktion des A1-Protein zu haben scheint, wird auch in Pelzer, 2004 gezeigt, wo Lysin-Mutanten des Bcl-2A1-Fusionsproteins, einem chimären Protein aus Bcl-2 und dem C-Terminus von A1, ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die anti-apoptotische Funktion hatten. Eine Erklärung für den in der vorliegenden Arbeit beobachteten meist etwas geringeren Apoptoseschutz der K-A1-Mutanten im Vergleich zum A1-Wildtyp könnte sein, dass alle K-A1-Mutanten mit Ausnahme der Mutanten mA1-K2, mA1-K3 und mA1-K4-K5 geringer als der A1-Wildtyp in den Zellen exprimiert wurden (Abb.16B+C). Die Mutanten mA1-K2, mA1-K3 und mA1-K4-K5 hingegen wiesen eine etwa gleiche Expressionsstärke wie der A1-Wildtyp auf und schützten entsprechend vor Etoposid-induzierter Apoptose wie der A1-Wildtyp.

Zusammengefasst erscheint es somit ziemlich wahrscheinlich, dass über die Ubiquitin-E3-Ligase sowohl die Stabilität als auch die anti-apoptotische Funktion von A1 reguliert oder zumindest beeinflusst wird. Um welche Ubiquitin-E3-Ligase es sich handelt und welcher genaue Mechanismus das anti-apoptotische Potential beeinflusst, muss noch geklärt werden. Das Modell der Ubiquitin-E3-Ligasen-vermittelten Stabilität von A1 erweitert das bisherige Modell im Hinblick auf die anti-apoptotische Funktion. Denn mit dem A1-Protein, das sich aufgrund der fehlenden Membranverankerung hauptsächlich im Zytoplasma befindet, scheint sich eine effiziente „Vorabwehr“ entwickelt zu haben, so dass eine direkte Eliminierung von „BH3-only“-Proteinen

bereits im Zytoplasma möglich ist, dadurch dass es „BH3-only“-Proteine in die Nähe von Ubiquitin-E3-Ligasen bringt, um deren Abbau zu forcieren. Dieses Modell setzt allerdings voraus, dass eine Ubiquitin-E3-Ligase auch *nach* Bindung von „BH3-only“-Proteinen noch am C-terminalen Ende von A1 gebunden bliebe, so dass nun sensible Lysine in den „BH3-only“-Proteinen selbst Akzeptoren für eine Ubiquitylierung würden. A1 würde demnach „BH3-only“-Moleküle einer Ubiquitin-E3-Ligase präsentieren und deren Abbau beschleunigen. Somit würde ein anti-apoptotisches Bcl-2-Familienmitglied die pro-apoptotischen Familienmitglieder nicht nur durch Bindung neutralisieren, sondern deren gezielten schnellen Abbau über den proteasomalen Weg einleiten. Dadurch würden die „BH3-only“-Proteine von den im Apoptoseprogramm entscheidenden neuralgischen Punkten wie den Mitochondrien oder dem endoplasmatischem Retikulum sehr effizient ferngehalten.

5. Zusammenfassung

Apoptose ist eine bestimmte Art des programmierten Zelltods. Dieser Prozess erfüllt zahlreiche wichtige physiologische Funktionen. Eine pathologische Dysregulation der Apoptose ist an der Entstehung etlicher Krankheiten beteiligt. Bei der Regulation der Apoptose nehmen die Bcl-2-Familienmitglieder und damit auch das anti-apoptotische Familienmitglied A1 eine wichtige Stellung ein. Die Stabilität und anti-apoptotische Funktion von A1 wird über den Ubiquitin-Proteasomen-Weg reguliert. Hierbei ist das C-terminale Ende von A1 essentiell. Ausgangspunkt für diese Arbeit war die Hypothese, dass an den C-Terminus von A1 eine bisher unbekannte Ubiquitin-E3-Ligase bindet, verzweigte Ubiquitinketten an Lysinreste des A1-Proteins konjugiert und das Protein dadurch für den proteasomalen Abbau markiert. Durch Mutationen einzelner Lysinreste von A1 sollte untersucht werden, welche dieser Aminosäuren ubiquitinyliert werden. Damit sollte der molekulare Mechanismus, der hinter der Instabilität und der anti-apoptotischen Funktion steckt, weiter charakterisiert werden.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 11 Mutanten des A1-Proteins hergestellt, bei denen die 11 Lysinreste von A1 gruppenweise zu Argininresten (K-A1-Mutanten) ausgetauscht wurden. Der Austausch von Lysin zu Arginin wurde gewählt, weil hierdurch die Ladung an der entsprechenden Position des Proteins gleich bleibt, während eine Konjugation von Ubiquitin an Arginin nicht möglich ist.

Im Ergebnis zeigte sich, dass das A1-Protein nicht nur an einzelnen, ganz spezifischen Lysinen, sondern an allen oder doch zumindest den meisten seiner 11 Lysine ubiquitinyliert werden kann, denn es ergaben sich bei den K-A1-Mutanten keine signifikanten Unterschiede in Stärke oder Muster ihrer Ubiquitinylierung. Es müssen also nicht einige wenige Lysine notwendigerweise ubiquitinyliert werden, um A1 zu destabilisieren, sondern die Ubiquitinylierung ganz unterschiedlicher Lysine markiert das Protein für den proteasomalen Abbau. Auch hat der Verlust bestimmter Lysingruppen und damit potentieller Ubiquitinylierungsstellen keinen signifikanten Einfluss auf die anti-apoptotische Funktion des A1-Proteins.

Zusammengefasst unterstützen die Ergebnisse die Hypothese, dass eine bisher nicht bekannte Ubiquitin-E3-Ligase sowohl die Stabilität als auch die anti-apoptotische

Funktion von A1 reguliert, indem sie verzweigte Ubiquitinketten an (fast) alle Lysine des Protein anhängt und das Protein damit für den proteasomalen Abbau markiert.

6. Summary

Apoptosis is a certain kind of programmed cell death and plays an important role in many physiological processes. Pathological dysregulation of apoptosis is involved in the development of a number of diseases. The Bcl-2 family members and with it the anti-apoptotic family member A1 are important regulators of apoptosis by regulating the integrity of the mitochondria. A1 is a very unstable protein, its stability is regulated by the ubiquitin/proteasome pathway. Based on published work, the hypothesis was set up, that a so far unknown ubiquitin-E3-ligase binds to the C-terminal end of A1, attaches ubiquitin chains to lysine residues and thereby marks the protein for proteasomal degradation. The ubiquitinylation and the molecular mechanisms behind the instability and the anti-apoptotic capacity of A1 should be further characterized by mutating the lysine residues of the protein.

For this paper altogether 11 mutants of the A1 protein were cloned. The 11 lysine residues of A1 were replaced in groups with arginine residues (K-A1 mutants). Arginine was chosen to keep the charge at that position in the protein but to inhibit ubiquitylation at this position.

The experiments indicate that all or at least most of the lysine residues of the A1 protein can be ubiquitinated, because no significant differences in ubiquitinylation of the K-A1 mutants compared to A1 wildtype protein could be observed. Thus, no specific lysine residues have to be necessarily ubiquitinated to destabilize the A1 protein, but ubiquitinylation of different lysine residues can mark the protein for proteasomal degradation. Furthermore, the loss of certain lysines showed no significant influence on the anti-apoptotic capacity of A1.

Altogether, the results support the hypothesis, that a so far unknown ubiquitin-E3-ligase attaches ubiquitin to most if not all lysine residues and thereby regulates the stability and the anti-apoptotic capacity of the protein.

7. Literaturverzeichnis

- Asher, G., et al., Mdm-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002. 99(20): 13125-13130.
- Bae, J., et al., Underphosphorylated BAD interacts with diverse antiapoptotic Bcl-2 family proteins to regulate apoptosis. *Apoptosis*, 2001. 6(5): 319-330.
- Baffy, G., et al., Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J Biol Chem*, 1993. 268(9): 6511-6519.
- Baldi, L., et al., Critical role for lysines 21 and 22 in signal-induced, ubiquitin mediated proteolysis of I κ B α . *J. Biol. Chem*, 1996. 271: 376-379.
- Böcker, Denk, Heitz, „Pathologie“, 2. Auflage, Urban & Fischer Verlag, 2001.
- Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, D.D. and Green, D.R., Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J*, 1998. 17(1): 37-49.
- Breitschopf, K., et al., Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(5): 1886-1896.
- Brown, T.A., „Gentechnologie für Einsteiger“, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2002.
- Campos, L., et al., High expression of Bcl-2 protein in acute myeloid leukaemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood*, 1993. 81: 3091-3096.

- Chen, L., et al., Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*, 2005. 17: 393-403.
- Cheng, E.H., et al., BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, 2001. 8(3): 705-711.
- Choi, S.S., et al., A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene*, 1995. 11(9): 1693-1698.
- Craxton, A., et al., The CD40-inducible Bcl-2 family member A1 protects B cells from antigen receptor-mediated apoptosis. *Cell Immunol*, 2000. 200(1): 56-62.
- Crompton, M., The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*, 1999. 341(Pt 2): 233-249.
- Cunningham, C.C., et al., A phase I trial of H-ras antisense oligonucleotide ISIS 2503 administered as a continuous intravenous infusion in patients with advanced carcinoma. *Cancer*, 2001. 92: 1265-1271.
- D`Sa-Eipper, C. and Chinnadurai, G., Functional dissection of Bfl-1, a Bcl-2 homolog: anti-apoptosis, oncogene-cooperation and cell proliferation activities. *Oncogene*, 1998. 16: 3105-3114.
- D`Sa-Eipper, C., Subramanian, T. and Chinnadurai, G., bfl-1, a bcl-2 homologue, suppresses p53-induced apoptosis and exhibits potent cooperative transforming activity. *Cancer Res*, 1996. 56: 3879-3882.
- Dimmeler et al., Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and proteasome pathway. *J Exp Med*, 1999. 189: 1815-1822.

- Donoso, G., Herzog, V. and Schmitz, A., Misfolded BiP is degraded by a proteasome-independent endoplasmic-reticulum-associated degradation pathway. *Biochem J*, 2005. 387(Pt 3): 897-903.
- Driscoll, J. and Goldberg, A.L., The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the 1500-kDa proteolytic complex which degrades ubiquitin conjugated proteins. *J Biol Chem*, 1990. 265(9): 4789-4792.
- Duriez, P.J., et al., A1 functions at the mitochondria to delay endothelial apoptosis in response to tumor necrosis factor. *J Biol Chem*, 2000. 275(24): 18099-18107.
- Green, D.R. and Kroemer, G., The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 2004. 305(5684): 626-629.
- Green, D.R. and Reed, J.C., Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998. 281(5381): 1309-1312.
- Gross, A., BCL-2 proteins: regulators of the mitochondrial apoptotic program. *IUBMB Life*, 2001. 52(3-5): 231-236.
- Grumont, R.J., Rourke, I.J. and Gerondakis, S., Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes Dev*, 1999. 13: 400-411.
- Gstaiger, M., et al., Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 5043-5048.
- Hamasaki, A., et al., Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene. *J Exp Med*, 1998. 188(11): 1985-1992.
- Hatakeyama, S., et al., Multiple gene duplication and expression of mouse bcl-2-related genes, A1. *Int Immunol*, 1998. 10(5): 631-637.

- Healy, J.I. and Goodnow, C.C., Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu Rev Immunol*, 1998. 16: 645-670.
- Hengartner, M.O., The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000. 407(6805): 770-776.
- Herold, M.J., Der C-Terminus des antiapoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedes A1 reguliert Stabilität und Funktionalität des Proteins. Dissertation, Institut für Virologie und Immunbiologie Universität Würzburg, 2005.
- Herold, M.J., et al., Mitochondria-dependent caspase-9 activation is necessary for antigen receptor-mediated effector caspase activation and apoptosis in WEHI 231 lymphoma cells. *J Immunol*, 2002. 168(8): 3902-3909.
- Herold, M.J., et al., The stability and anti-apoptotic function of A1 are controlled by its C- terminus. *J Biol Chem*, 2006. 281(19): 13663-13671.
- Hinds, M.G., et al., The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity. *Embo J*, 2003. 22(7): 1497-1507.
- Hockenbery, D.M., et al., Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 1993. 75(2): 241-251.
- Holmgren, S.P., et al., Survival activity of Bcl-2 homologs Bcl-w and A1 only partially correlates with their ability to bind pro-apoptotic family members. *Cell Death Differ*, 1999. 6: 525-532.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. and Shlomdik, M., „Immunologie“, 5.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2002.
- Jansen, B., et al., Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL-2 antisense therapy. *Lancet*, 2000. 356: 1728-1733.

- Jesenberger, V. and Jentsch, S., Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(2): 112-121.
- Johnstone, R.W., et al., Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, 2002. 108: 153-164.
- Joza, N., et al., Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 2001. 410: 549-554.
- Jung-Ha, H., et al., Expression of Bfl-1 in normal and tumor tissues: Bfl-1 over-expression in cancer is attributable to its preferential expression in infiltrating inflammatory cells. *Hum Pathol*, 1998. 29: 723-728.
- Kamesaki, S., et al., bcl-2 protein inhibits etoposide-induced apoptosis through its effects on events subsequent to topoisomerase II-induced DNA strand breaks and their repair. *Cancer Res*, 1993. 53(18): 4251-4256.
- Karsan, A., Yee, E. and Harian, J.M., Endothelial cell death induced by tumor necrosis factor-alpha is inhibited by the Bcl-2 family member A1. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. 271: 27201-27204.
- Kaufmann, T., et al., Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol*, 2003. 160(1): 53-64.
- Kaufmann, T., Schinzel, A. and Borner, C., Bcl-w(edding) with mitochondria. *Trends Cell Biol*, 2004. 14(1): 8-12.
- Kidd, V.J., Lahti, J.M. and Teitz, T., Proteolytic regulation of apoptosis. *Semin Cell Dev Biol*, 2000. 11(3): 191-201.
- Kim, K.D., et al., Inhibition of glucocorticoid-mediated, caspase-independent dendritic cell death by CD40 activation, *I Leukoc Biol*, 2001. 69: 426-434.

- Knödel, M., et al., Reversal of Blimp-1-mediated apoptosis by A1, a member of the Bcl-2 family. *Eur J Immunol*, 1999. 29: 2988-2998.
- Krammer, P.H., CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 2000. 407(6805): 789-795.
- Krammer, P.H., et al., Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Opin Immunol*, 1994. 6(2): 279-289.
- Kucharczak, J.F., et al., Constitutive proteasome-mediated turnover of Bfl-1/A1 and its processing in response to TNF receptor activation in FL5.12 pro-B cells convert it into a prodeath factor. *Cell Death Differ*, 2005. 12: 1225-1239.
- Kuss, A.W., et al., A1 expression is stimulated by CD40 in B cells and rescues WEHI 231 cells from anti-IgM-induced cell death. *Eur J Immunol*, 1999. 29(10): 3077-3088.
- Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970. 227(5259): 680-685.
- Latres, E., et al., Role of the F-box protein Skp2 in lymphomagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001. 98: 2515-2520.
- Lin, E.Y., et al., A1, a Bcl-2 family member, prolongs cell survival and permits myeloid differentiation. *Blood*, 1996. 87: 983-992.
- Lin, E.Y., et al., Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J Immunol*, 1993. 151(4): 1979-1988.
- Lindemann, D., et al., Versatile retrovirus vector systems for regulated gene expression in vitro and in vivo. *Mol. Med.* 1997. 3(7): 466-476.

- Liu, Y.C., Ubiquitin ligases and the immune response. *Annu Rev Immunol*, 2004. 22: 81-127.
- Löffler, Petrides, „Biochemie & Pathobiochemie“, 7. Auflage, Springer- Verlag, 2003.
- Mandal, M., et al., The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. *J Exp Med*, 2005. 201: 603-614.
- Mei, Y., et al., Puma (*)Mcl-1 interaction is not sufficient to prevent rapid degradation of Mcl-1. *Oncogene*, 2005. 24 (48): 7224-7237.
- Muzio, M., et al., FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*, 1996. 85(6): 817-827.
- Nachmias, B., Ashhab, Y. and Ben-Yehuda, D., The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol*, 2004. 14: 231-243.
- Newton, K. and Strasser, A., Ionizing radiation and chemotherapeutic drugs induce apoptosis in lymphocytes in the absence of Fas or FADD/MORT1 signaling. Implications for cancer therapy. *J Exp Med*, 2000. 191(1): 195-200.
- Olopade, O.I., et al., Overexpression of the BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *Cancer J Sci Am*, 1997. 3(4): 230-237.
- Opferman, J.T. and Korsmeyer, S.J., Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol*, 2003. 4(5): 410-415.
- Orlowsky, A., et al., Deficiency in the ant-apoptotic protein A1-a results in a diminished acute inflammatory response. *J Immunol*, 2002. 168: 1840-1846.

- Orlowski, R.Z., The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. *Cell Death Differ*, 1999. 6(4): 303-313.
- Pegoraro, L., et al., A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. 81(22): 7166-7170.
- Pelzer, C., Molekulare Analyse der Instabilität des Bcl-2 Familienmitglieds A1. Diplomarbeit, Institut für Virologie und Immunbiologie Universität Würzburg, 2004.
- Petroski, M.D. and Deshaies, R.J., Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. 6: 9-20.
- Platt, N., da Silva, R.P. and Gordon, S., Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol*, 1998. 8(9): 365-372.
- Rayburn, E., et al., MDM2 and human malignancies: expression, clinical pathology, prognostic markers, and implications for chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 2005. 5: 27-41.
- Reed, J.C., Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*, 1999. 17: 2941-2953.
- Sasaki, H., et al., Downregulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein induces apoptosis in chemoresistant human ovarian cancer cells. *Cancer Res*, 2000. 60: 5659-5666.
- Scaffidi, C., et al., Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J*, 1998. 17(6): 1675-1687.
- Silbernagel, Lang, „Taschenatlas der Pathophysiologie“, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1998.

- Skulachev, V.P., Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett*, 1998. 423(3): 275-280.
- Slee, E.A., et al., Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*, 1999. 144(2): 281-292.
- Somogyi, R.D., et al., Transient expression of the Bcl-2 family member, A1-a, results in nuclear localization and resistance to staurosporine-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, 2001. 8(8): 785-793.
- Soneoka, Y., et al., A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res*, 1995. 23(4): 628-633.
- Stryer, L., „Biochemie“, 4th Edition, Spektrum Akademischer Verlag, 1996.
- Tamm, I., et al., Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea? *Lancet*, 2001. 358: 489-497.
- Thompson, M.D., et al., Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev Med*, 1997. 48: 267-281.
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y., Caspases: enemies within. *Science*, 1998. 281(5381): 1312-1316.
- Tomayko, M.M. and Cancro, M.P., Long-lived B cells are distinguished by elevated expression of A1. *J Immunol*, 1998. 160: 107-111.
- Treier, M., Staszewski, L. M. and Bohmann, D., Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell*, 1994. 78(5): 787-798.

- Tsujimoto, Y. and Shimizu, S., VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ*, 2000. 7(12): 1174-1181.
- Tsujimoto, Y., et al., Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, 1984. 226(4678): 1097-1099.
- Van Engeland, M., et al., Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 1998. 31(1): 1-9.
- Varshavsky, A., Naming a targeting signal. *Cell* 1991. 64: 13-15.
- Vershelde, C., et al., A1/Bfl-1 expression is restricted to TCR engagement in T lymphocytes. *Cell Death Differ*, 2003. 10: 1059-1067.
- Vieira, H.L., et al., Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death Differ*, 2000. 7(12): 1146-1154.
- Vlahakis, S.R., et al., G protein-coupled chemokine receptors induce both survival and apoptotic signaling pathway, *J Immunol*, 2002. 169: 5546-5554.
- Weissman, A.M., Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001. 2: 169-178.
- Werner, A.B., et al., Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit its collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax. *J Biol Chem*, 2002. 277(25): 22781-22788.
- Wilson-Annan, J., et al., Proapoptotic BH3-only proteins trigger membrane integration of prosurvival Bcl-w and neutralize its activity. *J Cell Biol*, 2003. 162(5): 877-887.

- Wojcik, C., Proteasomes in apoptosis: villains or guardians? *Cell Mol Life Sci*, 1999. 56(11-12): 908-917.
- Xiang, Z., et al., Essential role of the prosurvival bcl-2 homologue A1 in mast cell survival after allergic activation. *J Exp Med*, 2001. 194: 1561-1569.
- Yang, E., et al., Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, 1995. 80(2): 285-291.
- Yin, X.M., Oltvai, Z.N. and Korsmeyer, S.J., BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, 1994. 369(6478): 321-323.
- Zha, H., et al., Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J Biol Chem*, 1996. 271(13): 7440-7444.
- Zhang, H., et al., Structural basis of BFL-1 for its interaction with BAX and its anti-apoptotic action in mammalian and yeast cells. *J Biol Chem*, 2000. 275: 11092-11099.
- Zheng, N., et al., Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell* 2000. 102: 533-539.

8. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
ATV	Adjusted-Trypsin-Versen
BCR	B-Zell-Rezeptor
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-(bovines)Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
Chx	Cycloheximid
CMV	Cytomegalievirus
d	Tag
(k)Da	(Kilo)Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
(c)DNA	(complementary) Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxyribonukleotid-Triphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP/GFP/EGZ	enhanced green fluorescent/zeocin protein
EYFP/EYZ	enhanced yellow fluorescent/zeocin protein
env	Envelope proteins (Retrovirus)
ERK	Extrazellulär aktivierte Kinase
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
FSC/SSC	Size difference (FSC)/granularity difference (SSC)
g	Gramm
gag	Gruppenspezifisches Antigen (Retrovirus)
h	Hour (Stunde)
HA	Hämagglutinin

Ig	Immunglobulin
IRES	Internal ribosomal entry site
kb	Kilobasen
l	Liter
LTR	Long terminal repeat
M	Mol
MCS	Multiple cloning site
min	Minute
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction
pol	Polymerase (Retrovirus)
(m)RNA	(messenger) Ribonucleic acid
rpm	Rounds per minute
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Privatdozent Dr. Ingolf Berberich, der durch seine kompetente wissenschaftliche Betreuung, seine guten Ratschläge, seine Diskussionsbereitschaft und seine hilfreiche Unterstützung zum Gelingen der Arbeit maßgeblich beigetragen hat.

Professor Dr. Paul-Gerhardt Schlegel danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Berberich möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima aufrichtig bedanken. Chris und Andrea danke ich besonders, da sie mich mit hohem persönlichem Einsatz in die praktische Labortätigkeit eingearbeitet haben und mich auch während der gesamten weiteren Laborzeit unterstützt haben. Bedanken möchte ich mich auch bei Doris und Christiane, die mir sowohl fachlich als auch praktisch eine wertvolle Hilfe waren.

Ganz besonders herzlich danke ich Marco Herold für dessen uneigennützig, großzügige und aufrichtige Hilfe bei allen Fragen und Problemen.

Auch möchte ich mich bei allen bedanken, die mich neben der eigentlichen Arbeit persönlich und moralisch unterstützt haben, vor allen bei meinen Eltern.