

**Die E3-Ubiquitinligase HectD1
reguliert die Stabilität des antiapoptotischen Bcl-2-
Familienmitglieds A1**

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

vorgelegt von

Josip Zovko

München

Würzburg 2013

Eingereicht am: 09.01.2013

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Rössler

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Ingolf Berberich

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Roy Gross

Tag des Promotionsquolloquiums: 08.05.2013

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

ERKLÄRUNGEN

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die hier vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass ich diese Dissertation weder in dieser noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt habe.

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg,

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01. Februar 2007 bis 31. Dezember 2010 am Institut für Virologie und Immunbiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Anleitung von Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Ingolf Berberich angefertigt.

Danksagung:

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

Insbesondere möchte ich Stefanie Manthey, Chris Kraus und Andrea Peters danken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und auch über schwierige Zeiten hinweghalfen.

Außerdem möchte ich Irene Zohn danken, die uns freundlicherweise die von ihr generierten HectD1 k.o. Mäuse zur Verfügung gestellt hat.

Herrn Prof. Dr. med. Axel Rethwilm danke ich für die Aufnahme ins MD/ PhD-Programm.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hünig danke ich für die freundliche Aufnahme ins Graduiertenkolleg GK 520.

Meiner Familie

(Tomislav, Nikola, Ana, Ante, Matej und meinen Eltern)

Buch der Sprichwörter:

Erwirb dir Weisheit, erwirb dir Einsicht mit deinem ganzen Vermögen! Halte sie hoch, dann wird sie dich erhöhen; sie bringt dich zu Ehren, wenn du sie unarmst

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung	13
1. Allgemeine Einführung in die Apoptose	13
2. Induktionswege und Regulationsmechanismen der Apoptose	14
2.1 Todesrezeptorpfad der Apoptose	14
2.2 Mitochondrialer Pfad der Apoptose	15
3. Die Bcl-2-Familie	16
3.1 Allgemeiner Überblick über die Bcl-2-Familie	16
3.2 A1/ Bfl-1	19
4. Allgemeine Einführung in das Ubiquitinsystem	23
4.1 Ubiquitinylierung	24
5. E3-Ubiquitinligasen	24
6. Bedeutung der Hect-Ligasen für:	26
6.1 Das Immunsystem	26
6.2 Die Organogenese	27
6.3 Humane Erkrankungen	27
7. Ubiquitinylierung und Apoptose	28
8. Ziel der Arbeit	29

INHALTSVERZEICHNIS

II. Material und Methoden	30
1. Material	30
1.1 Verwendete Chemikalien/ Reagenzien	30
1.2 Puffer und Lösungen	31
1.2.1 Allgemeine Puffer und Lösungen	31
1.2.2 DNA-Gelelektrophorese	32
1.2.3 Mini-Präp-Lösungen	33
1.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
1.2.5 Transfektion	34
1.2.6 Westernblot	34
1.2.7 ECL-Detektionssystem-Reagenz	35
1.2.8 Zellysepuffer	35
1.3 Plasmide	36
1.4 Primer und Oligonukleotide	39
1.5 shRNA	40
1.6 Enzyme	40
1.7 Inhibitoren	40
1.8 Antikörper und Matrixbeads	40
1.9 Antibiotika	42
1.10 Bakterien	42
1.11 Zelllinien	42
1.12 Nährmedien und Agarplatten für Bakterienkulturen	42
1.13 Nährmedien für Zellkulturen	43
1.14 Einfriermedium für Zellkulturen	43
1.15 Kits	44
1.16 Technische Großgeräte	44

INHALTSVERZEICHNIS

2. Methoden	44
2.1 Molekularbiologische Methoden	44
2.1.1 Isolation von RNA aus Zellen	44
2.1.2 cDNA Synthese aus RNA	44
2.1.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	45
2.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	45
2.1.4.1 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) zum qualitativen DNA-Nachweis	45
2.1.4.2 PCR zur Einführung von Mutationen	46
2.1.5 DNA-Gelelektrophorese	46
2.1.6 DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen	47
2.1.7 Klonierung/ Umklonierung	47
2.1.8 Transformation	48
2.1.9 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkolonien (Mini-Präp)	48
2.1.10 Großpräparation von Plasmid-DNA (Maxi-Präp)	49
2.1.11 DNA-Sequenzierung mittels fluorochrommarkierter Nukleotide	49
2.2 Zellbiologische Methoden	50
2.2.1 Kultivieren von Zellen	50
2.2.2 Einfrieren von Zellen	50
2.2.3 Auftauen von Zellen	50
2.2.4 Zellzahlbestimmung mittels Neubauerzählkammer	51
2.2.5 Transfektion/ Infektion	51
2.2.5.1 Kalziumphosphattransfektion	51
2.2.5.2 Infektion	52
2.2.6 Präparation von Maus Embryonalen Fibroblasten (MEF)	52
2.2.7 Durchflusszytometrie (FACS)	53
2.2.8 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	53
2.3 Proteinbiochemische Methoden	54

INHALTSVERZEICHNIS

2.3.1	Ganzzelllysate	54
2.3.2	Immunopräzipitation (IP)	54
2.3.3	SDS-PAGE	55
2.3.4	Westernblot	55
2.3.4.1	Transfer der Proteine auf die Blotmembran	55
2.3.4.2	Immunologische Detektion	56
2.3.4.3	Das ECL-System	56
III. Ergebnisse		57
1.	Nachweis einer Protein-Protein Interaktion zwischen A1 und HectD1 in einem Yeast-Two-Hybrid-Screen	57
2.	Die HectD1[Y2H]- und HectD1[Y2H]-Deletionsmutanten erhöhen die Expression von A1	58
3.	Die HectD1[Y2H]-Deletionsmutanten kopräzipitieren A1	61
4.	A1 und HectD1[Y2H] kolokalisieren in 293T Zellen	62
5.	Die dominant negative HectD1 erhöht die Expression von A1	64
5.1	HectD1 wird in Gegenwart von A1 gefällt	69
6.	Die Interaktion von A1 mit HectD1 ändert den Ubiquitylierungsgrad von A1	72
7.	Mutationen des C-Terminus beeinflussen die Expressionsstärke und die Ubiquitylierung von A1	74

INHALTSVERZEICHNIS

8. Die Expression von A1 und HectD1 in Wehi 231 Zellen ändert sich nach CD 40-Stimulation	78
9. Die Expression von A1 in Wehi 231 Zellen nimmt nach Inhibition der HectD1-Expression mittels spezifischer shRNAs zu	80
10. A1 wird in HectD1 defizienten Maus Embryonalen Fibroblasten (MEF) stabilisiert	81
IV. Diskussion	83
1. A1 interagiert mit der E3-Ubiquitinligase HectD1	83
2. Die Ubiquitylierung von A1 wird durch HectD1 beeinflusst	84
3. Der C-Terminus von A1 ist für die Stabilität/ Ubiquitylierung von A1 und für die Interaktion mit HectD1 wichtig	84
4. A1 und HectD1 haben onkogenes Potential und bedürfen Daher einer Kontrolle durch die Zelle	87
4.1 Mögliche Kontrollmechnismen der A1- und HectD1-Interaktion	87
4.2 Mögliche weitere Abbauwege von A1	89
V. Zusammenfassung	91
VI. Summary	92
VII. Abkürzungsverzeichnis	93

INHALTSVERZEICHNIS

VIII. Ein-Buchstabenkodierung für Aminosäuren	101
IX. Literaturverzeichnis	102
Verzeichnis wissenschaftlicher Artikel	102
Sonstige Quellenangaben	110
Fußnoten	110
X. Lebenslauf	111

EINLEITUNG

I. Einleitung

Die Apoptose spielt bei der Entwicklung und Homöostase von Geweben eine wichtige Rolle. Ohne Apoptose würden sich bis zum 80. Lebensjahr beim Menschen etwa zwei Tonnen Knochenmark ansammeln und das Intestinum auf eine Länge von etwa 16 km anwachsen (Melino, 2001). Eine Verschiebung des Gleichgewichts zu Gunsten oder gegen die Apoptose kann ernsthafte Konsequenzen zur Folge haben. So geht eine verstärkte Apoptose oft mit degenerativen Erkrankungen, z.B. des Nervensystems einher, wogegen eine Reduktion apoptotischer Faktoren oft Autoimmunerkrankungen oder Neoplasien zur Folge haben (Cory and Adams, 2002). Daher ist ein genaueres Verständnis der Kontroll- und Regulationsmechanismen der Apoptose unerlässlich.

1. Allgemeine Einführung in die Apoptose

Der Begriff Apoptose wurde aus dem altgriechischen entlehnt und bedeutet in etwa „Blätter fallen vom Baum“. Morphologisch lässt sie sich von der Nekrose durch Zellschrumpfung, Kondensation und intranukleosomale Degradation der DNA unterscheiden (Kerr et al., 1972). Die Charakteristika der Nekrose hingegen sind: Anschwellen von Zellen und Organellen, gefolgt von Zerstörung der Zelle und Freisetzung zytoplasmatischen Materials (Fiers et al., 1999).

In Abhängigkeit von der Initiation der Apoptose kann man grundsätzlich zwei verschiedene Pfade unterscheiden. Den extrinsischen oder Todesrezeptorpfad, sowie den intrinsischen oder mitochondrialen Pfad (Abb. I-1) (Green and Reed, 1998; Krammer, 2000; Scaffidi et al., 1998). Eine Schlüsselrolle nehmen dabei cysteinabhängige Aspartat spezifische Proteasen ein (Caspasen), die durch ihre Domänenstruktur in Initiator- (2, 8, 9), Effektor- (3, 6, 7) und Zytokinaktivatorcaspasen (1, 4, 11, 12) eingeteilt werden können (Srinivasula et al., 2001). Caspasen liegen als Procaspasen im Zytoplasma vor. Aktive Initiatorcaspasen aktivieren Effektorcaspasen durch proteolytische Spaltung (Donepudi and Grutter, 2002; Fuentes-Prior and Salvesen, 2004; Nicholson, 1999). Alle Apoptosepfade konvergieren in der Aktivierung von Caspase 3, die nach Aktivierung Proteine spaltet und somit den Zelltod auslöst. Ein dritter Pfad, der sogenannte Perforin/ Granzympfad, kann Apoptose über Granzym A und

EINLEITUNG

Granzym B (aus CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen) auslösen. Dabei kommt es ebenfalls zur Aktivierung von Caspase 3. Jedoch ist hier auch eine caspaseunabhängige Apoptoseinduktion möglich, da Granzym A zur Bildung von radical oxygen species (ROS) beiträgt, ohne die Integrität der Mitochondrienmembran zu beeinträchtigen (Elmore, 2007; Martinvalet et al., 2005).

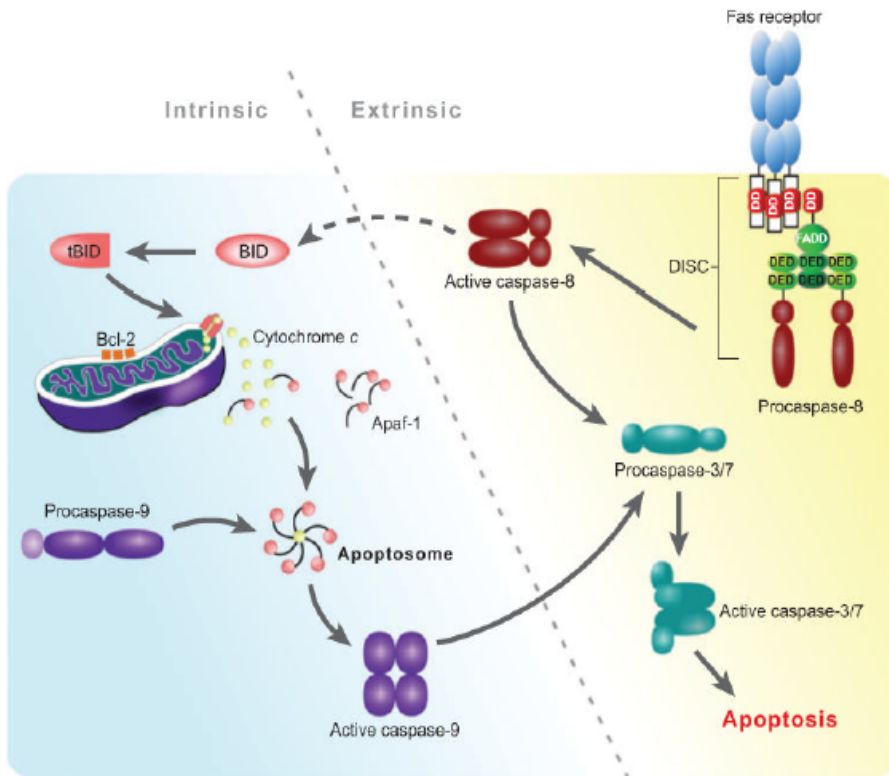


Abbildung I-1: Überblick über die beiden Apoptosewege: intrinsischer (mitochondrialer) Pfad und extrinsischer (Todesrezeptor) Pfad. Eine ausführliche Erläuterung der beiden Apoptosepfade findet sich unter Abschnitt 2: Induktionswege und Regulationsmechanismen der Apoptose (Best, 2008).

2. Induktionswege und Regulationsmechanismen der Apoptose

2.1 Todesrezeptorpfad der Apoptose

Der Todesrezeptorpfad wird durch Bindung von Liganden an Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie eingeleitet (Abb. I-1 rechts). Dazu gehören TNF und CD95 (Fas, Apo-1) (Locksley et al., 2001). Diese Rezeptoren besitzen in ihrer zytoplasmatischen Domäne eine Sequenz von etwa 80 Aminosäuren, die als death domain (DD) bezeichnet wird, und die für die Signaltransduktion von außerordentlicher Bedeutung ist (Ashkenazi and Dixit, 1998). Am

EINLEITUNG

ausführlichsten beschriebenen ist die Apoptoseinduktion nach FasL/ CD95 bzw. TNF-alpha/ TNFR1-Interaktion. Nach Bindung von FasL an CD95, bindet das zytoplasmatische Adapterprotein FADD an die DD von Fas und Procaspase 8 wird in den Komplex rekrutiert. Nach Bindung von TNF-alpha an seinen Rezeptor, wird zunächst TRADD rekrutiert, das als Adaptermolekül für FADD und RIP dient, die ihrerseits Procaspase 8 in den Komplex ziehen (Hsu et al., 1995; Wajant, 2002). Dieser wird als death inducing signaling complex (DISC) bezeichnet. Hier wird Procaspase 8 in einem komplexen Vorgang in aktive Caspase 8 überführt (Bekes and Salvesen, 2009; Kischkel et al., 1995). Caspase 8 aktiviert ihrerseits Caspase 3, die viele Proteine in der Zelle verdaut.

2.2 Mitochondrialer Pfad der Apoptose

Der mitochondriale Pfad der Apoptose (Abb. I-1 links) kann auf zweierlei Weise eingeleitet werden, durch Verlust der apoptotischen Hemmung, oder durch Zunahme proapoptotischer Stimuli wie Strahlung, freie Radikale, Hyperthermie, Viren und vieles mehr (Elmore, 2007). Durch die proapoptotischen Faktoren kommt es zu einer Störung der Integrität der äußeren Mitochondrienmembran, mit Öffnung der mitochondrial permeability transition pore (MPT), Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und der Freisetzung proapoptotischer Faktoren wie Cytochrom C, Smac/ DIABLO und HtrA2/ Omi ins Zytosol (Du et al., 2000; Garrido et al., 2006). Zytoplasmatisches Cytochrom C bindet Apaf-1 und Procaspase 9. Zusammen bildet dieser Komplex das Apoptosom, das Procaspase 9 in Caspase 9 spaltet, die nun proteolytisch aktiv ist und ihrerseits Caspase 3 aktivieren kann (Chinnaiyan, 1999; Hill et al., 2004). Smac/ DIABLO und HtrA2/ Omi (IAP Antagonisten) hingegen unterstützen die Apoptose, indem sie inhibitors of apoptosis (IAP) blockieren (Schimmer, 2004; van Loo et al., 2002). Entscheidende Bedeutung bei der Regulation des mitochondrialen Pfades der Apoptose kommt dabei den Mitgliedern der Bcl-2-Familie zu (Cory and Adams, 2002).

EINLEITUNG

3. Die Bcl-2-Familie

3.1 Allgemeiner Überblick über die Bcl-2-Familie

Die Bcl-2-Proteinfamilie besteht aus anti- und aus proapoptotischen Mitgliedern (Adams and Cory, 2007; Strasser, 2005; Youle and Strasser, 2008). Die anti- bzw. proapoptotische Funktion einzelner Mitglieder ist dabei eng mit der Anzahl der Bcl-2-Homologiedomänen (BH-Domänen) assoziiert (insgesamt vier an der Zahl). Die antiapoptotischen Bcl-2-Mitglieder (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1, BOO/ DIVA) enthalten 4 BH-Domänen (BH1-4), wohingegen die proapoptotischen Bcl-2-Mitglieder in Multidomain (Bax, Bak) mit 3 BH-Domänen (BH1-3) und BH3-only-Mitglieder (Bim, Noxa, Puma, Bid) mit nur einer BH-Domäne (BH3) unterteilt werden können (Abb. I-2) (Huang and Strasser, 2000; Moldoveanu et al., 2006; Willis and Adams, 2005).

Typisch für die antiapoptotischen Bcl-2-Mitglieder ist ein hydrophober C-Terminus, der ihnen ein Andocken/ Verankern an/ in intrazelluläre Membranen wie die äußere Mitochondrienmembran, das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder die Kernmembran ermöglicht. Dabei lokalisiert Bcl-2 vor allem an die Kernmembran und das ER, wohingegen Bcl-X und Bcl-w vorwiegend an den Mitochondrien vorzufinden sind (Kaufmann et al., 2004; Kaufmann et al., 2003). Mcl-1 gehört ebenso zur antiapoptotischen Bcl-2-Familie, (Kozopas et al., 1993) obwohl es über keine gut definierte BH4-Domäne verfügt (Adams and Cory, 2001). Durch alternatives Spleißen kann Exon 2 deletiert werden, wodurch anstelle der Mcl-1_L (Long) die Mcl-1_S (Short) Isoform entsteht (Bingle et al., 2000). Die beiden Isoformen unterscheiden sich dabei nicht nur in der Anzahl der Aminosäuren und der BH-Domänen (Mcl-1_L: 350 Aminosäuren, BH1-3, C-terminale Transmembrandomäne; Mcl-1_S: 271 Aminosäuren, BH3) sondern auch funktionell (Akgul et al., 2000). So ist Mcl-1_L anti-, Mcl-1_S hingegen proapoptotisch (Bingle et al., 2000). Mcl-1_L lokalisiert in der äußeren Mitochondrienmembran (Chen et al., 2005; Han et al., 2007; Shimazu et al., 2007; Willis et al., 2005; Clohessy et al., 2006).

Bak und Bax gehören zur Gruppe der Multidomainmitglieder. Ihnen gemeinsam ist, dass sie die BH1-, BH2- und BH3-Domäne besitzen über die sie eine hydrophobe Grube bilden können (siehe unten). Durch Homooligomerisation und Porenbildung stören sie die

EINLEITUNG

mitochondriale Integrität und führen zur Freisetzung von Cytochrom C (siehe unten) (Hotchkiss et al., 2009).

Bim, Noxa und Puma gehören zur proapoptotischen BH3-only-Gruppe der Bcl-2-Familie. Allen dreien gemeinsam ist, dass sie über ihre BH3-Domäne mit den proapoptotischen Multidomainmitgliedern Bax, Bak und den antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie interagieren können. Dabei binden Bim und Puma alle antiapoptotischen Bcl-2-Proteine, Noxa hingegen nur A1 und Mcl-1 (Adams and Cory, 2007).

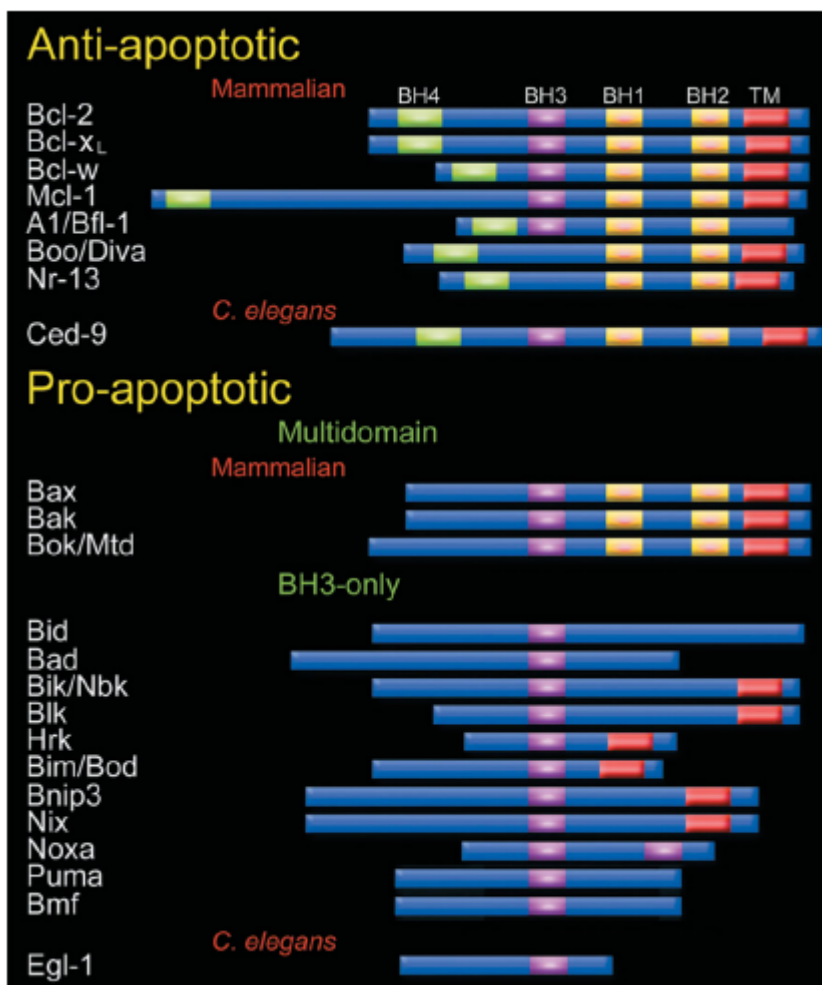


Abbildung I-2: Überblick über die Bcl-2-Familie (Opferman and Korsmeyer, 2003)

Die BH-Domänen 1, 2 und 3 der antiapoptotischen und Multidomainmitglieder bilden eine hydrophobe Grube, an die die alpha helikale BH3-Domäne der BH3-only-Mitglieder über nicht kovalente Bindungen andocken kann (Day et al., 2008; Lama and Sankararamakrishnan,

EINLEITUNG

2008; Liu et al., 2003; Petros et al., 2004; Sattler et al., 1997). Daraus ergeben sich zwei unterschiedliche Modelle wie die Apoptose durch die Bcl-2-Proteine reguliert wird. Beim direkten Aktivierungsmodell interagieren die BH3-only Proteine direkt mit Bax und Bak und aktivieren sie dadurch. Im indirekten Aktivierungsmodell hingegen binden BH3-only-Proteine an antiapoptotische Bcl-2-Mitglieder wie Bcl-2 und führen somit zu einer Freisetzung von gebundenem Bax oder Bak, die dann proapoptotisch Wirken können (Certo et al., 2006; Chen et al., 2005; Kuwana et al., 2005; Letai et al., 2002; Oh et al., 2006; Walensky et al., 2006; Willis and Adams, 2005; Willis et al., 2007). In beiden Fällen kann freies ungebundenes Bax bzw. Bak die äußere Mitochondrienmembran durch Porenbildung zerstören, wodurch Cytochrom C ins Zytosol gelangt und die Bildung des Apoptosoms initiiert (Green and Kroemer, 2004). Für das direkte Aktivierungsmodell spricht, dass Bid, Bim und Puma essentiell sind für die Bax und Bak vermittelte Apoptose sowie die damit verbundene Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium (Ren et al., 2010). Dabei wird folgender Mechanismus vorgeschlagen: Bax liegt im Zytosol als Monomer vor, wobei die alpha9 helikale Struktur des Bax C-Terminus die hydrophobe Grube belegt (Suzuki et al., 2000). Gleichzeitig stabilisiert die alpha1 helikale Struktur des N-Terminus von Bax die Bindung der alpha9 helikalen Struktur in der hydrophoben Grube. Binden tBid, Bim und Puma an die alpha1 helikale Struktur von Bax, so kommt es zu einer Konformationsänderung von Bax, die eine Freilegung der hydrophoben Grube zur Folge hat. Während die Bindung an die alpha1 helikale Struktur transients Natur war, können tBid, Bim und Puma nun eine stabile Interaktion mit Bax eingehen, indem sie an die BH1-Domäne der hydrophoben Grube binden. Die nun frei liegenden BH1- und BH3-Domänen der hydrophoben Grube sind für die Homooligomerisation von Bax unentbehrlich, da Mutationen in den entsprechenden Bereichen eine Zusammenlagerung einzelner Bax-Proteine unmöglich machen. Über das frei liegende C-terminale Ende binden die Bax-Homooligomere in die äußere Mitochondrienmembran und bilden somit eine Pore über die Cytochrom C freigesetzt werden kann (Abb. I-3). Bak exponiert die alpha1 Helix konstitutiv, weshalb die initiale Konformationsänderung nicht nötig ist. Im Übrigen ist der Mechanismus identisch (Kim et al., 2009).

EINLEITUNG

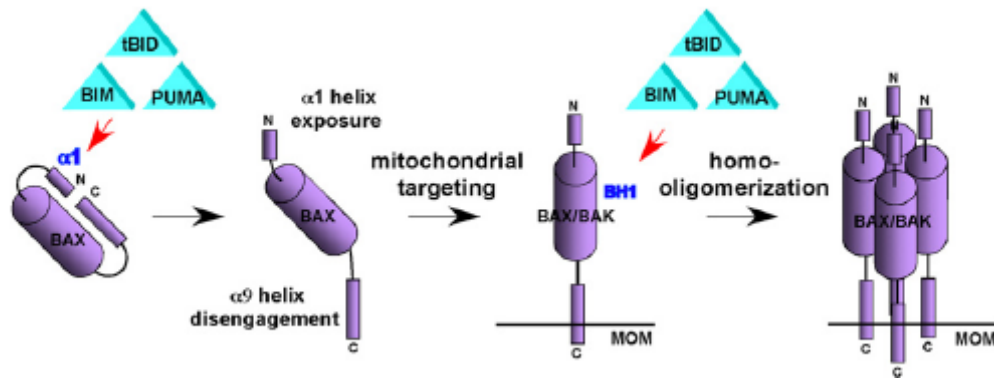


Abbildung I-3: Schematische Darstellung der Interaktion von Bax/ Bak und BH3-only-Proteinen im direkten Aktivierungsmodell (Kim et al., 2009).

3.2 A1/ Bfl-1

A1 gehört zur Gruppe der antiapoptotischen Bcl-2-Mitglieder und wurde im Rahmen von Genexpressionsstudien myeloider Zellen identifiziert und charakterisiert (Lin et al., 1993; Orlofsky et al., 1991). Sein humanes Homolog Bcl-2 related gene expressed in fetal liver (Bfl-1) wurde in humanen fetalen Leberzellen erstmalig beschrieben und liegt in zwei unterschiedlichen Varianten vor: Bfl-1 (175 Aminosäuren, lokalisiert ans Mitochondrium) und dessen Spleißvariante Bfl-1_S (163 Aminosäuren, lokalisiert an den Nukleus) (Choi et al., 1995; Ko et al., 2003). A1 ist 172 Aminosäuren lang, etwa 20 kDa groß und wird von Chromosom 9 kodiert, sein humanes Homolog Bfl-1 von Chromosom 15 (Lin et al., 1997). Auf Proteinebene weisen beide Proteine eine Homologie von 72 % auf (Xiang et al., 2006). Im Gegensatz zu Bfl-1 hat A1 vier Isoformen (A1a, A1b, A1c, A1d), wobei der Genlocus von A1-c ein Pseudogen ist. Die drei übrigen Genloci kodieren jeweils ein funktionelles Protein, und sind hochkonserviert (mehr als 96 % Homologie zwischen den Isoformen) (Hatakeyama et al., 1998). Auch funktionell scheinen die drei Isoformen identisch zu sein, da A1-a defiziente Mäuse lediglich einen milden Phänotyp mit leicht erhöhter spontaner Apoptoserate peripherer neutrophiler Granulozyten zeigen (Hamasaki et al., 1998).

Die A1-Expression kann über den Transkriptionsfaktor NFkappaB verstärkt werden. So nimmt nach Stimulation von Endothelzellen mit TNF-alpha bzw. nach Stimulation von Wehi 231 Lymphomzellen mit einem CD40 stimulierenden Antikörper die *a1*-Expression NFkappaB abhängig zu (Grumont et al., 1999; Karsan et al., 1996; Kuss et al., 1999).

EINLEITUNG

Sauerstoffradikale wie H_2O_2 führen ebenfalls zu einer vermehrten NFkappaB Aktivität und Expression von Bfl-1 (Kim et al., 2005). Im Gegensatz dazu ist die *al*-Transkription in Mastzellen NFkappaB unabhängig. Nach Kreuzvernetzung des Fc epsilon RI Rezeptors und Aktivierung der Mastzellen transloziert NFAT in den Zellkern und initiiert dort die *al*-Transkription (Ulleras et al., 2008; Xiang et al., 2006). Studien mit humanen Mastzellen zeigen, dass der Phosphoinositid 3 Kinase Pfad (PI-3 Kinase) hierbei wohl wichtig ist. Jedoch scheint dies mastzellenspezifisch zu sein, da in humanen neutrophilen Granulozyten eine *bfl-1*-Expression nach Fc epsilon RI Stimulation nicht möglich ist (Xiang et al., 2006).

In der Embryogenese wird *al* in zahlreichen Geweben exprimiert: an Tag 11,5 day post conceptionem (dpc) ist es in Leber, Gehirn und Gliedmaßen von Mausembryonen nachweisbar, an Tag 13,5 dpc in ZNS, Leber, Perichondrium und digitalen Zonen sich entwickelnder Gliedmaßen (Carrio et al., 1996). Es ist somit anzunehmen, dass eine geregelte A1-Expression für eine normale Entwicklung der Frucht sehr wichtig ist.

Auch im Immunsystem spielt A1/ Bfl-1 eine wichtige Rolle, unter anderem bei der Entwicklung der T-Zelle. T-Zellen beginnen ihre Entwicklung im Knochenmark als Doppelt negative T-Zellen (haben weder CD4 noch CD8 auf ihrer Oberfläche) und setzen diese im Thymus fort. Die in den Thymus eingewanderten pro T-Zellen differenzieren zu prä T-Zellen mit einem prä T-Zellrezeptor (bestehend aus beta Kette und prä T alpha Kette) und diese zu doppelt positiven T-Zellen (haben CD4 und CD8 sowie einen funktionalen T-cell receptor [TCR mit beta und alpha Kette] auf ihrer Oberfläche). Die doppelt positiven Zellen reifen schließlich zu einfach positiven T-Zellen (haben den TCR und CD4 oder CD8 auf ihrer Oberfläche) heran. Für die T-Zellentwicklung und -funktion ist die TCR major histocompatibility complex (MHC) Interaktion zwischen T-Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen unabdingbar (Abbas 6th edition).

Während der T-Zellentwicklung im Thymus nimmt die *al* mRNA-Expression beim Übergang vom double negative (DN) zum double positive (DP) Stadium stark zu, wohingegen die *al* mRNA-Menge in single positive (SP) und peripheren SP-Zellen um das 25 fache abnimmt. (Tomayko et al., 1999). Besonders in DP-Thymozyten, die die positive Selektion bereits durchlaufen haben (haben höhere TCR-Dichte auf der Zelloberfläche als solche die noch nicht positiv selektioniert wurden), nimmt die *al* mRNA-Expression deutlich zu. Daneben kommt es zu einer Akkumulation von A1 in DP-Thymozyten RAGF5 transgener Mäuse (exprimieren

EINLEITUNG

einen TCR, der nur für ein bestimmtes Influenzaviruspeptid spezifisch ist) die noch positiv selektioniert werden müssen. Auf die negative Selektion scheint A1 hingegen keinen Einfluss zu haben (Vershelde et al., 2006). Zwar ist die *al*-Expression nicht von der TCR-MHC Interaktion abhängig (die *al*-Mengen von DP-Thymozyten MHC defizienter Mäuse sind vergleichbar mit denen von wtMäusen), jedoch scheint die Signaltransduktionskaskade des TCR doch eine wichtige Rolle zu spielen (Tomayko et al., 1999). Neuere Untersuchungen belegen, dass *al* der Regulation des prä TCR unterliegt, wobei die Signaltransduktion über den Phospholipase C-gamma Pfad und die anschließende NFkappaB Aktivierung erfolgt. Dabei scheinen sowohl Inositoltriphosphat (IP₃) als auch Diacylglycerin (DAG) gleichermaßen bedeutsam zu sein (Mandal et al., 2005).

In B-Zellen scheint A1 ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen. So nimmt A1 beim Übergang von der unreifen B-Zelle zur langlebigen reifen B-Zelle zu. Dies geschieht über Signale des B-cell receptor (BCR) (Tomayko and Cancro, 1998). Nach Kreuzvernetzung des BCR mit einem Anti-IgM-Antikörper nimmt die *al* mRNA-Expression in verschiedenen B-Zellsubpopulationen ebenfalls zu (Trescol-Biemont et al., 2004). Auch hier scheint der Phospholipase C-gamma2 Pfad eine wichtige Rolle zu spielen. So kann in Phospholipase C-gamma2 defizienten B-Zellen nach BCR-Ligation die *al*-Expression nicht mehr induziert werden (Trescol-Biemont et al., 2004; Wen et al., 2003). Die A1-Expression kann jedoch auch unterdrückt werden. So ist bekannt, dass nach Überexpression von Blimp-1 Wehi 231 Zellen zu kurzlebigen Immunglobuline sezernierenden Plasmazellen differenzieren, wobei es zu einer signifikanten Abnahme von *al* kommt (Knodel et al., 1999).

Ihre antiapoptotische Wirkung entfalten A1/ Bfl-1 durch binden von Bim, Noxa, Puma und tBid (Chen et al., 2005; Herold et al., 2006; Werner et al., 2002). So ist aus *in vitro* Versuchen bekannt, dass A1/ Bfl-1 die Prozessierung von Bid nicht nur unterbinden (Duriez et al., 2000) sondern tranquiertes Bid (tBid) auch binden und somit die Interaktion mit Bax/ Bak verhindern kann (Werner et al., 2002). Dabei spielen die BH1-4-Domänen eine wichtige Rolle, da Mutationen in den BH-Domänen die antiapoptotische Effekte von A1/ Bfl-1 reduzieren. Dabei sind Mutationen in den BH1- und BH2-Domänen gravierender als in den BH3- und BH4-Domänen (D'Sa-Eipper and Chinnadurai, 1998).

Das Binden der BH3-only-Proteine hat zur Folge, dass Bax und Bak nicht mehr die Cytochrom C-Freisetzung aus Mitochondrien einleiten können und es somit nicht zur

EINLEITUNG

Caspasenaktivierung kommt. So unterbindet überexprimiertes A1/ Bfl-1 nachweislich die etoposidinduzierte Apoptose in Fibrosarkomzellen durch Hemmung der Cytochrom C Freisetzung, wobei die Aktivität von Caspase 3 reduziert zu sein scheint (Wang et al., 1999). Und in Endothelzellen hemmt A1 nach Lokalisation ans Mitochondrium innerhalb der ersten 24 Stunden nach TNF-Stimulation die Cytochrom C-Freisetzung und Spaltung von Caspase 9. Auf die Prozessierung von Caspase 3 und 8 hat es hingegen keinen Einfluss (Duriez et al., 2000). Allerdings gibt es auch Daten, die einen Einfluss von A1/ Bfl-1 auf die Prozessierung von Caspase 3 belegen, da überexprimiertes A1/ Bfl-1 in einer prä TCR-Zelllinie die Caspase 3-Aktivierung unterbindet (Mandal et al., 2005).

Ebenso wie Bcl-X ist A1/ Bfl-1 vorwiegend an den Mitochondrien anzufinden (Brien et al., 2009; Duriez et al., 2000; Kaufmann et al., 2003), wobei die exakte Lokalisation von Bfl-1 derzeit noch Gegenstand der Diskussion ist. So lokalisiert endogenes Bfl-1 an den Mitochondrien maligner B-Zellen und peripheral blood lymphocytes (PBL) (Brien et al., 2009), während es in COS-7 (Fibroblasten) Zellen im Überexpressionssystem an den Nukleus zu lokalisieren scheint (Somogyi et al., 2001). Dabei ist das C-terminale Ende von A1/ Bfl-1 nicht nur für die mitochondriale Lokalisation entscheidend (Diplomarbeit Alva Rosendahl), sondern auch für dessen Funktion. So ist die antiapoptotische Funktion von A1/ Bfl-1 in C-terminalen Deletionsmutanten eingeschränkt (Herold et al., 2006 D'Sa-Eipper et al., 1996). Aus Überexpressionstudien ist eine Interaktion zwischen Bfl-1 und Bak bekannt. Gleichzeitig bindet eine A1/ Bfl-1-Deletionsmutante, der der C-Terminus fehlt endogenes Bak schwächer als wtBfl-1 (Simmons et al., 2008). Zwar hat weder A1 noch Bfl-1 eine klar definierte C-terminale transmembranäre Region, jedoch scheint der amphipatische Charakter des C-Terminus von A1/ Bfl-1 für die Ausbildung zweier unterschiedlicher konformaler Zustände verantwortlich zu sein, abhängig davon ob das C-terminale Ende in der hydrophoben Grube der BH1-3-Domänen bindet oder nicht. So wird vorgeschlagen, dass die Einbettung des C-Terminus in der hydrophoben Grube von Bfl-1 dessen Lokalisation ans Mitochondrium und die Bindung proapoptotischer BH3-only-Proteine beeinträchtigt, wohingegen das frei liegende C-terminale Ende ein Andocken von Bfl-1 an die Mitochondrien sowie das Binden von BH3-only-Proteinen über die hydrophobe Grube erlaubt (Brien et al., 2009). Daneben ist das C-terminale Ende von A1/ Bfl-1 für dessen Stabilität und Ubiquitylierung außerordentlich wichtig. So ist eine verkürzte Version von A1/ Bfl-1, der die letzten 21 Aminosäuren fehlen

EINLEITUNG

im Vergleich zu wtA1 wesentlich stabiler. Außerdem ist die Ubiquitylierung dieser Deletionsmutante deutlich reduziert (Herold et al., 2006; Kucharczak et al., 2005).

Ein Defekt im ubiquitinvermittelten Abbau von A1/ Bfl-1 begünstigt wiederum die Entstehung von Lymphomen (Fan et al., 2010). Daneben wird das Überleben von prä T-Zellen (siRNA knock down von A1 beeinträchtigt deren Überleben) ebenso wie auch die Entwicklung einer T-Zellleukämie (*al* mRNA ist überexprimiert in Thymozyten, die spezifische Marker für die T-ALL haben, nicht aber in sich normal differenzierenden Thymozyten) durch A1/ Bfl-1-Expression begünstigt (Mandal et al., 2005). Außerdem gibt es Hinweise, dass die Philadelphiachromosomtranslokation (BCR/ ABL [Kinase]), welche die Akute myeloische Leukämie (AML), die Chronische myeloische Leukämie (CML) und die Akute lymphatische Leukämie (ALL) Entstehung begünstigt, ebenfalls die A1/ Bfl-1-Expression beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass die A1-Expression in Patienten CML Zellen von der Kinaseaktivität des BCR/ ABL-Fusionsproteins abhängig ist. Darüberhinaus wird A1/ Bfl-1 zusammen mit pim-1 (Kinase) für die BCR/ ABL vermittelte Leukämogenese benötigt. Dabei scheinen A1 und pim nicht nur die Apoptose zu hemmen, sondern unterstützen wohl auch noch die Zellproliferation (Nieborowska-Skorska et al., 2002).

4. Allgemeine Einführung in das Ubiquitinsystem

Die Ubiquitylierung ist eine posttranslationale Proteinmodifikation. Hierbei werden an Proteine Ubiquitinketten (Ubiquitin: 76 Aminosäuren) angehängt, woraufhin die ubiquitylierten Proteine vom 26S Proteasom erkannt und degradiert werden können. Allerdings reguliert diese Modifikation auch die Endozytose, Signalübertragung und Proteinsortierung in der Zelle. Die Entscheidung, welcher Prozess gesteuert wird hängt davon ab, welches der 7 Lysine von Ubiquitin (Lysin in Position 6, 11, 27, 29, 33, 48 und 63 (Rotin and Kumar, 2009)) für den Aufbau der Kette verwendet wird. So geht eine Vernetzung mit K48 modifizierten Ubiquitinketten (Lysin an Position 48 von Ubiquitin s.u.) mit proteosomaler Degradation einher, wohingegen eine Vernetzung mit K63 modifizierten Ubiquitinketten Prozesse wie Endozytose oder vesikuläre Sortierung steuert. Im Allgemeinen geht man davon aus, dass das Anhängen von Polyubiquitinketten an sämtliche Lysine - außer K63 - Proteine für die proteosomale Degradation markiert. K11 hingegen scheint spezifisch

EINLEITUNG

für den Abbau von Proteinen bei der Endoplasmatisches Retikulum assoziierten Degradation (ERAD) zu sein (Hershko and Ciechanover, 1998) (Hicke and Dunn, 2003).

4.1 Ubiquitinylierung

Die kovalente Proteinmodifikation läuft dabei immer nach demselben Prinzip ab. Ein E1-Enzym (ubiquitin activating protein) bindet Ubiquitin kovalent unter ATP Verbrauch. Ein E2 konjugierendes Enzym (ubiquitin conjugating enzyme) übernimmt das aktivierte Ubiquitin von E1. Und eine E3-Ubiquitinligase bildet schließlich einen Komplex mit dem Ubiquitin tragenden E2 konjugierenden Enzym sowie dem Zielprotein und überträgt das Ubiquitin vom E2 konjugierenden Enzym auf das Zielprotein (Abb. I-4). Das E2 konjugierende Enzym legt hierbei prinzipiell fest, welche Art von Ubiquitinmodifikation stattfindet, wohingegen die E3-Ubiquitinligase die Substratspezifität determiniert (Yang et al., 2010). Derzeit geht man davon aus, dass das menschliche Genom etwa 2 E1-, 30 E2- und über 600 E3-Ubiquitinligasen kodiert (Rotin and Kumar, 2009). Anzumerken ist, dass die Ubiquitinylierung ein reversibler Prozess ist, der von sogenannten deubiquitinating enzymes (DUB) rückgängig gemacht werden kann (Amerik and Hochstrasser, 2004; Wilkinson, 2000).

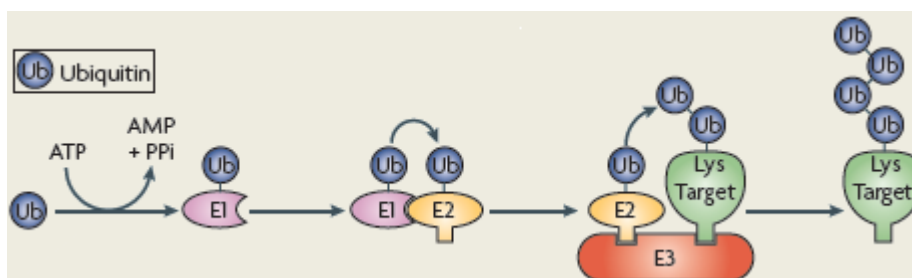


Abbildung I-4: Überblick über die Ubiquitinylierungskaskade (Rotin and Kumar, 2009)

5. E3-Ubiquitinligasen

Die E3-Ubiquitinligasen lassen sich in zwei Familien einteilen: die Hect- und die RING-Familie. Die Hect-Ligasen zeichnen sich dadurch aus, dass sie über einen konservierten

EINLEITUNG

Cysteinrest mit dem C-Terminus des Ubiquitins eine Thioesterbrücke bilden ehe das Substrat ubiquitinyliert wird. RING-Ligasen hingegen bilden ein Gerüst, das das Protein und aktiviertes E2-Ubiquitin zusammenführt und die Ubiquitinylierung des Substrats vermittelt (Abb. I-5) (Rotin and Kumar, 2009). Von den über 600 E3-Ubiquitinligasen gehört die überwiegende Mehrzahl zur Familie der RING-Ligasen. Lediglich 28 Hect-Ligasen sind beim Menschen beschrieben (Li et al., 2008). In Abhängigkeit von ihrer N-terminalen Domänenstruktur lassen sich die Hect-Ligasen in drei Gruppen einordnen: Die Nedd4-Familie (9 Mitglieder), die HERC-Familie (6 Mitglieder) und die sonstigen Hect (13 Mitglieder, darunter HectD1) (Rotin and Kumar, 2009).

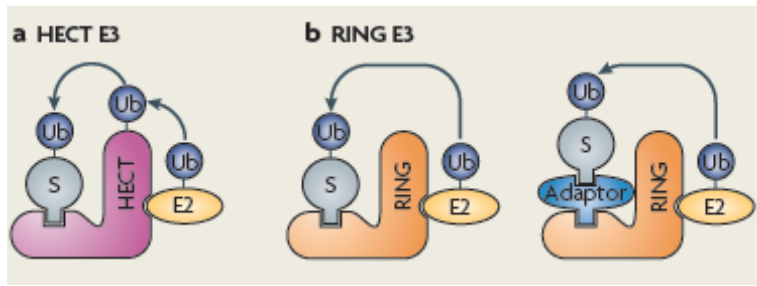


Abbildung I-5: Schematische Darstellung von Hect- und RING-E3-Ubiquitinligasen, sowie deren Ubiquitinylierungsmechanismen (Rotin and Kumar, 2009).

HectD1 ist eine bislang nicht näher charakterisierte E3-Ubiquitinligase aus der Untergruppe der sonstigen Hect-Ligasen. Die murine HectD1 wird von Chromosom 12 (humane von Chromosom 14) kodiert und ist 2.610 Aminosäuren lang und etwa 290 kDa groß. Sie enthält eine Hect-E3-Ubiquitinligasedomäne sowie Ankyrinrepeats, die eine Protein-Protein Interaktion ermöglichen. HectD1 wird ubiquitär während der frühen Entwicklung von Mausembryonen exprimiert. Und homozygote HectD1 defiziente Mäuse sind embryonal letal, da es zu keinem Verschluss des Neuralrohres kommt (Zohn et al., 2007). Desweiteren ist bekannt, dass HectD1 in wenigstens zwei Isoformen vorkommt und in der T-ALL vermehrt exprimiert wird (Dohnal et al., 2006).

EINLEITUNG

6. Bedeutung der Hect-Ligasen für:

6.1 Das Immunsystem

T-Zellen spielen in der Regulation der Immunantwort eine Schlüsselrolle, weil sie infizierte Zellen abtöten, B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen und Fresszellen (Makrophagen) aktivieren können. $CD8^+$ T-Zellen leiten die zelluläre Immunantwort ein (Makrophagenaktivierung, direktes Abtöten von infizierten Zellen), während $CD4^+$ T-Zellen die antikörperabhängige humorale Immunantwort einleiten. Die $CD4^+$ T-Zellen können weiter unterteilt werden in Th1- und Th2-Zellen, die sich in ihrer Funktion unterscheiden. Th1-Zellen fördern über IFN γ Freisetzung die Makrophagen- und B-Zellaktivierung sowie die IgG-Synthese und unterstützen somit die Eliminierung von Bakterien und Viren, während Th2-Zellen über IL-4-Freisetzung vor allem die IgE-Synthese der B-Zellen fördern und somit die Eliminierung von Helminthen unterstützen. Daneben stehen Th2-Zellen in Verdacht Asthma und atopische Erkrankungen wie Heuschnupfen zu befördern (Abbas 6th Edition).

E3-Ubiquitinligasen aus der Hect-Familie spielen wiederum bei der Regulation der T-Zellaktivität eine wichtige Rolle.

Nedd4 ist für die Aktivierung der T-Zelle sehr wichtig. So sind die Proliferation und IL-2-Produktion in Nedd4 defizienten T-Zellen ebenso beeinträchtigt, wie deren Fähigkeit B-Zellen zu aktivieren (B-Zellen produzieren weniger antigenspezifisches IgG in Gegenwart von Nedd4 defizienten T-Zellen). Dies geschieht vermutlich über Interaktion und Ubiquitylierung von Cbl-b. So sind die Cbl-b-Proteinmengen in Nedd4 defizienten T-Zellen erhöht (Yang et al., 2008). Gleichzeitig ist Cbl-b eine E3-Ubiquitinligase, die die Signaltransduktion des TCR-Komplexes durch Ubiquitylierung nachfolgender Signalproteine hemmt und dadurch den Übergang der T-Zellen in einen anergen (Unvermögen der T-Zelle eine Immunantwort einzuleiten) Zustand fördert (Abbas 6th Edition).

AIP2 ist eine weitere E3-Ubiquitinligase die die T-Zellaktivierung beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass AIP2 zur T-Zellaktivierung beiträgt, da primäre T-Zellen nach AIP-Überexpression vermehrt IL-2 produzieren und proliferieren. Dabei ubiquityliert AIP2 den Transkriptionsfaktor early growth response (EGR2) und fördert somit seinen proteosomalen Abbau (Chen et al., 2009). EGR2 ist ein wichtiger negativer Regulator der T-Zellaktivierung

EINLEITUNG

und ist an der Einleitung der T-Zellanergie beteiligt (wahrscheinlich durch vermehrte Transkription von Cbl-b) (Harris et al., 2004; Safford et al., 2005).

Itch hingegen ist als negativer Regulator der T-Zellaktivierung beschrieben. So ist Itch für die Induktion der T-Zellanergie sehr wichtig. Indem es Phospholipase C-gamma1 (PLCgamma1) und Proteinkinase θ (PKC θ) ubiquitinyliert, findet eine Signaltransduktion nach T-Zellstimulation nicht mehr statt. In Itch defizienten Mäusen beispielsweise ist eine Induktion der Anergie bei gleichzeitig erhöhtem PKC θ und PLCgamma1 nicht mehr möglich (Heissmeyer et al., 2004). Gleichzeitig führt eine erhöhte JunB (Transkriptionsfaktor) Aktivität aufgrund einer Itch-Deletion zu einer Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen zu einem Th2-Phänotyp mit einer T-Zellhyperproliferation, allergischen Reaktionen und erhöhten Serumspiegeln an IgE (Fang et al., 2002).

6.2 Die Organogenese

Auch für die Organ- und Gewebeentwicklung sind Hect-Ligasen wichtig. Nedd 4-1 defiziente Mäuse versterben in Utero aufgrund von Fehlbildungen des Herzens (Fouladkou et al., 2010). Dabei geht man davon aus, dass Nedd 4-1 als Inhibitor von Thrombospondin 1 (Angiogenesefaktor) wirkt. Auf die Bedeutung von HectD1 für die Neuralrohrentwicklung wurde bereits hingewiesen. Mule ist für die neuronale Entwicklung ebenfalls sehr wichtig, da es N-Myc mit K48 modifizierten Ubiquitinketten vernetzen kann. Die anschließende proteosomale Degradation von N-Myc hat schließlich eine Differenzierung von Stammzellen zu neuronalem Gewebe zur Folge (Stanton et al., 1992) (Zhao et al., 2008). Smurf1 ist ebenfalls eine E3-Ubiquitinligase aus der Hect-Familie, die einen Einfluss auf die Entwicklung von Geweben hat. So hat eine Überexpression von Smurf1 *in vitro* eine Hemmung der Osteoblastenbildung zur Folge und *in vivo* ist im Mausmodell die Osteogenese beeinträchtigt (Zhao et al., 2004).

6.3 Humane Erkrankungen

Aufgrund der Bedeutung der Hect-Ligasen in der Organogenese verwundert es nicht, dass sie auch mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. So geht die

EINLEITUNG

Überexpression von Smurf2 in squamösen Karzinomzellen des Ösophagus mit einer schlechten Prognose einher (Fukuchi et al., 2002). Ebenso wird die essentielle Hypertonie (Bluthochdruckerkrankung) mit Polymorphismen im *NEDD 4-2*-Gen in Verbindung gebracht (Russo et al., 2005). Gleichzeitig scheint Nedd 4-2 auch mit dem Liddle Syndrom (Erkrankung mit Bluthochdruck, Hypokaliämie Metabolischer Alkalose und niedrigen Plasmaspiegeln an Aldosteron und Renin) assoziiert zu sein, da Nedd 4-1/ Nedd 4-2 den epithelial natrium channel (ENaC) ubiquitinyliert, der daraufhin abgebaut wird. Mutationen im ENaC beeinträchtigen die Nedd/ ENaC-Interaktion und ENaC akkumuliert in der Plasmamembran (Botero-Velez et al., 1994; Hansson et al., 1995; Shimkets et al., 1994).

7. Ubiquitinylierung und Apoptose

Die Bedeutung von Ubiquitinylierung und Apoptose für die Zelle wurden bereits erläutert. Nun soll das Zusammenspiel der beiden Systeme näher dargelegt werden. Grundsätzlich kann es durch Ubiquitinylierung zu pro- aber auch zu antiapoptotischen Effekten kommen.

Durch Cullin 3 abhängige Ubiquitinylierung von Caspase 8 kann diese oligomerisiert und autoaktiviert werden (Jin et al., 2009). Ebenso können IAP-Antagonisten wie Reaper, Hid und Grim aus *Drosophila* die Autoubiquitinylierung und proteosomale Degradierung von IAP einleiten und damit die Caspaseinhibition unterbinden (Ryoo et al., 2002; Wilson et al., 2002). Somit führen sowohl die Ubiquitinylierung von Caspase 8 als auch der IAP zu einer verstärkten Apoptose (proapoptotisch).

Mule vernetzt Mcl-1 mit K48 modifizierten Ubiquitinketten und markiert es somit für den proteosomalen Abbau (Zhong et al., 2005). p53 als essentieller Regulator der Apoptose und des Zellzyklus wird durch die E3-Ubiquitinligase Mdm2 für den proteosomalen Abbau markiert und degradiert (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997). In human vein endothelial cells (HUVEC) kann Bcl-2 nach TNF-alpha-Stimulation dem proteosomalen Abbau durch Ubiquitinylierung zugänglich gemacht werden. Ebenso werden Bax, Bik und tBid durch Ubiquitinylierung degradiert (Breitschopf et al., 2000; Dimmeler et al., 1999). Ubiquitinylierung von Mcl-1, p53, Bcl-2, Bax, Bik und tBid macht daher die Zelle weniger anfällig für die Apoptose (antiapoptotisch).

EINLEITUNG

8. Ziel der Arbeit

In Anbetracht der Bedeutung von Apoptose und Ubiquitinylierung für die zelluläre Homöostase und basierend auf der Beobachtung, dass A1 durch Ubiquitinylierung für den proteosomalen Abbau markiert wird, stellt sich die Frage, welche E3-Ubiquitinligase(n) für die Ubiquitinylierung von A1 verantwortlich ist/ sind. Ziel der Arbeit ist es daher geeignete E3-Ubiquitinligasen zu identifizieren und zu charakterisieren.

MATERIAL UND METHODEN

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Verwendete Chemikalien/ Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien von AppliChem

- Acrylamid 30 %
- AGAR-Kobe
- Ammoniumpersulfat
- EDTA
- DMSO
- Ethanol 100 %
- Glycerol 100 %
- Glycin
- HCl
- LB-Medium
- Luminol
- Methanol 100 %
- NaCl
- NP40 100 %
- SDS
- TRIS
- Wasserstoffperoxid 35 %
- TEMED
- TWEEN 20

Chemikalien und Reagenzien von Ferak

- Kaliumacetat
- NaF
- Na₂HPO₄
- MgCl₂

Chemikalien und Reagenzien von Invitrogen

- Trizol®

Chemikalien und Reagenzien aus der Medienküche

- ATV
- PBS

Chemikalien und Reagenzien von Merck

- Cumarsäure (4-Hydroxycimtsäure)
- KCl
- Nariumdesoxycholat
- Triton X-100

MATERIAL UND METHODEN

Chemikalien und Reagenzien von Roche

- Pepstatin

Chemikalien und Reagenzien von Roth

- Agarose NEE0
- Anodenpuffer
- Bromphenolblau
- Chloroform
- Ethidiumbromid 1 %
- HEPES
- Kathodenpuffer

Chemikalien und Reagenzien von Sigma

- CaCl_2
- DTT
- Glucose
- Polybren
- Trypanblau
- Proteaseinhibitor

Das Milchpulver wird im Lebensmittelhandel erworben.

1.2 Puffer und Lösungen

1.2.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

Ammoniumpersulfat 10 % (APS)

1 g APS in 10 ml ddH₂O lösen; APS etwa alle 7 Tage neu ansetzen

ATV

- NaCl 8,00 g
- KCl 4,00 g
- D(+) Glucose 5,80 g
- NaHCO₃ 0,58 g
- Trypsin 0,50 g
- Versene (EDTA) 0,20 g

ad ddH₂O 1.000 ml

Bromphenolblau

Einige Krümel Bromphenolblau in 10 ml ddH₂O lösen

MATERIAL UND METHODEN

6x Lämmli

- 4x Sammelgelpuffer 21,00 ml
- Glycerol 9,00 ml
- SDS 3,00 g
- Bromphenolblau 3,75 mg
- DTT 2,775 g

ad ddH₂O 30 ml

Lämmli mittels PBS auf gewünschte Konzentration einstellen (z.B. 1x Lämmli: 1 ml 6x Lämmli mit 5 ml PBS mischen)

3 M NaCl

174,32 g NaCl in 1.000 ml ddH₂O lösen

Phosphat Buffered Saline (PBS)

- NaCl 137,0 mM
- KCl 2,7 mM
- Na₂HPO₄ 10,0 mM
- KH₂PO₄ 2,0 mM

einstellen auf pH = 7,4

Tris (hydroxymethyl-) Aminoethan (TRIS)

1 M TRIS HCl 121,1 g TRIS in 1.000 ml ddH₂O lösen und auf gewünschten pH mit HCl einstellen.

0,1 M TRIS 1:10 mit ddH₂O verdünnen

1.2.2 DNA-Gelelektrophorese

50x TAE

- TRIS 242,0 g
- EDTA 18,6 g
- Eisessig 90,0 ml

ad 1.000 ml ddH₂O und auf pH = 7,6 einstellen

1x TAE

20 ml 50x TAE in 980 ml ddH₂O lösen

MATERIAL UND METHODEN

1.2.3 Mini-Präp-Lösungen

Lösung 1

- Glucose 50 mM
- EDTA 10 mM
- TRIS HCl (pH = 8,0) 25 mM

Lösung 2

- NaOH 0,2 N
- SDS 1 %

Lösung 3

- KaAcetat 3 M
- Essigsäure 2 M

1.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

10x SDS-Laufpuffer

- TRIS 30,2 g
- Glycin 144,0 g
- SDS 10,0 g

ad 1.000 ml ddH₂O

4x Sammelgelpuffer

- TRIS 6,05 g
- SDS 0,40 g

ad ddH₂O 100 ml; einstellen auf pH = 6,8

4x Trenngelpuffer

- TRIS 91 g
- SDS 2 g

ad ddH₂O 500 ml; einstellen auf pH = 8,8

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle II-1: Rezeptur zur Herstellung eines Trenngels

Trenngel	7 %	10 %	15 %
4x Trenngelpuffer	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
ddH ₂ O	7,78 ml	6,25 ml	3,75 ml
TEMED	25 µl	25 µl	25µl
APS 10 %	150 µl	150 µl	150 µl
Acrylamid 30 %	3,5 ml	5,0 ml	7,5 ml

Tabelle II-2: Rezeptur zur Herstellung eines Sammelgels

Sammelgel	
4x Sammelgelpuffer	1,25 ml
ddH ₂ O	3 ml
TEMED	10 µl
APS 10 %	100 µl
Bromphenolblau	10 µl
Acrylamid	0,65 ml

1.2.5 Transfektion

2x HBS

- KCl 10,0 mM
- HEPES 50,0 mM
- Glucose (2,25 M) 12,0 mM
- NaCl (3 M) 280,0 mM
- Na₂HPO₄ (90 mM) 1,5 mM

2 M CaCl₂

221,96 g CaCl₂ in 1.000 ml ddH₂O lösen

1.2.6 Westernblot

Anodenpuffer/ Kathodenpuffer

- Anoden- bzw. Kathodenpuffer 100 ml
- Methanol 200 ml
- ddH₂O 700 ml

10x TBS

MATERIAL UND METHODEN

- 3 M NaCl 250 ml
- 1M TRIS HCl pH = 7,5 250 ml

1x TBST

- 10x TBS 100 ml
- ddH₂O 900 ml
- TWEEN 20 1 ml

Blockierlösung

5 g Milchpulver in 100 ml 1x TBST lösen

1.2.7 ECL-Detektionssystem-Reagenz

ECL Plus Westernblotting Detektionssystem (Amersham)

ECL-Lösung 1

- 10 ml 0,1 M TRIS
- 50 µl Luminol
- 40 µl Cumarsäure

ECL-Lösung 2

- 10 ml 0,1 M TRIS
- 5 µl H₂O₂

Lösung 1 und Lösung 2 im Verhältnis 1:2 mischen

Stocklösung Luminol: 250 mM in DMSO

Stocklösung Cumarsäure: 90 mM in DMSO

1.2.8 Zelllysepuffer

RIPA-Puffer

- PBS 97,5 %
- NP-40 (100 %) 1,0 %
- Natriumdesoxycholat 0,5 %
- SDS 0,1 %

MATERIAL UND METHODEN

Unmittelbar vor Anwendung Proteaseinhibitor 1:100 und DTT 1:1000 zugeben

Flag-IP-Lysepuffer

- EDTA (0,5 M pH = 8,0) 1 mM
- 1 M TRIS HCl pH = 8,0 50 mM
- NaCl 137 mM
- NaF 10 mM
- Triton X-100 1 %
- Glycerin 10 %

Unmittelbar vor Anwendung Proteaseinhibitor 1:100 und Pepstatin 1:1000 zugeben

1 % Triton-IP-Lysepuffer

- 1 M TRIS HCl pH = 7,4 50 mM
- NaCl 150 mM
- EDTA (0,5 M pH = 8,0) 5 mM
- Triton X-100 1 %

Waschpuffer

Entspricht dem Rezept für 1 % Triton-IP-Lysepuffer, Ausnahme: 0,1 % Triton.

Unmittelbar vor Anwendung Proteaseinhibitor 1:100 und Pepstatin 1:1000 zugeben

1.3 Plasmide

Die jeweilige cDNA der einzelnen Konstrukte wurde in bizistronische, retrovirale Vektorplasmide kloniert. Der Ausgangsvektor ist pEYZ-MCS der im 5' long terminal repeat (5'LTR) des Murinen Leukämievirus (MuLV) anstelle seiner U3 Region ein Zytomegalievirus (CMV) Enhancerelement hat, was die Transkriptionseffizienz erhöht (Abb. II-1). Eine intra ribosomal entry site (IRES) erlaubt eine koordinierte Koexpression des vorgeschalteten Testgens und des nachfolgenden Markergenprodukts (i.d.R. ein chimäres Protein aus Antibiotikaresistenz und Fluoreszenzprotein). Innerhalb der multiple cloning site (MCS) befinden sich zahlreiche Restriktionsstellen. Je nach Plasmid ist ein Flag-, HA- oder MYC-Tag N- bzw. C-terminal eingefügt. In prokaryontischen Organismen dient eine Ampizillinresistenz als Selektionsmarker, in eukaryontischen Organismen hingegen Zeozin. Die Plasmide pEGZ-HA3 und pIH-HA3cherry2SG4-MCS basieren auf pEYZ-MCS, haben

MATERIAL UND METHODEN

allerdings eine Grün- bzw. Rotfluoreszenz. Der pH-Vektor hat darüber hinaus anstelle einer Zeozin eine Hygromylinresistenz.

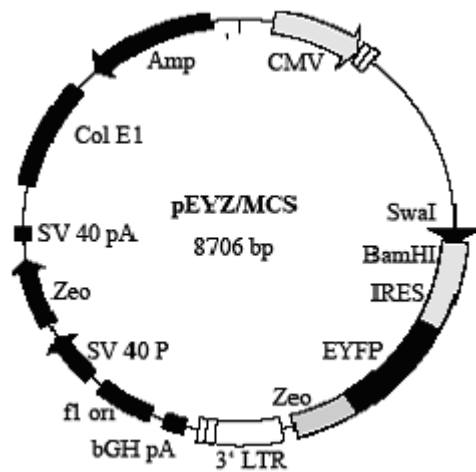


Abbildung II-1: retroviraler, bizistronischer Vektor pEYZ-MCS (modifiziert nach Steinert, 2006)

pHIT 60: *gag-pol* (ekotrop) Kingsman Labor (Oxford)
 pHIT 123: *env* (ekotrop) Kingsman Labor (Oxford)
 pHIT 456: *env* (amphotrop) Kingsman Labor (Oxford)
 pVSV-G: *env* (amphotrop) Kingsman Labor (Oxford)

Tabelle II-3: Liste aller eingesetzten Plasmide

Positionsnummer	Plasmid	Markergen
67	pEYZ-Flag Eco	Enhanced yellow fluorescent protein/ Zeozin Resistenzprotein; chimär
115	pEYZ-FmA1-2.151trunc	Enhanced yellow fluorescent protein/ Zeozin Resistenzprotein; chimär
230	pEYZ-FmA1wt	Enhanced yellow fluorescent protein/ Zeozin Resistenzprotein; chimär
264	pEGZ-HA3	Enhanced green fluorescent protein/ Zeozin Resistenzprotein; chimär
291	pEGZ-HA3mNoxa	Enhanced green fluorescent protein/ Zeozin Resistenzprotein; chimär
296	pEGZ-HA3mBimEL	Enhanced green fluorescent protein/ Zeozin Resistenzprotein; chimär
328	pE4G-FmA1	Enhanced green fluorescent protein/ CD4 der Ratte; chimäre
400	pEGZ-HA3mPuma	Enhanced green fluorescent protein/ Zeozin Resistenzprotein; chimär

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle II-3: Liste aller eingesetzten Plasmide (Fortsetzung I)

Positionsnummer	Plasmid	Markergen
510	pIZ-EGFP-FmA1wt	Enhanced green fluorescent protein/ Zeozinrresistenz/ Fusionsprotein
515	pIZ-rCD4egfp-MCS	Enhanced green fluorescent protein/ Zeozin Resistenzprotein; chimär
516	pIZ-rCD4egfp-FmA1	Enhanced green fluorescent protein/ Zeozin Resistenzprotein; chimär
535	pIZ-EGFP-FmA1.151	Enhanced green fluorescent protein/ Zeozinrresistenz/ Fusionsprotein
555	pEYZ-FmA1[153A157]	Enhanced yellow fluorescent protein/ Zeozin Resistenzprotein; chimär
572	pIZ-EGFP-FmA1[153A157]	Enhanced green fluorescent protein/ Zeozinrresistenz/ Fusionsprotein
602	pCDNA3.1/Zeo-MCS-cherryHA	Red fluoreszent protein
603	pEYZ-FmMcl1	Enhanced yellow fluorescent protein/ Zeozin Resistenzprotein; chimär
605	pEGZ3-mHECTD1[2068aa]HA	Enhanced green fluorescent protein/ Zeozin Resistenzprotein; chimär
624	pCDNA3.1/Zeo- mHECTD1[2068aa]cherryHA	Red fluoreszent protein/ Fusionsprotein
633	pIH-HA3cherry2SG4-MCS	Red fluoreszent protein, Hygromycinresistenz/ Fusionsprotein
648	pCMVretro- mHECTD1[ΔAnkR,ΔHECT]cherryHA	Red fluoreszent protein/ Fusionsprotein
649	pEGZ3-mHECTD1wtHA	Red fluoreszent protein, Hygromycinresistenz
650	pCDNA3.1/Zeo- mHECTD1wtcherryHA	Red fluoreszent protein/ Fusionsprotein
664	pIH-HA3cherry2SG4-mHECTD1[y2h]	Red fluoreszent protein, Hygromycinresistenz/ Fusionsprotein
665	pIH-HA3cherry2SG4-mHECTD1[- 33aa.y2h]	Red fluoreszent protein, Hygromycinresistenz/ Fusionsprotein
666	pIH-HA3cherry2SG4-mHECTD1[- 33aa.y2h.-33aa]	Red fluoreszent protein, Hygromycinresistenz/ Fusionsprotein
667	pIH-HA3cherry2SG4-mHECTD1[- 33aa.y2h.-66aa]	Red fluoreszent protein, Hygromycinresistenz/ Fusionsprotein
668	pIH-HA3cherry-mPuma	Red fluoreszent protein, Hygromycinresistenz/ Fusionsprotein

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle II-3: Liste aller eingesetzten Plasmide (Fortsetzung II)

Positionsnummer	Plasmid	Markergen
669	pEGZ-MYCmUbiwt	Enhanced green fluorescent protein/ Zeozin Resistenzprotein; chimär
684	pEGZ3-HAmHECTD1[2068aa]HA	Enhanced green fluorescent protein/ Zeozin Resistenzprotein; chimär
835	pIZ-EGFP-MCS-F	Enhanced green fluorescent protein/ Zeozinrssistenz

Tabelle II-4: Liste aller klonierten Plasmide

Konstrukt	Ausgangsvektor	Restriktionsenzyme	Insert	Restriktionsenzyme	Template
pEGZ-MYCmUbiwt	pEGZ-MYCmNoxa	EcoRI/ BamHI	Ubiwt	MfeI/BamHI	PCR von pEGZ-HA3Ubi mit Primernr. 739 und 3
pEYZ-FmMcl1	pEYZ-Flag Eco	EcoRI/ BamHI	Mcl1	EcoRI/ BglII	PCR aus Wehi wt cDNA mit Primer 553 und 554
LMP-shRNAHectD1	MSVC-LTRmir30(PIG) (LMP)	XhoI/ EcoRI	shRNAHectD1	XhoI/EcoRI	Umklonierung aus pSM2-Vektor

1.4 Primer und Oligonukleotide

Tabelle II-5: Primer für Klonierungen und Sequenzierungen

Positionsnummer	Bezeichnung	Sequenz
3	3mUbiquitin/Stop(BamHI)	atcctgggatccttactaaccacccgaagtctcaacac
35	5EG/YZ_1990	ctctccaagctcacttacagg
52	3IRES3prime	gtaaagcatgtgcaccgaggc
549	5EG/YZ[2200]	ctcaaagtagacggcatcgag
553	5mMcl1[Eco.ATG	ggagtgggaattcgcgccatgtttggcctgcggagaaac
554	3mMcl1[Stop.Bam.Mlu.Bgl]	gggatcgagatctacgcgtggatcctcactatcttattagatatgccagacc
739	5mUbiquitin[ATG.Mfe]	cgtcaccaattggcgcctgcagatctttgtgaagacc

Tabelle II-6: Murine HectD1 Primer für Reverse Transkriptase PCR

Positionsnummer	Bezeichnung	Sequenz
516	5mHectD1(7659)	ttccaatggagaaattaagttcctt
517	3mHectD1(8000)	caggtaactaagatagtgacac
518	5mHectD1(8223)	tgacaaaacaaaccttaactac
519	3mHectD1(8523)	aacggctggagatgctcactaa

MATERIAL UND METHODEN

Alle hier angegebenen Primer haben eine Stockkonzentration von 100 μM . Die Gebrauchskonzentration liegt bei 25 μM .

1.5 shRNA

Tabelle II-7: shRNA

Bezeichnung	Sequenz	Herkunft
VM2_159331 (shHectD1)	gaagggactgcttatat	Open Biosystems

1.6 Enzyme

- T4-Ligase (Promega)
- Pfu-Polymerase (Fermentas)
- EcoRI (Fermentas)
- BamHI (Fermentas)
- BglII (Fermentas)
- MfeI (Fermentas)
- XhoI (Fermentas)

1.7 Inhibitoren

Tabelle II-8: Inhibitoren

Bezeichnung	Endkonzentration	Stocklösung	Herkunft
Proteaseinhibitorcocktail (P8340)	1:100 einsetzen	-	Sigma
MG-132	1:1000 einsetzen	10 mM	Calbiochem
Etoposid	Nach Bedarf	25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Calbiochem
Cycloheximid	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Sigma

1.8 Antikörper und Matrixbeads

Alle hier beschriebenen Erstantikörper werden in 5 % Milchpulver TBST in angegebener Konzentration gelöst.

Tabelle II-9: Antikörper zur Stimulation von Zellen

Bezeichnung	Spezifität	Herkunft	Endkonzentration
Anti-CD40 (FGK 45.5)	Ratten IgG(kappa)	Immunotools	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle II-10: Erstantikörper zur Proteindetektion im Westernblot

Bezeichnung	Spezifität	Herkunft	Verdünnung
Bim	Monoklonaler Antikörper gerichtet gegen das BH3-only Protein Bim (Kanninchen)	BD Pharmingen	1:500
Erk	Monoklonaler Antikörper gerichtet gegen Erk (Kanninchen)	Santa Cruz	1:100
Flag	Monoklonaler Antikörper gerichtet gegen Flag (Maus)	Sigma	In Glycerin 1:2 vorverdünnten AK 1:500 einsetzen
GFP	Monoklonaler Antikörper gerichtet gegen Grün fluoreszierendes Protein (GFP) (Kanninchen)	Sigma Aldrich Invitrogen	1:1000
HA	Polyklonaler Serumantikörper gerichtet gegen Hämagglutinin (Maus)	Arbeitskreis	1:50
EULIR (H-300)	Polyklonaler Antikörper gerichtet gegen HectD1 (Kanninchen)	Santa Cruz	1:200
Myc	Monoklonaler Antikörper gerichtet gegen Myc (Maus)	Cell Signalling	1:1000
Ubiquitin	Polyklonaler Antikörper gerichtet gegen Ubiquitin (Kanninchen)	Santa Cruz	1:200

Die Zweitantikörper werden alle in der angegebenen Konzentration in 1x TBST gelöst

Tabelle II-11: Zweitantikörper zur Proteindetektion im Westernblot

Bezeichnung	Spezifität	Herkunft	Verdünnung
Anti-Kanninchen	Peroxidasegekoppeltes Esel-IgG	Jackson/ Bionova	1:10.000
Anti-Maus	Peroxidasegekoppeltes Ziegen-IgG	Jackson/ Bionova	1:10.000

Tabelle II-12: Matrix-Beads und Antikörper für Proteinfällung (Immunopräzipitation)

Bezeichnung	Eingesetzte Menge	Herkunft
Protein G Agarose Fast Flow	20 µl	Milipore
Affinity Matrix Mono HA-11 (16B12)	15 µl	Covance
Flag-Antikörper	1 µl des in Glycerin 1:2 vorverdünnten Antikörpers	Sigma
EULIR (H-300)	20 µl	Santa Cruz
Cbl-b	20 µl	Santa Cruz

MATERIAL UND METHODEN

1.9 Antibiotika

Tabelle II-13: Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration	Stocklösung	Herkunft
Ampizillin	50 µg/ml	50 mg/ml	Sigma
Penizillin	50 µg/ml	0,1 mg/ml	Medienküche
Plasmozin	0,1 µg/ml	25 mg/ml	Invivogen
Puromyzin	2,5 µg/ml	2,5 mg/ml	Sigma
Streptomyzin	50 µg/ml	0,1 mg/ml	Medienküche
Zeozin	2,5 µg/ml	100 mg/ml	Invivogen

1.10 Bakterien

Tabelle II-14: Bakterien

Bakterium	Spezies/ Stamm	Herkunft
Top 10F	E. coli	Arbeitskreis
DH 5 alpha	E. coli	Invitrogen

1.11 Zelllinien

Tabelle II-15: Murine Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Medium	Referenz/ Herkunft
Wehi 231	B-Zelllymphom	RPMI	ATCC CRL 1702
MEF	Maus embryonale Fibroblasten	DMEM	Arbeitskreis

Tabelle II-16: Humane Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Medium	Referenz/ Herkunft
293T	Embryonale Nierenzelllinie	MEM	ATCC CCRL 11268

1.12 Nährmedien und Agarplatten für Bakterienkulturen

LB-Medium

20 g LB-Pulvermedium in 1.000 ml ddH₂O lösen und autoklavieren

LB-AGAR

20 g LB-Pulvermedium und 15 g Agar in 1.000 ml ddH₂O lösen und autoklavieren. Eventuell nach dem autoklavieren zu handwarmem Medium geeignetes Antibiotikum in gewünschter Konzentration zugeben.

MATERIAL UND METHODEN

1.13 Nährmedien für Zellkulturen

DMEM (Invitrogen) für Transfektionen

500 ml DMEM (GlutaMAX™) für Transfektionen werden supplementiert mit 50 ml FCS und 0,5 ml Penizillin/ Streptomycin.

DMEM (Invitrogen) für MEF Zellen

500 ml DMEM (GlutaMAX™) für MEF Zellen werden supplementiert mit 50 ml FCS, 5 ml Nicht essentiellen Aminosäuren, 5 ml Glutamin, 5 ml Pyruvat, 0,5 ml Penizillin/ Streptomycin und 0,5 ml Beta-Mercaptoethanol.

MEM (Medienküche) für 293T Zellen

500 ml MEM für 293T Zellen werden supplementiert mit 50 ml FCS und 0,5 ml Penizillin/ Streptomycin.

RPMI (Medienküche)

500 ml RPMI werden supplementiert mit 25 ml FCS, 5 ml Pyruvat, 5 ml Nicht essentielle Aminosäuren, 0,5 ml Penizillin/ Streptomycin und 0,5 ml Beta-Mercaptoethanol.

Zu allen Medien werden zum Schutz vor Mykoplasmenbefall der Zellen noch 50 µl Plasmozin pro 500 ml Medium zugegeben. Das FCS wird vor Verwendung für 45 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert.

Tabelle II-17: Zusätze zu Zellkulturmedien

Substanz	Stocklösung	Herkunft
Beta-Mercaptoethanol	50 mM	Gibco
FCS	-	Gibco
Glutamin	5 %	Medienküche
Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA)	100x Konzentrat	Gibco
Pyruvat	100x Konzentrat	Gibco

1.14 Einfriermedium für Zellkulturen

Das Einfriermedium besteht aus 90 % FCS und 10 % DMSO.

MATERIAL UND METHODEN

1.15 Kits

Tabelle II-18: Kits

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller
Abi Prism Big Dye DNA Sequencing Kit 3.1	DNA-Sequenzierung	Perkin Elmer
GeneClean III Kit	DNA-Aufreinigung Agarosegelen	aus Bio 101.Inc
Gene Elute™ Plasmid Maxi-Präp Kit for 50 Isolations	Plasmidaufreinigung	Sigma
cDNA Synthesis Kit	cDNA Synthese	Fermentas

1.16 Technische Großgeräte

Tabelle II-19: Technische Großgeräte

Gerät	Software	Verwendungszweck
LAS 3000 Image Reader	Aida	Westernblotdetektion
FACS Calibur	Cell Quest	Durchflusszytometrie
LSM 510 konfokalen Mikroskop (Carl Zeiss)	LSM 510 Software 3.2 SP2	Konfokalmikroskopie

2 Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Isolation von RNA aus Zellen

Zur RNA-Isolation aus Zellen lysiert man etwa $1 \text{ bis } 2 \times 10^6$ Zellen in $500 \mu\text{l}$ Trizol®, überführt diese in eine Eppendorfküvette und lässt das Lysat bei Raumtemperatur etwa 3 bis 5 Minuten stehen. Anschließend gibt man $100 \mu\text{l}$ Chloroform zu, mischt den Küvetteninhalt und lässt ihn weitere drei Minuten bei Raumtemperatur stehen, um eine Phasentrennung zu ermöglichen. Danach wird das Trizol-Chloroformgemisch bei 4°C und 14.000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Die obere klare Phase ($250 \mu\text{l}$) daraufhin in eine neue Eppendorfküvette mit $250 \mu\text{l}$ Isopropanol überführen, gut durchmischen und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. In einem zweiten Zentrifugationsschritt RNA bei 4°C und 15.000 rpm 10 Minuten fällen. Die ausgefallene RNA in 70% Ethanol waschen. Zur Weiterverwendung der RNA wird diese getrocknet in $10 \mu\text{l}$ DEPC-Wasser (Inaktivierung von RNAsen) suspendiert und für 10 Minuten bei 56°C gelöst. Andernfalls die RNA in 70% Ethanol bei -20°C lagern.

2.1.2 cDNA Synthese aus RNA

Zur reversen Transkription von RNA in cDNA werden zu $3 \mu\text{l}$ der nicht vermessenen RNA $1 \mu\text{l}$ Oligo-dt-Primer zugegeben, und DEPC-Wasser auf ein Endvolumen von $11 \mu\text{l}$ aufgefüllt.

MATERIAL UND METHODEN

Dieses Gemisch inkubiert für 5 Minuten bei 70°C. Anschließend den Mix kurz zentrifugieren, und für 1 bis 2 Minuten auf Eis stehen gelassen. Nun 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl RNase-Inhibitor (20 mM) und 2 µl dNTP (10 mM) zugeben, gut mischen und für weitere 5 Minuten bei 37°C inkubieren. Zuletzt 2 µl Reverse Transkriptase zugeben und den Mix bei 37°C für eine Stunde inkubieren. Nach einer Stunde die synthetisierte cDNA für 10 Minuten bei 70°C erhitzen und Reaktion stoppen.

2.1.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

1 µl DNA in 100 µl Wasser lösen und bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen. Dabei entspricht eine OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Unter Einbeziehung der Verdünnung wird die tatsächliche DNA-Konzentration wie folgt berechnet:
$$OD_{\text{gemessen}}/10 = \text{DNA-Konzentration } (\mu\text{g}/\mu\text{l})$$

2.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine der wichtigsten molekularbiologischen Techniken und dient der Vermehrung von DNA-Produkten. Grundlage der DNA-Amplifikation mittels PCR ist eine thermostabile DNA abhängige DNA-Polymerase, die eine exponentielle Vermehrung des PCR-Produkts erlaubt.

In aller Regel erfolgt die DNA-Amplifikation in einer 3 Schritt-PCR bestehend aus einer sich wiederholenden Abfolge von Denaturierung bei 94°C bis 97°C (Aufbrechen der DNA-Doppelstränge), Annealing bei 62°C (Primeranlagerung an Einzelstrang DNA) und Elongation bei 72°C (Synthese des komplementären Stranges). Die Annealingtemperatur richtet sich dabei nach den in den Primern vorhandenen Basen. Dabei gilt, pro A/ T eine Temperatur von 2°C und pro G/ C eine Temperatur von 4°C. Durch die Wahl der Primer wird das zu amplifizierende DNA-Fragment bestimmt, durch die Elongationstemperatur, die Dauer der Nukleotidanlagerung. Dabei gilt als Faustregel, 1 Minute Elongationszeit pro kB DNA.

2.1.4.1 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) zum qualitativen DNA-Nachweis

3 Schritt-PCR:

- Denaturierung bei 96°C für 1 Minute
- Annealing bei 62°C für 1 Minute
- Elongation bei 72°C für 2 Minuten

25 - 40 Zyklen je nach DNA

MATERIAL UND METHODEN

Reaktionsansatz:

- 1 µl DNA (1 µg/µl)
- 1 µl Primer1
- 1 µl Primer 2
- 7 µl ddH₂O
- 10 µl 2x PCR MasterMix (Fermentas)

2.1.4.2 PCR zur Einführung von Mutationen

3 Schritt-PCR:

- Denaturierung bei 96°C für 1 Minute
- Annealing bei 62°C für 1 Minute
- Elongation bei 72°C für 2 - 5 Minuten

In der Regel 30 Zyklen

Reaktionsansatz:

- 1 µl DNA (1 µg/µl)
- 1 µl Primer1
- 1 µl Primer 2
- 1 µl *Pfu* Polymerase
- x µl 10x *Pfu* Puffer
- x µl ddH₂O

Endvolumen 40 µl

2.1.5 DNA-Gelelektrophorese

Die aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladenen DNA-Fragmente wandern in einem auspolymerisierten Agarosegel bei angelegter elektrischer Spannung und leicht basischem pH (pH = 7,6) von der Kathode zur Anode. Dabei wird die DNA entsprechend der Porösität der Gelmatrix nach ihrer Größe aufgetrennt. 1 bis 1,5 % Gele eignen sich zur Auftrennung von DNA-Stücken im Bereich von 1 bis 10 kB, wohingegen 2 bis 3 % Gele besser 0,1 bis 1 kB große DNA-Fragmente auftrennen. Die aufgetrennte DNA kann schließlich durch das zwischen die Nukleotide eingelagerte Ethidiumbromid (Interkalation) bei einer Wellenlänge von 260 nm unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

MATERIAL UND METHODEN

Zur Herstellung eines 1,5 % Agarosegels werden 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TAE gelöst und in der Mikrowelle für 2 Minuten bei 600 Watt erhitzt. Die nun im Puffer gelöste Agarose bei Raumtemperatur abkühlen lassen bis das Gel handwarm ist. Dann 4 µl Ethidiumbromid 1 % (10 mg/ml) (Roth) zugeben, das Gel gießen und auspolymerisieren lassen. Die Auftrennung der DNA-Amplifikate (Elektrophorese) erfolgt schließlich bei einer konstanten Spannung von 90 Volt.

2.1.6 DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen

Nachdem die DNA-Fragmente mittels Elektrophorese aufgetrennt wurden, kann es notwendig werden diese aus dem Gel zu eluieren.

Dazu wird das Gel im Bereich der zu isolierenden DNA unter einer UV-Handlampe ausgeschnitten und das Gel samt DNA-Fragment in 500 µl Ultra Salt Lösung bei 56°C gelöst. Anschließend unter Zugabe von 10 µl Beads die gelöste DNA mischen und die Suspension 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen. Die DNA bindet nun an die Beads. Nach 10 Minuten die Suspension für 1 Minute bei Raumtemperatur und 15.000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen und Beads einmal mit 1 ml eisgekühltem Ultra Waschpuffer waschen. Die Suspension erneut zentrifugieren, den Überstand verwerfen (eventuell kurz nachzentrifugieren) und die pelletierten Beads bei Raumtemperatur 5 Minuten trocknen lassen. Im Anschluss die Beads in 10 µl ddH₂O lösen. Zum besseren Ablösen der DNA resuspendierte Beads bei 56°C 5 Minuten inkubieren lassen. Zuletzt die Beads erneut zentrifugieren und den Überstand mit der DNA in neue Eppendorfküvette überführen.

2.1.7 Klonierung/ Umklonierung

Soll eine Mutation in eine spezifische DNA eingeführt werden, oder ein chimäres Fusionsprotein hergestellt werden, so spricht man von Klonierung. Bei einer Umklonierung, wird ein bereits existierendes DNA-Fragment aus einem Vektor in einen anderen umgesetzt. Zunächst wird bei Klonierungen mittels PCR ein DNA-Fragment amplifiziert. Je nach gewähltem Primerpaar, kann dabei ein wildtypisches DNA-Stück oder eines mit einer Mutation amplifiziert werden. Die amplifizierte DNA wird anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel aufgereinigt (siehe 2.1.6). Das aufgereinigte DNA-Fragment wird nun mit geeigneten Restriktionsenzymen an seinen Enden nach Herstellerangaben geschnitten („verdaut“). Ebenso wird der gewünschte Plasmidvektor mit den geeigneten Restriktionsenzymen in seiner MCS behandelt, elektrophoretisch aufgetrennt und schließlich aus dem Gel eluiert.

MATERIAL UND METHODEN

Die anschließende Ligation des vorbehandelten DNA-Fragments mit dem enzymatisch aufgeschlossenen Vektor findet bei 16°C über einen Zeitraum von 12 bis 16 Stunden statt. Dabei sollte das molare Verhältnis von Plasmid zu DNA etwa 1 zu 3 betragen.

Das Ligationsschema sieht dabei wie folgt aus:

- 1 µl T4-Ligase (Fermentas)
- 1 µl 10x T4-Ligasepuffer (Fermentas)
- x µl DNA-Fragment
- x µl Plasmid
- x µl ddH₂O

Das Endvolumen des Ligationsansatzes beträgt 10 µl.

Der Ligationsansatz wird schließlich transformiert und die transformierten Bakterien auf Agarplatten ausgesät. Das ligierte Plasmid wird, nachdem sich einzelne Bakterienkolonien gebildet haben, über eine Mini-Präp aus den Bakterien isoliert, sowie mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

2.1.8 Transformation

Unter Transformation versteht man das einbringen von Fremd-DNA (i.d.R. Plasmid-DNA) in ein Bakterium. Dazu werden 50 µl Bakterien (Top 10F: Standardbakterium; DH 5 alpha: für dnHectD1 und wtHectD1) mit 1 bis 1,5 µl Plasmid vereinigt. Der Mix inkubiert für 30 Minuten auf Eis, wird anschließend für 90 Sekunden auf 42°C erwärmt und dann für weitere 2 Minuten erneut auf Eis abgekühlt. Daraufhin wird der Ansatz in 0,5 ml LB-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C und 200 U/min geschüttelt. Zuletzt wird die Bakteriensuspension auf ampizillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Aus den gewonnenen Bakterienkolonien kann mittels Mini-Präp (Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkolonien) DNA isoliert werden. Zur Transformation der wildtypischen, sowie der dominant negativen HectD1 werden sämtliche Inkubationsschritte bei 30°C durchgeführt.

2.1.9 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkolonien (Mini-Präp)

Die Bakterienkolonien werden von der Agarplatte geerntet, in 3 ml LB-Medium mit Apizillin (1:1000) überführt und über Nacht bei 37°C und 200 U/min geschüttelt. 1,5 ml der Übernachtskulturen werden am nächsten Tag in eine Eppendorfküvette überführt und bei 15.000 rpm für 1 Minute bei Raumtemperatur pelletiert. Der Überstand wird verworfen und

MATERIAL UND METHODEN

die sedimentierten Bakterien in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Anschließend 200 µl Lösung 2 zugeben und die Bakterien lysieren. Dabei beide Lösungen vorsichtig mischen. Nach Zugabe von 150 µl Lösung 3 (Neutralisation) Lysat mischen und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Anschließend 0,5 ml des klaren Überstandes zu 1 ml Ethanol geben, und die DNA für 10 Minuten bei 15.000 rpm pelletieren. Zuletzt isolierte Plasmid-DNA in 50 µl ddH₂O aufnehmen.

2.1.10 Großpräparation von Plasmid-DNA (Maxi-Präp)

Soll eine Stocklösung der klonierten DNA aufbewahrt werden, so erfolgt die Isolierung größerer Mengen des Plasmid aus 250 ml Bakterienkultur mit Hilfe des Genelute Plasmid Maxi-Prep Kits entsprechend den Herstellerangaben (Sigma). Für die Übernachtskultur wird das benötigte Plasmid in 50 µl Bakterien transformiert (siehe 2.1.8) und die Bakteriensuspension in 250 ml LB-Medium mit Ampizillin (1:1.000) überführt. Die 250 ml Übernachtskultur schüttelt bei 37°C und 200 U/min. Die transformierten Bakterien mit der wildtypischen oder der dominant negativen HectD1 werden über zwei Tage bei 30°C bebrütet.

2.1.11 DNA-Sequenzierung mittels fluorochrommarkierter Nukleotide

Die Sequenzierung eines DNA-Stücks dient der Überprüfung der Richtigkeit der Nukleotidabfolge. Die verwendete Sequenziermethode nach Sanger et al. (Sanger et al., 1977) beruht auf der Didesoxymethode. Dabei werden neben Desoxiribonukleotiden auch fluoreszenzmarkierte Didesoxiribonukleotide verwendet, die zwar eine 5' Phosphat, aber keine 3' OH Gruppe enthalten. Dadurch kann das markierte Didesoxynuklotid über die Phosphatgruppe angehängt, aber aufgrund der fehlenden Hydroxygruppe nicht verlängert werden. In der Folge kommt es zum Kettenabbruch. Mit Hilfe einer linearen PCR (es wird nur ein Primer verwendet) werden die Kettenabbruchprodukte amplifiziert und mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Da jede der vier Basen mit einem bestimmten Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, kann die exakte Sequenz mittels einer Software als Vierfarbendiagramm dargestellt werden.

Der für die Sequenzreaktion nötige PCR-Ansatz sowie das entsprechende PCR-Protokoll sehen wie folgt aus:

- 1 µl Master Mix (Abi-Prism Big Dye Sequencing Kit/ Perkin Elmer)
- 1 µl Primer (25 µM)
- 2 µl DNA

MATERIAL UND METHODEN

- $\mu\text{l ddH}_2\text{O}$

Endvolumen 10 μl

PCR-Zyklus:

- 10 sec 96°C (Denaturierung)
- 5 sec 50°C (Annealing)
- min 30 sec 60°C (Elongation)

25 Zyklen

Anschließend wird das PCR-Produkt mit Hilfe von Sephadex Beads über eine Säule aufgereinigt. Dazu 100 μl Sephadex Beads in die Säule geben und 3 Minuten bei 3.000 rpm zentrifugieren, um das Wasser zu entfernen. Danach das PCR-Produkt zu 100 μl Sephadex Beads geben und 3 Minuten bei 3.000 rpm zentrifugieren. Zuletzt den PCR-Durchfluss in 15 μl Formamid aufnehmen, das Gemisch in 100 μl PCR-Küvette überführen und sequenzieren lassen.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kultivieren von Zellen

Alle adhärennten Zellen werden zu Beginn und am Ende der Woche routinemäßig passagiert. Dazu die Zellen mit 1 ml ATV ablösen, in 10 ml Medium resuspendieren und davon 2 ml in neue Zellkulturschale mit 10 ml Medium überführen.

Wehi 231 Suspensionszellen werden dreimal die Woche verdünnt. Dazu 1 ml Wehi Zellsuspension in 5 ml Medium lösen.

Die Inkubation aller Zellen erfolgt im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂.

2.2.2 Einfrieren von Zellen

Sollen Zellen längere Zeit bei -70°C gelagert werden, so werden etwa 5×10^6 Zellen geerntet und in 1 ml Einfriermedium bestehend aus 90 % FCS und 10 % DMSO aufgenommen. Diese werden anschließend in ein methanolhaltiges Kryoeinfriergerät überführt, wodurch die Zellen langsam auf -70°C abkühlen (ca. 1°C pro Minute). Am darauffolgenden Tag werden die Zellen aus dem Kryoeinfriergerät in Kryoboxen überführen und bei -70°C gelagert.

2.2.3 Auftauen von Zellen

Um gefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, entnimmt man sie aus -70°C und taut sie rasch bei Raumtemperatur auf. Nach Desinfektion des Röhrchens, überführt man die

MATERIAL UND METHODEN

Zellsuspension in ein 15 ml Röhrchen und gibt etwa 10 ml des nötigen Zellkulturmediums dazu. Anschließend bei 1.500 rpm für 5 Minuten zentrifugieren. Die Zellen in neuem Medium aufnehmen und abermals zentrifugieren. Anschließend die Zellen in Zellkulturschalen überführen.

2.2.4 Zellzahlbestimmung mittels Neubauerzählkammer

Die Bestimmung der Zellzahl pro ml Medium erfolgt mit Hilfe der Neubauerzählkammer. Dabei die Zellsuspension und die Trypanblaulösung (Stock 1:5 in PBS verdünnt) im Verhältnis 1:2 mischen, wodurch sich tote Zellen blau anfärben. Daraufhin 30 µl des Gemisches in die Neubauerzählkammer geben, in der man nur die nicht angefärbten weißen Zellen aus einem großen Quadranten (jeweils bestehend aus 4x4 kleinen Quadranten) zählt.

Zuletzt berechnet man die Zellzahl durch folgende Formel:

$$N = \text{Verdünnungsfaktor} \times Z \times 10^4/\text{ml}$$

N = Zellzahl in 1 ml Probensuspension

Z = Zellzahl in einem großen Quadranten

2.2.5 Transfektion/ Infektion

Die Transfektion dient der Transduktion von Fremd-DNA in eine eukaryontische Zelle. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kalziumphosphatmethode angewandt (Chen and Okayama, 1987).

2.2.5.1 Kalziumphosphattransfektion

Die an Kalziumphosphatkristalle gebundene DNA präzipitiert und wird schließlich von der Zelle mittels Endozytose aufgenommen. Dazu werden am Vortag 293T Zellen auf $3,5 \times 10^5$ Zellen pro ml eingestellt, und 4 ml dieser Zellsuspension in 6 cm Zellkulturschalen ausplattiert. Desweiteren wird eine geeignete Menge DMEM (supplementiert mit 10 % FCS und Penicillin/ Streptomycin) über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ äquilibriert, ebenso werden 2 M CaCl₂ und 2x HBS-Puffer bei Raumtemperatur äquilibriert. Da die kalziumphosphatvermittelte Transfektion pH-abhängig ist, wird etwa zwei Stunden vor der eigentlichen Transfektion MEM durch 4 ml äquilibriertes DMEM ersetzt. Nach zwei Stunden wird der Transfektionsmix hergestellt, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich vorsichtig auf die zu transfizierenden Zellen pipettiert.

MATERIAL UND METHODEN

Der Transfektionsmix besteht aus:

- 425 μ l ddH₂O (obligat)
- 65 μ l 2M CaCl₂ (obligat)
- x μ l DNA (obligat)
- 5 μ l Verpackungs-DNA (1 μ g/ μ l) (fakultativ)
- 500 μ l 2x HBS (obligat)

Etwa 24 Stunden nach der Transfektion findet ein erneuter Mediumwechsel auf MEM statt.

2.2.5.2 Infektion

Im Gegensatz zur Transfektion baut eine Zelle bei einer Infektion die aufgenommene Fremd-DNA stabil ins eigene Genom ein. Dazu bedient man sich des pHIT-Verpackungssystems (Soneoka et al., 1995) bestehend aus pHIT 60 (Gag/Pol Expressionskonstrukt) und pHIT 123 (Env Expressionskonstrukt) des Murinen Leukämievirus für murine Zelllinien. Für 293T Zellen verwendet man neben pHIT 60 noch VSV, einem Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus das eine Verschmelzung der Virushülle mit der endosomalen Membran ermöglicht.

Für Infektionen werden die Transfektionsüberstände mit viraler Verpackung zwei Tage nach der Transfektion geerntet und steril filtriert (0,45 μ m Porendurchmesser). Dann werden 2 x 10⁵ Zellen adhärenter 293T für zwei Tage mit viralem Überstand inkubiert, bzw. 0,5 ml einer am Vortag auf 1 x 10⁵ Zellen pro ml eingestellten Wehi Vorkultur für zwei Stunden mit viralem Überstand bei 2.200 rpm und 32°C zentrifugiert. Zur Steigerung der Transfektionseffizienz wird noch Polybren zugegeben (10 μ g/ml) das durch Maskierung der Ladung der Zellmembran das Eindringen des Virus erleichtert.

2.2.6 Präparation von Maus Embryonalen Fibroblasten (MEF)

Um MEF zu erhalten werden zunächst Mäuse verpaart. An Tag 12 bis 16 dpc wird die trächtige Maus eingeschläfert und die Embryonen werden entnommen. Die entnommenen Embryonen werden in 20 ml PBS aufnehmen, dekapitieren und unter einen Mikroskop die inneren Organe entfernen. Den embryonalen Torso in neue Schale mit 20 ml PBS überführen. Anschließend Embryonen in Schale mit 5 ml ATV überführen und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzeln. Danach ATV auf ein Endvolumen von 10 ml auffüllen und Zellsuspension 10 Minuten bei 37°C inkubieren. Im Anschluss Zellen durch erneutes vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzeln und abermals 10 Minuten bei 37°C inkubieren.

MATERIAL UND METHODEN

Nach 10 Minuten die Zellsuspension in 50 ml Röhrchen überführen und mit MEF-Medium auf ein Endvolumen von 50 ml auffüllen. Die Zellen etwa 10 Minuten stehen lassen, um ein Sedimentieren der Zelltrümmer zu ermöglichen. Den Überstand anschließend in neues 50 ml Röhrchen überführen und 5 Minuten bei 3.000 rpm zentrifugieren. Überstand verwerfen und die sedimentierten Zellen in 10 ml MEF-Medium aufnehmen. Danach je 1 ml Zellsuspension in 10 cm Zellkulturschalen aussähen und mit MEF Medium auf ein Endovolumen von 10 ml auffüllen. Unter täglichem Mediumwechsel Zellen dicht anwachsen lassen. Die MEF lassen sich bis zu achtmal passagieren, ehe sie die Proliferation einstellen.

2.2.7 Durchflusszytometrie (FACS)

Mit der Durchflusszytometrie lassen sich fluoreszierende Zellen untersuchen und sortieren. Dabei kann die Fluoreszenz durch Färbung von Oberflächenproteinen, oder Expression, von zuvor über Infektion eingebrachte, Fluoreszenzproteine beurteilt werden.

Dazu wird der Fluoreszenzfarbstoff von einem Laser zur Emission Lichtes charakteristischer Wellenlänge angeregt. Diese wird schließlich detektiert und gibt somit Auskunft über die untersuchte Zelle/ Zellpopulation.

2.2.8 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Im Vergleich zur konventionellen Lichtmikroskopie, bei der das gesamte Präparat beleuchtet wird, sammelt die konfokale Laser Scanning Mikroskopie das vom Präparat reflektierte und emittierte Licht aus einer einzigen Ebene und liefert damit ein kontrastreiches, hochauflösendes Abbild der Probe. Dies geschieht durch ein punkt- und zeilenweises Abtasten der Probe mit einem Laserstrahl. Daneben wird durch eine im Strahlengang angebrachte Lochblende außerhalb der Schärfenebene stammendes Licht blockiert, was die Auflösung entlang der optischen Achse erhöht.

Die Aufnahme der Zellen erfolgt an einem LSM 510 konfokalen Mikroskop (Carl Zeiss) unter Anwendung der „Zeiss Laser Scanning Microscop LSM 510 Software 3.2 SP2“. Dazu werden 293T Zellen 24 Stunden vor der Messung auf „Chamberslides“ ausplattiert. Hierzu Zellen auf 1×10^5 Zellen pro ml einstellen und 400 μ l der Zellsuspension pro „Chamber“ zugeben. Anschließend über Nacht bei 37°C kultivieren.

MATERIAL UND METHODEN

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Ganzzelllysate

Ganzzelllysate werden mit RIPA-Puffer hergestellt. Dazu die Zellen zunächst in 1 ml PBS einmal waschen und etwa 5×10^5 Zellen in 50 μ l RIPA-Puffer aufnehmen; 30 Minuten bei 4°C lysieren und anschließend Lysat 15 Minuten bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugieren, den Überstand in neues Eppendorfgesäß überführen und 6x Lämmli zugeben, so dass eine Endkonzentration von 1x Lämmli vorliegt. Anschließend die in Lämmli aufgenommenen Extrakte bei 97°C 10 Minuten aufkochen. Die transfizierten 293T Zellen werden zwei Tage nach der Transfektion in 200 μ l RIPA-Puffer aufgenommen.

2.3.2 Immunopräzipitation (IP)

Die Immunopräzipitation dient dem Nachweis einer Protein-Protein Interaktion. Dabei werden in Abhängigkeit von der Proteingröße unterschiedliche Puffer verwendet. Für die Immunopräzipitation zunächst etwa 2×10^7 Zellen in 2 ml Medium aufnehmen und eine Stunde mit Proteasomeninhibitor (MG-132 1:1000 eingesetzt) bei 37°C behandeln. Im Anschluss die Zellen einmal in 1 ml PBS waschen. Während der Behandlung mit Proteasomeninhibitor 20 μ l Beads dreimal mit 1 ml PBS waschen und in 0,5 ml 4 % Milchpulver-PBS eine Stunde bei Raumtemperatur blockieren. Danach die Beads dreimal in 0,5 ml PBS waschen, erneut in 0,5 ml PBS aufnehmen und 1 μ l geeigneten Antikörper zugeben (i.d.R. Flag 1:1 in Glycerin verdünnt). Den Antikörper nun zwei Stunden bei Raumtemperatur an die Beads binden lassen. Währenddessen die in PBS gewaschenen Zellen in 0,5 ml Lysepuffer aufnehmen, 30 Minuten bei 4°C lysieren und dann 15 Minuten bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugieren. Während der Zentrifugation 20 μ l Beads dreimal in Lysepuffer waschen, mit dem Lysatüberstand vereinen und eine Stunde bei 4°C inkubieren lassen. Dies ermöglicht eine Vorreinigung des Lysatüberstandes von Proteinen, die unspezifisch an die Beads binden. Nach einer Stunde den vorgereinigten Lysatüberstand 15 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugieren. Den gereinigten Lysatüberstand anschließend mit antikörperbeladenen, blockierten Beads vereinen und über einen Zeitraum von fünf Stunden (bei niedermolekularen Proteinen/ Peptiden) bzw. über Nacht (bei hochmolekularen Proteinen) das Binden des Proteins an den Antikörper bei 4°C ermöglichen. Nach fünf Stunden Immunopräzipitation dreimal bzw. fünfmal nach Übernachtpräzipitation mit 0,5 ml geeignetem Puffer waschen. Zuletzt die gewaschene Immunopräzipitation in 50 μ l 2x Lämmli aufnehmen und 10 Minuten bei 97°C aufkochen.

MATERIAL UND METHODEN

Zur Immunopräzipitation hochmolekularer Proteine (200 kDa und größer) wird der Flag-IP-Puffer für die Lyse und zum Waschen verwendet. Für Immunopräzipitationen von Proteinen mit Molekulargewichten von etwa 20 bis 50 kDa werden 1 % Triton-IP-Lysepuffer und Waschpuffer verwendet (siehe 1.2.8). Wird die HA-gekoppelte Affinity Matrix von Covance für eine Immunopräzipitation verwendet, so wird obiges Protokoll angewandt, wobei das Beladen der Beads mit Antikörper entfällt.

2.3.3 SDS-PAGE

Mittels SDS-PAGE können Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Dabei werden die Proteine durch das interkalierende Detergenz SDS aufgefaltet, und entsprechend ihrer Größe negativ geladen. Die ursprüngliche Nettoladung der Proteine ist dabei vernachlässigbar. Eventuelle Protein-Protein Interaktionen werden hierbei gelöst. Als Trägermatrix dienen chemisch inerte, als Molekularsiebe wirkende Polyacrylamidgele. Diese entstehen durch die Polymerisation von Acrylamid und dem quervernetzenden N,N'-Tetramethyldiamin (TEMED). Das TEMED dient dabei als Katalysator, der die Bildung freier Radikale aus Ammoniumpersulfat (APS) fördert, die dann die Polymerisation einleiten. Dem Trenngel ist ein Sammelgel vorgelagert, in dem sich bei pH = 6,8 aufgrund des zwitterionischen Glycins und des negativ geladenen Chlorids zwei Pufferfronten ausbilden. Zwischen den beiden Pufferfronten bildet sich ein Feldstärkegradient aus, der die SDS-Proteinkomplexe konzentriert.

Die Herstellung von Polyacrylamidgelen ist in Tabelle II-1 und II-2 beschrieben.

Zur Durchführung einer SDS-PAGE das Polyacrylamidgel in Vertikallaufkammer einspannen und sowohl oberes als auch unteres Pufferreservoir mit 1x Laufpuffer auffüllen. Um die Geltaschen frei von Luftblasen und Gelresten zu bekommen, werden diese mit einer Spritze ausgespült. Anschließend Sammelgel mit 10 µl Probe und 3 µl Bench Mark™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) beladen. An das Gel eine Spannung von 150 Volt und eine Stromstärke von 40 mA anlegen und Proteine auftrennen.

2.3.4 Westernblot

2.3.4.1 Transfer der Proteine auf die Blotmembran

Der Westernblot erlaubt eine antikörperabhängige spezifische Proteindetektion. Dazu das SDS-Polyacrylamidgel mit den gewünschten Proben beladen und Proteine nach oben beschriebener Vorschrift auftrennen. Anschließend das Sammelgel entfernen und das Trenngel in ddH₂O spülen. Die Blotmembran (Immobilon™-P; PVDF-Membran; Millipore)

MATERIAL UND METHODEN

auf Trenngelgröße zuschneiden und in 100 % Methanol eintauchen. Ebenso die Whatman-Papiere zuschneiden und je vier Papiere in Anoden, bzw. Kathodenpuffer eintauchen (siehe 1.2.6). Die Graphitplatten mit destiliertem Wasser benetzen und anschließend in Graphitkammer „Sandwich“ für Transfer wie folgt zusammenbauen:

Auf vier Anoden-Whatmann folgt die in Methanol getränkte PVDF-Membran. Auf diese legt man das Trenngel, das von vier Kathoden-Whatmann bedeckt wird.

Der Transfer erfolgt bei einer Stromstärke von 70 mA pro Membran und konstanter Spannung von 250 Volt über einen Zeitraum von zwei Stunden.

Zur Fixierung der Proteine auf der Membran, diese nach zwei Stunden kurz in Methanol tauchen und lufttrocknen.

2.3.4.2 Immunologische Detektion

Die luftgetrocknete Membran in einer Blockierlösung aus 5 % Milchpulver gelöst in TBST für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren. Dies hat eine Absättigung unspezifischer Bindungsstellen zur Folge. Im Anschluss geeigneten Erstantikörper auf die Membran geben, und ein Binden des Antikörpers an das gesuchte Protein über Nacht bei 4°C ermöglichen. Am nächsten Tag den Erstantikörper abnehmen und die Membran dreimal 20 Minuten in TBST waschen. Anschließend die Membran in 10 ml TBST aufnehmen und einen peroxidasegekoppelten Zweitantikörper in geeigneter Verdünnung zugeben (i.d.R. 1:10.000). Die Antikörper etwa 2 Stunden binden lassen. Danach die Membran abermals dreimal 20 Minuten mit TBST waschen und die Nachweisreaktion unter Verwendung des ECL-Systems durchführen.

2.3.4.3 Das ECL-System

Im ECL-System katalysiert die antikörpergebundene Peroxidase eine chemolumineszierende Reaktion, bei der Licht emittiert wird, das von einer Fluoreszenzkamera (LAS 3000 Image Reader) detektiert wird.

Dazu werden die beiden Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:2 gemischt und mit dieser Lösung die PVDF-Membran eine Minute inkubiert. Die Überschüssige Lösung wird von der Membran getupft und anschließend der Blot mittels einer Fluoreszenzkamera detektiert. Bei schwer nachzuweisenden Proteinen wird anstelle der selbst hergestellten ECL-Lösung eine kommerziell erhältliche Lösung (ECL Plus Westernblotting Detektionsystem, Amersham) entsprechend den Herstellerangaben angesetzt.

ERGEBNISSE

III. Ergebnisse

1. Nachweis einer Protein-Protein Interaktion zwischen A1 und HectD1 in einem Yeast-Two-Hybrid-Screen

Mit Hilfe eines von Hybrigenics¹ durchgeführten Proteininteraktions-Screens in Hefezellen (Yeast-Two-Hybrid-Screen; Y2H) wurde die E3-Ubiquitinligase HectD1 aus der Untergruppe der Hect-Ligasen als möglicher Interaktionspartner von A1 identifiziert. Es wurde ein 185 Aminosäuren langes Peptidfragment isoliert, das A1 bindet und im nachfolgenden HectD1[Y2H] genannt wird. HectD1 ist 2.690 Aminosäuren lang und etwa 290 kDa groß. Im ersten Drittel seiner Aminosäuresequenz verfügt es über N-terminal lokalisierte Ankyrinrepeats (Ank) sowie die A1-Bindestelle (A1 bdg). C-terminal befindet sich die E3-Ubiquitinligasedomäne (Abb. III-1). Da eine Interaktion des A1-Köderproteins mit den proapoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern Bim (BH3-only Gruppe) und Bid (Multidomainingruppe) ebenfalls nachweisbar war, war eine spezifische Interaktion von A1 mit HectD1 wahrscheinlich. Die Interaktion von A1 mit HectD1 im Y2H-Screen sollte im Folgenden in Säugerzellen überprüft werden. Da endogenes A1 aufgrund seiner niedrigen Expressionsrate auf Proteinebene nicht detektierbar ist, wurden alle Versuche mit überexprimiertem und Flag markiertem A1 (Flag-A1) durchgeführt.

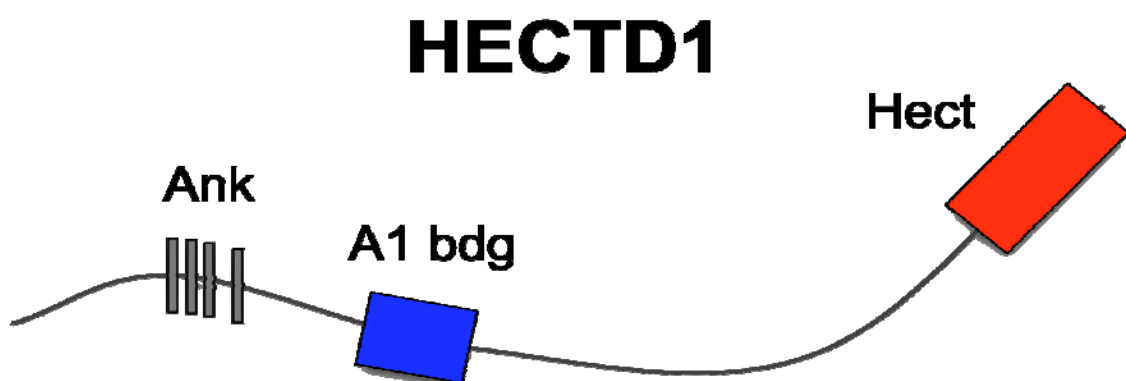


Abbildung III-1: Schematische Darstellung von wildtypischem HectD1 (wtHectD1). HectD1 ist 2.690 Aminosäuren lang. Die N-terminal lokalisierten Ankyrinrepeats (Ank) (AS 349 - 494) sind für Protein-Protein Interaktionen von Bedeutung. Die im Y2H-Screen detektierte A1-Bindestelle (A1 bdg) der HectD1 befindet sich im Bereich von Aminosäure 801 bis 986. C-terminal ist die Hect-Ligasedomäne (Hect) lokalisiert (AS 2.149 - 2.610), die für die Proteinubiquitylierung notwendig ist.

ERGEBNISSE

2. Die HectD1[Y2H]- und HectD1[Y2H]-Deletionsmutanten erhöhen die Expression von A1

In einem ersten Schritt sollte geklärt werden, ob das im Y2H-Screen detektierte HectD1 Fragment einen Einfluss auf die Expression von A1 hat. Der theoretischen Überlegung zufolge sollte es nach Überexpression antagonistisch auf das Bindungsverhalten der endogenen HectD1 mit A1 wirken und somit als dominant negativer Effektor A1 stabilisieren und damit eine erhöhte Expression von A1 bewirken. Dazu wurde HectD1[Y2H] in einen Cherryvektor kloniert, wodurch HectD1[Y2H] als Fusionsprotein mit Cherry exprimiert wird. Zum Nachweis im Westernblot war das Cherryprotein am N-terminalen Ende mit einem Hämagglutinintag (HA3-Tag) markiert. Mit diesem markierten HA3cherryHectD1[Y2H]-Konstrukt wurden anschließend 293T Zellen, die A1 auf niedrigem Niveau (Flag-A1_{low}) exprimierten, transfiziert. A1 war zuvor über eine retrovirale Infektion in 293T Zellen gebracht worden. Die infizierten Zellen wurden anschließend auf eine Population hin sortiert, die A1 gering exprimiert (Flag-A1_{low}). Um A1 detektieren zu können war es am N-terminalen Ende mit einem Flag-Tag markiert (Flag-A1). Abbildung III-2 zeigt, dass die HectD1[Y2H]-Bindedomäne ebenso wie Puma (Positivkontrolle) die A1-Expression positiv regulieren kann. Da die kodierenden Sequenzen für Flag-A1 und die Gelbvariante des green fluorescent protein (im Nachfolgenden GFP genannt) im pEYZ-Vektor über eine intra ribosomal entry site (IRES) verknüpft sind, und die GFP-Expression konstant ist, lässt sich die Datenlage dahingehend interpretieren, dass das stärkere Proteinsignal von A1 nicht auf unterschiedliche Transkription zurückzuführen ist, sondern durch eine Stabilisierung des Proteins bewirkt wird (Abb. III-2).

ERGEBNISSE

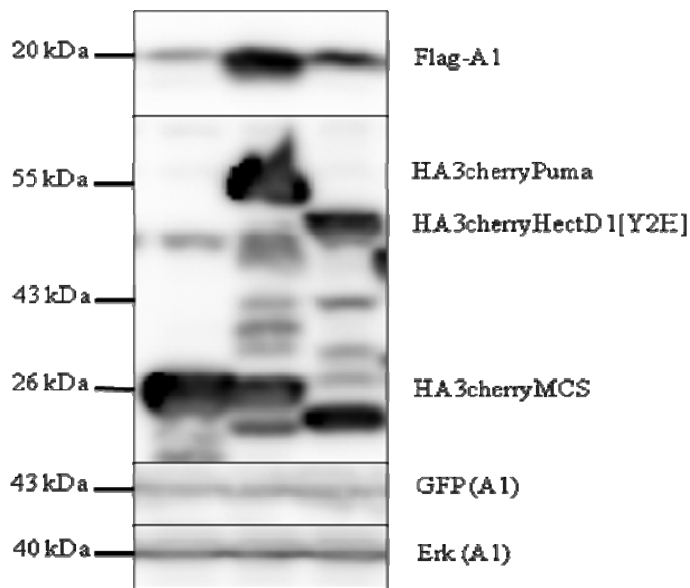


Abbildung III-2: Erhöhung der A1-Signalintensität durch HA3cherryHectD1[Y2H]. 293T Flag-A1_{low} Zellen (pEYZ-Flag-A1), wurden mit der BH3-only Puma-Positivkontrolle (HA3cherryPuma), der HectD1-Bindedomäne für A1 (HA3cherryHectD1[Y2H]) bzw. der dazugehörigen Negativkontrolle (HA3cherryMCS) transient transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden RIPA-Extrakte gemacht und diese anschließend im Westernblot analysiert. A1 wurde mit Anti-Flag, Puma und HectD1[Y2H] mit Anti-HA detektiert. Die kodierenden Sequenzen für A1 und GFP sind im pEYZ-Vektor über eine IRES miteinander verbunden.

Da nach Transfektion des HectD1[Y2H]-Fragments die A1-Expression erhöht ist, sollte die Binderegion des HectD1[Y2H]-Fragments weiter eingegrenzt werden. Dazu wurden ausgehend vom HA3cherryHectD1[Y2H]-Konstrukt verschiedene Deletionsmutanten kloniert, denen vom N-terminalen Ende 33 Aminosäuren und vom C-terminalen Ende 33 bzw. 66 Aminosäuren entfernt wurden. Auf diese Weise erhielten wir folgende Mutanten:

HA3cherryHectD1[Y2H]-33N

HA3cherryHectD1[Y2H]-33N/-33C

HA3cherryHectD1[Y2H]-33N/-66C

Mit diesen HA3cherryHectD1[Y2H]-Varianten wurden schließlich 293T Flag-A1_{low} Zellen transient transfiziert, und Gesamtzelllysate im Westernblot analysiert. Dabei führten alle Deletionsmutanten zu einer Expressionserhöhung von A1 (Abb. III-3). Zwar scheint es, dass die jeweiligen Deletionsmutanten die Expressionsstärke von A1 unterschiedlich beeinflussen, jedoch war diese Beobachtung vom einzelnen Versuch abhängig und nicht reproduzierbar.

ERGEBNISSE

Vielmehr haben die einzelnen Deletionsmutanten vergleichbare Effekte auf die Expressionsstärke von A1. Basierend auf diesen Ergebnissen, konnte die HectD1-Bindedomäne für A1 auf einen Bereich zwischen Aminosäure 834 und 920 eingegrenzt werden. Das deutet darauf hin, dass lediglich 87 Aminosäuren in HectD1 notwendig sind, um eine Bindung von HectD1 an A1 zu ermöglichen.

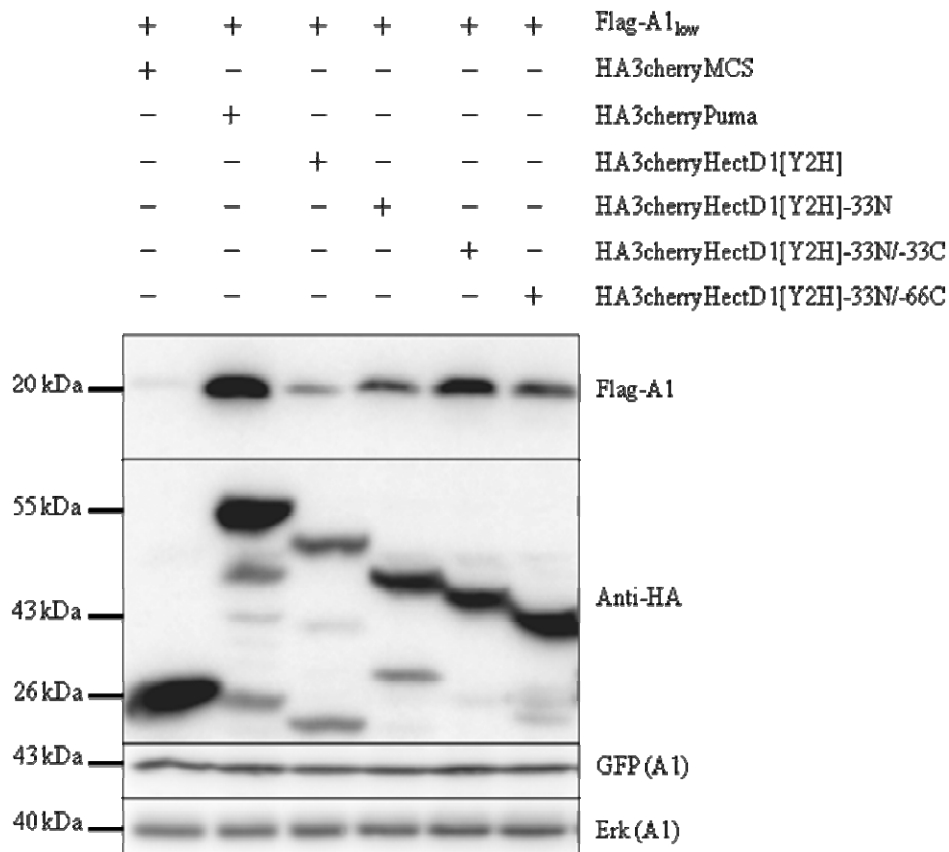


Abbildung III-3: Die Anwesenheit von 87 Aminosäuren des HectD1[Y2H]-Fragments reichen aus um die Signalintensität von A1 zu erhöhen. 293T Flag-A1_{low} Zellen, wurden mit der Negativkontrolle (HA3cherryMCS), der BH3-only-Puma-Positivkontrolle (HA3cherryPuma), der HectD1-Bindedomäne (HectD1[Y2H]) sowie verschiedenen HectD1[Y2H]-Deletionsmutanten transient transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden RIPA-Extrakte gemacht und diese anschließend im Westernblot analysiert. A1 wurde mit Anti-Flag, Puma, HectD1[Y2H] und die Deletionsmutanten mit Anti-HA detektiert. Die kodierenden Sequenzen für A1 und GFP sind über eine IRES verbunden.

ERGEBNISSE

3. Die HectD1[Y2H]-Deletionsmutanten kopräzipitieren A1

Basierend auf den Expressionsstests sollte als nächstes mittels Immunopräzipitationsstudien eine direkte Protein-Protein Interaktion zwischen A1 und HectD1[Y2H] gezeigt werden. Dazu wurden wildtypische 293T Zellen mit Flag-A1 und den HA3cherryHectD1[Y2H]-Konstrukten transient kotransfiziert und zwei Tage post transfektionem HectD1[Y2H] über ein HA-Matrix gefällt. Im Westernblot wurden HectD1[Y2H] mittels eines HA-Antikörpers und A1 mit Hilfe eines Flag-Antikörpers nachgewiesen.

In der Tat kann eine direkte Protein-Protein Interaktion mittels Koimmunopräzipitation zwischen den HectD1[Y2H]-Konstrukten und A1 nachgewiesen werden. Wie durch die Expressionsstudien bereits angedeutet, konnte A1 auch mit der kürzesten Deletionmutante (HA3cherryHectD1[Y2H]-33N/-66C) präzipitiert werden (Abb. III-4).

ERGEBNISSE

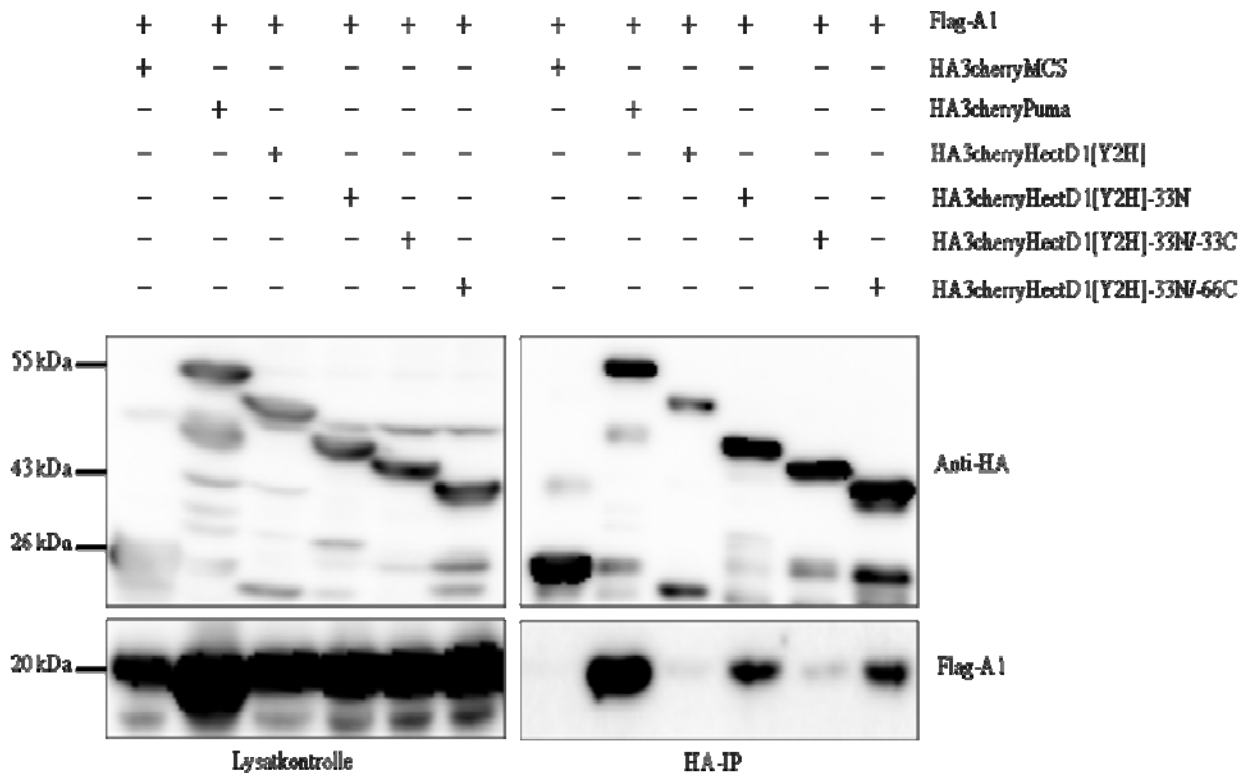


Abbildung III-4: 87 Aminosäuren sind ausreichend um A1 in Gegenwart von HectD1[Y2H] zu präzipitieren. 293T Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen in 1 % Triton-IP-Puffer lysiert und die HA markierten HectD1[Y2H]-Konstrukte mit Hilfe einer HA-gekoppelten Matrix gefällt. Kopräzipitiertes A1 wurde mittels Anti-Flag und die HA3cherryHectD1[Y2H] Konstrukte bzw. HA3cherryPuma mittels Anti-HA nachgewiesen.

4. A1 und HectD1[Y2H] kolokalisieren in 293T Zellen

Um die Ergebnisse der Expressionstests und Immunopräzipitationsstudien mit einer weiteren physiologischeren Methode zu verifizieren, wurden Kolokalisationsstudien mittels Konfokalmikroskopie durchgeführt. Da hierbei eine mögliche Kolokalisation zweier Proteine im intakten lebenden Zellverbund untersucht wird, handelt es sich bei der Konfokalmikroskopie um eine Methode, die eine Analyse von Proteinen unter sehr physiologischen Bedingungen erlaubt. Das Versuchsprinzip ist dabei in Abbildung III-5 beschrieben: da sowohl A1 als auch (vermutlich) HectD1 zytosolische Proteine sind, wurde A1 an ein membranständiges Molekül fusioniert. Hierfür wurde CD4 der Ratte (rCD4) genommen, dessen intrazellärer Abschnitt durch das enhanced green fluorescent protein (EGFP) ersetzt war (rCD4-EGFP). Das A1-Fusionsprotein wird in der Folge als rCD4-EGFPFmA1 bezeichnet. Abbildung III-6 zeigt, dass membranverankertes rCD4-EGFPFmA1

ERGEBNISSE

(A1) das Fusionsprotein HA3cherryHectD1[Y2H] (HECTD1) aus dem Zytoplasma an die Kernmembran „zieht“ (Abb. III-6, Spalte 1). Hingegen scheint rCD4-EGFPmA1 (A1) mit HA3cherryMCS (co) ebenso wenig zu kolokalisieren wie rCD4-EGFP (co) mit HA3cherry HectD1[Y2H] (co) (Abb. III-6 Spalte 2 und 3). Somit bestätigen die Konfokaldaten die bisherigen Stabilitäts- und Immunopräzipitationstudien dahingehend, dass A1 und HectD1[Y2H] auf direkte oder indirekte Weise miteinander interagieren.

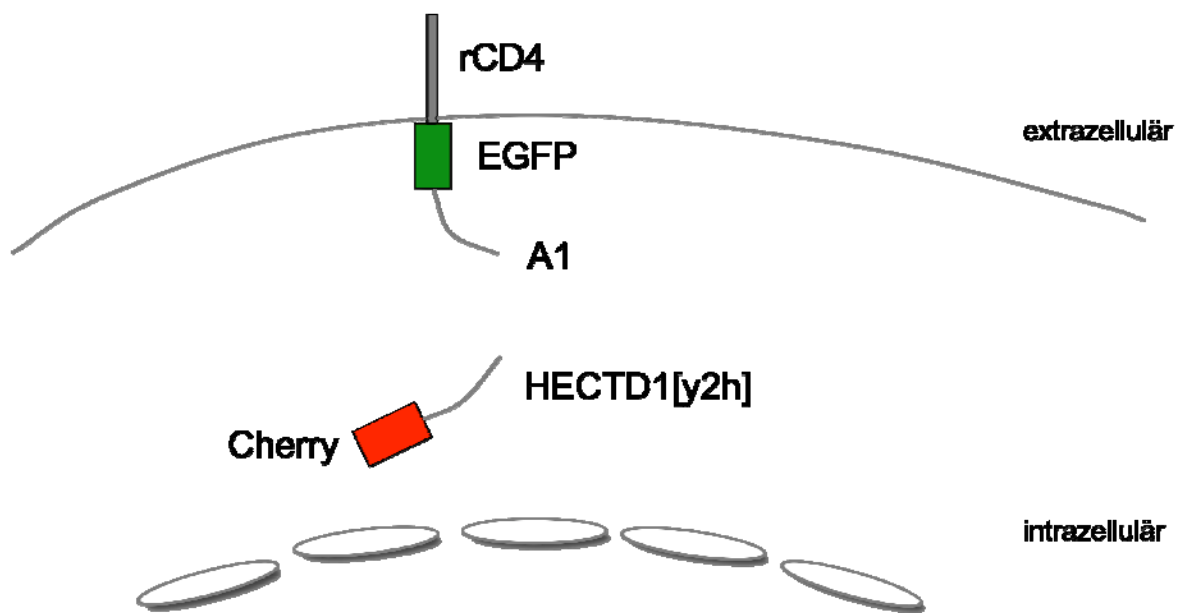


Abbildung III-5: Versuchsaufbau zur Detektion einer Kolokalisation zweier Proteine in der Konfokalmikroskopie: Zytosolisches Protein X (A1) wird in einen rCD4-EGFP-Fusionsvektor kloniert um eine Lokalisation in die zytoplasmatische Membran zu ermöglichen. Zytosolisches Protein Y wird in einen Cherryfusionsvektor kloniert. Ist eine Kolokalisation und somit eine mögliche Interaktion zwischen Protein X und Protein Y zu erwarten, so wandert das zytosolische Protein Y in Richtung des in der Zellmembran gebundenen Proteins X, was sich in der Konfokalmikroskopie als Farbwechsel von Grün und Rot nach Gelb darstellt.

ERGEBNISSE

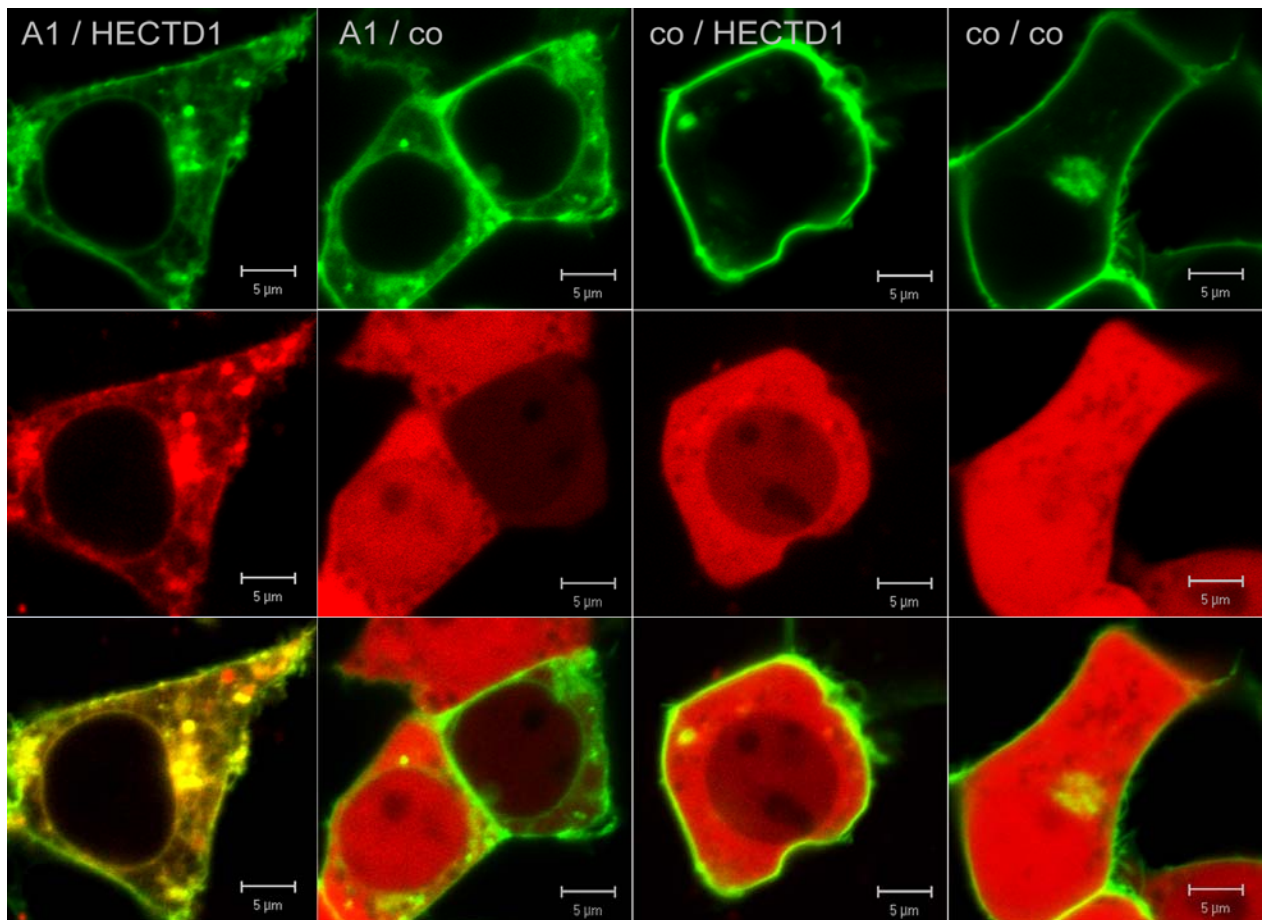


Abbildung III-6: A1 und HectD1[Y2H] kolokalisieren in 293T Zellen. 293T Zellen wurden mit rCD4-EGFP, rCD4-EGFPmA1, HA3cherryMCS und HA3cherryHectD1[Y2H] transfiziert und mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie detektiert. Da A1 und vermutlich auch HectD1 zytosolische Proteine sind, wurde A1 in einen rCD4-EGFP- (CD4 der Ratte) Vektor kloniert, um eine Lokalisation an die Zellmembran zu ermöglichen.

5. Die dominant negative HectD1 erhöht die Expression von A1

Da die bisherigen Studien mit den HectD1[Y2H]-Konstrukten eine Interaktion mit A1 nahe legen, sollte im Folgenden eine entsprechende Versuchsserie mit einer dominant negativen HectD1-E3-Ubiquitinligase (dnHectD1), der nur die Hect-Ligationsdomäne fehlt, wiederholt werden. So galt es zunächst zu klären, ob A1 in Gegenwart der dnHectD1 auch stabilisiert werden kann. Dazu wurden 293T Zellen mit aufsteigenden Mengen einer hämagglutinin-markierten dnHectD1 (dnHectD1-HA) sowie einer konstanten Menge Flag-A1 transfiziert. Dabei zeigte sich, eine Verstärkung der A1-Signalintensität in Gegenwart der dnHectD1. Aufgrund der gleichbleibenden GFP-Expression lässt sich die Datenlage auch hier derart

ERGEBNISSE

interpretieren, dass das stärkere Proteinsignal auf eine Stabilisierung von A1 und nicht auf unterschiedliche Transfektionseffizienz bzw. Genexpression zurückzuführen ist. (Abb. III-7).

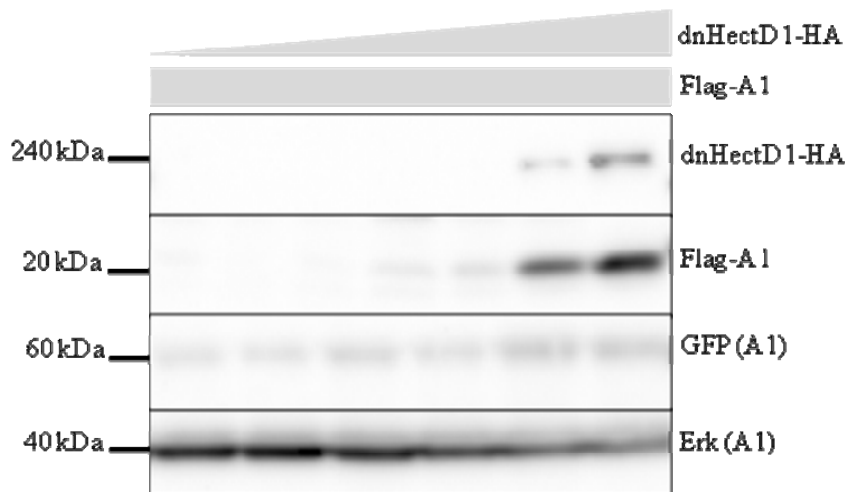


Abbildung III-7: Die A1-Expressionstärke nimmt mit zunehmender Menge an dnHectD1 zu. 293T Zellen wurden mit einer konstanten Menge (1 µg) pE4G-Flag-A1 und aufsteigenden Mengen pEGZ-dnHectD1-HA (0,5 µg; 1 µg; 2 µg; 4 µg; 8 µg und 10 µg) transfiziert und zwei Tage nach der Transfektion RIPA-Extrakte gemacht. Flag-A1 wurde im Westernblot mit Anti-Flag und dnHectD1-HA mit Anti-HA nachgewiesen. Die beiden GFP-Markerproteine von pE4G (membranverankertes CD4 der Ratte mit zytoplasmatisch fusioniertem GFP) und pEGZ („Grünvariante“ von GFP⁺) unterscheiden sich in ihrem Molekulargewicht und lassen sich somit eindeutig der Expression von Flag-A1 und dnHectD1-HA zuordnen. Die DNA-Differenz wurde in den einzelnen Ansätzen mit der entsprechenden Vektorkontrolle für die dnHectD1 (pEGZ) aufgefüllt. A1 und GFP sind auch im pEGZ-Vektor über eine IRES miteinander verbunden.

Vergleichsexperimente, bei denen 293T Flag-A1_{high} Zellen (exprimieren Flag-A1 stabil auf hohem Niveau) mit verschiedenen BH3-only-Proteinen (Bim, Puma, Noxa) und der dnHectD1 transfiziert wurden, zeigten dass die durch die dnHectD1 induzierte erhöhte A1-Expression in etwa der durch Bim hervorgerufenen A1-Stabilisierung entspricht (Abb. III-8a). Eine statistische Auswertung der Daten bestätigt die Zunahme der A1-Signalintensität in Gegenwart der dnHectD1 um mehr als das Doppelte im Vergleich zur A1-Vektorkontrolle (Abb. III-8b).

ERGEBNISSE

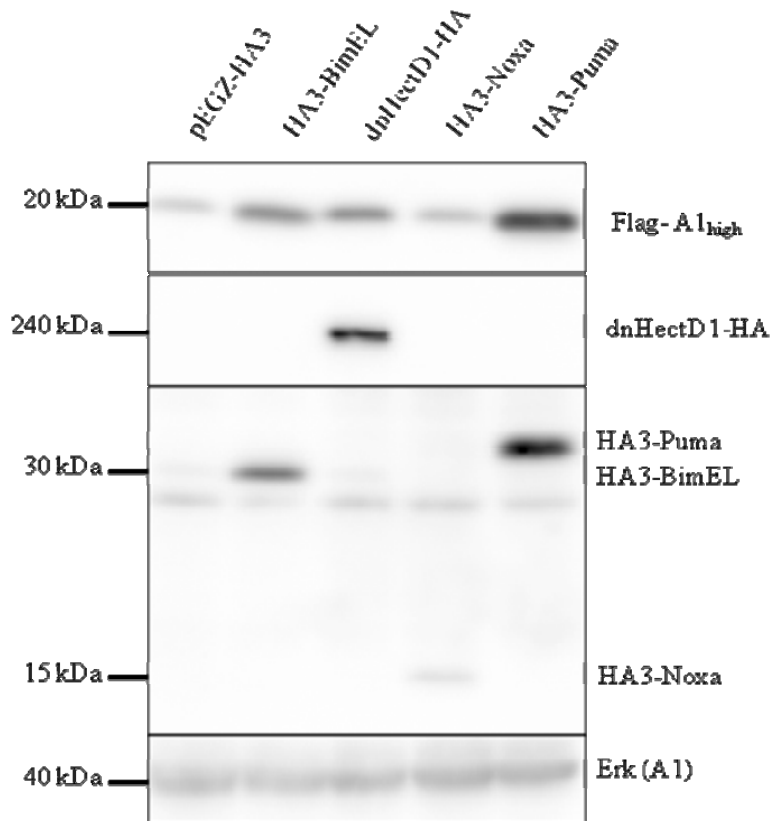


Abbildung III-8a: Zunahme der A1-Signalintensität durch Bim und Puma (BH3-only-Proteine) sowie durch dnHectD1. 293T Zellen die Flag-A1 (pEYZ-Flag-A1) stabil auf hohem Niveau exprimieren (Flag-A1_{high}), wurden mit Vektor, den BH3-only-Proteinen Bim, Puma und Noxa, sowie der dnHectD1 transient transfiziert. Zwei Tage post transfektionem wurden RIPA-Extrakte und im Westernblot analysiert. Bim, dnHectD1, Noxa und Puma wurden mittels Anti-HA nachgewiesen. A1 wurde mit Anti-Flag detektiert.

ERGEBNISSE

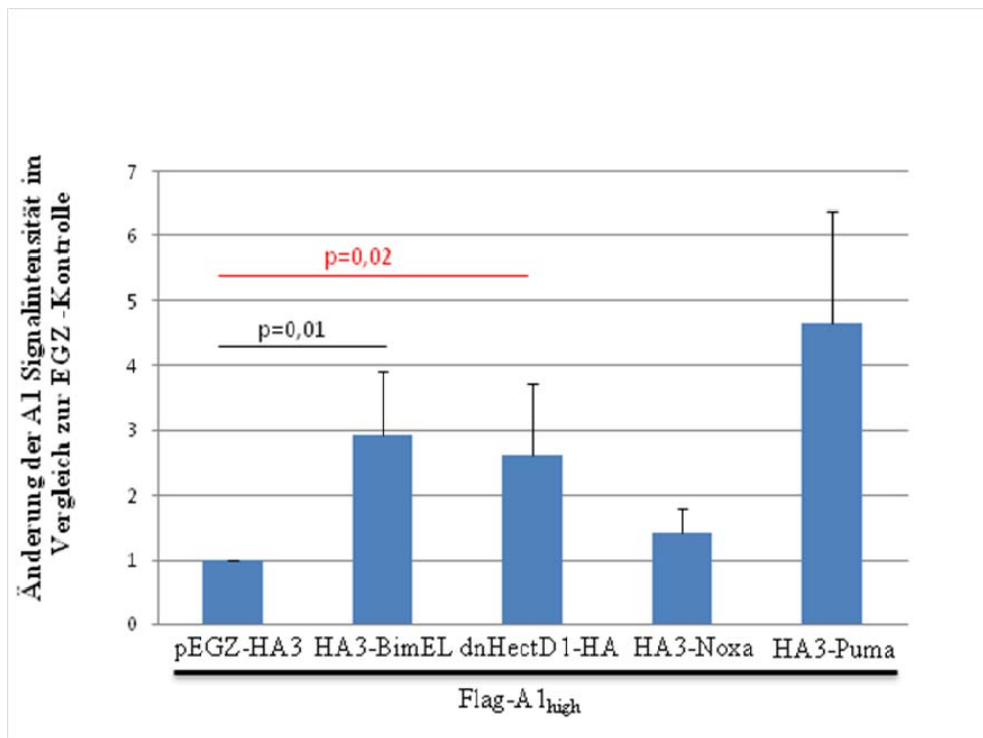


Abbildung III-8b: Zunahme der Signalintensität von A1 in Gegenwart von dnHectD1 und den BH3-only Proteinen Bim und Puma. Von den in Abbildung III-8a gezeigten A1-Daten wurden unter Zuhilfenahme der Advanced Image Data Analyser-Software (AIDA Version 3.20.116) die Signalintensitäten ermittelt. Anschließend wurde der Quotient aus den A1/ BH3-only- bzw. A1/ dnHectD1- (Zähler) und dem A1/ EGZ- (Nenner) Signalen gebildet. Daraus ergibt sich für A1/ EGZ-HA3 ein Quotient von eins, zu dem alle anderen Werte in Relation gesetzt werden. Zur Bestimmung der Standardabweichung wurden fünf unabhängige Experimente ausgewertet.

Die bisherigen Experimente deuten an, dass dnHectD1 die Halbwertszeit von A1 verändert. Um dies direkt zu überprüfen, wurden 293T Flag-A1_{high} Zellen mit pEGZ-HA3 (Negativkontrolle), HA3-BimEL (Positivkontrolle) und dnHectD1-HA transfiziert. Diese transfizierten Zellen wurden zwei Tage später über 30 und 60 Minuten mit Cycloheximid (CHX) behandelt, um die Neusynthese von Protein zu blockieren. Dabei zeigte sich, dass - bei etwa gleichen Ausgangsmengen an A1-Protein - die Halbwertszeit von A1 in Gegenwart den dnHectD1 verlängert ist und von etwa 17 Minuten auf 75 Minuten anwächst (Abb. III-9a und 9b).

ERGEBNISSE

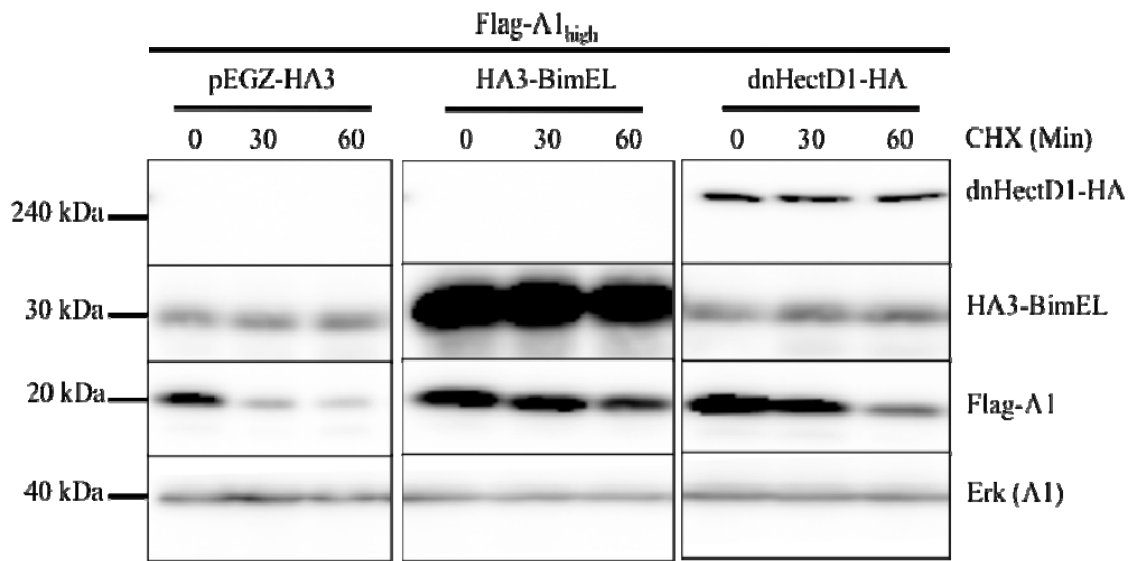


Abbildung III-9a: Die Halbwertszeit von A1 ist in Gegenwart der dnHectD1 verlängert. 293T Flag-A1_{high} Zellen wurden mit der Vektorkontrolle (pEGZ-HA3), der Bim-Positivkontrolle (HA3-BimEL) und dnHectD1 (dnHectD1-HA) transient transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die jeweiligen Ansätze mit 10 µg/ml Cycloheximid (CHX) über den angegebenen Zeitraum behandelt. Anschließend wurden RIPA-Extrakte angefertigt, und diese im Westernblot untersucht. A1 wurde mit Anti-Flag, HectD1 mit Anti-HA und Bim mit Anti-Bim detektiert.

ERGEBNISSE

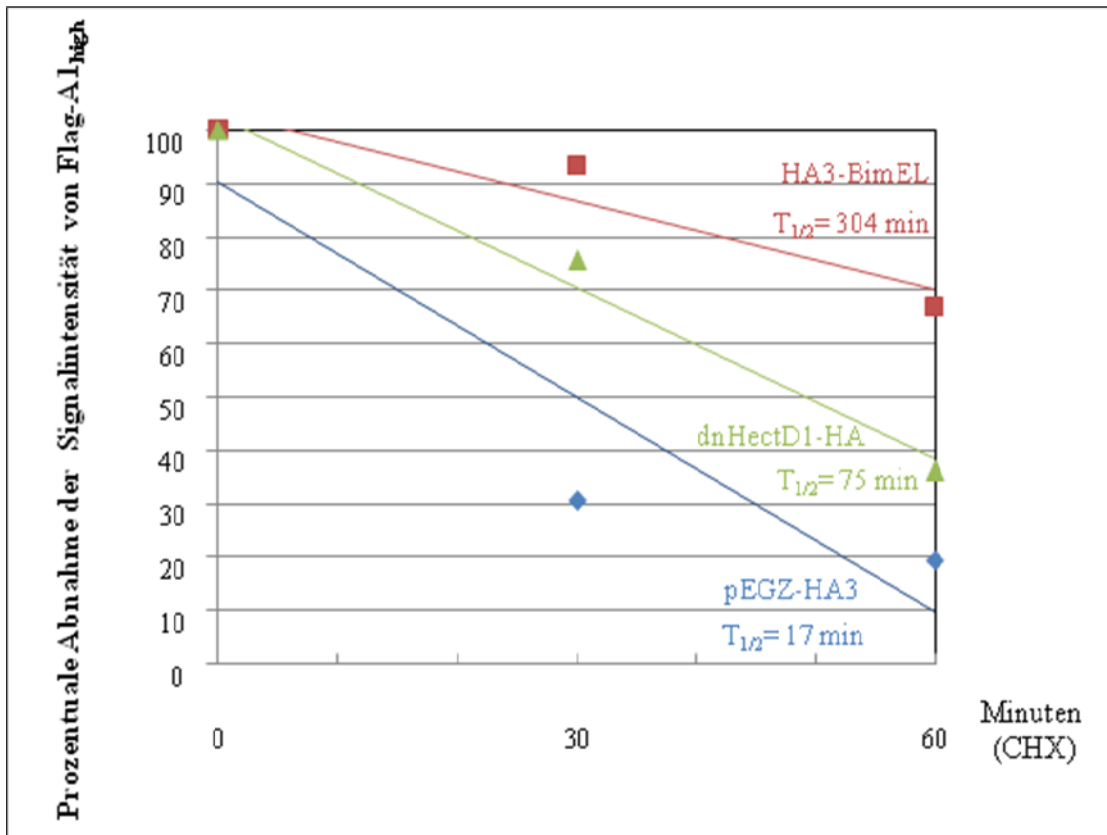


Abbildung III-9b: Die Halbwertszeit von A1 ist in Gegenwart von Bim und dnHectD1 erhöht. Statistische Darstellung der Abnahme der Signalintensität von Flag-A1 und Berechnung der Halbwertszeiten ($T_{1/2}$). Die Signalintensitäten von A1 sind unter Verwendung der Advanced Image Data Analyser-Software (AIDA Version 3.20.116) berechnet worden. Dazu wurde innerhalb einer CHX-Versuchsreihe der Quotient aus den Null-Werten (Nenner) der A1/ BH3-only-, A1/ dnHectD1- und der A1/ EGZ-Signale mit denen des 30 und 60 Minuten Wertes (Zähler) gebildet und mit 100 multipliziert um auf Prozentwerte zu kommen. Daraus ergeben sich für den Null-Wert 100 % auf die alle übrigen Werte innerhalb einer Versuchsreihe in Relation gesetzt werden. Die Halbwertszeit ist unter Berücksichtigung des 30 Minuten Wertes mit folgender Formel berechnet worden. $T_{1/2} = (-T \cdot (\ln(2)) / (\ln(\% \text{ bei } T)))$. T: Zeitpunkt der Messung. % bei T: Prozentmenge zum Messzeitpunkt (Prozentwerte zuvor durch 100 dividieren). LN: Natürlicher Logarithmus. Für alle drei Ansätze wurde jeweils eine Trendlinie ermittelt. Die Abbildung ist repräsentativ für zwei Experimente

5.1 HectD1 wird in Gegenwart von A1 gefällt

Durch Koimmunoprecipitationstudien sollte nun überprüft werden, ob A1 und die (beinahe) Gesamt HectD1 ebenfalls miteinander interagieren. Dazu wurden 293T Zellen mit Flag-A1 und dnHectD1-HA transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen lysiert und Flag-A1 mittel eines Flag Antikörpers gefällt. Präzipitate wurden im Westernblot mit Hilfe von Anti-

ERGEBNISSE

Flag und Anti-HA Antikörpern untersucht. Dabei zeigte sich, dass A1 dnHectD1 kopräzipitiert, während im Kontrollansatz dnHectD1 nicht präzipitiert wird (Abb. III-10).

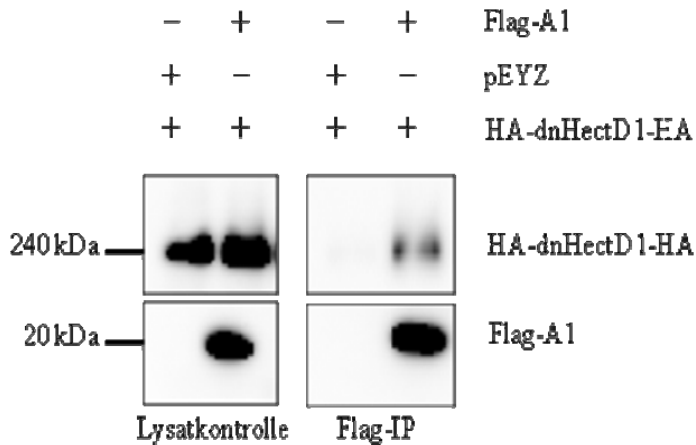


Abbildung III-10: A1 präzipitiert dnHectD1. 293T Zellen wurden transient mit Flag-A1, pEYZ (Vektorkontrolle für A1) und dnHectD1 transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit Flag-IP-Puffer lysiert und A1 mit Flag gefällt und nachgewiesen. dnHectD1 wurde im Westernblot mit Anti-HA detektiert. dnHectD1 ist hier N- und C-terminal mit einem HA-Tag markiert.

Da HectD1 über Ankyrinrepeats verfügt, die Protein-Protein Interaktionen ermöglichen, stellte sich die Frage, ob diese auch für eine Interaktion zwischen A1 und HectD1 notwendig sind. Dazu wurde in 293T Zellen Flag-A1 mit dnHectD1, einer dnHectD1 Δ Ank (dnHectD1 der die Ankyrinrepeats fehlen), oder dem vollständigen HectD1 (wildtypisch: wt) nach transients Transfektion exprimiert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, lysiert und eine Immunopräzipitation mittels eines Flag-Antikörpers durchgeführt. In der Westernblot-Analyse war eine Interaktion zwischen A1, der dnHectD1, der dnHectD1 Δ Ank und der wtHectD1 nachweisbar (Abb. III-11). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Ankyrinrepeats für die Interaktion zwischen A1 und HectD1 nicht relevant sind und auch das wildtypische HectD1 mit A1 interagiert.

ERGEBNISSE

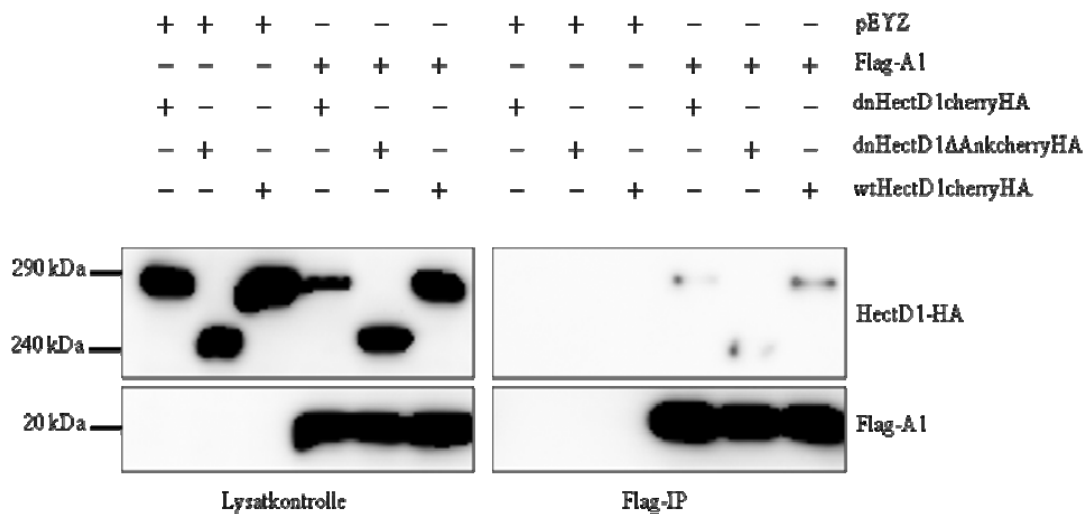


Abbildung III-11: A1 präzipitiert dnHectD1, dnHectD1ΔAnk und wtHectD1. 293T Zellen wurden transient mit Flag-A1, der Vektorkontrolle für A1 (pEYZ) der dnHectD1cherryHA, der dnHectD1ΔAnkcherryHA, sowie der wtHectD1cherryHA transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und A1 mit Anti-Flag gefällt und HectD1 mit einem HA-spezifischen Antikörper detektiert.

Da im Überexpressionssystem A1 und HectD1 miteinander interagieren, sollte nun noch geklärt werden, ob auch endogenes HectD1 von A1 gebunden werden kann. Dazu wurden 293T Flag-A1_{high} Zellen lysiert und HectD1 präzipitiert. Dabei zeigte sich, dass A1 in Anwesenheit von HectD1 gefällt werden kann, wohingegen kein A1 nachweisbar ist, wenn ein unspezifischer Kontrollantikörper für die Fällung verwendet wurde (Abb. III-12). Somit bestätigt das „Semi-endogene“ System die Überexpressionsdaten. Alle vorausgegangenen Versuche deuten somit auf eine direkte oder zumindest indirekte Interaktion zwischen A1 und HectD1 hin.

ERGEBNISSE

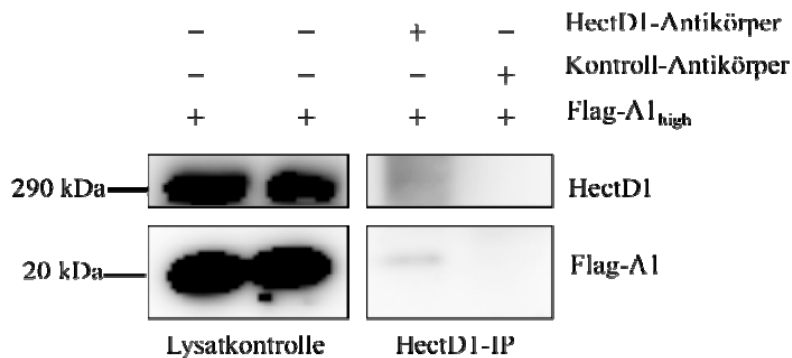


Abbildung III-12: A1 wird durch endogenes HectD1 präzipitiert. 293T Flag-A1_{high} exprimierende Zellen wurden auf $2 - 3 \times 10^7$ Zellen expandiert lysiert und endogenes HectD1 mittels eines spezifischen Antikörpers gefällt. Mittels Anti-Flag wurde Flag-A1 nachgewiesen. Parallel wurde zu Kontrollzwecken eine Präzipitation mit einem HectD1 und A1 nicht bindenden Kontrollantikörper durchgeführt

6. Die Interaktion von A1 mit HectD1 ändert den Ubiquitylierungsgrad von A1

Nachdem gezeigt werden konnte, dass A1 und HectD1 miteinander interagieren, galt es nun zu untersuchen, welchen Einfluss diese Interaktion auf den Ubiquitylierungsgrad von A1 hat. Dazu wurden zunächst 293T Zellen mit Flag-A1 und HA3cherry HectD1[Y2H] sowie Myc-Ubi (wildtypisches Ubiquitin an das zu Detektionszwecken ein Myc-Tag fusioniert wurde) transient transfiziert. Nach zwei Tagen wurde A1 unter Verwendung eines Flag-Antikörpers gefällt. Dabei zeigte sich eine im Vergleich zur Vektorkontrolle reduzierte Ubiquitylierung von A1 in Gegenwart von HectD1[Y2H]-33N/-33C (Abb. III-13, Spur 7 und 8). Das Ergebnis lässt sich dahingehend interpretieren, dass Bindung von HA3cherry HectD1[Y2H]-33N/-33C an A1 die Bindung von endogenem HectD1 erschwert. Hierdurch wird die Ubiquitylierung von A1 verringert und der proteasomale Abbau des Bcl-2-Proteins verlangsamt, so dass die Expression von A1 erhöht wird.

ERGEBNISSE

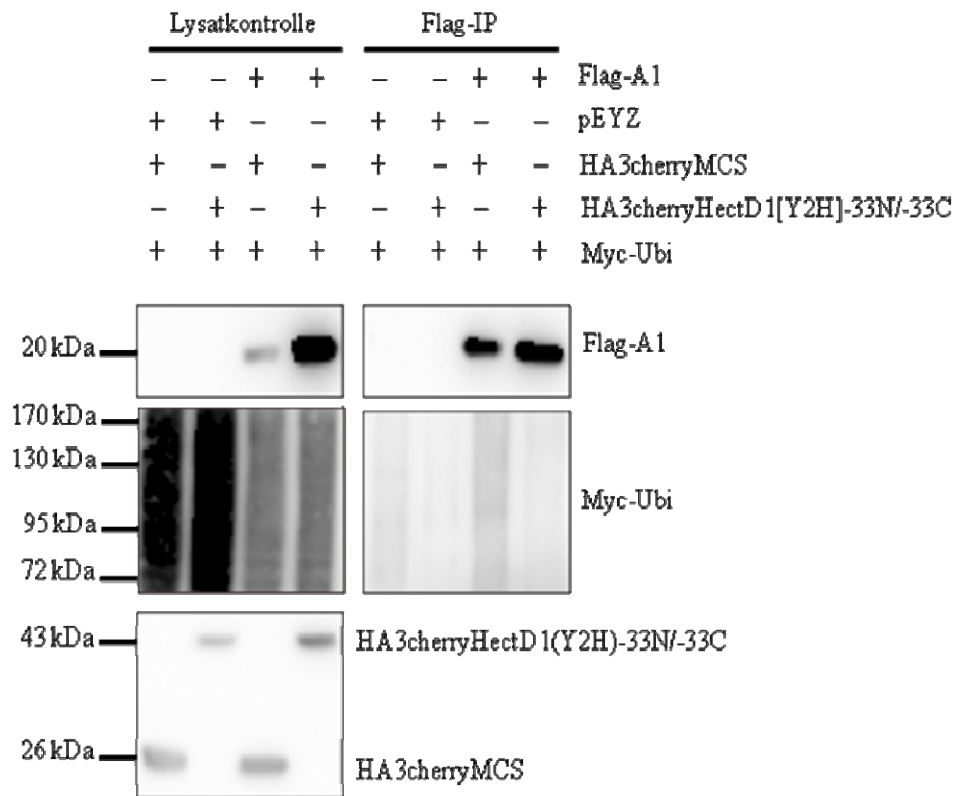


Abbildung III-13: Die Ubiquitinylierung von A1 nimmt in Gegenwart des HectD1[Y2H]-33N/-33C Fragments ab. 293T Zellen wurden transient mit Flag-A1, EYZ, HA3cherryMCS, HA3cherryHectD1[Y2H]-33N/-33C sowie Myc-Ubi transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen unter Verwendung des 1% Triton-IP-Puffers lysiert und A1 mittels Anti-Flag präzipitiert. Die Ubiquitinylierung von A1 wurde mittels Anti-Myc nachgewiesen, HectD1[Y2H] durch Anti-HA.

Diese Daten sollten im Weiteren durch ergänzende Untersuchungen untermauert werden. Dazu wurden erneut 293T Flag-A1_{high} Zellen mit dnHectD1-HA bzw. der geeigneten Vektorkontrolle transfiziert, und zwei Tage später die Zellen geerntet und lysiert. A1 wurde mittels eines Flag-Antikörpers gefällt sowie detektiert. Die Ubiquitinylierung von A1 mit endogenem Ubiquitin wurde mittels eines ubiquitinspezifischen Antikörpers nachgewiesen. In der Tat nimmt auch unter diesen Bedingungen die Ubiquitinylierung von A1 in Anwesenheit einer dominant negativen HectD1 Mutante ab (Abb. III-14).

ERGEBNISSE

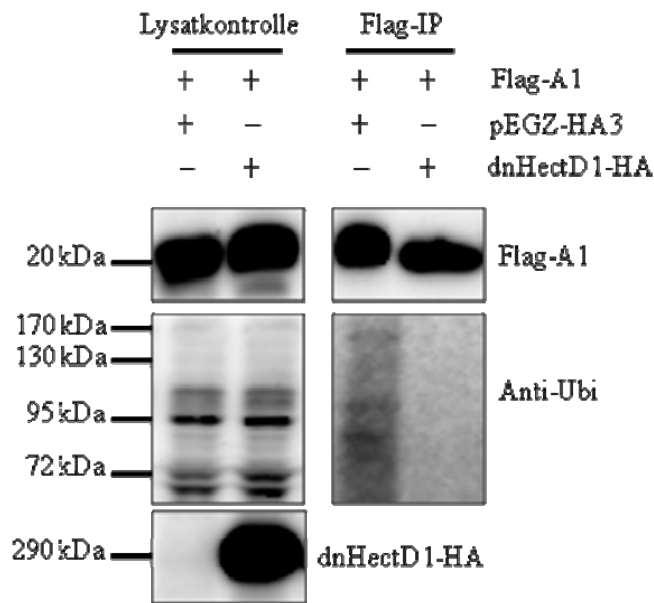


Abbildung III-14: Die endogene Ubiquitylierung von A1 nimmt in Gegenwart der dnHectD1 ab. 293T FmA1_{high} Zellen wurden mit der dnHectD1-HA bzw. pEGZ-HA (Vektorkontrolle für dnHectD1) transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und A1 mittels eines Flag Antikörpers präzipitiert. Mittels eines HA-spezifischen Antikörpers wurde HectD1 in der Koimmunopräzipitation detektiert. Mittels eines ubiquitinspezifischen Antikörpers wurde endogenes Ubiquitin nachgewiesen. Da die A1 Stabilität in Anwesenheit der dnHectD1 zunimmt, wurde das A1/ dnHectD1 Extrakt soweit verdünnt, dass die A1-Proteinmenge in Anwesenheit der dnHectD1 der A1-Proteinmenge in Anwesenheit der Vektorkontrolle entspricht.

7. Mutationen des C-Terminus beeinflussen die Expressionsstärke und die Ubiquitinylierung von A1

Bereits Herold et al., konnten zeigen, dass die A1-Stabilität von seinem C-terminalen Ende abhängt. So nimmt die Stabilität von A1 deutlich zu, wenn die letzten 21 Aminosäuren am C-Terminus von A1 deletiert (Flag-A1.151), bzw. die Aminosäuren zwischen Position 153 und 157 in Alanine mutiert werden (Flag-A1.153A157) (Abb. III-15 A) und (Abb. III-16 Unten). Umgekehrt nimmt die Stabilität von GFP deutlich ab, wenn ein EGFPFmA1-Fusionskonstrukt kloniert wird (Abb. III-15 B). Gleichzeitig kann jedoch die Stabilität des Fusionsproteins erneut erhöht werden, wenn die letzten 21 Aminosäuren von A1 deletiert werden (EGFPFmA1.151), bzw. die Aminosäuren zwischen Position 153 und 167 in Alanine mutiert werden (EGFPFmA1.153A157) (Abb. III-15 B). Auch eine FACS-analytische Auswertung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität der EGFPFmA1-Varianten bestätigt die Westernblotdaten (Abb. III-16 oben). Wie schon mehrfach gezeigt, wird A1 in Gegenwart

ERGEBNISSE

von HA3cherryHectD1[Y2H] -33N/-33C in seiner Expression positiv reguliert. Passt man die Proteinmengen von A1.151 und A1.153A157 an die Proteinmenge von A1 an, so kann auch bei den beiden Mutanten eine Zunahme der Signalintensität in Anwesenheit der HectD1[Y2H] beobachtet werden. Allerdings fallen die Effekte sehr viel geringer als bei A1 aus (Abb. III-15 C). Daher kann davon ausgegangen werden, dass auch die A1-Mutanten trotz ihrer erhöhten Stabilität eine Interaktion mit HectD1 eingehen.

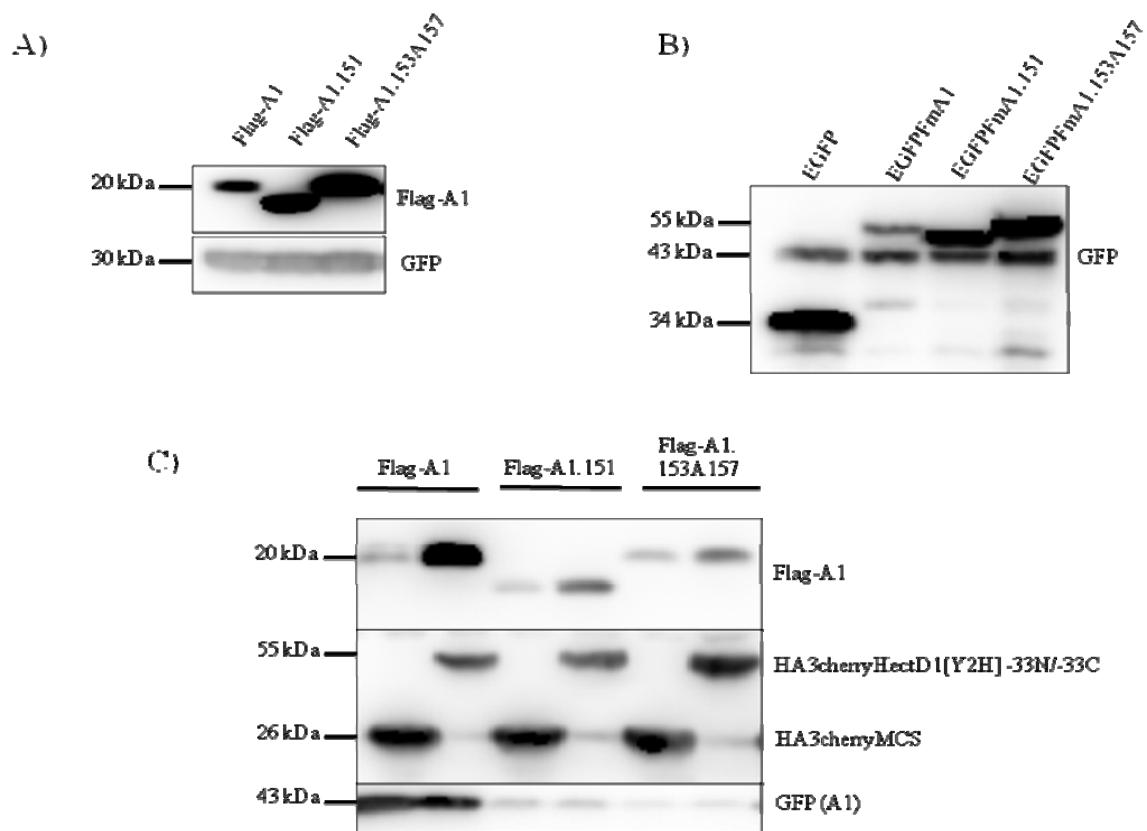


Abbildung III-15: Mutationen des C-terminalen Endes von A1 beeinflussen dessen Stabilität. A), B) und C) 293T Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden RIPA-Extrakte hergestellt und die Proteine mittels Westernblot detektiert. A) Transfektion gleicher DNA-Mengen Flag-A1, Flag-A1.151 und Flag-A1.153A157. Die kodierenden Sequenzen für GFP und die jeweiligen A1-Konstrukte sind über eine IRES miteinander verbunden B) Transfektion mit gleichen DNA-Mengen, Detektion von EGFP, EGFPFmA1, EGFPFmA1.151 und EGFPFmA1.153A157 mittels Anti-GFP. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde ein zusätzliches GFP-Plasmid transfiziert. C) Transfektion von 1µg Flag-A1, 250ng Flag-A1.151 und 50ng Flag-A1.153A157 sowie gleicher Mengen HA3cherryMCS und HA3cherryHectD1[Y2H]. Die kodierenden Sequenzen für GFP und die jeweiligen A1-Konstrukte sind über eine IRES miteinander verbunden. Die Proteindetektion erfolgte in mittels Anti-Flag und Anti-HA.

ERGEBNISSE

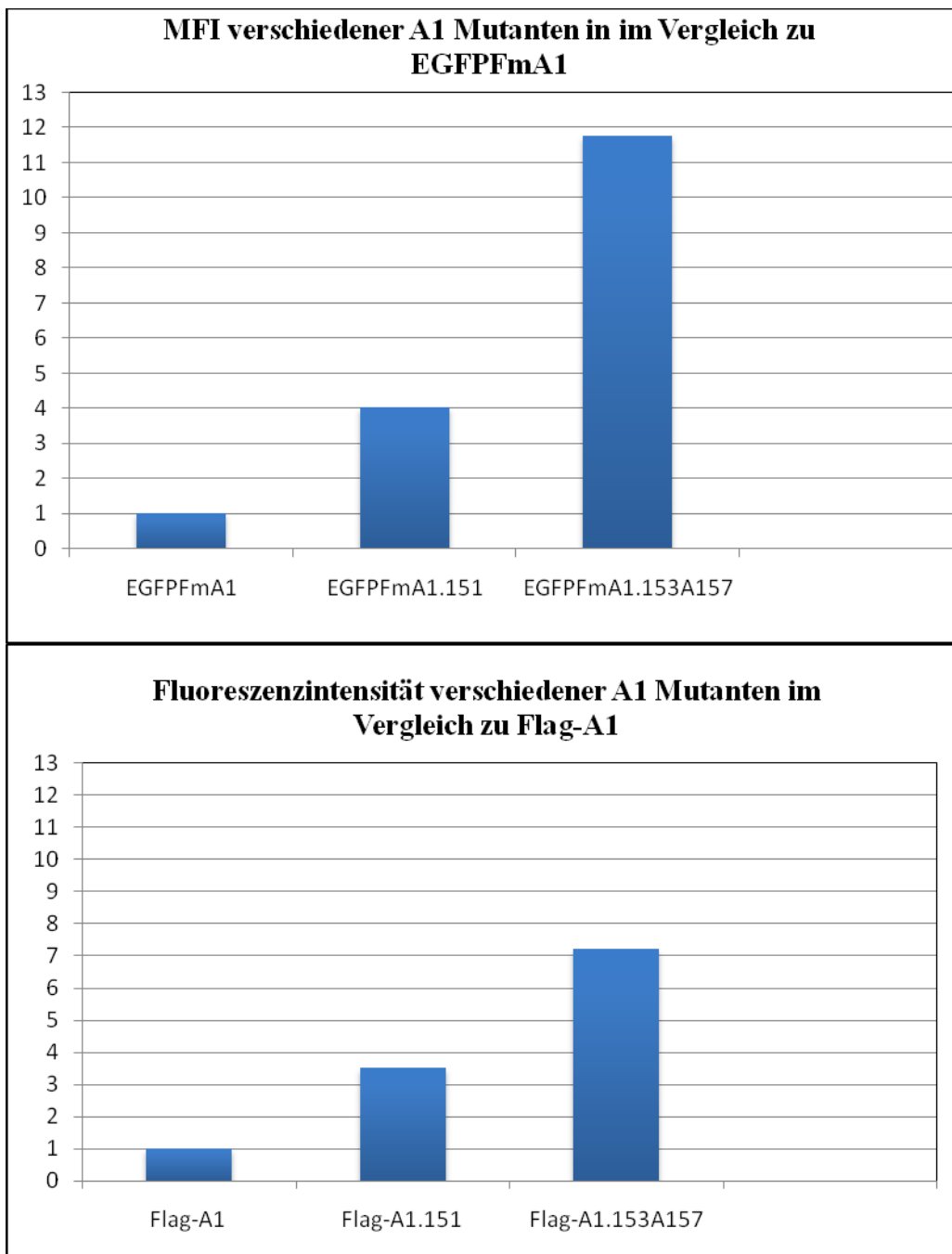


Abbildung III-16: (Oben) Die MFI von EGFPFmA1.151 bzw. EGFPFmA1.153A157 ist bezogen auf wtA1 (EGFPFmA1) um den Faktor 4 bzw 12 höher, was mit der erhöhten Proteinstabilität einhergeht. Wehi 231 Zellen wurden mit verschiedenen EGFPFmA1-Konstrukten transduziert und anschließend mittels FACS die mean fluorescent intensity (MFI) ermittelt. Die Abbildung ist repräsentativ für zwei Experimente. **(Unten) Die Signalintensität von Flag-A1.151 bzw. Flag-A1.153A157 nehmen um den Faktor 3 - 4 bzw 7 zu.** Die Abbildung ist repräsentativ für drei Experimente Die Signalintensitäten der A1-Daten aus Abbildung III-15 A wurden mittels der AIDA-Software auf bekannte Weise bestimmt und auf wtA1 (Flag-A1) bezogen.

ERGEBNISSE

Da die beiden Mutanten von A1 stabiler sind als wildtypisches A1 stellte sich die Frage, ob die einzelnen A1-Mutanten auch in ihrem Ubiquitinylierungsgrad voneinander abweichen. Dazu wurden 293T Zellen mit Vektoren für die drei A1-Proteine und mit Myc-ubiquitinkodierenden Plasmiden transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, lysiert und A1 mittels Anti-Flag präzipitiert und im Westernblot detektiert. Die Ubiquitinylierung von A1 wurde mittels eines Myc-Antikörpers nachgewiesen. Es zeigte sich dabei, dass die Stabilität der jeweiligen A1-Mutanten mit deren Ubiquitinylierungsgrad einhergeht. So wird A1.151 im Vergleich zu wtA1 schwächer ubiquitinyliert, und die Ubiquitinylierung von A1.153A157 nimmt in Relation zu A1.151 nochmals ab. Aus Vorversuchen war von Mcl-1 bekannt, dass es im Vergleich zu A1 weniger ubiquitinyliert wird, und diente daher als Vergleichskontrolle (Abb. III-17).

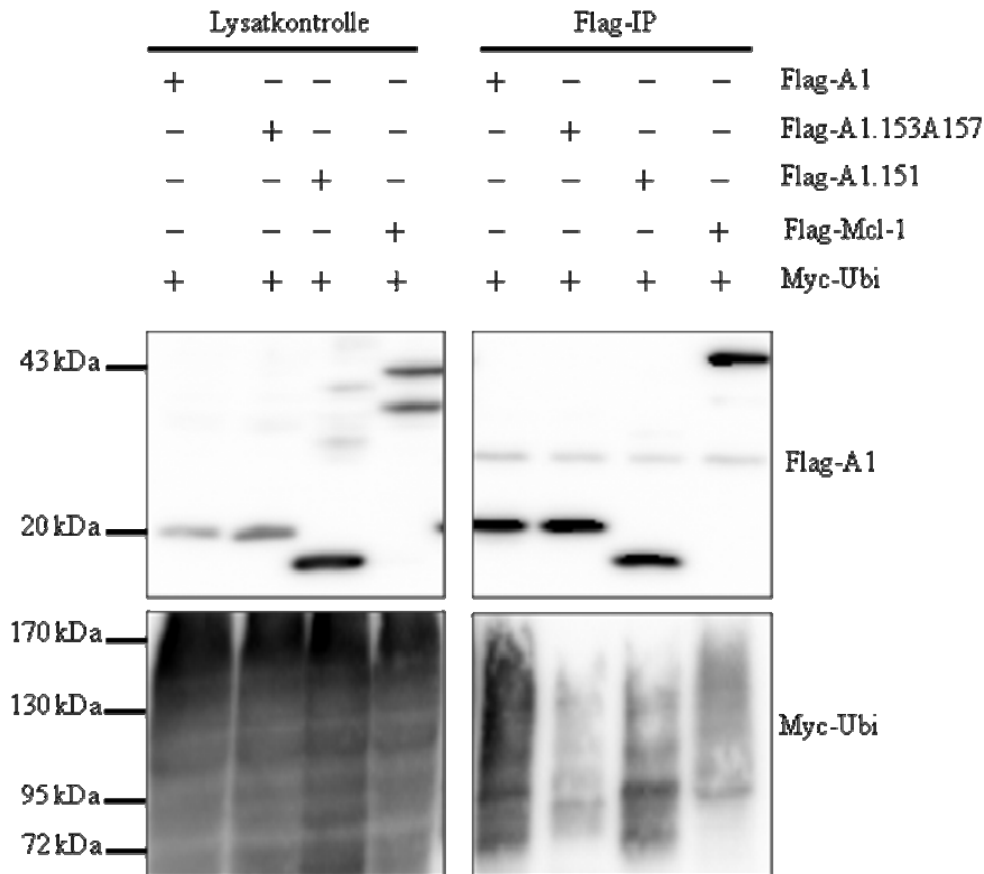


Abbildung III-17: Verschiedene A1-Varianten werden im Vergleich zu wtA1 vermindert ubiquitinyliert. 293T Zellen wurden mit Flag-A1, Flag-A1.151, Flag-A1.153A157, Flag-Mcl-1 und Myc-Ubi transfiziert und nach zwei Tagen lysiert. Die A1-Varianten wurden mittels Flag präzipitiert und im Westernblot detektiert. Ubiquitin wurde mittels Anti-Myc detektiert.

ERGEBNISSE

Da die Expressionstests mit den verschiedenen A1-Mutanten in Gegenwart von HectD1[Y2H]-33N/-33C (Abb. III-15 C) noch eine - wenn auch geringe - Zunahme der Proteininstabilität nahe legen stellte sich die Frage, ob in Koimmunopräzipitationsversuchen noch eine Interaktion zwischen HectD1[Y2H] und den jeweiligen A1-Mutanten nachweisbar ist. Überraschenderweise ist eine sogar verstärkte Präzipitation von HectD1[Y2H]-33N/-33C in Gegenwart der A1-Mutanten im Vergleich zum Flag-A1 nachweisbar (Abb. III-18). Zusammen deuten diese Daten auf eine vermutlich komplexere Rolle des C-terminalen Endes von A1 hin, die möglicherweise über eine reine Andockstelle für HectD1 hinaus geht.

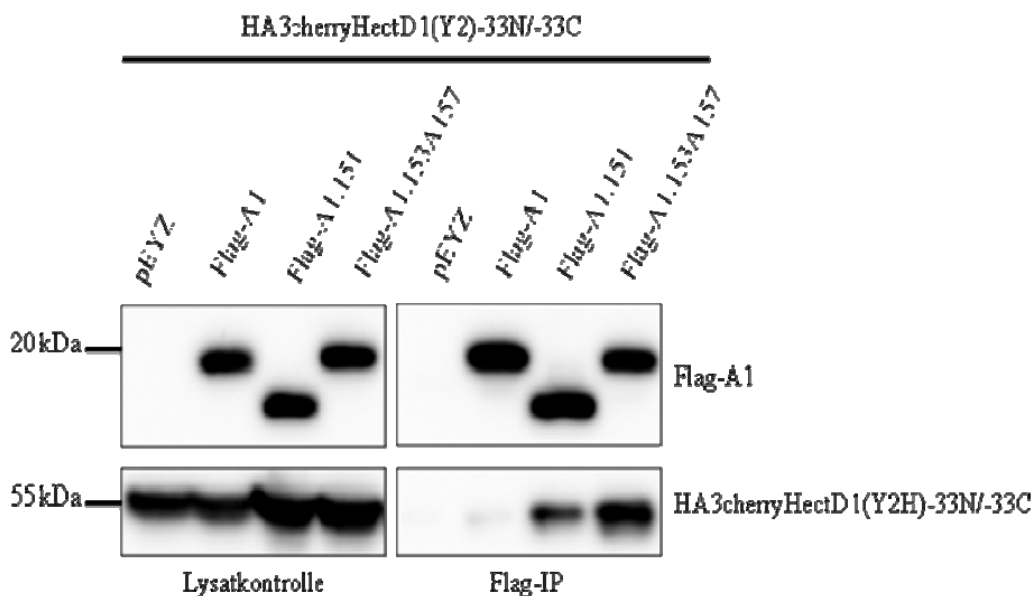


Abbildung III-18: Die A1-Mutanten Flag-A1.151 und Flag-A1.153A157 präzipitieren HA3cherryHectD1[Y2H]-33N/-66C im Vergleich zu Flag-A1 stärker. 293T Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert (Flag-A1 1µg; Flag-A1.151 250ng; Flag-A1153A1550 50ng). Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und im 1 % Triton-IP-Puffer lysiert. Anschließend wurde A1 über Anti-Flag präzipitiert. Im Westernblot erfolgte die Detektion von A1 mittel Anti-Flag. Die Koimmunopräzipitation von HA3cherryHectD1[Y2H]-33N/-66C wurde durch Anti-HA nachgewiesen.

8. Die Expression von A1 und HectD1 in Wehi 231 Zellen ändert sich nach CD40-Stimulation

Nachdem die Interaktion zwischen A1 und HectD1 gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob die Expressionsstärke von HectD1 reguliert wird. Deshalb wurden Wehi 231 Zellen

ERGEBNISSE

mit unterschiedlichen Stimuli (LPS, LPS/ Anti-CD40, Phorbol ester, Phorbol ester/ Ionomycin) behandelt. Exemplarisch sollen die Stimulationsversuche mit CD40 beschrieben werden. Die übrigen Stimulationsbedingungen ergaben vergleichbare Daten. Wehi 231 Flag-A1_{high} Zellen wurden mit einem CD40 stimulierenden Antikörper behandelt und nach 2, 4, 8 sowie 24 Stunden Zellextrakte (RIPA) gemacht. Dabei zeigte sich, dass HectD1 auf Proteinebene einer leicht positiven Regulation durch CD40 unterliegt. So nimmt die HectD1-Expression über einen Zeitraum von 2 bis 24 Stunden zu, wobei die maximale Signalintensität in einem Zeitraum von 8 bis 24 Stunden erreicht wird. Gleichzeitig besteht zwischen A1 und HectD1 eine umgekehrt proportionale Korrelation, da die A1-Expression nach CD40-Stimulation im gleichen Zeitraum kontinuierlich abnimmt (Abb. III-19). Die Abnahme der A1-Expression wird durch eine verringerte A1-Stabilität bedingt, wie die Cycloheximidbehandlung Wehi 231 Flag-A1_{high} Zellen zeigt (Abbildung III-20). Somit lässt sich zusammenfassen sagen, dass nach CD40-Stimulation zumindest eine Korrelation zwischen den Signalintensitäten von A1 und HectD1 besteht.

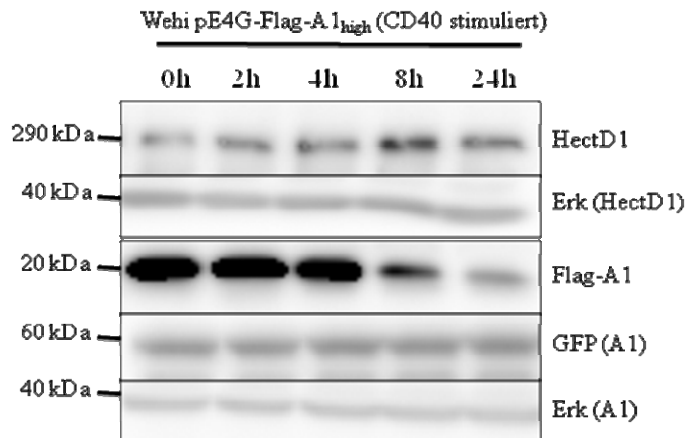


Abbildung III-19: Die A1-Expression nimmt nach CD40-Stimulation ab, bei gleichzeitig leichter Zunahme der HectD1-Expression. Wehi 231 pE4G-Flag-A1_{high} exprimierende Zellen wurden über einen Zeitraum von 0, 2, 4, 8 und 24 Stunden mit einem CD40 aktivierenden Antikörper (1 µg/ml) stimuliert. Anschließend wurden je 2×10^6 Zellen in 50 µl RIPA lysiert und 10 µl im Westernblot aufgetragen. A1 wurde mit Anti-Flag und HectD1 mit Anti-HectD1 im Westernblot detektiert. Da HectD1 290 kDa groß ist A1 aber nur 20 kDa wurden beide Proteine in getrennten Gelen untersucht. Daher sind auch zwei verschiedene Erk-Ladekontrollen angegeben.

ERGEBNISSE

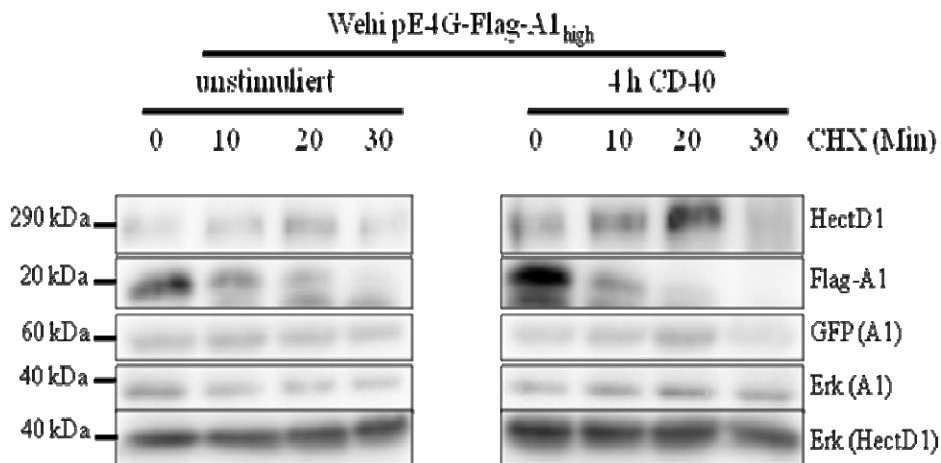


Abbildung III-20: Nach CHX-Behandlung nimmt die A1-Expression in der CD40 stimulierten Population im Vergleich zur unstimulierten deutlich ab. Gleichzeitig nimmt die HectD1-Expression nach CD40-Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu. Ebenso ist eine Zunahme der Stabilität von HectD1 nach CHX-Behandlung über einen Zeitraum von 20 Minuten erhöht. 2×10^6 Wehi pE4G-Flag-A1_{high} Zellen wurden für 4 Stunden mit $1 \mu\text{g}$ CD40-Antikörper behandelt, bzw. unbehandelt belassen. Nach 4 Stunden wurden die Zellen mit $10 \mu\text{g}$ CHX für 10, 20, bzw. 30 Minuten behandelt. Die Lade- (Erk) bzw. Expressionskontrollen (GFP) sind untereinander vergleichbar. Auch hier wurden A1 und HectD1 in verschiedenen Gelen untersucht.

9. Die Expression von A1 in Wehi 231 Zellen nimmt nach Inhibition der HectD1-Expression mittels spezifischer shRNAs zu

Nachdem eine Korrelation zwischen der HectD1 und der A1-Expression nach CD40-Stimulation gezeigt werden konnte, sollte im Weiteren der Zusammenhang zwischen A1 und HectD1 näher untersucht werden. Dabei galt es zunächst zu klären, ob die Inhibierung der Genexpression von HectD1 mittels spezifischer shRNA einen Effekt auf die A1-Signalintensität hat (Abb. III-21). Dazu wurden Wehi 231 Zellen eingesetzt, die Flag-A1 auf niedrigem Niveau stabil exprimierten (Wehi Flag-A1_{low}). Diese Zellpopulation wurde mit rekombinater Retrovirus-DNA (rRV) infiziert, die für eine HectD1 spezifische shRNA (Abb. III-22) kodierte und mit Zeozin (Flag-A1-gekoppelt) und Puromycin (shRNA-gekoppelt) selektiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, Ganzzellextrakte gemacht und RNA gewonnen. A1 wurde schließlich im Westernblot mittels Flag detektiert, bzw. die Änderung der HectD1-Expression mittels RT-PCR quantifiziert. Dabei zeigte sich, eine Zunahme der A1-Expression nach Hemmung der *hectD1*-Expression (Abb. III-21). Die Änderung der *hectD1*-Expression wurde mittels PCR überprüft. Schon eine Abnahme der *hectd1*-Expression um den Faktor zwei führte zu einer dramatischen Zunahme des A1-Signals auf Proteinebene.

ERGEBNISSE

Da die Erk-Ladekontrolle in beiden Spuren (Vektorkontrolle und shHectD1) vergleichbar ist, kann man davon ausgehen, dass in beiden Fällen dieselbe Menge an Protein geladen ist. Daher kann man annehmen, dass die Zunahme der A1-Proteinmenge auf die Abnahme der *hectD1* RNA-Menge zurückzuführen ist.

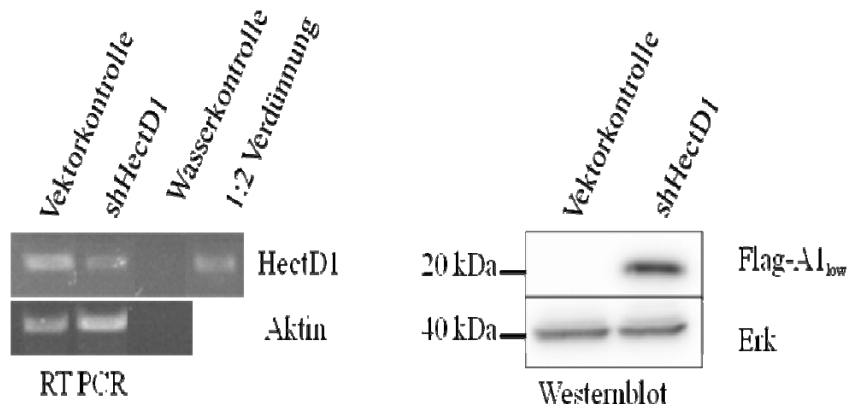


Abbildung III-21: Eine Abnahme der *hectD1* RNA-Expression um den Faktor zwei führt zu einer deutlichen Zunahme des A1-Signals im Westernblot. Die von der eingesetzten shRNA erkannte *hectD1* mRNA-Sequenz lautet: gaaggactgcttatat. Etwa 8 Tage nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und aus je 1×10^6 Zellen wurden Ganzzelextrakte gemacht, indem sie in 2x Lämmli aufgenommen und aufgeköcht wurden. 1×10^6 Zellen wurden in Trizol® aufgenommen und RNA isoliert. A1 wurde schließlich im Westernblot mittels Flag detektiert, bzw. die Änderung der *hectD1*-Expression mittels RT-PCR quantifiziert. Die Abnahme der *hectD1*-Expression wurde mittels einer 28 Zyklen RT-PCR ermittelt.

10. A1 wird in HectD1 defizienten Maus Embryonalen Fibroblasten (MEF) stabilisiert

Da die A1-Expression zunimmt, wenn die HectD1-Expression mittels einer spezifischen shRNA unterdrückt wird, sollten die Daten in einem weiteren physiologischeren System überprüft werden. Dazu wurden uns freundlicherweise von Irene Zohn² Mäuse zur Verfügung gestellt, die defizient für HectD1 waren (opm Mutation: „nonsense“-Mutation führt zum Stop nach Aminosäure 143). Da die HectD1 defizienten Mäuse (*HectD1*^{opm/opm}) noch im Mutterleib versterben, wurden aus den Mausembryonen an Tag 12 bis 16 post conceptionem MEF präpariert, und diese mit Flag-A1 (pEYZ-Flag-A1) stabil transfiziert. Nach Infektion der MEF mit Flag-A1-kodierenden rRV wurden diese expandiert und anschließend daraus RIPA-Extrakte gemacht. Dabei zeigte sich, dass Flag-A1 bei fehlender HectD1 stärker exprimiert

ERGEBNISSE

wird (vergleiche: HectD1^{opm/opm} mit HectD1^{wt/opm} und HectD1^{wt/wt}). Das konstante GFP-Signal in allen drei Populationen spricht dafür, dass tatsächlich die Abwesenheit von HectD1 und nicht eine erhöhte Transkriptionsrate von Flag-A1 zum Anstieg der Expression führt (Abb. III-22). Dies zusammen mit den shRNA-Daten ist ein weiterer wichtiger Hinweis dafür, dass A1 einer Regulation durch HectD1 unterliegt.

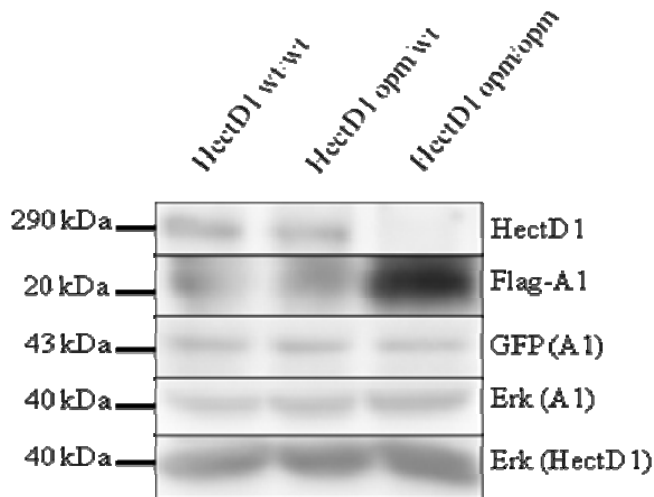


Abbildung III-22: Die A1-Signalintensität nimmt in k.o. MEF (HectD1 opm/opm) im Vergleich zu wt (HectD1 wt/wt) bzw. heterozygoten MEF (HectD1 opm/wt) zu. Embryonen wurden an Tag 12 bis 16 post conceptionem aus der schwangeren Maus entnommen und Maus Embryonalen Fibroblasten (MEF) präpariert. Diese wurden expandiert und 4×10^5 Zellen mit Flag-A1 (pEYZ-FmA1) stabil infiziert. Aus den Flag-A1 positiven Zellen wurden RIPA-Extrakte gemacht und diese im Westernblot analysiert. A1 wurde mittels eines Flag-spezifischen Antikörpers nachgewiesen. A1 ist über eine IRES mit GFP verbunden, weshalb die Expressioneffizienz von A1 durch GFP nachgeprüft werden kann.

DISKUSSION

IV. Diskussion

1. A1 interagiert mit der E3-Ubiquitinligase HectD1

Das antiapoptotische Bcl-2-Familienmitglied A1 wird durch Ubiquitylierung und proteosomale Degradation in seiner Stabilität beeinflusst (Herold et al., 2006). Gestörte ubiquitinvermittelte Degradation von Bfl-1 begünstigt im Mausmodell die Entstehung von Lymphomen (Beverly and Varmus, 2009; Fan et al., 2010). Auch in der T-ALL ist Bfl-1 als ein die Leukämieentstehung begünstigender Faktor beschrieben (Mandal et al., 2005). In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde die E3-Ubiquitinligase HectD1 in einem Y2H-Screen als Interaktionspartner von A1 identifiziert (durchgeführt von Hybrigenics¹, Frankreich), die aufgrund ihrer Enzymaktivität A1 ubiquitylieren und dadurch deren Stabilität kontrollieren kann. Die E3-Ubiquitinligase HectD1 (MW: 290 kD) gehört zur Gruppe der Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus Ligasen (Hect). Charakteristisch für diese Gruppe ist, dass sie ein hohes Molekulargewicht (>200 kD), eine C-terminal lokalisierte Hect-Domäne (ca. 350 Aminosäuren) und mindestens eine Protein-Protein Interaktionsdomäne haben. Die Hect-Domäne ist bilobär aufgebaut. Im C-terminalen Bereich (C-Lobe) befindet sich ein konserviertes Cystein, an das über eine Thioesterbrücke Ubiquitin kovalent gebunden wird, ehe dieses Ubiquitin auf das Substrat übertragen wird. Im N-terminalen Abschnitt (N-Lobe) liegt die Bindestelle für ein E2 konjugierendes Enzym. Die Bindestellen für Substrate sind außerhalb der Hect-Domäne lokalisiert (Metzger et al., 2012; Rotin and Kumar, 2009; Zohn et al., 2007).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde mittels Stabilitäts- und Immunoprecipitationstests HectD1 in Säugerzellen als Interaktionspartner von A1 bestätigt (Abb. III-2 und Abb. III-4). *In vivo* Kolo-kalisation von EGFPfM1 mit HA3cherryHectD1[Y2H] in der Konfokalmikroskopie unterstützen die *in vitro* Immunoprecipitationsexperimente (Abb. III-6). Die Region von HectD1, die A1 bindet, wurde auf 87 Aminosäuren (Aminosäure 834-920) eingegrenzt (Abb. III-3 und III-4). Die Interaktion von A1 wurde auch mit der dnHectD1, der dnHectD1 Δ Ank bzw. der wtHectD1 überprüft und bestätigt (Abb. III-7 und III-10). Schließlich konnte auch A1 nach Präzipitation von endogenem HectD1 gefällt werden (Abb. III-12).

Interessanterweise binden sowohl dnHectD1 als auch HectD1[Y2H] neben A1 auch Mcl-1 (Daten nicht gezeigt). Die Hect-Ubiquitinligase Mule, die im Lungen-, Mamma- und Kolorektalemkarzinom überexprimiert wird (Adhikary et al., 2005; Chen et al., 2005a; Yoon

DISKUSSION

et al., 2005) kann ebenfalls mit Mcl-1 interagieren und das Protein mit K48 vernetzten Ubiquitinketten modifizieren (Zhong et al., 2005). Hingegen scheint A1 nicht mit der Mcl-1 bindenden BH3-Domäne von Mule (BH3-Mule) zu interagieren, da in Stabilitäts- und Kolokalisationstests keine Interaktion nachgewiesen werden konnte. (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Regulation antiapoptotischer Bcl-2-Proteine einem komplexen Regulationsmechanismus unterworfen ist.

2. Die Ubiquitylierung von A1 wird durch HectD1 beeinflusst

Während die Immunopräzipitations- und Kolokalisationsexperimente eine Interaktion von A1 und HectD1 nahe legen, deuten die Versuche in OPM-MEF (HectD1^{opm/opm}) (Abb. III-22) darauf hin, dass A1 von HectD1 ubiquityliert wird, da die A1-Signalintensität in HectD1 defizienten MEF, im Vergleich zu wtMEF mit funktioneller HectD1, zunimmt (Abb. III-22). Ebenso nimmt die Expression von A1 in 293T Zellen in Anwesenheit der HectD1[Y2H] (Abb. III-2) bzw. der dnHectD1 (Abb. III-7) zu. Die verlängerte Halbwertszeit von A1 in Gegenwart der dnHectD1 (Abb. III-9A und III-9B) ist ein weiterer indirekter Hinweis auf die Ubiquitylierung von A1 durch HectD1. Ferner sprechen die Untersuchungen über den Ubiquitylierungsgrad von A1 in Anwesenheit von dnHectD1 bzw. HectD1[Y2H] (Abb. III-13 und III-14) dafür, dass A1 tatsächlich durch HectD1 ubiquityliert und somit für den proteosomalen Abbau markiert wird. Hierbei scheint die Ubiquitylierung nicht an bestimmte Lysine in A1 gebunden zu sein, wie Manuel Langer in seiner Doktorarbeit zeigen konnte.

3. Der C-Terminus von A1 ist für die Stabilität/ Ubiquitylierung von A1 und für die Interaktion mit HectD1 wichtig

A1/ Bfl-1 ist vorwiegend an den Mitochondrien zu finden (Brien et al., 2009; Duriez et al., 2000). Dort verankert der C-Terminus das Protein in der Mitochondrienmembran (Brien et al., 2009) und A1/ Bfl-1 entfaltet seine antiapoptotische Wirkung durch binden der proapoptotischen Proteine Bim, Noxa, Puma und tBid (Chen et al., 2005b; Herold et al., 2006; Werner et al., 2002). Dabei spielen die BH1-4-Domänen von A1/ Bfl-1 eine wichtige Rolle, da Mutationen in den BH-Domänen die antiapoptotischen Effekte von A1/ Bfl-1 reduzieren. Die Mutationen in den BH1- und BH2-Domänen sind in diesem Zusammenhang gravierender als in den BH3- und BH4-Domänen (D'Sa-Eipper and Chinnadurai, 1998). Interessanterweise ist der C-Terminus von A1/ Bfl-1 nicht nur als Membrananker wichtig, sondern auch für Funktion, Stabilität und Ubiquitylierung von A1/ Bfl-1 verantwortlich (Herold et al., 2006;

DISKUSSION

Kucharczak et al., 2005). A1.151 - eine verkürzte Version von A1, der die letzten 21 Aminosäuren fehlen - ist im Vergleich zu wtA1 zwar wesentlich stabiler funktionell jedoch weniger aktiv. Entsprechend ist die Ubiquitylierung dieser Deletionsmutante deutlich reduziert (Herold et al., 2006). Analog verhält sich eine Bfl-1-Deletionsmutante, der die letzten 23 Aminosäuren fehlen (Kucharczak et al., 2005). Die Untersuchungen in der hier vorliegenden Arbeit legen nahe, dass bei all diesen Aspekten der A1-Regulation HectD1 zumindest mitbeteiligt ist.

Fusionsproteine aus enhanced green fluorescenting protein (EGFP) und A1 zeigen die Bedeutung des C-terminalen Endes von A1 für dessen Stabilität (Abb. III-15B und III-16 oben). Sogar das sehr stabile EGFP wird nach Fusion mit FmA1 dramatisch destabilisiert. EGFPFmA1.114-151 (Fusionskonstrukt bestehend aus EGFP und den Aminosäuren 114 bis 151 von A1) ist stabiler als EGFPFmA1.114-172 (Fusionskonstrukt bestehend aus EGFP und den Aminosäuren 114 bis 172 von A1). Und das Fusionskonstrukt EGFPFmA1.151 (Fusionskonstrukt bestehend aus EGFP und A1.151) ist wesentlich stabiler als das Fusionskonstrukt EGFPFmA1 (Fusionskonstrukt bestehend aus EGFP und wtA1) (Abb. III-15B und Abb. III-16 oben). Auch bei den nicht EGFP markierten Proteinen ist die A1.151 Mutante im Vergleich zu wtA1 deutlich stabiler (Zunahme der Signalintensität um den Faktor 3-4; Abb. III-15A und Abb. III-16 unten) und wird im Vergleich zu wtA1 weniger ubiquityliert (Abb. III-17). Gezielte Punktmutationen im C-terminalen Ende von A1 erhöhen dessen Stabilität erheblich wie die Daten mit der A1.153A157 Mutante zeigen (A1 Variante mit Austausch der Aminosäuren zwischen Position 153 und 157 in Alanine) (Abb. III-15A und B, Abb. III-16 sowie Abb. III-17). Alle diese Daten deuten darauf hin, dass das C-terminale Ende von A1 bei der Ubiquitylierung und Stabilität von A1 durch HectD1 eine essentielle Rolle spielt.

Überraschenderweise war das sehr stabile A1.153A157 nach wie vor in der Lage, HectD1[Y2H] zu präzipitieren (Abb. III-18). Weshalb diese Mutation in A1 die Interaktion mit HectD1 ermöglicht, gleichzeitig den schnellen Abbau des Proteins aber verhindert bleibt gegenwärtig ungeklärt. Denkbar wäre eine durch die Mutation induzierte Konformationsänderung von A1, die eine Interaktion zwischen A1 und HectD1 erlaubt, gleichzeitig aber die Lysine in A1 „maskiert“ und somit für die Ubiquitylierung durch HectD1 schwer zugänglich bzw. ganz unzugänglich macht. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Ligaseaktivität von HectD1 nur dann funktionell ist, wenn A1 korrekt an HectD1 bindet und somit dessen aktives Zentrum freilegt.

DISKUSSION

Die Ergebnisse mit der A1.151-Mutante zeigen, dass der Verlust von Aminosäuren am C-Terminus eine Interaktion von A1 mit HectD1 noch erlaubt (Abb. III-17 und Abb. III-18). Die Bindestelle für HectD1 beschränkt sich daher nicht auf die letzten 21 Aminosäuren am C-Terminus von A1. Ein Teil der Andockstelle könnte in oder nahe der hydrophoben Grube von A1 liegen. Für Bfl-1 konnte gezeigt werden, dass es in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegt, die durch die Lage des C-Terminus bestimmt sind (Brien et al., 2009). So wird der globuläre Charakter von A1/ Bfl-1 betont, wenn die alpha9 Helix des C-Terminus in der hydrophoben Grube lokalisiert. Der amphiphatische Charakter des C-Terminus hingegen wird betont, wenn die alpha9 Helix außerhalb der hydrophoben Grube freiliegt. Im zweiten Fall kann A1/ Bfl-1 über den freiliegenden C-Terminus an die Mitochondrien binden und diese vor einer Schädigung durch proapoptotische Bcl-2-Mitglieder wie Bim schützen. Auch für die proapoptotischen Proteine Bax und Bak ist beschrieben, dass ihre Funktion stark von der Konformation und der Lage des C-terminalen Endes relativ zur hydrophoben Grube abhängt (Kim et al., 2009). Eine Deletion am C-terminalen Ende von A1 würde die Andockstelle von HectD1 teilweise erhalten da die hydrophobe Grube nach wie vor intakt ist. So könnte HectD1 zwar noch über die hydrophobe Grube binden, jedoch wären die Lysine für HectD1 wie oben für die A1.153A157-Mutante diskutiert nicht mehr zugänglich bzw. die Enzymaktivität der HectD1 würde durch diese Art der Bindung inhibiert werden. Die erhöhte Funktionalität von wtA1 im Vergleich zu A1.151 ließe sich in diesem Modell damit erklären, dass der C-Terminus von A1 bevorzugt außerhalb der hydrophoben Grube lokalisiert und A1 somit durch Anreicherung an den Mitochondrien seine antiapoptotische Wirkung gezielt entfaltet. Dies steht ein wenig im Widerspruch zu einem Mausmodell, in dem eine Bfl-1deltaC Mutante (hier fehlen die letzten 24 C-terminalen AS in Bfl-1) die Lymphomentstehung begünstigt (Fan et al., 2010). Jedoch gilt es zu bedenken, dass die Bfl-1deltaC Mutante nur in Koexpression mit mutiertem dominant negativem p53 die Lymphomentstehung begünstigt. Ob Bfl-1deltaC die Lymphomentstehung auch selbständig begünstigt ist anhand des publizierten Mausmodells bislang nicht klar.

DISKUSSION

4. A1 und HectD1 haben onkogenes Potential und bedürfen daher einer Kontrolle durch die Zelle

4.1 Mögliche Kontrollmechanismen der A1- und HectD1-Interaktion

Eine Regulation des beschriebenen Zusammenspiels von A1 und HectD1 ist für einen mehrzelligen Gesamtorganismus von entscheidender Bedeutung, da beide Proteine onkogenes Potential haben. So scheint die derzeit noch nicht näher charakterisierte E3-Ubiquitinligase HectD1 in der Tumorentstehung eine Rolle zu spielen. Unter anderem ist *HectD1* in mindestens zwei Isoformen in der T-ALL nachweisbar (Dohnal et al., 2006). Verminderte Expression von HectD1 könnte wiederum eine aggressivere Form der B-CLL begünstigen, wie Microarray Analysen aus Knochenmarkproben betroffener Patienten mit einer 13q Chromosomendeletion zeigen (Hernandez et al., 2009).

In der anaplastic large cell lymphoma (ALCLS), einer Untergruppe von Non-Hodgkin Lymphomen sind A1 und C/ EBPbeta unerlässlich, um das Überleben des Lymphoms zu gewährleisten (Piva et al., 2006). In einem Myc abhängigem Maustumormodell konnte Bfl-1 als wichtiger Faktor der Leukämieentstehung identifiziert werden (Beverly and Varmus, 2009). Und in der T-ALL ist A1 ebenfalls als ein die Leukämieentstehung begünstigender Faktor beschrieben (Mandal et al., 2005). Außerdem gibt es Hinweise, dass die Philadelphiachromosomtranslokation (BCR/ ABL [Kinase]), welche die Akute myeloische Leukämie (AML), die Chronische myeloische Leukämie (CML) und die Akute lymphatische Leukämie (ALL) Entstehung begünstigt, ebenfalls die A1/ Bfl-1-Expression beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass die Bfl-1-Expression in Patienten CML-Zellen von der Kinaseaktivität des BCR/ ABL-Fusionsproteins abhängig ist. Darüberhinaus wird A1 zusammen mit Pim-1 (Kinase) für die BCR/ ABL vermittelte Leukämogenese benötigt (Nieborowska-Skorska et al., 2002). In der B-CLL geht die erhöhte *Bfl-1*-Expression mit einer erhöhten Chemoresistenz einher (Olsson et al., 2007). Ebenso scheint eine *A1*-Überexpression nach CD154- (CD40L) Stimulation in der CLL ebenfalls eine Chemoresistenz zu induzieren (Vogler et al., 2009). Im Multiplen Myelom hingegen spielt nach derzeitigem Kenntnisstand, A1/ Bfl-1 keine Rolle (Tarte et al., 2004).

Diese Daten legen nahe, dass A1/ Bfl-1 und HectD1 onkogenes Potential haben und daher einer Kontrolle unterliegen müssen. Für Mcl-1 ist bekannt, dass eine Glykogen Synthase Kinase 3beta (GSK 3) vermittelte S155 und S159 Phosphorylierung die Ubiquitinylierung und Degradation von Mcl-1 fördert (Ding et al., 2007). Herold et al konnten zeigen, dass A1

DISKUSSION

durch Nachahmung einer Phosphorylierung im C-terminalen Ende stabilisiert wird, dieses Protein aber funktionell in seiner antiapoptotischen Wirkung gegenüber wtA1 eingeschränkt ist (Herold et al., 2006). Diese Daten deuten an, dass Phosphorylierung von A1 dessen antiapoptotische Funktion verringern kann. Zwar ist eine Interaktion zwischen A1 und der Il-2 Rezeptor assoziierten Kinase 2 (IRAK-2) bekannt (Diplomarbeit, Christine Siegl), jedoch ist derzeit nicht klar, ob A1 auch physiologischerweise einer Modifikation durch Phosphorylierung unterliegt. Falls ja, könnte die eingeschränkte Funktionalität von phosphoryliertem A1 als eine Art Gegenmechanismus des Organismus auf zellulärer Ebene interpretiert werden, um sich vor den „toxischen“ Effekten von A1 zu schützen.

Aber auch HectD1 selber könnte einer Modifikation unterliegen, um das zelluläre Gleichgewicht aufrechtzuerhalten. So wird gezeigt, dass die E3-Ubiquitinligase Nedd 4-2 im unphosphorylierten Zustand an den epithelialen Natriumkanal ENaC binden und ihn ubiquitinylieren kann. Nach Phosphorylierung zweier Serinreste in Nedd 4-2 ist eine Interaktion mit ENaC nicht mehr möglich (Snyder, 2009). Sollte eine vergleichbare Phosphorylierung von HectD1 möglich sein, wäre folgendes Szenario denkbar: Unphosphoryliertes HectD1 interagiert mit A1 ubiquitinyliert es und markiert es für die proteosomale Degradation. Wird HectD1 jedoch phosphoryliert, ist eine Interaktion mit A1 nicht mehr möglich und A1 kann nicht mehr für den proteosomalen Abbau markiert werden.

Die E3-Ubiquitinligase Mdm2 bindet das Adaptermolekül DAXX. DAXX wiederum rekrutiert die Deubiquitinase HAUSP und schützt somit Mdm2 vor Autoubiquitinylierung (Tang et al., 2006). Im Review von Meek und Hupp wird nun vorgeschlagen, dass die Kinase ATM Mdm2 phosphoryliert und dadurch der Mdm2/ DAXX/ HAUSP Komplex aufgelöst wird, was eine verstärkte Autoubiquitinylierung und Degradation von Mdm2 zur Folge hat (Meek and Hupp, 2010). Ein vergleichbarer Mechanismus ist auch für HectD1 denkbar, wo durch Phosphorylierung von HectD1 eine Autoubiquitinylierung und Degradation von HectD1 und somit indirekt eine Stabilisierung von A1/ Bfl-1 induziert wird.

Zusammenfassend sind mindestens drei verschiedene Modelle der Beeinflussung der A1/ Bfl-1 und HectD1 Interaktion denkbar:

1. A1 wird phosphoryliert und somit für die Interaktion mit HectD1 unzugänglich gemacht
2. HectD1 wird phosphoryliert und somit für die Interaktion mit A1 unzugänglich gemacht

DISKUSSION

3. HectD1 wird phosphoryliert und fördert die Autoubiquitynilierung und eigene Degradation, was zu einer schwachen Interaktion zwischen A1 und HectD1 und somit zu einer indirekten Stabilisierung von A1 führt.

Welches der hier vorgeschlagenen Modelle möglicherweise zutreffend sein könnte, muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

4.2 Mögliche weitere Abbauege von A1

Eine Verschiebung des Gleichgewichts zu Gunsten antiapoptotischer Faktoren führt ebenso zu malignen Neoplasien, wie Fehlfunktionen des ubiquitynylierenden Systems. Daher ist eine Aufrechterhaltung des zellulären Gleichgewichts für einen mehrzelligen Organismus überlebensnotwendig. Um dies zu gewährleisten gibt es zwei primäre Abbauege für Proteine, die die Zelle nicht mehr benötigt. Den ubiquitinvermittelten und den autophagievermittelten Abbaueg (Kirkin et al., 2009; Nedelsky et al., 2008). Gleichzeitig scheint eine Verbindung zwischen beiden Abbauegen zu bestehen (Arndt et al., 2010; Kirkin et al., 2009). Obwohl die Literatur für A1/ Bfl-1 einen ubiquitinvermittelten Degradationsprozess beschreibt, kann derzeit ein ubiquitinunabhängiger Abbaumechanismus für A1/ Bfl-1 nicht ausgeschlossen werden. So gibt es zum Beispiel Hinweise darauf, dass Mcl-1, das ebenso wie A1/ Bfl-1 dem ubiquitinvermittelten proteosomalen Abbau unterliegt, auch über einen oder mehrere derzeit nicht näher charakterisierte ubiquitinunabhängige Weg(e) abgebaut wird (Stewart et al., 2010). Unsere eigenen Daten legen für A1/ Bfl-1 ebenfalls einen solchen Schluss nahe, da die A1-Stabilisierung in Gegenwart der Y2H-Fragmente bzw. der dnHectD1-Mutante immer unter der Stabilisierung durch Puma bzw. Bim lag (Abb. III-2; III-3 und III-8). Ein möglicher alternativer Abbaueg für A1/ Bfl-1 könnte die chaperonvermittelte Autophagie sein. Dabei handelt es sich um ein System, über das ein Chaperon-Protein Komplex rezeptorvermittelt durch die lysosomale Membran in das Lysosom transloziert wird (Glick et al., 2010; Koga and Cuervo, 2010). Hierfür muss das Protein aber über eine KFERQ-Konsensussequenz verfügen, in der dem Glutamin (Q) vier basische (R, K), saure (D, E) oder hydrophobe (F, I, L, V) Aminosäuren vorausgehen. Eine entsprechende Sequenz ist bei A1/ Bfl-1 N-terminal lokalisiert. Das neuronale Protein alpha-Synuclein ist beispielhaft für ein Protein, das auf zwei verschiedenen Wegen abgebaut werden kann. Es wird sowohl durch den ubiquitinproteosomalen Abbaueg als auch durch chaperonvermittelte Autophagie degradiert (Li et al., 2010; Nedelsky et al., 2008; Orenstein

DISKUSSION

and Cuervo, 2010). Es ist also durchaus denkbar, dass dieser Mechanismus auch einen Einfluss auf den Abbau von A1/ Bfl-1 haben kann somit zumindest in Teilen mögliche Defekte der ubiquitinvermittelten proteosomalen Degradation von A1/ Bfl-1 kompensiert.

ZUSAMMENFASSUNG

V. Zusammenfassung

Die Bcl-2-Familienmitglieder A1 und sein humanes Homolog Bfl-1 gewährleisten das Überleben der Zelle. Gleichzeitig trägt eine Dysregulation der Expression von A1/ Bfl-1 zur Krebsentstehung bei. Die Stabilität von A1/ Bfl-1 wird durch deren Ubiquitylierung sowie die anschließende proteosomale Degradation gesteuert.

Mit Hilfe eines Yeast-Two-Hybrid-Screens wurde die E3-Ubiquitinligase HectD1 als potentieller Interaktionspartner von A1/ Bfl-1 identifiziert.

Die Interaktion von A1 und HectD1 des Yeast-Two-Hybrid-Screens konnte in Säugerzellen bestätigt werden. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass lediglich 87 Aminosäuren für eine Interaktion von HectD1 und A1 nötig sind. Da membrangebundenes HectD1 zu einer Translokation von zytosolischem A1 an die Zellmembran führt, kann man davon ausgehen, dass beide Proteine auch *in vivo* miteinander interagieren. Eine dominant negative HectD1-Mutante schließlich beeinflusst die Ubiquitylierung von A1 und führt somit zu dessen Stabilisierung.

Diese Daten legen nahe, dass HectD1 ein wichtiger negativer Regulator von A1/ Bfl-1 ist und dass HectD1 für die Regulierung der A1/ Bfl-1-Proteinmenge in (Krebs)zellen sehr wichtig ist.

SUMMARY

VI. Summary

The Bcl-2 family members A1 and its human orthologue Bfl-1 support survival of cells. Dysregulation of their expression contributes to cancer. Stability of A1/ Bfl-1 is controlled by ubiquitination followed by degradation via the proteasome.

Using a yeast two-hybrid screen we identified the E3 ubiquitin-ligase HectD1 as potential A1/ Bfl-1-interacting partner.

We confirmed interaction of these two proteins in mammalian cells. Only 87 amino acids of HectD1 are necessary for the interaction of the protein with A1. Membrane-bound HectD1 recruits A1 to the membranes further supporting the notion that the two proteins interact *in vivo*. Importantly, dominant negative versions of HectD1 interfered with ubiquitination of A1 stabilizing the protein.

These findings indicate that HectD1 maybe an important negative regulator of the A1/ Bfl-1 anti-apoptotic protein, providing an important target for interfering with dysregulation of A1/ Bfl-1 in cancer.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

VIII. Abkürzungsverzeichnis

A	Amper
Abb.	Abbildung
AIP2	ABI (abscisic acid intensive) 3-interacting protein 2
ALCLS	anaplastic large cell lymphoma
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
Apo-1	apoptosis antigen 1
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
A/ T	Adenin/ Thymin
ATCC	american type cell culture
ATP	Adenosin 5`-triphosphat
ATV	adjusted trypsin versen
B-	bursa of fabricius
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2 antagonist/ killer 1
BamHI	Bacillus amyloliquefacies HI
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell CLL/ lymphoma 2
BCR	B cell receptor
Bcl-w	Bcl-2-like 2 protein
Bcl-x	Bcl-2 like 1
Bcl-XL	Bcl-2 related protein, long isoform
Bfl-1	Bcl-2 related gene expressed in fetal liver

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

bdg	binding
Bgl II	Bacillus globigii
BH	Bcl-2 homology
BH3-only	Bcl-2 homology 3 only
Bid	BH3-interacting-domain death agonist
Bim	Bcl-2-interacting mediator of cell death
Blimp-1	B lymphocyte induced maturation protein 1
bzw.	Beziehungsweise
C-	Carboxyterminal
Caspase	Cysteinyl Aspartat Proteasen
Cbl	casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
cEBPbeta	CCAAT/ enhancer binding protein beta
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalievirus
CHX	Cycloheximid
COS-7	cercopithecusaethiops, origin defective SV-40
DAG	Diaclglycerin
DAXX	death domain associated protein
DD	death domain
dd	doppelt destiliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIABLO	direct IAP binding protein with low PI
DISC	death inducing signaling complex
DIVA	death inducing vBcl-2/ Apaf-1 binding protein

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

DMEM	dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	dominant negative
DN	Double negative
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	2'Didesoxyribonukleosid 5'Triphosphat
DP	double positive
dpc	days post conceptionem
DTT	Dithiotretiol
DUB	deubiquitinatin enzyme
ECL	Enhanced Chemolumineszenz
EcoRI	Escherichia coli Nuklease I aus Stamm R
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGR 2	Early growth response 2
env	envelope
ENaC	epithelial natrium channel
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	endoplasmatic reticulum associated degradation
Erk	extracellular signal related kinase
E6-AP	E6 associated protein
EYZ	enhanced yellow fluorescent/ zeocin protein
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zellsortierer
FADD	fas associated death domain
FasL	fatty acid synthetase ligand
FasR	fatty acid synthetase receptor
FCS	fetal calf serum

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

g	gramm
gag	group specific antigen
G/ C	Guanin/ Cytosin
GFP	green fluorescent protein
GSK-3beta	Glycogen Synthase Kinase 3 beta
HA	Hämagglutinin
HAUSP	herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease
HectD1	hect domain containing 1
Hect	homologous to E6-AP carboxyl terminus
HEPES	N (2-hydroxyethyl) Peiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HERC	hect and RCC1 domain protein
HtrA2/ Omi	high temperature requirement
HUVEC	human vein endothelial cell
IAP	inhibitor of apoptosis protein
i.d.R.	in der Regel
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
IP ₃	Inositoltriphosphat
IRAK	IL-1 Receptor associated kinase
IRES	intra ribosomal entry Site
JunB	ju-nana for 17 (aus dem japanischen)
kB	kilo (10 ³) Basen
kDA	kilo (10 ³) Dalton
km	kilo (10 ³) Meter

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	long terminal repeat
m	milli (10^{-3})
μ	mikro (10^{-6})
M	Molar
mA	milli Amper
Mcl-1	myeloid cell leukemia 1
MCS	multiple Cloning side
Mdm2	transformed 3T3 cell double minute 2
MEF	mouse embryonic fibroblast
MEM	modified eagle medium
MfeI	Myoplasma fermentas
MFI	mean fluorescent intensity
MHC	major histo compatibility
ml	Milliliter
MPT	mitochondrial transition pore
mRNA	messenger RNA
Mule	mcl-1 ubiquitine ligase E3
MuLV	Murines Leukämievirus
Myc	myeolocytomatosis viral oncogene homolog
n	nano (10^{-9})
N-	Aminoterminal
NEAA	non essetial amino acid
Nedd4-2	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NFkappaB	nuklear factor kappa B

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Noxa	Latein für Schaden
NP-40	Nonident 40
OD	Optische Dichte
Opm	open mind
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBL	peripheral blood lymphocyte
PBS	phosphate buffered sialine
PCR	polymerase chain reaction (Polymersaekettenreaktion)
Pfu	Pyrococcus furiosus
pH	Konzentration der H ⁺ Ionen in einer Lösung
PI3-Kinase	Phosphoinositid 3 Kinase
Pim-1	proviral integration of moloney virus 1
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase C
pol	Polymerase
Puma	p53-upregulated modulator of apoptosis
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
RAG	recombination activating gene
RING	really interesting new gene
RIP	receptor-interacting protein
RIPA	radioactive immune precipitation assay
RNA	ribonukleicacid
ROS	radical oxygen species
rpm	rounds per minute
RPMI	roswell Park Memorial Institute
rRV	rekombinante Retroviren

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	silencingRNA
SMAC	second mitochondrial activator of caspases
Smurf1	ssmad ubiquitination regulator factor 1
SP	single positive
T-	Thymus
TAE	Tri-Acetat-EDTA-Puffer
tBid	tranquiertes Bid
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline Tween
TCR	T cell receptor
TEMED	Terta-Methyl-Ethylen-Diamin
Th	T Helper
TNF	tumor necrosis factor
TNFR1	tumor necrosis factor receptor 1
TRADD	TNF-receptor associated death domain
TRIS	N,N,N-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TWEEN	Polyoxymethylen-Sorbitan-Monolaureat
UV	Ultra Violett
VSV	Vesiikuläres Stomatitis Virus
wt	wildtypisch
XhoI	Xantomonas holcicola

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Y2H	Yeast Two Hybrid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

EIN-BUCHSTABENKODIERUNG FÜR AMINOSÄUREN

VIII. Ein-Buchstabenkodierung für Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

LITERATURVERZEICHNIS

IX. Literaturverzeichnis

Verzeichnis wissenschaftlicher Artikel:

1. Adams, J. M. and S. Cory (2001). "Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family." Trends Biochem Sci **26**(1): 61-66.
2. Adams, J. M. and S. Cory (2007). "The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy." Oncogene **26**(9): 1324-1337.
3. Adhikary, S., F. Marinoni, et al. (2005). "The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation." Cell **123**(3): 409-421.
4. Akgul, C., D. A. Moulding, et al. (2000). "In vivo localisation and stability of human Mcl-1 using green fluorescent protein (GFP) fusion proteins." FEBS Lett **478**(1-2): 72-76.
5. Amerik, A. Y. and M. Hochstrasser (2004). "Mechanism and function of deubiquitinating enzymes." Biochim Biophys Acta **1695**(1-3): 189-207.
6. Arndt, V., N. Dick, et al. (2010). "Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance." Curr Biol **20**(2): 143-148.
7. Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**(5381): 1305-1308.
8. Bekes, M. and G. S. Salvesen (2009). "The CULt of caspase-8 ubiquitination." Cell **137**(4): 604-606.
9. Best, S. M. (2008). "Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row." Annu Rev Microbiol **62**: 171-192.
10. Beverly, L. J. and H. E. Varmus (2009). "MYC-induced myeloid leukemogenesis is accelerated by all six members of the antiapoptotic BCL family." Oncogene **28**(9): 1274-1279.
11. Bingle, C. D., R. W. Craig, et al. (2000). "Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death." J Biol Chem **275**(29): 22136-22146.
12. Botero-Velez, M., J. J. Curtis, et al. (1994). "Brief report: Liddle's syndrome revisited--a disorder of sodium reabsorption in the distal tubule." N Engl J Med **330**(3): 178-181.
13. Breitschopf, K., A. M. Zeiher, et al. (2000). "Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bid. A functional consequence on apoptosis induction." J Biol Chem **275**(28): 21648-21652.
14. Brien, G., A. L. Debaud, et al. (2009). "C-terminal residues regulate localization and function of the antiapoptotic protein Bfl-1." J Biol Chem **284**(44): 30257-30263.
15. Carrio, R., M. Lopez-Hoyos, et al. (1996). "A1 demonstrates restricted tissue distribution during embryonic development and functions to protect against cell death." Am J Pathol **149**(6): 2133-2142.
16. Certo, M., V. Del Gaizo Moore, et al. (2006). "Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members." Cancer Cell **9**(5): 351-365.
17. Chen, A., B. Gao, et al. (2009). "The HECT-type E3 ubiquitin ligase AIP2 inhibits activation-induced T-cell death by catalyzing EGR2 ubiquitination." Mol Cell Biol **29**(19): 5348-5356.
18. Chen, C. and H. Okayama (1987). "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA." Mol Cell Biol **7**(8): 2745-2752.

LITERATURVERZEICHNIS

19. Chen, L., S. N. Willis, et al. (2005). "Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function." Mol Cell **17**(3): 393-403.
20. Chen, D., N. Kon, et al. (2005). "ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor." Cell **121**(7): 1071-1083.
21. Chinnaiyan, A. M. (1999). "The apoptosome: heart and soul of the cell death machine." Neoplasia **1**(1): 5-15.
22. Choi, S. S., I. C. Park, et al. (1995). "A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow." Oncogene **11**(9): 1693-1698.
23. Clohessy, J. G., J. Zhuang, et al. (2006). "Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis." J Biol Chem **281**(9): 5750-5759.
24. Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." Nat Rev Cancer **2**(9): 647-656.
25. D'Sa-Eipper, C. and G. Chinnadurai (1998). "Functional dissection of Bfl-1, a Bcl-2 homolog: anti-apoptosis, oncogene-cooperation and cell proliferation activities." Oncogene **16**(24): 3105-3114.
26. D'Sa-Eipper, C., T. Subramanian, et al. (1996). "bfl-1, a bcl-2 homologue, suppresses p53-induced apoptosis and exhibits potent cooperative transforming activity." Cancer Res **56**(17): 3879-3882.
27. Day, C. L., C. Smits, et al. (2008). "Structure of the BH3 domains from the p53-inducible BH3-only proteins Noxa and Puma in complex with Mcl-1." J Mol Biol **380**(5): 958-971.
28. Dimmeler, S., K. Breitschopf, et al. (1999). "Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway." J Exp Med **189**(11): 1815-1822.
29. Ding, Q., X. He, et al. (2007). "Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization." Mol Cell Biol **27**(11): 4006-4017.
30. Dohnal, A. M., A. Inthal, et al. (2006). "Leukemia-associated antigenic isoforms induce a specific immune response in children with T-ALL." Int J Cancer **119**(12): 2870-2877.
31. Donepudi, M. and M. G. Grutter (2002). "Structure and zymogen activation of caspases." Biophys Chem **101-102**: 145-153.
32. Du, C., M. Fang, et al. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." Cell **102**(1): 33-42.
33. Duriez, P. J., F. Wong, et al. (2000). "A1 functions at the mitochondria to delay endothelial apoptosis in response to tumor necrosis factor." J Biol Chem **275**(24): 18099-18107.
34. Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicol Pathol **35**(4): 495-516.
35. Fan, G., M. J. Simmons, et al. (2010). "Defective ubiquitin-mediated degradation of antiapoptotic Bfl-1 predisposes to lymphoma." Blood **115**(17): 3559-3569.
36. Fang, D., C. Elly, et al. (2002). "Dysregulation of T lymphocyte function in itchy mice: a role for Itch in TH2 differentiation." Nat Immunol **3**(3): 281-287.
37. Fiers, W., R. Beyaert, et al. (1999). "More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage." Oncogene **18**(54): 7719-7730.

LITERATURVERZEICHNIS

38. Fouladkou, F., C. Lu, et al. (2010). "The ubiquitin ligase Nedd4-1 is required for heart development and is a suppressor of thrombospondin-1." J Biol Chem **285**(9): 6770-6780.
39. Fuentes-Prior, P. and G. S. Salvesen (2004). "The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition." Biochem J **384**(Pt 2): 201-232.
40. Fukuchi, M., Y. Fukai, et al. (2002). "High-level expression of the Smad ubiquitin ligase Smurf2 correlates with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma." Cancer Res **62**(24): 7162-7165.
41. Garrido, C., L. Galluzzi, et al. (2006). "Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria." Cell Death Differ **13**(9): 1423-1433.
42. Glick, D., S. Barth, et al. (2010). "Autophagy: cellular and molecular mechanisms." J Pathol **221**(1): 3-12.
43. Green, D. R. and G. Kroemer (2004). "The pathophysiology of mitochondrial cell death." Science **305**(5684): 626-629.
44. Green, D. R. and J. C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." Science **281**(5381): 1309-1312.
45. Grumont, R. J., I. J. Rourke, et al. (1999). "Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis." Genes Dev **13**(4): 400-411.
46. Hamasaki, A., F. Sendo, et al. (1998). "Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene." J Exp Med **188**(11): 1985-1992.
47. Han, J., L. A. Goldstein, et al. (2007). "Functional linkage between NOXA and Bim in mitochondrial apoptotic events." J Biol Chem **282**(22): 16223-16231.
48. Hansson, J. H., C. Nelson-Williams, et al. (1995). "Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome." Nat Genet **11**(1): 76-82.
49. Harris, J. E., K. D. Bishop, et al. (2004). "Early growth response gene-2, a zinc-finger transcription factor, is required for full induction of clonal anergy in CD4+ T cells." J Immunol **173**(12): 7331-7338.
50. Hatakeyama, S., A. Hamasaki, et al. (1998). "Multiple gene duplication and expression of mouse bcl-2-related genes, A1." Int Immunol **10**(5): 631-637.
51. Haupt, Y., R. Maya, et al. (1997). "Mdm2 promotes the rapid degradation of p53." Nature **387**(6630): 296-299.
52. Heissmeyer, V., F. Macian, et al. (2004). "Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins." Nat Immunol **5**(3): 255-265.
53. Hernandez, J.A., Rodriguez, A.E., Gonzalez, M., Benito, R., Fontanillo, C., Sandoval, V., Romero, M., Martin-Nunez, G., de Coca, A.G., Fisac, R., et al. (2009). A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. Haematologica **94**, 364-371.
54. Herold, M. J., J. Zeitz, et al. (2006). "The stability and anti-apoptotic function of A1 are controlled by its C terminus." J Biol Chem **281**(19): 13663-13671.
55. Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-479.
56. Hicke, L. and R. Dunn (2003). "Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 141-172.

LITERATURVERZEICHNIS

57. Hill, M. M., C. Adrain, et al. (2004). "Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes." EMBO J **23**(10): 2134-2145.
58. Hotchkiss, R. S., A. Strasser, et al. (2009). "Cell death." N Engl J Med **361**(16): 1570-1583.
59. Hsu, H., J. Xiong, et al. (1995). "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation." Cell **81**(4): 495-504.
60. Huang, D. C. and A. Strasser (2000). "BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death." Cell **103**(6): 839-842.
61. Jin, Z., Y. Li, et al. (2009). "Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling." Cell **137**(4): 721-735.
62. Karsan, A., E. Yee, et al. (1996). "Endothelial cell death induced by tumor necrosis factor-alpha is inhibited by the Bcl-2 family member, A1." J Biol Chem **271**(44): 27201-27204.
63. Kaufmann, T., A. Schinzel, et al. (2004). "Bcl-w(edding) with mitochondria." Trends Cell Biol **14**(1): 8-12.
64. Kaufmann, T., S. Schlipf, et al. (2003). "Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane." J Cell Biol **160**(1): 53-64.
65. Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.
66. Kim, H., Y. N. Kim, et al. (2005). "Oxidative stress attenuates Fas-mediated apoptosis in Jurkat T cell line through Bfl-1 induction." Oncogene **24**(7): 1252-1261.
67. Kim, H., H. C. Tu, et al. (2009). "Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis." Mol Cell **36**(3): 487-499.
68. Kirkin, V., D. G. McEwan, et al. (2009). "A role for ubiquitin in selective autophagy." Mol Cell **34**(3): 259-269.
69. Kischkel, F. C., S. Hellbardt, et al. (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." EMBO J **14**(22): 5579-5588.
70. Knodel, M., A. W. Kuss, et al. (1999). "Reversal of Blimp-1-mediated apoptosis by A1, a member of the Bcl-2 family." Eur J Immunol **29**(9): 2988-2998.
71. Ko, J. K., M. J. Lee, et al. (2003). "Bfl-1S, a novel alternative splice variant of Bfl-1, localizes in the nucleus via its C-terminus and prevents cell death." Oncogene **22**(16): 2457-2465.
72. Koga, H. and A. M. Cuervo (2010). "Chaperone-mediated autophagy dysfunction in the pathogenesis of neurodegeneration." Neurobiol Dis.
73. Kozopas, K. M., T. Yang, et al. (1993). "MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3516-3520.
74. Krammer, P. H. (2000). "CD95's deadly mission in the immune system." Nature **407**(6805): 789-795.
75. Kubbutat, M. H., S. N. Jones, et al. (1997). "Regulation of p53 stability by Mdm2." Nature **387**(6630): 299-303.

LITERATURVERZEICHNIS

76. Kucharczak, J. F., M. J. Simmons, et al. (2005). "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 **12**(9): 1225-1239.
77. Kuss, A. W., M. Knodel, et al. (1999). "A1 expression is stimulated by CD40 in B cells and rescues WEHI 231 cells from anti-IgM-induced cell death." Eur J Immunol **29**(10): 3077-3088.
78. Kuwana, T., L. Bouchier-Hayes, et al. (2005). "BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly." Mol Cell **17**(4): 525-535.
79. Lama, D. and R. Sankararamkrishnan (2008). "Anti-apoptotic Bcl-XL protein in complex with BH3 peptides of pro-apoptotic Bak, Bad, and Bim proteins: comparative molecular dynamics simulations." Proteins **73**(2): 492-514.
80. Letai, A., M. C. Bassik, et al. (2002). "Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics." Cancer Cell **2**(3): 183-192.
81. Li, W., M. H. Bengtson, et al. (2008). "Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling." PLoS One **3**(1): e1487.
82. Li, W., Q. Yang, et al. (2010). "Chaperone-mediated autophagy: machinery, regulation and biological consequences." Cell Mol Life Sci.
83. Lin, E. Y., C. A. Kozak, et al. (1997). "The bcl-2 family member, Bcl2a1, maps to mouse chromosome 9 and human chromosome 15." Mamm Genome **8**(4): 293-294.
84. Lin, E. Y., A. Orlofsky, et al. (1993). "Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2." J Immunol **151**(4): 1979-1988.
85. Liu, X., S. Dai, et al. (2003). "The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function." Immunity **19**(3): 341-352.
86. Locksley, R. M., N. Killeen, et al. (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." Cell **104**(4): 487-501.
87. Mandal, M., C. Borowski, et al. (2005). "The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival." J Exp Med **201**(4): 603-614.
88. Martinvalet, D., P. Zhu, et al. (2005). "Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis." Immunity **22**(3): 355-370.
89. Meek, D. W. and T. R. Hupp (2010). "The regulation of MDM2 by multisite phosphorylation--opportunities for molecular-based intervention to target tumours?" Semin Cancer Biol **20**(1): 19-28.
90. Melino, G. (2001). "The Sirens' song." Nature **412**(6842): 23.
91. Metzger, M.B., Hristova, V.A., and Weissman, A.M. (2012). HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. J Cell Sci **125**, 531-537.
92. Moldoveanu, T., Q. Liu, et al. (2006). "The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site." Mol Cell **24**(5): 677-688.
93. Nedelsky, N. B., P. K. Todd, et al. (2008). "Autophagy and the ubiquitin-proteasome system: collaborators in neuroprotection." Biochim Biophys Acta **1782**(12): 691-699.

LITERATURVERZEICHNIS

94. Nicholson, D. W. (1999). "Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death." Cell Death Differ **6**(11): 1028-1042.
95. Nieborowska-Skorska, M., G. Hoser, et al. (2002). "Complementary functions of the antiapoptotic protein A1 and serine/threonine kinase pim-1 in the BCR/ABL-mediated leukemogenesis." Blood **99**(12): 4531-4539.
96. Oh, K. J., S. Barbuto, et al. (2006). "A membrane-targeted BID BCL-2 homology 3 peptide is sufficient for high potency activation of BAX in vitro." J Biol Chem **281**(48): 36999-37008.
97. Olsson, A., M. Norberg, et al. (2007). "Upregulation of bfl-1 is a potential mechanism of chemoresistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia." Br J Cancer **97**(6): 769-777.
98. Opferman, J. T. and S. J. Korsmeyer (2003). "Apoptosis in the development and maintenance of the immune system." Nat Immunol **4**(5): 410-415.
99. Orenstein, S. J. and A. M. Cuervo (2010). "Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance." Semin Cell Dev Biol **21**(7): 719-726.
100. Orlofsky, A., M. S. Berger, et al. (1991). "Novel expression pattern of a new member of the MIP-1 family of cytokine-like genes." Cell Regul **2**(5): 403-412.
101. Petros, A. M., E. T. Olejniczak, et al. (2004). "Structural biology of the Bcl-2 family of proteins." Biochim Biophys Acta **1644**(2-3): 83-94.
102. Piva, R., E. Pellegrino, et al. (2006). "Functional validation of the anaplastic lymphoma kinase signature identifies CEBPB and BCL2A1 as critical target genes." J Clin Invest **116**(12): 3171-3182.
103. Ren, D., H. C. Tu, et al. (2010). "BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program." Science **330**(6009): 1390-1393.
104. Rotin, D. and S. Kumar (2009). "Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(6): 398-409.
105. Russo, C. J., E. Melista, et al. (2005). "Association of NEDD4L ubiquitin ligase with essential hypertension." Hypertension **46**(3): 488-491.
106. Ryoo, H. D., A. Bergmann, et al. (2002). "Regulation of Drosophila IAP1 degradation and apoptosis by reaper and ubcd1." Nat Cell Biol **4**(6): 432-438.
107. Safford, M., S. Collins, et al. (2005). "Egr-2 and Egr-3 are negative regulators of T cell activation." Nat Immunol **6**(5): 472-480.
108. Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467.
109. Sattler, M., H. Liang, et al. (1997). "Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis." Science **275**(5302): 983-986.
110. Scaffidi, C., S. Fulda, et al. (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." EMBO J **17**(6): 1675-1687.
111. Schimmer, A. D. (2004). "Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice." Cancer Res **64**(20): 7183-7190.

LITERATURVERZEICHNIS

112. Shimazu, T., K. Degenhardt, et al. (2007). "NBK/BIK antagonizes MCL-1 and BCL-XL and activates BAK-mediated apoptosis in response to protein synthesis inhibition." Genes Dev **21**(8): 929-941.
113. Shimkets, R. A., D. G. Warnock, et al. (1994). "Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel." Cell **79**(3): 407-414.
114. Simmons, M. J., G. Fan, et al. (2008). "Bfl-1/A1 functions, similar to Mcl-1, as a selective tBid and Bak antagonist." Oncogene **27**(10): 1421-1428.
115. Snyder, P. M. (2009). "Down-regulating destruction: phosphorylation regulates the E3 ubiquitin ligase Nedd4-2." Sci Signal **2**(79): pe41.
116. Somogyi, R. D., Y. Wu, et al. (2001). "Transient expression of the Bcl-2 family member, A1-a, results in nuclear localization and resistance to staurosporine-induced apoptosis." Cell Death Differ **8**(8): 785-793.
117. Soneoka, Y., P. M. Cannon, et al. (1995). "A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors." Nucleic Acids Res **23**(4): 628-633.
118. Srinivasula, S. M., A. Saleh, et al. (2001). "Isolation and assay of caspases." Methods Cell Biol **66**: 1-27.
119. Stanton, B. R., A. S. Perkins, et al. (1992). "Loss of N-myc function results in embryonic lethality and failure of the epithelial component of the embryo to develop." Genes Dev **6**(12A): 2235-2247.
120. Stewart, D. P., B. Koss, et al. (2010). "Ubiquitin-independent degradation of antiapoptotic MCL-1." Mol Cell Biol **30**(12): 3099-3110.
121. Strasser, A. (2005). "The role of BH3-only proteins in the immune system." Nat Rev Immunol **5**(3): 189-200.
122. Suzuki, M., R. J. Youle, et al. (2000). "Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization." Cell **103**(4): 645-654.
123. Tang, J., L. K. Qu, et al. (2006). "Critical role for Daxx in regulating Mdm2." Nat Cell Biol **8**(8): 855-862.
124. Tarte, K., M. Jourdan, et al. (2004). "The Bcl-2 family member Bfl-1/A1 is strongly repressed in normal and malignant plasma cells but is a potent anti-apoptotic factor for myeloma cells." Br J Haematol **125**(3): 373-382.
125. Tomayko, M. M. and M. P. Cancro (1998). "Long-lived B cells are distinguished by elevated expression of A1." J Immunol **160**(1): 107-111.
126. Tomayko, M. M., J. A. Punt, et al. (1999). "Expression of the Bcl-2 family member A1 is developmentally regulated in T cells." Int Immunol **11**(11): 1753-1761.
127. Trescol-Biemont, M. C., C. Vershelde, et al. (2004). "Regulation of A1/Bfl-1 expression in peripheral splenic B cells." Biochimie **86**(4-5): 287-294.
128. Ulleras, E., M. Karlberg, et al. (2008). "NFAT but not NF-kappaB is critical for transcriptional induction of the prosurvival gene A1 after IgE receptor activation in mast cells." Blood **111**(6): 3081-3089.

LITERATURVERZEICHNIS

129. van Loo, G., M. van Gurp, et al. (2002). "The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity." Cell Death Differ **9**(1): 20-26.
130. Verschelde, C., D. Michonneau, et al. (2006). "Overexpression of the antiapoptotic protein A1 promotes the survival of double positive thymocytes awaiting positive selection." Cell Death Differ **13**(7): 1213-1221.
131. Vogler, M., M. Butterworth, et al. (2009). "Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia." Blood **113**(18): 4403-4413.
132. Wajant, H. (2002). "The Fas signaling pathway: more than a paradigm." Science **296**(5573): 1635-1636.
133. Walensky, L. D., K. Pitter, et al. (2006). "A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX." Mol Cell **24**(2): 199-210.
134. Wang, C. Y., D. C. Guttridge, et al. (1999). "NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis." Mol Cell Biol **19**(9): 5923-5929.
135. Wen, R., Y. Chen, et al. (2003). "Phospholipase Cgamma2 provides survival signals via Bcl2 and A1 in different subpopulations of B cells." J Biol Chem **278**(44): 43654-43662.
136. Werner, A. B., E. de Vries, et al. (2002). "Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit its collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax." J Biol Chem **277**(25): 22781-22788.
137. Wilkinson, K. D. (2000). "Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome." Semin Cell Dev Biol **11**(3): 141-148.
138. Willis, S. N. and J. M. Adams (2005). "Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis." Curr Opin Cell Biol **17**(6): 617-625.
139. Willis, S. N., L. Chen, et al. (2005). "Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins." Genes Dev **19**(11): 1294-1305.
140. Willis, S. N., J. I. Fletcher, et al. (2007). "Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak." Science **315**(5813): 856-859.
141. Wilson, R., L. Goyal, et al. (2002). "The DIAP1 RING finger mediates ubiquitination of Dronc and is indispensable for regulating apoptosis." Nat Cell Biol **4**(6): 445-450.
142. Xiang, Z., C. Moller, et al. (2006). "IgE-receptor activation induces survival and Bfl-1 expression in human mast cells but not basophils." Allergy **61**(9): 1040-1046.
143. Yang, B., D. L. Gay, et al. (2008). "Nedd4 augments the adaptive immune response by promoting ubiquitin-mediated degradation of Cbl-b in activated T cells." Nat Immunol **9**(12): 1356-1363.
144. Yang, W. L., X. Zhang, et al. (2010). "Emerging role of Lys-63 ubiquitination in protein kinase and phosphatase activation and cancer development." Oncogene **29**(32): 4493-4503.
145. Yoon, S. Y., Y. Lee, et al. (2005). "Over-expression of human UREB1 in colorectal cancer: HECT domain of human UREB1 inhibits the activity of tumor suppressor p53 protein." Biochem Biophys Res Commun **326**(1): 7-17.
146. Youle, R. J. and A. Strasser (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 47-59.

LITERATURVERZEICHNIS

147. Zhao, M., M. Qiao, et al. (2004). "Smurf1 inhibits osteoblast differentiation and bone formation in vitro and in vivo." J Biol Chem **279**(13): 12854-12859.
148. Zhao, X., J. I. Heng, et al. (2008). "The HECT-domain ubiquitin ligase Huwe1 controls neural differentiation and proliferation by destabilizing the N-Myc oncoprotein." Nat Cell Biol **10**(6): 643-653.
149. Zhong, Q., W. Gao, et al. (2005). "Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis." Cell **121**(7): 1085-1095.
150. Zohn, I. E., K. V. Anderson, et al. (2007). "The Hectd1 ubiquitin ligase is required for development of the head mesenchyme and neural tube closure." Dev Biol **306**(1): 208-221.

Sonstige Quellenangaben:

1. Cellular and Molecular Immunology, Sixth Edition, Abdul K. Abbas; Andrew H. Lichtmann, 2007 Elsevier Saunders
2. Langer Manuel (2009), Analyse der Instabilität und Funktionalität des Anti-Apoptose-Proteins A1; Dissertation. Universität Würzburg, Medizinische Fakultät; Oktober 2009
3. Rosendahl Alva (2009); Funktionelle Analyse des anti-apoptotischen Bcl-2 Proteins Bfl-1; Diplomarbeit im Studiengang Biologie; Universität Würzburg; Biologische Fakultät; Januar 2009
4. Siegl Christiene (2009), Analyse der Interaktion des Bcl-2 Familienmitgliedes A1 mit IRAK2 Diplomarbeit im Studiengang Biologie; Universität Würzburg, Biologische Fakultät; August 2009
5. Steinert, A.M. (2006). Etablierung stabiler Transfektanten für funktionelle Analysen des MALT-Gens in t(11;18)(q21;q21)-positiven MALT-Typ-Lymphomen. Dissertation. Universität Würzburg, Medizinische Fakultät

Fußnoten:

Hybricenic Services; 3-5 Impasse Reille, 75014 Paris - France¹

Howard Hughes Medical Institute, Department of Pediatrics, Section of Developmental Biology, University of Colorado at Denver and Health Sciences Center-Fitzsimmons Campus, Aurora, CO 80045, USA.²

LEBENS LAUF

X. Lebenslauf

Schulbildung:

1994 Mittlere Reife
1998 Abitur

Grundwehrdienst:

1998-1999 Wehrdienst bei der Bundeswehr in München und Regensburg

Hochschulbildung:

05/2000-11/2006 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München.
02/2004-2/2005 Anfertigung einer experimentellen medizinischen Doktorarbeit am Max von Pettenkofer Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
12/2006-12/2010 Stipendiat im MD/ PhD-Programm der Universität Würzburg am Institut für Virologie und Immunbiologie.

Promotion:

01/2009 Promotion zum Dr. med. durch die medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem Thema: mRNA Induktion des inaktivierenden Transkriptionsfaktors *klf2* durch bakterielle Pathogene.

Berufliche Tätigkeit:

Seit 02/2011 Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Würzburg (Direktor: Prof. Dr. med. Hermann Einsele)