

Untersuchungen zur Apoptose:
Charakterisierung von mDAP-3,
eines pro-apoptotischen, konservierten,
mitochondrialen Proteins

Dissertation
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Thorsten Berger
aus
Bonn

2001

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2001

Prüfungskommission:

Herr Prof. David (Vorsitz)

Frau Prof. Weiß

Herr Prof. Koop

Herr PD Dr. Eick (Protokoll)

Herr Dr. Kretzler (Gast)

FÜR MEINE MUTTER

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Berger, T., Brigl, M., Herrmann, J.M., Vielhauer, V., Luckow, B., Schlöndorff, D. and Kretzler, M. (2000). The apoptosis mediator mDAP-3 is a novel member of a conserved family of mitochondrial proteins. *J. Cell Sci.*, 113, 3603-3612.

Tagungsbeiträge:

Vorträge:

Berger, T., Herrmann, J.M., Schlöndorff, D. and Kretzler, M. (2000). The Apoptosis Mediator mDAP-3 Is a Novel Member of a Conserved Family of Mitochondrial Proteins. 33st Annual Meeting of the American Society of Nephrology, *J. Am. Soc. Nephrol.*, Vol. 11, 451A, 2373A.

Berger, T., Herrmann, J.M., Schlöndorff, D. and Kretzler, M. (2000). MERM-3, a Novel Murine Renal Apoptosis Mediator, is a Member of an Evolutionary Conserved Family of Mitochondrial Proteins. 31. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, *Kidney Blood Press. Res.*, Vol. 23, No. 3-5, p. 230, 47.

Berger, T., Brigl, M., Vielhauer, V., Schlöndorff, D. and Kretzler, M. (1998). Molecular Characterisation of MERM-3, a Putative Renal Apoptosis Mediator. 31st Annual Meeting of the American Society of Nephrology, *J. Am. Soc. Nephrol.*, Vol. 9, 434A, A2222.

Berger, T., Brigl, M., Vielhauer, V., Schlöndorff, D. and Kretzler, M. (1998). Molecular Characterisation of MERM-3, a Putative Renal Apoptosis Mediator. 29. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, *Kidney Blood Press. Res.*, Vol. 21, No. 2-4, p. 121, 114.

Poster

Berger, T., Herrmann, J.M., Schlöndorff, D. and Kretzler, M. (2001). mDAP-3 a Novel Murine Apoptosis Mediator Belongs to a Conserved Family of Mitochondrial Proteins. Keystone Symposia, Molecular Mechanisms of Apoptosis, p. 76, 123.

Berger, T., Brigl, M., Vielhauer, V., Schlöndorff, D. and Kretzler, M. (1999). MERM-3, a New Renal Mitochondria Associated Apoptosis Mediator. 32nd Annual Meeting of the American Society of Nephrology, *J. Am. Soc. Nephrol.*, Vol. 10, 487A, 2461A.

Berger, T., Brigl, M., Vielhauer, V., Schlöndorff, D. and Kretzler, M. (1999). MERM-3, a New Renal Mitochondria Associated Apoptosis Mediator. 30. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, *Kidney Blood Press. Res.*, Vol. 22, No. 4-6, p. 332, 305.

Die vorliegende Arbeit wurde von August 1997 bis April 2001 in den Forschungslabors der Medizinischen Poliklinik (Direktor Prof. Dr. Detlef Schlöndorff) der Ludwig-Maximilians-Universität in München unter der Anleitung von Dr. med. M. Kretzler durchgeführt.

Die Betreuung und Vertretung vor der Biologische Fakultät übernahm Prof. Dr. C. N. David, Zoologisches Institut, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Die Arbeit wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Ehrenwörtliche Versicherung:

Hiermit erkläre ich, diese Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Thorsten Berger

eingereicht:	14.05.2001
Erstgutachter:	Prof. Dr. Charles N. David
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Elisabeth Weiß
Sondergutachter:	Dr. Matthias Kretzler

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
VERWENDETE ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN	4
ZUSAMMENFASSUNG.....	6
1 EINLEITUNG.....	8
1.1 ALLGEMEINE BEDEUTUNG DER APOPTOSE	8
1.2 KONTROLLE DER APOPTOSE	8
1.2.1 Apoptosekontrolle bei <i>C. elegans</i>	9
1.2.2 Caspasen.....	10
1.2.3 Aktivierung von Caspasen, Signaltransduktion in der Apoptose	12
1.2.4 Bcl-2 Familienmitglieder und Apoptose	14
1.2.5 Zwei unterschiedliche apoptotische Signaltransduktionswege.....	16
1.3 APOPTOSE UND MITOCHONDRIEN	18
1.3.1 Überblick über die mitochondriale Physiologie und Struktur	18
1.3.2 Mitochondrien als Reservoir pro-apoptotischer Proteine	21
1.3.3 Der Permeability Transition Pore Komplex	22
1.4 ISOLIERUNG (ENTDECKUNG) VON MERM-3 UND DAP-3.....	25
1.4.1 Isolierung neuer muriner embryonaler Nieren-Marker Genprodukte (MERM).....	25
1.4.2 Death Associated Protein 3 (DAP-3).....	27
1.5 AUFGABENSTELLUNG UND ZIELE DER VORLIEGENDEN ARBEIT	28
2 MATERIAL UND METHODEN	29
2.1 CHEMIKALIEN, MEDIENZUSÄTZE UND ANTIKÖRPER.....	29
2.1.1 Chemikalien und Medienzusätze.....	29
2.1.2 Verwendete Antibiotika.....	30
2.1.3 Verwendete Antikörper	30
2.2 BIOLOGISCHES MATERIAL	31
2.3 SPEZIELLE PUFFER.....	31
2.4 METHODEN	31
2.4.1 DNA-Sequenzanalyse.....	31
2.4.2 Protein-Sequenzanalyse.....	32
2.4.3 RNA Isolierung aus Gewebe und Zellkulturmaterial	32
2.4.4 Die Polymerase Chain Reaction (PCR).....	34
2.4.5 Northern-Blot.....	35
2.4.6 Kultivierung und Lagerung von <i>Escherichia coli</i> und <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
2.4.7 Plasmid-Konstruktion.....	38
2.4.8 Säugerzellkultivierung	41
2.4.9 Standard-Hefekultur	42
2.4.10 Transiente Transfektion.....	43
2.4.11 Proteinsolubilisierung	43
2.4.12 Proteinbestimmung.....	43
2.4.13 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
2.4.14 Western Blot	45
2.4.15 Apoptose Induktionsmethoden	46
2.4.16 Apoptose Nachweis-Assays.....	47
2.4.17 Zellorganell Färbung	48
2.4.18 Mitochondrien-Isolierung aus Ratten- und Mäuseleber	49
2.4.19 Zellfraktionierung von Zellkulturmaterial	51
2.4.20 Digitoninbehandlung isolierter Mitochondrien	51
2.4.21 Alkalische Proteinfractionierung.....	52
2.4.22 TCA-Fällung.....	52
3 ERGEBNISSE.....	53
3.1 MDAP-3 SEQUENZANALYSE.....	53

3.1.1	Northern Blot zur Bestimmung der Länge der mDAP-3 cDNA	53
3.1.2	Sequenzanalyse der mDAP-3 cDNA	54
3.1.3	Analyse der Proteinsequenz von mDAP-3	56
3.2	HOMOLOGIE VON MDAP-3 ZU ANDEREN GENEN	61
3.2.1	hDAP-3 (Death Associated Protein 3).....	62
3.2.2	Ionizing Radiation Resistance Confering Gene (IRRCG).....	63
3.2.3	Drosophila melanogaster CG3633 Gen Produkt	63
3.2.4	C. elegans cec14a_4.2 Gen Produkt.....	63
3.2.5	Hypothetisches Saccharomyces cerevisiae Protein YGL129c	64
3.2.6	Zusammenfassung der Homologie von mDAP-3 zu anderen Genen	64
3.3	MDAP-3 mRNA VERTEILUNG.....	66
3.3.1	Northern-Blot-Analyse zur Organverteilung der mDAP-3 mRNA.....	66
3.3.2	In situ-Hybridisierung	67
3.4	ETABLIERUNG UND EVALUIERUNG VERSCHIEDENER APOPTOSE NACHWEISMETHODEN	67
3.4.1	Bestimmung des DNA-Gehaltes mit Propidiumiodid (PI)	68
3.4.2	Annexin-V-FLUOS-Färbung	69
3.4.3	DNA-Fragmentierung (DNA-Leiter)	70
3.5	ETABLIERUNG DER APOPTOSEINDUKTION IN MMC UND MTC.....	71
3.5.1	Stimulation von MMC mit IFN- γ , TNF- α , oder Fas-Ak.....	72
3.5.2	Fas-Expression durch IFN- γ und TNF- α Stimulation von MMC und MTC	73
3.5.3	Apoptoseinduktion in MMC und MTC durch IFN- γ , TNF- α und Fas-Ak Stimulation	74
3.6	ANALYSE DER MDAP-3 EXPRESSION IN APOPTOTISCHEN ZELLEN.....	75
3.6.1	mDAP-3 mRNA-Expression nach Apoptosestimulation	76
3.6.2	mDAP-3 Protein-Expression nach Apoptosestimulation	77
3.7	ANALYSE DER MDAP-3-FUNKTION DURCH TRANSIENTE ÜBEREXPRESSION	79
3.7.1	Expression eines mDAP-3/EGFP-Fusionsproteines	80
3.7.2	Apoptoseinduktion in MMCs durch transiente Überexpression des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteines.....	81
3.7.3	Ein funktioneller P-Loop ist essentiell für die Apoptoseinduktion durch mDAP-3	82
3.7.4	mDAP-3 Überexpression bewirkt die Freisetzung von Cytochrom c	83
3.8	LOKALISATION VON MDAP-3	84
3.8.1	Computer gestützte Vorhersage der intrazellulären DAP-3 Lokalisation	84
3.8.2	Subzelluläre Lokalisation des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteines	85
3.8.3	Mito-Tracker-Red CMXRos TM Färbung	87
3.8.4	Lyso-Tracker-Red TM Färbung.....	89
3.8.5	Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie	90
3.8.6	Mitochondriale Lokalisation des endogenen mDAP-3 durch Zellfraktionierung.....	92
3.8.7	DAP-3 bleibt bei Apoptose mitochondrial lokalisiert.....	97
3.8.8	Eine konservierte N-terminale Sequenz ist verantwortlich für die mitochondriale Lokalisation von mDAP-3 99	
3.9	CHARAKTERISIERUNG DES HEFE MDAP-3 HOMOLOGS	107
3.9.1	YGL129c Nullmutation führt zu mtDNA-Verlust	108
3.9.2	mDAP-3 Transfektion rettet den mtDNA-Verlust der yDAP-3 Nullmutanten.....	109
4	DISKUSSION	111
4.1	ETABLIERUNG VON APOPTOSE- INDUKTION UND -NACHWEIS	111
4.1.1	IFN- γ induzierte Apoptose in murinen Zelllinien.....	111
4.1.2	Vergleich verschiedener Apoptosenachweisverfahren	112
4.2	MDAP-3 EXPRESSION WÄHREND DER APOPTOSE	113
4.2.1	mDAP-3 mRNA Veränderung während IFN- γ und TNF- α induzierter Apoptose	113
4.2.2	mDAP-3 Protein Veränderung während IFN- γ , TNF- α und Fas-Antikörper induzierter Apoptose 114	
4.3	ÜBEREXPRESSION VON MDAP-3 BESTÄTIGT DIE PRO-APOPTOTISCHE FUNKTION VON MDAP-3	115
4.4	INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON MDAP-3	117
4.4.1	Drei unterschiedliche Experimente bestätigen die mitochondriale Lokalisation	117
4.4.2	Das Volllänge mDAP-3 Protein ist für eine Proteininteraktion notwendig.....	117
4.5	IDENTIFIZIERUNG EINER ZWEITEN PHYLOGENETISCH ÄLTEREN FUNKTION DER DAP-3 PROTEINE	118
4.6	MÖGLICHE EINORDNUNG DER DAP-3 FUNKTION IN DIE APOPTOSE	120
4.6.1	Regulation der dualen DAP-3 Funktion	120
4.6.2	Interagiert DAP-3 mit dem Glucocorticoid-Rezeptor ?.....	122
4.6.3	DAP-3 ist ein mitochondriales ribosomales Protein	123

4.7	AUSBLICK	126
5	ANHANG.....	128
5.1	SEQUENZEN DER VERWENDETEN PCR-PRIMER	128
5.1.1	<i>Site-Directed Mutagenesis Primer.....</i>	<i>128</i>
5.1.2	<i>mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein Primer</i>	<i>128</i>
5.1.3	<i>mDAP-3 Hefeexpression.....</i>	<i>128</i>
5.2	SEQUENZEN DER VERWENDETEN SEQUENZIER-PRIMER	128
5.2.1	<i>Sense Primer.....</i>	<i>128</i>
5.2.2	<i>Antisense Primer.....</i>	<i>129</i>
6	LITERATURVERZEICHNIS	130
	LEBENS LAUF	151
	DANKSAGUNG	153

Verwendete Abkürzungen und Einheiten

ANT	Adenin Nucleotide Translocator
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
Da	Dalton
DD	Death Domain
DEPC	Diethylpyrocarbammat
DIABLO	Direct IAP Binding Protein with Low pI
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FADD	Fas Associated Death Domain protein
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde
HUSAR	Heidelberg Unix Sequence Resource
IAP	Inhibitor of Apoptosis
ICE	Interleukin 1 β -Converting Enzyme
IFN- γ	Interferon- γ
IM	mitochondriale Innenmembran
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobase

l	Liter
M	Molar (= mol/l)
min	Minute
MMC	Maus-Mesangialzellen
mRNA	messenger RNA
MTC	Maus-Tubuluszellen
mtPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transition
OM	mitochondriale Außenmembran
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEI	Polyethylenimin
pH	$-\log c_{H^+}$
PI	Propidiumiodid
RNA	engl. für Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	engl. für Natriumdodecylsulfat
Smac	Second Mitochondria-derived Activator of caspases
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
ÜN	über Nacht
U	unit
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel

Zusammenfassung

Programmierter Zelltod oder Apoptose ist essentiell für die Entwicklung und Homöostase mehrzelliger Organismen. Störungen in der Regulierung dieser Prozesse können zu zahlreichen Erkrankungen führen, unter anderem zu Autoimmunerkrankungen und Krebs. In den letzten Jahren konnte in zahlreichen Arbeiten gezeigt werden, daß Mitochondrien eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Apoptoseprozesse spielen. So wird Cytochrom c, ein Protein aus dem mitochondrialen Intermembranraum, durch einen pro-apoptotischen Stimulus als ein Caspase-Aktivierungsfaktor ins Cytosol freigesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wird die initiale Charakterisierung eines neuen murinen Proteins (mDAP-3) beschrieben. mDAP-3 wurde identifiziert bei dem Versuch molekulare Marker der Nierenentwicklung mit Hilfe einer modifizierten „differential display“ Polymerase Kettenreaktion zu finden. Die 1,7 kb große mDAP-3 mRNA kodiert für ein ca. 45 kDa großes Protein, das als funktionelles Motiv eine ATP/GTP-Bindungsstelle (P-Loop) besitzt. Die Analyse der Aminosäuresequenz von mDAP-3 ergab eine 81 %ige Identität zu dem humanen DAP-3 (Death Associated Protein 3), einem positiven Apoptose Mediator.

Northern-Blot-Analyse von 20 µg Gesamt-RNA aus 11 Organen adulter Mäuse zeigte eine abundante mDAP-3 Expression in Niere, Herz, Leber, Thymus, Muskel, Milz, Darm und Bauch, mit einem Expressionsmaximum in Testis. Eine geringe bis fast fehlende Expression konnte in der Lunge und im Ovar gezeigt werden.

Die Überexpression eines mDAP-3/EGFP Fusionproteins in murinen Mesangialzellen (MMC) führte zu einer Apoptoseinduktion bei $27,6\% \pm 2,6\%$ ($n=3$) der Zellen gegenüber einer Apoptose Inzidenz von $11,9\% \pm 2,8\%$ bei MMCs die mit einem Kontrollvektor transfiziert wurden. Die pro-apoptotische Funktion von mDAP-3 ist dabei abhängig von der Funktionalität des P-Loops. Die Überexpression eines P-Loop mutierten mDAP-3/EGFP Fusionproteins führte zu keiner Apoptoseinduktion. Sowohl das murine als auch das humane DAP-3 bleiben während der Apoptose intra-mitochondrial und werden nicht in das Cytosol freigesetzt.

Für die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von mDAP-3 wurde ebenfalls das mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein verwendet. Murine-Tubuluszellen (MTC) zeigten nach Transfektion mit dem Fusionsprotein ein punktiertes Signal im Fluoreszenz-Mikroskop. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen nach Transfektion mit dem EGFP-Expressionsvektor alleine das für EGFP typische diffuse, zytosolische Fluoreszenzsignal. Sowohl im Fluoreszenz-

Mikroskop als auch im konfokalen Laser-Scann-Mikroskop lokalisierte mDAP-3/EGFP zusammen mit einem mitochondrialen Farbstoff, jedoch nicht mit einem lysosomalen. Diese Ergebnisse weisen auf eine mitochondriale Lokalisation von mDAP-3 hin.

Zellfraktionierungen bestätigten die mitochondriale Lokalisation von mDAP-3. Das endogene mDAP-3 Protein konnte nur in der mitochondrialen Fraktion, nicht jedoch in der endoplasmatischen Reticulum- oder der zytosolischen-Fraktion, nachgewiesen werden. Proteinase-K-Behandlung isolierter Mitochondrien führte zu keiner Reduktion der mDAP-3 Proteinmenge im Western-Blot. Dies ließ auf eine intra-mitochondriale Lokalisation von mDAP-3 schließen. Digitonin-Behandlung isolierter Mitochondrien zeigte eine Freisetzung von mDAP-3 aus den Mitochondrien bei relativ hohen Digitonin Konzentrationen (0,3%). Ganz im Gegensatz dazu wurde Cytochrom c bereits bei 0,075% Digitonin freigesetzt. Diese Daten weisen auf eine mDAP-3 Lokalisation in der mitochondrialen Matrix hin.

Da die DAP-3 Proteinfamilie in Eukaryonten sehr konserviert ist und auch in nicht-apoptotischen Organismen wie *S. cerevisiae* vertreten ist, muß DAP-3 eine weitere Funktion neben der pro-apoptotischen besitzen. Um die Rolle von DAP-3 näher zu definieren wurde eine Disruption des mDAP-3 Hefe-Orthologs YGL129c (yDAP-3) durchgeführt. Die yDAP-3 Nullmutanten zeigten keinen Wachstumsverlust auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie Glycerol oder Lactat. Dies deutet darauf hin, daß yDAP-3 für die mitochondriale Atmung nicht zwingend notwendig ist. Allerdings zeigten Hefen bei einer yDAP-3 Disruption einen signifikanten und progressiven Verlust ihrer mitochondrialen DNA (mtDNA) (46% in Δ yDAP-3 vs. 3% im Wildtyp). Dieser Verlust der mtDNA, der auf eine Funktion von yDAP-3 für die mitochondriale Biogenese hinweist, ließ sich durch eine Transfektion der Δ yDAP-3 Hefen mit dem murinen DAP-3 teilweise verhindern. Damit konnte bewiesen werden, daß die Funktion, die DAP-3 für die Biogenese der Mitochondrien ausübt, unter Eukaryonten konserviert ist.

Diese Daten identifizieren mDAP-3 als einen der ersten pro-apoptotischen Faktoren der mitochondrialen Matrix. Weiterhin kann eine duale Funktion für die Mitglieder der DAP-3 Proteinfamilie postuliert werden. Zum Einen spielen sie eine wichtige, evolutionär konservierte Rolle für die Biogenese von Mitochondrien, zum Anderen besitzen sie in mehrzelligen Organismen eine zusätzliche pro-apoptotische Funktion.

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Bedeutung der Apoptose

Programmierter Zelltod oder Apoptose beschreibt den organisierten Zusammenbruch einer Zelle. Er besteht aus verschiedenen charakteristischen Merkmalen, die unter anderem die Bildung von Membranbläschen, Verkleinerung der Zelle, Proteinfragmentierung, Chromatin-Kondensation, und DNA-Degradation beinhalten. Diese Prozesse enden schließlich in der schnellen Phagozytose der degradierenden, sterbenden Zelle durch angrenzende Zellen. Apoptose ist ein elementarer Bestandteil mehrzelliger Organismen, und das Programm, das den Zelltod steuert, ist in seinen Grundzügen konserviert von einfachen Organismen wie dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* bis hin zu Säugern.

Beim Menschen erfordert der Erhalt des Körpergleichgewichts, daß täglich ca. eine Milliarde Zellen durch Apoptose sterben, nur um die Zahl der Zellen, die durch Mitose neu gebildet werden, auszugleichen. Während der Embryogenese ist Apoptose essentiell an der Entwicklung des Körpers, der Differenzierung der Organe und der Ausbildung einzelner Strukturen, wie z.B. der Finger und Zehen, beteiligt. Sowohl das Nervensystem, als auch das Immunsystem entstehen aus einer Überproduktion von Zellen, gefolgt vom Tod derjenigen Zellen, die nicht in der Lage sind, funktionierende synaptische Verbindungen zu bilden bzw. korrekte Antigenpezifitäten auszubilden. Apoptose ist für die Eliminierung pathogen infizierter Zellen ebenso wichtig wie für die Beseitigung autoreaktiver Immunzellen. Diese Vielzahl an Funktionen mit solch weitreichenden Konsequenzen muß sehr genau kontrolliert werden, denn sowohl zuviel als auch zu wenig Apoptose kann zu Defekten in der Embryogenese, Autoimmunerkrankungen, neurodegenerativen Erkrankungen und Krebs führen. Es ist also nicht überraschend, daß große Anstrengungen unternommen werden, herauszufinden, welche Zellen wann und warum sterben. (bis 2001 wurden weit über 50.000 Fachartikel publiziert).

1.2 Kontrolle der Apoptose

Der Begriff Apoptose wurde geprägt von Curie und Mitarbeitern, die einen häufigen Typ des programmierten Zelltodes wiederholt in verschiedenen Zelltypen beobachteten (Kerr et al., 1972). Sie bemerkten, daß diese sterbenden Zellen Merkmale aufwiesen, die sich deutlich von

denen unterschieden, die für pathologisch veränderte, nekrotische Zellen bekannt waren. Sie schlugen deshalb vor, daß diese gemeinsamen morphologischen Merkmale das Ergebnis eines gemeinsamen, konservierten Zelltodprogrammes sind (Wyllie et al., 1980).

1.2.1 Apoptosekontrolle bei *C. elegans*

Einen wichtiger Beitrag für das Verständnis der Apoptose wurde durch genetische Studien am Nematoden *C. elegans* erzielt. Bei der Embryogenese von *C. elegans* werden nach einem genau zeitlich und räumlich festgelegten Programm eine bestimmte Anzahl an Zellen eliminiert. Die Klonierung der Gene, die für die Steuerung dieses Zelltodprogrammes bei *C. elegans* verantwortlich sind (Ellis and Horvitz, 1986; Horvitz et al., 1983) und die Entdeckung, daß Säuger orthologe Gene mit homologen Funktionen besitzen, bedeutete den Beginn des Verständnisses der apoptotischen Kontrollmechanismen.

Während der normalen Entwicklung von *C. elegans* sterben genau 131 der 1090 somatischen Zellen durch Apoptose. Das Zelltodprogramm von *C. elegans* ist dabei in vier verschiedene Abschnitte unterteilt: die Entscheidungsphase, die Ausführungsphase, die Verschlingungsphase und die Beseitigungsphase (Abbildung 1). Die spezifischen Gene, die für die Entscheidung, ob eine Zelle stirbt oder nicht, verantwortlich sind, sind *ces-1* und *ces-2* (für cell death specification) (Ellis and Horvitz, 1991) und *egl-1* (für egg-laying defective) (Conradt and Horvitz, 1998). Die Gene *ced-3* und *ced-4* (für cell-death abnormal) werden in allen sterbenden Zellen exprimiert. Mutationen mit einem Funktionsverlust in einem dieser Gene führen zum Überleben von Zellen, die ansonsten durch Apoptose gestorben wären (Ellis and Horvitz, 1986). Die negative Regulation der Apoptose in *C. elegans* wird durch das Gen *ced-9* kontrolliert (Hengartner et al., 1992; Shaham and Horvitz, 1996). Mutationen mit einem Funktionsverlust des *ced-9* Gens resultieren deshalb in übermäßigem Zelltod und embryonaler Letalität.

Nachdem die Entscheidung zum Tod einer Zelle gefallen ist, wird die sterbende Zelle durch Nachbarzellen phagozytiert. Ein Defekt für diese Aufnahme der sterbenden Zellen kann durch eine Doppelmutation entstehen. Dazu muß eines der Gene *ced-2*, *ced-5* oder *ced-10* und eines der Gene *ced-1*, *ced-6* oder *ced-7* eine Mutation mit einem Funktionsverlust haben. Schließlich konnte gezeigt werden, daß das Gen *nuc-1* für eine Endonuklease kodiert, die für die Degradation der DNA verantwortlich ist (Ellis et al., 1991).

Das CED-3 Protein ist eine Cystein Protease, oder Caspase (s. 1.2.2.), mit mehreren Säuger-Homologen, und stellt das zentrale Effektormolekül der Apoptose in *C. elegans* dar. CED-4 und CED-3 können über CARD-Domänen (caspase recruitment domain) aneinander binden. Diese Domänen befinden sich am N-Terminus des CED-4 Proteins und in der Pro-Domäne des CED-3 Proteins (Chinnaiyan et al., 1997). CED-4 fungiert dabei als ein Adaptorprotein, das die inaktive CED-3 Procaspase in die aktive Caspase umwandelt. CED-4 ist homolog zu dem Säugerprotein Apaf-1 (Apoptose Protease Aktivierungsfaktor 1) und es konnte gezeigt werden, daß CED-4 sowohl mit CED-9 (homolog zu Bcl-2) als auch mit CED-3 (homolog zu Caspase-3) assoziieren und einen Komplex bilden kann, der dem Apoptosome ähnelt. CED-4 und das Säuger Homolog Apaf-1 spielen somit eine zentrale Rolle im Signaltransduktionsweg der Apoptose, indem sie Proteine der Bcl-2 Familie und die Caspasen biochemisch verbinden (Spector et al., 1997; Zou et al., 1997).

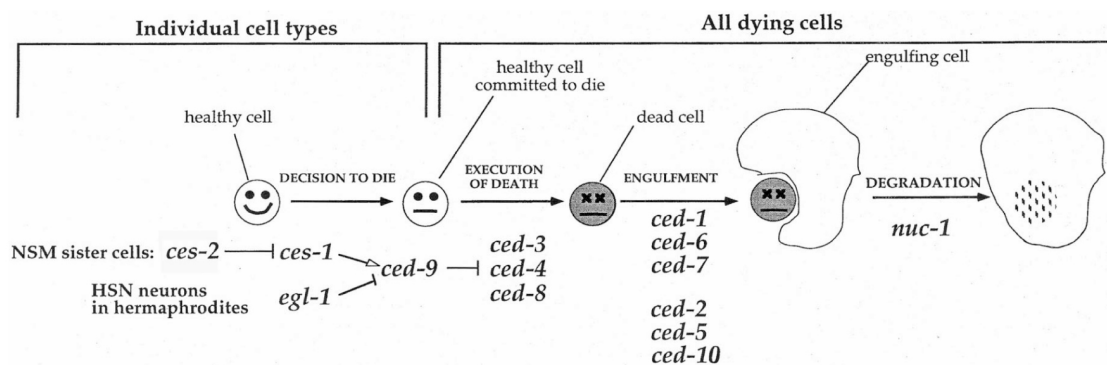


Abbildung 1: Genetische Signaltransduktion der Apoptose in *C. elegans*. Apoptose in *C. elegans* wird von wenigen Genen kontrolliert. Mutationen dieser Gene führen zu Inhibition oder Induktion von Apoptose, je nachdem ob die Gene eine positive Regulation der Apoptose (→) oder eine Inhibition der Apoptose (—|) bewirken. Vier Phasen der Regulation sind beschrieben. Nur in der Entscheidungsphase werden einzelne Gene Zelltyp spezifisch exprimiert. (nach (Desnoyers and Hengartner, 1997)).

1.2.2 Caspasen

Die meisten der von Kerr *et al.* beschriebenen morphologischen Veränderungen werden durch eine Familie von Cystein-Proteasen, die während der Apoptose aktiviert werden, hervorgerufen. Diese Proteasen sind homolog zueinander und gehören zu der großen Proteinfamilie der Caspasen (Alnemri et al., 1996). Der Name Caspase stammt von der „cystein aspartat protease“ Aktivität dieser Proteasefamilie. Caspasen sind im Laufe der Evolution stark konserviert geblieben, und es gibt sie sowohl im Menschen wie auch in Insekten, Nematoden und sogar in Hydra (Budihardjo et al., 1999; Cikala et al., 1999;

Earnshaw et al., 1999). Zur Zeit sind 14 verschiedene Caspasen bekannt, die alle ein konserviertes Cystein im aktiven Zentrum besitzen.

Caspasen werden als inaktive Pro-Enzyme synthetisiert, die aus drei Domänen bestehen, einer N-terminalen Pro-Domäne und einer großen (20 kDa) und einer kleinen (10 kDa) Untereinheit. Die aktive Caspase entsteht durch eine Abspaltung der Pro-Domäne und einer Trennung der kleinen und großen Untereinheit. Sie bildet in allen bisher untersuchten Fällen ein Tetramer, bestehend aus jeweils zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten mit zusammen zwei aktiven Zentren (Abbildung 2 A).

Die Substratspezifität der verschiedenen Caspasen wird durch die vier N-terminal zu der Spaltstelle, dem Aspartat, liegenden Aminosäuren bestimmt (Thornberry et al., 1997). Caspasen können auf Grund von phylogenetischen Untersuchungen in zwei Untergruppen eingeteilt werden. Die eine Gruppe besteht aus den Mitgliedern der ICE Unterfamilie (Caspase-1, -4, -5 und -13), die zweite Unterfamilie der CED-3 ähnlichen Caspasen beinhaltet die Caspase-3, -2, -6, -7, -8, -9 und -10. ICE (Interleukin 1 β -Converting Enzyme, Caspase-1) ist die prototypische Caspase, die zunächst identifiziert worden war als die Protease, die für die proteolytische Spaltung von pro-Interleukin-1 β in das aktive Zytokin verantwortlich ist (Cerretti et al., 1992; Thornberry et al., 1992).

Ungefähr zur gleichen Zeit wurden in dem Nematoden *C. elegans* eine Reihe von Genen entdeckt, die für den Ablauf der Apoptose in diesem einfachen Organismus essentiell sind (s. 1.2.1). Es zeigte sich, daß eines dieser Gene, CED-3, das *C. elegans* Homolog zu dem Säugerprotein ICE war (Xue et al., 1996; Yuan et al., 1993).

Eine mögliche weitere Unterteilung der Caspasen kann nach ihren unterschiedlich großen Pro-Domänen vorgenommen werden. Drei Caspasen (Caspase-3, -6 und -7) besitzen eine kurze- und die übrigen eine lange-Pro-Domäne.

Alternativ ist eine Einteilung der Caspasen auf Grund ihrer Substratspezifität möglich. Danach gibt es drei Gruppen: Gruppe 1 (Caspase-1, -4, -5, -11 und -13) besteht aus Caspasen, die die Erkennungssequenz WEHD für ihre proteolytische Aktivität benötigen, Gruppe 2 besteht aus den Caspasen-2, -3 und -7, sie benötigen die Sequenz DEXD und Gruppe 3 beinhaltet die Caspasen-6, -8, -9, und -10, ihre Signalsequenz ist (IVL)EXD.

1.2.3 Aktivierung von Caspasen, Signaltransduktion in der Apoptose

Drei unterschiedliche Mechanismen für die Aktivierung von Caspasen sind bekannt (Abbildung 2). a) Die meisten Caspasen werden durch eine proteolytische Spaltung der Procaspase nach der Pro-Domäne und zwischen der großen und kleinen Untereinheit aktiviert. Sämtliche dafür notwendigen Spaltungsstellen sind selbst potentielle Caspase Substratstellen, was auf eine mögliche autokatalytische Aktivierung der Caspasen schließen läßt (Thornberry et al., 1997). Tatsächlich ist die einfachste Möglichkeit, eine Caspase zu aktivieren, sie mit einer bereits aktivierten Caspase zusammenzubringen. Diese Strategie der Caspasen-Kaskade wird vor allem für die Aktivierung der drei Effektor Caspasen mit den kurzen Pro-Domänen (Caspase-3, -6 und -7) angewandt (Abbildung 2 A). Dies ist eine effiziente Weise, um proapoptotische Signale zu verstärken, es erklärt jedoch nicht, wie eine initiale Aktivierung entstehen kann.

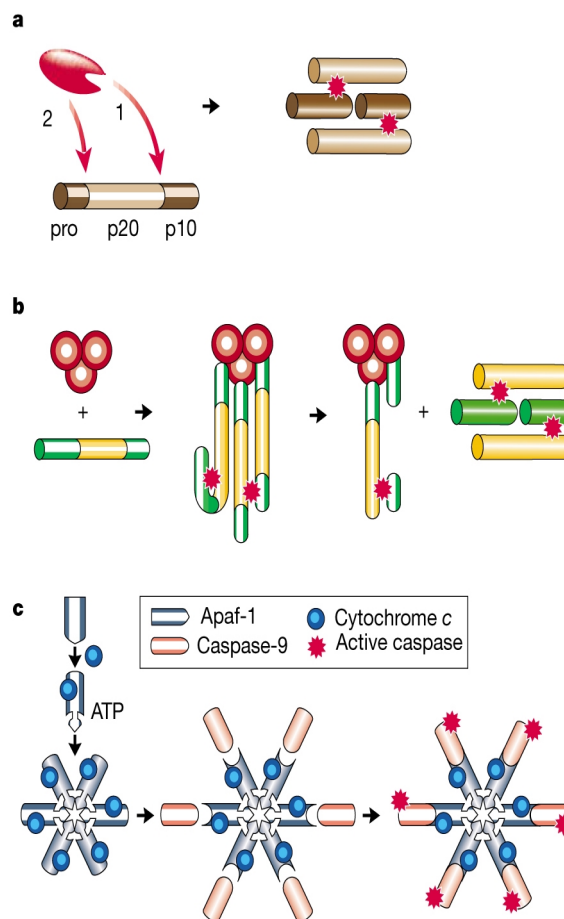


Abbildung 2: Drei verschiedene Mechanismen für die Aktivierung von Caspasen sind bekannt: (a) die proteolytische Spaltung durch eine andere Caspase; (b) induzierte Nähe; (c) Holoenzymbildung. Die proteolytische Spaltung durch eine in der Signaltransduktionskaskade höher gelegene Caspase ist ein einfacher Mechanismus, der sehr effektiv hauptsächlich für die Aktivierung der Effektor Caspasen angewandt wird. Der zweite Mechanismus, die Rekrutierung

und eventuelle Aggregation mehrerer Procaspase-8 Moleküle in räumlicher Nähe zueinander führt auf bisher nicht bekannte Weise zu einer gegenseitigen Aktivierung. Der tatsächliche Ablauf ist wahrscheinlich stärker kontrolliert und deutlich komplizierter als in **b** angedeutet. Bei der Formierung eines Holoenzym bewirkt die Cytochrome c und ATP abhängige Oligomerisierung von Apaf-1 eine Rekrutierung der Procaspase-9 in diesen Apoptosom-Komplex. Die Aktivierung der Caspase-9 erfolgt dann durch eine Konformationsänderung und nicht durch proteolytische Prozesse. Die tatsächliche Stöchiometrie des Apoptosoms ist noch unbekannt und in **c** aus rein ästhetischen Gründen als Hexamer gezeigt (nach (Hengartner, 2000)).

b) Dazu bedarf es der Aktivierung der wichtigsten Initiator-Caspase (Caspase-8), durch die Mitglieder der Todes-Rezeptor-Familie. Diese Rezeptoren, wie z.B. CD95 (Apo-1/Fas) aggregieren, nachdem sie Liganden gebunden haben und formen so membrangebundene Signalkomplexe. Diese Komplexe rekrutieren durch die Adapterproteine FAAD (Fas associated death domain) mehrere Procaspase-8 Moleküle. Durch die dadurch resultierende große räumliche Nähe der Procaspase-8 Moleküle können diese sich, durch ihre in geringem Maße vorhandene intrinsische Protease-Aktivität, gegenseitig aktivieren (Abbildung 2 B) (Muzio et al., 1998). Dies ist eine eher einfache Methode, um das Schicksal einer Zelle zu kontrollieren und obwohl es wahrscheinlich korrekt ist, gibt es sicherlich weitere Regulationsebenen, die diesen Prozeß kontrollieren (Hengartner, 2000).

c) Der dritte Weg zur Aktivierung einer Caspase erfolgt über einen spezifischen Kofaktor. Diese Form der Aktivierung ist für die Caspase-9 beschrieben (Abbildung 2 C). Im Gegensatz zu anderen Caspasen hat eine proteolytische Prozessierung dieser Caspase nur einen geringen Effekt auf die katalytische Aktivität des Enzyms (Rodriguez and Lazebnik, 1999; Stennicke et al., 1999). Wichtiger für die Aktivierung der Caspase-9 ist das Adapterprotein Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor). Apaf-1 wurde als eines der beiden Proteine identifiziert, die für die Aktivierung von Caspase-9 essentiell sind (Li et al., 1997; Zou et al., 1997) (das andere, Cytochrome c, wird genauer unter 1.2.5 beschrieben).

Initial glaubte man, daß Apaf-1 nur vorübergehend für die Aktivierung der Caspase-9 benötigt wird. Heute wird jedoch angenommen, daß der Apaf-1/Caspase-9 Komplex die tatsächliche aktive Einheit der Caspase-9 darstellt (Rodriguez and Lazebnik, 1999). Apaf-1 darf also nicht nur als Caspase-9 aktivierendes Protein angesehen werden, sondern es bildet vielmehr zusammen mit der Caspase-9 das aktive Holoenzym (Hengartner, 2000). Dieses aktive Holoenzym, das häufig auch als Apoptosom bezeichnet wird, ist ein sehr großer Komplex von ca. 700 kDa in dem wahrscheinlich weitere Proteine enthalten sind (Beere et al., 2000; Cain et al., 2000; Cain et al., 1999).

1.2.3.1 Regulation der Caspase-Aktivierung

Die Aktivierung der Procaspasen wird von verschiedenen Klassen von Proteinen reguliert. Auf der Ebene der Apoptosombildung sind Proteine aus der Familie der Inhibitoren der Apoptose (IAP, inhibitors of apoptosis) ein Beispiel für diese negativen Regulatoren der Apoptose. IAPs binden an die Procaspase-9, und verhindern so die Formation des Apoptosoms und damit ebenfalls die Aktivierung weiterer Caspasen (Deveraux et al., 1998). Vor kurzem wurde ein negativer Regulator für IAPs in Säugern entdeckt. Das mitochondriale Intermembranprotein DIABLO (direct IAP binding protein with low pI) / Smac (second mitochondria-derived activator of caspases) wird aus den Mitochondrien ins Cytosol freigesetzt und eliminiert dann den inhibitorischen Effekt der IAPs (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000).

Ebenfalls erst vor kurzer Zeit wurden Hitzeschockproteine als eine weitere Gruppe von negativen Regulatoren der Apoptose erkannt. Es konnte gezeigt werden, daß Mitglieder dieser Proteinfamilie entweder direkt mit Apaf-1 interagieren und so die Formation des Apoptosoms verhindern, oder sie fangen das aus den Mitochondrien freigesetzte Cytochrom c ab und verhindern so die Bildung des Apoptosoms (Beere et al., 2000; Bruey et al., 2000; Li et al., 2000; Pandey et al., 2000; Saleh et al., 2000).

Die Kompartimentierung von Caspasen und ihren Aktivierungsfaktoren ist ein weiterer Mechanismus für die Regulierung der Caspasen-Aktivierung. Die meisten Procaspasen sind im Cytosol lokalisiert, wo sowohl die Apoptosom-, als auch die Rezeptor-vermittelte Caspasen-Aktivierung stattfindet. Neue Daten zeigen, daß die Procaspasen-2, -3, und -9 auch innerhalb der Mitochondrien lokalisiert sein können (Mancini et al., 1998; Susin et al., 1999a). Caspase-2 ist zusätzlich auch im Nukleus und am Golgi-Apparat lokalisiert (Mancini et al., 2000). Für Caspase-12 konnte eine Lokalisation am Endoplasmatischen Reticulum gezeigt werden (Nakagawa et al., 2000). Diese Ergebnisse deuten auf eine Regulation der Caspase-Aktivierung durch Translokation dieser Proteine während der Apoptose hin (Krajewski et al., 1999; Susin et al., 1999a; Zhivotovsky et al., 1999).

1.2.4 Bcl-2 Familienmitglieder und Apoptose

Die Mitglieder der Bcl-2 Familie sind wichtige Regulatoren für die Entscheidung über Leben oder Tod einer Zelle (Reed, 1998). Diese sich ständig vergrößernde Proteinfamilie beinhaltet sowohl anti-apoptotische Proteine (wie z.B. Bcl-2, Bcl-X_L), als auch pro-apoptotische Proteine (wie z.B. Bax, Bid). Sie alle sind gekennzeichnet durch das Vorhandensein mindestens eines

der vier konservierten Bcl-2 Homologie-Motive (BH). Diese Domänen ermöglichen es den verschiedenen Mitgliedern der Bcl-2 Familie, entweder Homo- oder Hetero-Dimere zu bilden und sich gegenseitig zu regulieren (Kelekar and Thompson, 1998; Oltvai et al., 1993). Die meisten Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie sind hauptsächlich an die mitochondriale Außenmembran lokalisiert (Goping et al., 1998) und üben ihre Funktion überwiegend auf die Mitochondrien aus (Tsujimoto and Shimizu, 2000).

Die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 oder Bcl-XL verhindern die Aktivierung von Caspasen durch das mitochondriale Cytochrom c in vielen verschiedenen Zelltypen und bei vielen verschiedenen Apoptosestimuli (Kluck et al., 1997; Vander Heiden et al., 1997; Yang et al., 1997). Für Bcl-2 und Bcl-XL konnte weiterhin eine protektive Funktion für die Integrität der Mitochondrien durch eine Stabilisierung des Membranpotentials $\Delta\Psi$ (Shimizu et al., 1996) und durch eine Inhibierung der mitochondrialen „permeability transition pore“ (mtPTP) (Marzo et al., 1998b) gezeigt werden. Bcl-2 kann außerdem das Freisetzen weiterer pro-apoptotischer Proteine, wie z.B. des AIF (apoptosis inducing factor) (Susin et al., 1996) und verschiedener Caspasen (Krajewski et al., 1999; Susin et al., 1999a) aus den Mitochondrien verhindern. Dies bedeutet, daß Bcl-2 Apoptose durch eine direkte Wirkung auf Mitochondrien, die zentrale Schaltstation der Apoptose, verhindern kann.

Das pro-apoptotische Bax vermittelt seine apoptotischen Signale ebenfalls in die Mitochondrien. Bax transloziert an die Mitochondrien, oligomerisiert und lagert sich in die mitochondriale Außenmembran ein (Gross et al., 1998). Dort bewirkt Bax die Freisetzung von Cytochrom c und den Verlust des Membranpotentials $\Delta\Psi$ (Pastorino et al., 1998). Diese Effekte von Bax können durch Bcl-2 und Bcl-XL verhindert werden (Eskes et al., 1998; Jurgensmeier et al., 1998; Narita et al., 1998). Bax alleine ist ausreichend, um die Mitochondrien zu schädigen und Zelltod zu induzieren, ohne das Caspasen aktiviert werden müssen (Xiang et al., 1996). Das pro-apoptotische Protein Bid benötigt jedoch Caspasen für seine Aktivierung und um pro-apoptotische Signale zu den Mitochondrien weiterleiten zu können. Nach einer proteolytischen Spaltung durch die Caspase-8 transloziert das aktivierte Bid Protein zu den Mitochondrien und bewirkt dort die Freisetzung von Cytochrom c in das Cytosol (Desagher et al., 1999; Luo et al., 1998; Shimizu and Tsujimoto, 2000).

Anti-apoptotische Proteine, die in der Apoptose Signaltransduktionskaskade unterhalb der Cytochrom c Freisetzung liegen, können Apoptose inhibieren (Oltvai et al., 1993; Rosse et al., 1998). Es wurde hypothetisiert, daß Bcl-XL (Hu et al., 1998; Pan et al., 1998) und das ebenfalls anti-apoptotische Protein Boo (Diva) (Inohara et al., 1998; Song et al., 1999)

eventuell mit Apaf-1 interagieren können und so die Aktivierung der Procaspase-9 verhindern. Allerdings sind diese Annahmen sehr umstritten (Hausmann et al., 2000; Moriishi et al., 1999; Newmeyer et al., 2000).

1.2.5 Zwei unterschiedliche apoptotische Signaltransduktionswege

Die bisher beschriebenen Mechanismen der Apoptoseinduktion können in zwei verschiedenen Signaltransduktionswegen zusammengefaßt werden (Abbildung 3).

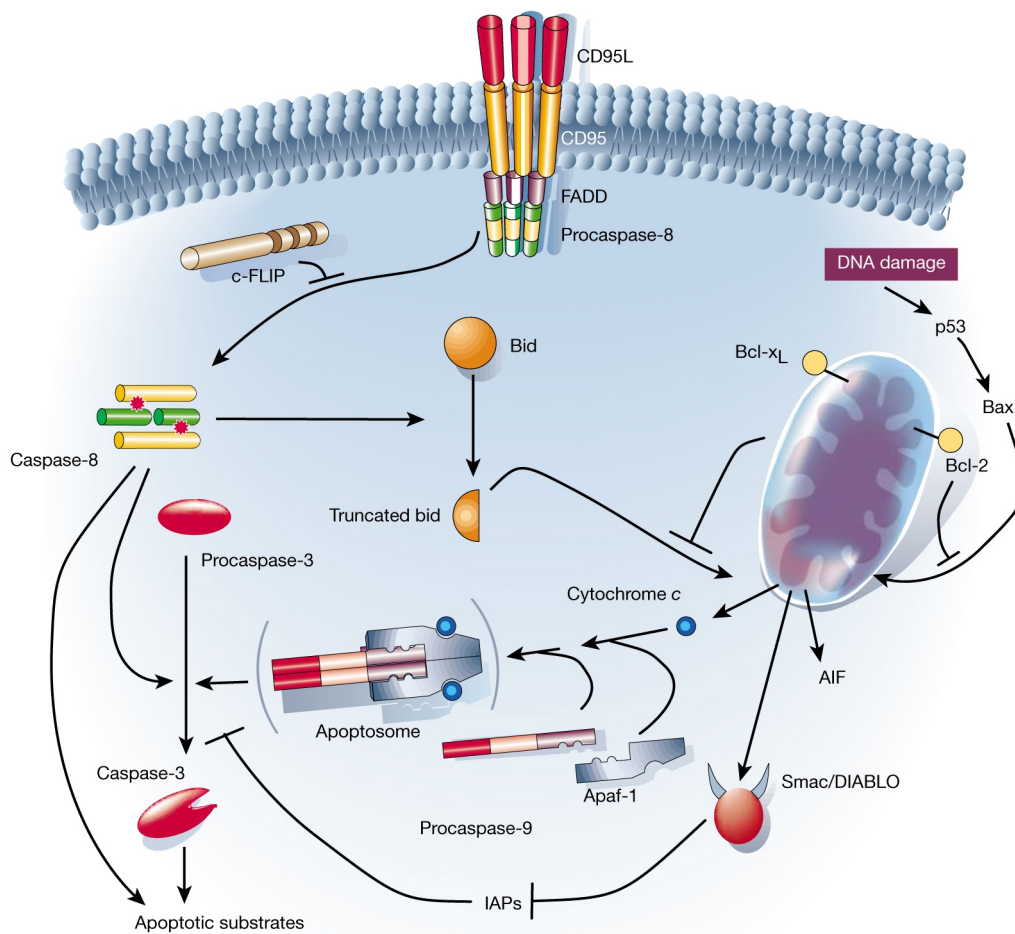


Abbildung 3: Zwei verschiedene Signaltransduktionswege der Apoptose sind bekannt. Auf der linken Seite der Todes-Rezeptor abhängige Signaltransduktionsweg und auf der rechten Seite der mitochondriale Signaltransduktionsweg. Erklärung siehe Text; (nach (Hengartner, 2000)).

Der Todes-Rezeptor Signaltransduktionsweg wird durch Mitglieder der sogenannten Todes-Rezeptor-Superfamilie induziert. Die Bindung des CD95-Liganden an den CD95-Rezeptor führt zu einer Trimerisierung der Rezeptoren und zur Formierung eines Zelltod induzierenden Signalkomplexes. Dieser Signalkomplex besteht aus den cytoplasmatisch gelegenen DD

(death domain) der Rezeptoren und den Adaptermolekülen FADD (Fas-associated death domain protein) (Chinnaiyan et al., 1995), die mit ihren DD an die Rezeptoren binden. An diesen Komplex können dann mehrere Procaspase-8 Moleküle binden, wodurch die Bildung der DISC (death-inducing signalling complex) komplettiert ist (Boldin et al., 1996; Kischkel et al., 1995). Autoaktivierung der Procaspase-8 führt dann zu einer Caspase-Aktivierungskaskade, durch die weitere Caspasen aktiviert werden (vergl. 1.2.3). Die Aktivierung der Procaspase-8 kann durch das degenerierte Caspasen-Homolog c-FLIP (Irmeler et al., 1997) verhindert werden.

Ein zweiter alternativer Signaltransduktionsweg beginnt bei den Mitochondrien und wird durch eine Vielzahl von endogenen und exogenen Stimuli hervorgerufen, z.B. auch durch geschädigte DNA. Diese verschiedenen Signalwege werden an den Mitochondrien, häufig durch die Aktivierung pro-apoptotischer Bcl-2 Familienmitglieder, vereint. Durch die Translokation dieser meist im Cytosol vorkommenden Proteine an die Mitochondrien wird die Freisetzung pro-apoptotischer Proteine (Cytochrom c, AIF) aus den Mitochondrien in das Cytosol induziert. Der genaue Mechanismus für diese Freisetzung ist noch ungeklärt (Hengartner, 2000). Durch die Bildung des Apoptosom aus Cytochrom c, Procaspase-9 und ATP werden dann weitere Caspasen aus der Gruppe der Exekutions-Caspasen aktiviert.

Die beiden Signaltransduktionswege treffen bei der Aktivierung der Caspase-3 aufeinander, und eine Interaktion zwischen den beiden Signaltransduktionswegen ist z.B. durch das pro-apoptotische Protein Bid möglich. Durch proteolytische Spaltung und Aktivierung von Bid durch die Caspase-8 transloziert Bid an die Mitochondrien und induziert dort die Freisetzung von Cytochrom c (Luo et al., 1998). Welcher der beiden Signaltransduktionswege tatsächlich zur Anwendung kommt, hängt neben dem apoptotischen Stimulus auch von dem jeweiligen Zelltyp ab. Ein Caspase dominierter Zelltod kann durch Caspase-Inhibitoren geblockt oder zumindest verzögert werden. Die mitochondriale Schädigung kann jedoch nicht immer durch Caspase-Inhibitoren verhindert werden (Hengartner, 2000). Ein Caspase unabhängiger Signalweg wird durch AIF induziert. Dabei können DNA-Spaltung und weitere morphologische Charakteristika der Apoptose durch AIF in Abwesenheit von Caspasen hervorgerufen werden (Susin et al., 1999b). Komplexe Interaktionen der anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine mit der mtPTP regulieren die Freisetzung der pro-apoptotischen mitochondrialen Proteine und können so Apoptose verhindern oder zumindest verlangsamen (Shimizu et al., 1998; Susin et al., 1996; Yang et al., 1997).

1.3 Apoptose und Mitochondrien

Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen Erkrankungen. Daß Mitochondrien auch eine wichtige Rolle in der Apoptose spielen ist erst seit einigen Jahren bekannt. Heute gelten die Mitochondrien als äußerst wichtige Entscheidungszentren für die Apoptoseprozesse in Säugerzellen. Es gibt viele Hinweise darauf, daß Mitochondrien in den frühen Phasen der Apoptose starke morphologische und physiologische Veränderungen durchmachen (z.B. Verlust des Membranpotentials $\Delta\Psi$). Weiterhin sind mitochondriale Proteine wichtige limitierende Proteine für die Aktivierung von Caspasen (Budihardjo et al., 1999), wie im Falle von Cytochrom c, oder sogar Apoptose ausführende Exekutoren, wie im Falle des Caspasen unabhängigen Apoptosesignalweges durch AIF (Daugas et al., 2000b). Auch interagieren pro- und anti-apoptotische Proteine der Bcl-2 Proteinfamilie mit Mitochondrien (vergl. 1.2.4), indem sie entweder die mitochondriale Permeabilitäts-Transition (mtPTP) hervorrufen oder verhindern (Kroemer, 1997; Porter, 1999; Vander Heiden and Thompson, 1999).

Inhibierung der mitochondrialen Atmungskette und Induktion der mtPTP induziert Apoptose, hingegen führt eine pharmakologische Inhibierung der mtPTP zu einem Schutz gegenüber Apoptose, wie in vielen Modellen gezeigt werden konnte (Aguilar et al., 1996; Bauer et al., 1999; Bernardi, 1996; Hirsch et al., 1998). Die Inhibierung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung ist ein wichtiger Entscheidungsfaktor in der Apoptose, so kann z.B. ein Rückgang der intrazellulären ATP-Konzentration die Art des programmierten Zelltodes von Apoptose zu Nekrose verschieben (Bal-Price and Brown, 2000; Latta et al., 2000; Leist et al., 1999b). Mitochondrien repräsentieren also ein wichtiges Entscheidungszentrum für den Ablauf und die Art des programmierten Zelltodes (Alnemri, 1999; Kroemer and Reed, 2000). Der Energiestatus (Leist and Nicotera, 1997; Leist et al., 1999a) und die Permeabilisierung der mitochondrialen Membranen (Halestrap et al., 1998; Kroemer and Reed, 2000) scheinen dabei zwei kritische Parameter für die strikte Kontrolle dieser Entscheidung zu sein.

1.3.1 Überblick über die mitochondriale Physiologie und Struktur

Mitochondrien sind Zellorganellen mit zwei distinkt voneinander getrennten Kompartimenten: der mitochondrialen Matrix, die von der mitochondrialen Innenmembran (IM) umgeben ist und dem Intermembranraum, der von der mitochondrialen Außenmembran (OM) umgeben ist (Abbildung 4). Die IM ist in zahlreiche Falten, die sog. Cristae gelegt, die

die Oberfläche der IM stark erhöhen. Die IM enthält die Atmungskettenenzyme der mitochondrialen Atmungskette, d.h. der Elektronen-Transportkette in den Mitochondrien und außerdem die ATP-Synthetase und den ADP-ATP Antiporter (ANT, adenin nucleotide translocator). Für den elektrochemischen Gradienten ($\Delta\Psi$) quer zur IM, der durch die Atmungskette aufgebaut wird und die ATP-Synthese antreibt, ist es eine wichtige Voraussetzung, daß die IM für die meisten kleinen Ionen undurchlässig ist.

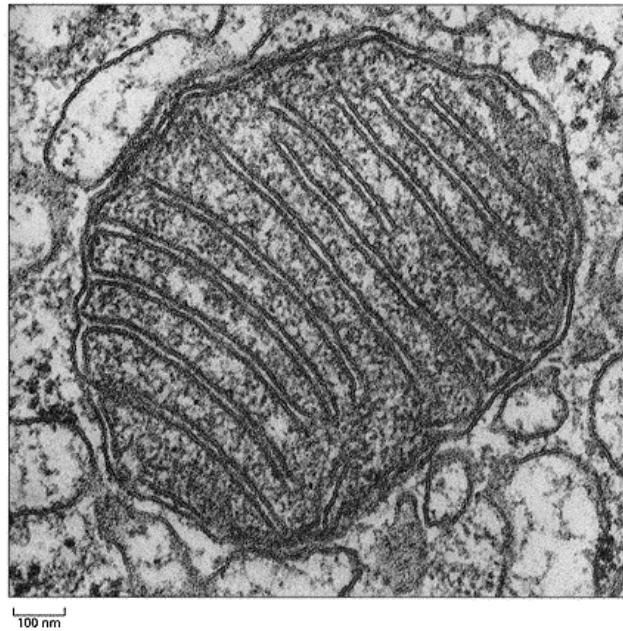


Abbildung 4: Die EM Aufnahme eines Mitochondriums zeigt die Ultrastruktur eines Mitochondriums. Mitochondrien bestehen aus zwei getrennten Kompartimenten, der Matrix und dem Intermembranraum, die von je einer Membran, der Innenmembran (IM) und der Außenmembran (OM) umgeben sind. (aus The Art of MboC³)

Die mitochondriale Atmungskette besteht aus mehr als 20 Elektronen-Carriern die in vier Enzymkomplexe gruppiert sind. Die mitochondriale Atmungskette katalysiert den Elektronentransport von NADH zu dem letztlichen Elektronenakzeptor O_2 . Anhand isolierter Enzymkomplexe konnte gezeigt werden, daß die Enzymkomplexe Protonen durch die Membran pumpen, sobald Elektronen transportiert werden. In der nativen Membran vervollständigen die beweglichen Elektronen-Carrier Ubichinon und Cytochrom c die Elektronen-Transportkette, indem sie zwischen den Enzymkomplexen pendeln. Die Atmungskettenenzyme koppeln den energetisch günstigen Elektronentransport mit dem Export von Protonen aus der Matrix. Der resultierende elektrochemische Protonengradient wird genutzt, um durch einen anderen Transmembran-Proteinkomplex, die ATP-Synthetase, ATP herzustellen. Durch die ATP-Synthetase fließen die Protonen zurück in die Matrix. Das

ATP wird auf der Matrixseite der IM gebildet und im Austausch für ADP durch den ANT exportiert.

Das Cytochrom c ist auch ein für die Apoptose wichtiges Protein. Es hat ein Molekulargewicht von 14,5 kDa und ist sowohl in der IM als auch im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert und kann sich relativ frei in der IM bewegen (Ardail et al., 1990). In der Atmungskette wird Cytochrom c von der Ubiquinol-Cytochrom c Oxireductase (Komplex III) reduziert und von der Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) oxidiert.

Das häufigste Protein der OM ist das Porin (oder VDAC, für voltage-dependent anion channel), ein großes kanalbildendes Protein, durch das die OM für alle Moleküle, die kleiner als 5 kDa sind, durchlässig ist.

1.3.1.1 Mitochondriale Proteinsynthese

Das humane mitochondriale Genom besteht aus einer 16,569 bp großen, ringförmigen doppelsträngigen DNA (Anderson et al., 1981), die in jedem Mitochondrium in mehrfacher Kopienzahl vorliegt (Grossman and Shoubridge, 1996). Es ist hoch kompakt, mit der Ausnahme einer 1 kb großen regulatorischen Region (D-Loop) kodiert fast jedes Nukleotid. Das mitochondriale Genom enthält nur 37 Gene: zwei Gene kodieren für ribosomale RNA, 22 kodieren tRNA und 13 Gene kodieren für Polypeptide. Alle 13 Polypeptide sind Proteinuntereinheiten der Atmungskettenkomplexe oder des oxidativen Phosphorylierungssystems. 7 der 13 Proteine gehören zu dem Atmungsketten Komplex I (NADH Dehydrogenase-Ubiquinone Oxidoreduktase), eines ist eine Untereinheit des Komplexes II (Ubiquinone-Cytochrom c Oxidoreduktase), drei gehören zu Komplex IV (Cytochrom c Oxidase) und zwei sind Untereinheiten der ATP-Synthetase.

Alle übrigen mitochondrialen Proteine werden von nukleären Genen kodiert, im Cytosol synthetisiert und selektiv in die Mitochondrien importiert. Die Komplexe der Atmungskette werden also aus mitochondrial und nukleär kodierten Proteinen zusammengesetzt. Synthetisiert werden die mitochondrial kodierten Proteine an den mitochondrialen Ribosomen. Diese unterscheiden sich von ihren cytosolischen Gegenstücken durch die erhöhte Anzahl an Proteinen, bedingt durch einen verringerten Anteil an RNA (de Vries and Koogh-Schuuring, 1973). Die Ribosomen in Säuger-Mitochondrien sind 55-60 S große Partikel, die aus einer großen Untereinheit (39S) und einer kleinen Untereinheit (28S) bestehen.

Die mitochondrialen Ribosomen haben einen ungewöhnlichen Dekodierungsmechanismus, der einen modifizierten und mehr symmetrischen genetischen Code mit weniger tRNAs benötigt, als dies für den universellen genetischen Code notwendig wäre (Grossman and Shoubridge, 1996). Da alle mitochondrial kodierten Proteine nur zusammen mit nukleär kodierten Proteinen funktionieren, ist es interessant zu fragen, wie die Regulation einer stöchiometrischen Menge an Genprodukten durchgeführt wird, wenn die entsprechenden Gene an zwei unterschiedlichen Orten in der Zelle lokalisiert sind. Leider ist bis jetzt nur wenig über diese Regulation bekannt. Hinweise könnte die Isolierung zweier Transkriptionsfaktoren NRF1 und NRF2 (Nuclear Respiratory Factors 1 und 2) geben, für die Bindungssequenzen innerhalb von Promotoren einiger nukleär kodierter mitochondrialer Gene, wie z.B. Cytochrom c, gefunden worden sind. Interessanterweise enthält der mitochondriale Transkriptionsfaktor mtTFA Konsensusstellen sowohl für NRF1 als auch für NRF2, womit sich ein möglicher Signaltransduktionsweg für die Integration der Expression von nukleär kodierten Proteinen und der mitochondrialen Transkription ergibt (Virbasius and Scarpulla, 1994). Eine weitere Möglichkeit wäre eine duale Funktion bisher nur als nukleär agierender Transkriptionsfaktoren. So wurden z.B. Glucocorticoid-Rezeptor-Bindungsstellen in der mitochondrialen DNA gefunden (Demonacos et al., 1995; Tsiriyotis et al., 1997).

1.3.2 Mitochondrien als Reservoir pro-apoptotischer Proteine

Wie bereits beschrieben, werden während der Apoptose pro-apoptotische Proteine aus den Mitochondrien in das Cytosol freigesetzt. Dieser Vorgang wird als einer der zentralen Entscheidungspunkte in der Signalkaskade der Apoptose angesehen (Cai et al., 1998; Desagher and Martinou, 2000). Besonders zwei mitochondriale Proteine sind direkt an der Apoptoseinduktion beteiligt: Cytochrom c und AIF. Unter physiologischen Bedingungen sind beide Proteine in den mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert.

AIF ist ein Flavoprotein mit einem Molekulargewicht von 57 kDa, das eine Homologie zu einer bakteriellen Oxidoreduktase aufweist (Susin et al., 1999b). Verschiedene pro-apoptotische Stimuli können eine selektive Freisetzung von AIF in das Cytosol induzieren. Dies geschieht wahrscheinlich durch eine Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran (Daugas et al., 2000a; Daugas et al., 2000b).

Cytochrom c wird ebenfalls während der Apoptose aus den Mitochondrien in das Cytosol freigesetzt, wo es an Apaf-1 bindet und zusammen mit der Caspase-9 das Apoptosome bildet (Li et al., 1997).

Die Art und Weise, wie die Freisetzung pro-apoptotischer Proteine aus den Mitochondrien in das Cytosol geschieht, ist umstritten. Es konnte gezeigt werden, daß gleichzeitig mit Cytochrom c weitere Proteine des mitochondrialen Intermembranraumes, wie z.B. die Adenylatkinase (Single et al., 1998), in das Cytosol gelangen. Diese Experimente unterstützen die These, daß eine nicht-selektive Freisetzung mitochondrialer Proteine während der Apoptose stattfindet. Allerdings konnte in einigen Arbeiten gezeigt werden, daß die Freisetzung mitochondrialer Proteine differentiell reguliert sein kann. So wird z.B. das deutlich größere AIF durch Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran in das Cytosol freigesetzt, ohne daß eine gleichzeitige Cytochrom c-Freisetzung stattfindet (Daugas et al., 2000b).

Virale Proteine können die Cytochrom c-Freisetzung, aber nicht die AIF-Freisetzung, blockieren (Zhou and Roizman, 2000). Diese Daten können zum Teil dadurch erklärt werden, daß Cytochrom c vorzugsweise an Cardiolipin, ein mitochondriales Lipid, aber nicht an Cardiolipin-Hydroperoxid, bindet. Für die Cytochrom c-Freisetzung wird daher wahrscheinlich eine Oxidierung von Cardiolipin benötigt (Nomura et al., 2000), aber der genaue Mechanismus der Freisetzung ist noch unbekannt und wird weiter untersucht.

1.3.3 Der Permeability Transition Pore Komplex

Obwohl die Permeabilität der mitochondrialen Innenmembran (IM) für Ionen und Metabolite sehr stark reguliert ist, kann ein völlig unselektiver Verlust der Permeabilitätskontrolle der IM auftreten. Dieses Phänomen wurde als „permeability transition“ (PT) bezeichnet und an isolierten Mitochondrien nach der Zugabe von Ca^{2+} und in Anwesenheit von ATP und P_i beschrieben. Haworth und Hunter konnten erste Hinweise erbringen, daß die Bildung einer Pore an der „permeability transition“ beteiligt war. Allerdings war die Art und Zusammensetzung der Pore noch unbekannt (Haworth and Hunter, 1980). Später konnte dann gezeigt werden, daß die PT-Pore durch einen Proteinkomplex aus mehreren Proteinen gebildet wird. Die Haupteinheit der PT-Pore wird aus dem VDAC-ANT-CyP-D Komplex gebildet (Crompton, 1999). Andere Proteine, wie die Hexokinase, die mitochondriale Creatin-Kinase, der Benzodiazepin-Rezeptor und Bax, sind ebenfalls mit der PT assoziiert und fungieren wahrscheinlich als positive oder negative Regulatoren (Beutner et al., 1996; Brdiczka et al., 1998; Marzo et al., 1998b). Die PT entsteht durch eine Konformationsänderung des ANT, die durch Calciumionen oder oxidativen Streß hervorgerufen werden kann, und dazu führt, daß der ANT von einem selektiven Antiporter zu

einer unspezifischen Pore wird (Halestrap et al., 1998). Die PT-Pore kann durch Cyclosporin A, das an Cyclophilin D bindet (Bernardi, 1996), und auch durch ADP und Mg^{2+} inhibiert werden (Broekemeier et al., 1998).

Verschiedene Substanzen, wie z.B. die intrazellulären Signalstoffe Ca^{2+} und NO, können die PT induzieren (Brookes et al., 2000; Chernyak et al., 1995; Takeyama et al., 1993). Eine Depolarisierung der Mitochondrien sowie eine Inhibierung der mitochondrialen Atmungskette, besonders an Komplex I, führt ebenfalls zu einer PT-Induktion (Fontaine et al., 1998; Isenberg and Klaunig, 2000; Scorrano et al., 1999a). Vor kurzem konnte gezeigt werden, daß das Gangliosid GD3, ein intrazellulärer Botenstoff, in der Lage ist, die Bildung der PT sowohl in isolierten Mitochondrien als auch in Zelllinien zu induzieren (Kristal and Brown, 1999; Scorrano et al., 1999b).

Während der PT wird die mitochondriale Innenmembran durchlässig für Stoffe bis zu einer Größe von ca. 1500 Da. Unter physiologischen Bedingungen scheint die PT eine wichtige Rolle für die Ca^{2+} -Pufferung und -Freisetzung zu spielen (Murchison and Griffith, 2000). Die Induktion der PT alleine ist ausreichend, um Apoptose hervorzurufen (Larochette et al., 1999; Zamzami et al., 1998). Es ist bekannt, daß ein zu langes Öffnen der PT-Pore einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, ATP-Mangel, Ca^{2+} -Freisetzung, den Verlust der Ca^{2+} -Pufferfähigkeit, Anschwellen der Mitochondrien und Freisetzung mitochondrialer Proteine hervorrufen kann (Hirsch et al., 1997). Zur Zeit ist noch nicht geklärt, ob die PT ein unspezifisches Zerreißen der mitochondrialen Außenmembran hervorruft, oder ob das Entstehen der PT eher zu einer Reihe von spezifischen Reaktionen führt, an deren Ende die Bildung eines Kanals und die selektive Freisetzung mitochondrialer Proteine steht.

Die Permeabilisierung der mitochondrialen Membranen (MMP, mitochondrial membrane permeabilisation) kann durch verschiedene Mechanismen entstehen. *In vitro* Experimente an isolierten Mitochondrien, oder mit Proteinen, die in artifizielle Membranen eingefügt wurden, führten zu insgesamt vier miteinander konkurrierenden Modellen (Kroemer and Reed, 2000):

Im ersten Modell (Abbildung 5 A) führt die Porenbildung durch ANT zu einer Permeabilisierung der IM, einem osmotischen Anschwellen der mitochondrialen Matrix und einem dadurch bedingten Zerreißen der OM. Dies geschieht, da die IM mit ihren gefalteten Cristae ein Anschwellen der Matrix viel leichter ausgleichen kann als die OM. Für dieses Modell spricht, daß pro-apoptotische Moleküle wie Calciumionen, Palmitat oder Thiol-Oxidantien, ANT zu einer Konformationsänderung bringen und damit die Bildung einer unspezifischen Pore induzieren. Viele bekannte Regulatoren der MMP, unter anderem

Cyclophilin D, Bax, Bak, Bcl-2 und Bcl_{XL} können mit ANT interagieren (Brenner et al., 2000; Crompton, 1999; Marzo et al., 1998a). Einige virale Proteine mit pro- oder anti-apoptotischer Funktion interagieren ebenfalls spezifisch mit ANT (Goldmacher et al., 1999; Jacotot et al., 2000).

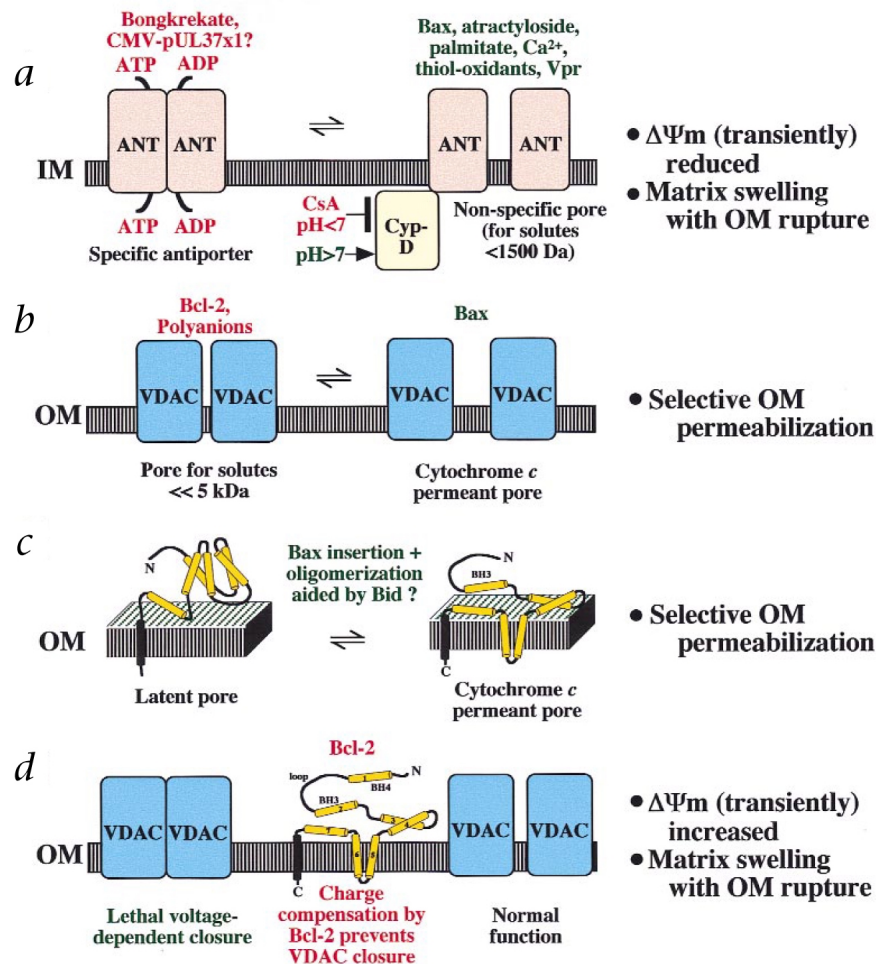


Abbildung 5: Vier mögliche Mechanismen für die Permeabilisierung (MMP) der mitochondrialen Innen- (IM) oder Außen- (OM) Membran. MMP-Inhibitoren sind rot, und MMP-Verursacher sind grün gekennzeichnet. Erläuterungen im Text (nach (Kroemer and Reed, 2000)).

Im zweiten Modell (Abbildung 5 B) ist der VDAC (Voltage Dependant Anion Channel) für eine primäre Permeabilisierung der OM verantwortlich, ohne die IM zu verändern (Shimizu et al., 1999). Für dieses Modell spricht, daß der VDAC mit Proteinen der Bcl-2-Familie interagiert. Außerdem konnte die Permeabilität von VDAC-enthaltenden Liposomen für Cytochrom c *in vitro* durch Bax erhöht und durch Bcl-2 inhibiert werden. Dabei kann die Porenbildung von VDAC in Anwesenheit von Bax mit Koenig's Poly-anion, einem VDAC-Inhibitor, verhindert werden, was darauf hindeutet, daß VDAC und nicht Bax das eigentlich porenbildende Protein ist (Shimizu et al., 1999).

Im dritten Modell (Abbildung 5 C) wird eine Porenbildung durch oligomerisiertes Bax, das unabhängig von VDAC agiert, postuliert. Diese Pore bildet einen eigenständigen Kanal, der Proteine durch die OM in das Cytosol befördert und eventuell von Bid oder tBid reguliert wird (Eskes et al., 1998; Eskes et al., 2000).

Im vierten Modell schließlich (Abbildung 5 D) reguliert der VDAC das Entstehen der MMP durch einen weiteren Mechanismus, der im Zusammenhang mit seinem physischen und funktionellen Kontakt mit ANT steht. Eine durch Apoptosestimuli hervorgerufene Zunahme des mitochondrialen Membranpotentials an der IM transferiert Ladung an die OM, wodurch der VDAC geschlossen wird (Vander Heiden et al., 1999; Vander Heiden and Thompson, 1999). Bcl-2 würde, dem Modell zufolge, als Ionophore agieren und dabei das Membranpotential entlang der OM reduzieren, indem es eine für Ionen, aber nicht Protein, durchlässige Pore in der OM bildet. Dadurch würde Bcl-2 indirekt den VDAC- und ANT-abhängigen ADP/ATP-Austausch entlang der mitochondrialen Membranen aufrecht erhalten und so ein Anschwellen der Matrix verhindern.

Obwohl einige dieser Modelle exklusiv zu sein scheinen, können sie vielleicht doch in einen großen molekularen Zusammenhang gebracht werden.

1.4 Isolierung (Entdeckung) von MERM-3 und DAP-3

1.4.1 Isolierung neuer muriner embryonaler Nieren-Marker Genprodukte (MERM)

Einzelheiten der Entwicklung oder Regeneration der Niere sind bisher nur teilweise aufgeklärt. Es wäre daher von Vorteil, Gene als Marker für die verschiedenen Stadien der Nephrogenese zu identifizieren, um eventuelle Ähnlichkeiten während der Regeneration geschädigter Nieren zu erkennen und eine Heilung therapeutisch fördern zu können. Kretzler *et al.* versuchten daher, molekulare Marker der Nephrogenese zu isolieren. Dazu wurde das Genexpressionsmuster von Maus-Nieren 11,5, 13,5, 15,5, und 17,5 Tage post conceptionem mit Hilfe einer modifizierten Differential Display PCR (DD-PCR) Technik untersucht. Es konnten 19 Genprodukte mit differentieller Expression während der Nephrogenese isoliert werden (Kretzler et al., 1996). Differentielle Expression bedeutet, daß die entsprechenden Gene nur während eines bestimmten Zeitpunktes, bis zu, oder erst ab einem bestimmten Zeitpunkt während der Nephrogenese exprimiert werden.

17 der isolierten Klone zeigten bei dem Vergleich mit Datenbanken keine signifikante Homologie zu bisher bekannten Nukleotid-Sequenzen. Es ist daher anzunehmen, daß die entdeckten Genfragmente zu bisher noch unbekannt Genen gehören. Das durch die DD-PCR gezeigte differentielle Expressionsmuster wurde mit einer „semi-quantitativen“ Reversen Transkriptions-PCR (RT-PCR) zur Bestätigung der differentiellen Genexpression genauer analysiert. Die DD-PCR wurde mit Hilfe sequenzspezifischer Primer, an *in vivo* und an Organkultur-Material, durchgeführt. Die Fragmente der isolierten Genprodukte mit einer Länge von 150 bis 300 Basenpaaren aus dem 3' Ende der zugehörigen mRNA wurden MERMs (für Mouse Embryonic Renal Marker gene products) genannt.

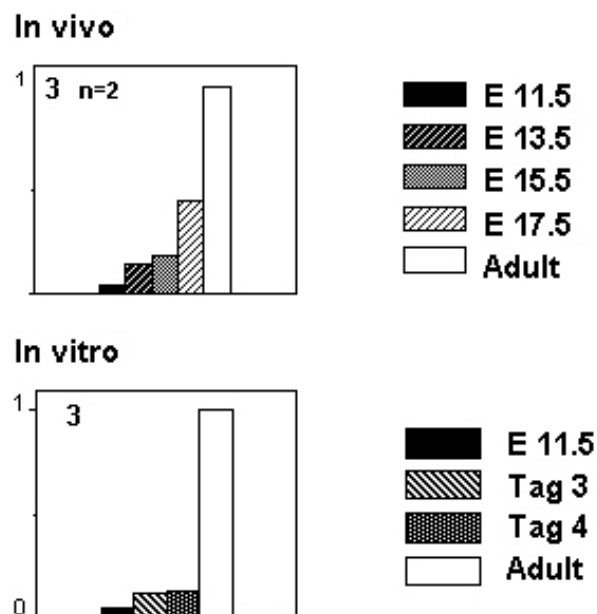


Abbildung 6: MERM-3 mRNA Expressionsmuster. MERM-3 Expressionszeitverläufe wurden mittels quantitativer RT-PCR während der *in vivo* Entwicklung und in der metanephrischen Organkultur (*in vitro*) bestimmt. E entspricht embryonaler Entwicklungstag post conceptionem. (nach (Kretzler et al., 1996)).

MERM-3, eines der 19 neu entdeckten Genfragmente, ist in frühen Stadien der Nephrogenese nur niedrig exprimiert. Mit einer zunehmenden Differenzierung der Niere zeigt MERM-3 jedoch einen Expressionsanstieg und erreicht das Expressionsmaximum in der adulten Niere (Abbildung 6).

1.4.2 Death Associated Protein 3 (DAP-3)

Die Sequenzanalyse des kurzen cDNA-Fragmentes von MERM-3 wies eine signifikante Homologie zu einem putativen humanen Apoptosemediator, DAP-3 (für Death Associated Protein 3) auf. Die Klonierung der murinen Vollängen-cDNA von MERM-3 (Berger et al., 2000; Brigl, 2000) ergab eine 86 %ige Identität der Nukleotidbasen- und 81 %ige Identität der Aminosäuresequenz zu DAP-3.

DAP-3 wurde durch ein innovatives funktionelles Screeningprotokoll, einem sog. „technical knock out“ (Deiss and Kimchi, 1991) von der Arbeitsgruppe um A. Kimchi isoliert. Hierbei wurde eine cDNA Bank in anti-sense Orientierung in HeLa-Zellen transfiziert. Anschließend wurden die Klone isoliert, die eine erhöhte Resistenz gegen Interferon- γ induzierte Apoptose aufwiesen. Mit diesem Ansatz gelang die Isolierung einer Reihe von putativen Apoptosemediatoren (Cohen et al., 1997; Deiss and Kimchi, 1991; Kissil et al., 1995; Levy-Strumpf et al., 1997), deren weitere Charakterisierung Hinweise auf Tumorsuppressoraktivität der Apoptosemediatoren erbrachte (Inbal et al., 1997).

Für DAP-3, das auf dem humanen Chromosom 1q21 lokalisiert ist (Kissil and Kimchi, 1997), konnte der Nachweis geführt werden, daß eine Überexpression zu einer 18-fach reduzierten Zellviabilität führt. Eine Suppression der DAP-3 Spiegel durch anti-sense cDNA führte zu einer 10-fach erhöhten Resistenz gegen Interferon- γ induziertem Zelltod. Hierbei waren die spontanen Wachstumskurven und der zytostatische Effekt von Interferon- γ in den DAP-3 supprimierten Zellen unbeeinträchtigt (Kissil et al., 1995).

Ein mRNA-Organoscreen zeigte eine ubiquitäre DAP-3 Expression. DAP-3 mRNA wird durch Apoptoseinduktion nicht alteriert, und die Proteinspiegel erhöhen sich lediglich um den Faktor 2. Da eine Neusynthese von Apoptosemediatoren nicht notwendig ist (Weil et al., 1996), sind diese Daten trotzdem gut vereinbar mit einer relevanten Rolle von DAP-3 bei der Apoptoseinduktion.

Eine weitere Charakterisierung von DAP-3 konnte zeigen, daß das Volllänge-DAP-3 notwendig ist, um Apoptose durch Überexpression zu induzieren. Eine Mutante mit nur 230 N-terminalen Aminosäuren kann in dominant negativer Weise Apoptose verhindern. Diese beiden Funktionen sind abhängig von der Funktionalität des P-Loops, der einzigen bisher beschriebenen funktionellen Gruppe, einer putativen ATP / GTP Bindungsstelle (Kissil et al., 1999). Die Expression der dominant negativen DAP-3 Mutante oder die Expression von DAP-3 anti-sense cDNA konnte TNF- α oder Fas induzierte Apoptose verhindern. Daraus

kann geschlossen werden, daß DAP-3 als ein positiver Apoptosemediator dieser beiden Stimuli fungiert. DAP-3 ist also unterhalb des Rezeptor-Signal-Komplexes in die Apoptosekaskade einzuordnen. Außerdem konnte gezeigt werden, daß DAP-3 vermittelte Apoptose Caspasen abhängig ist (Kissil et al., 1999).

In *C. elegans* konnte ein putatives DAP-3 Homolog isoliert werden, dessen Überexpression in Säugerzellen ebenfalls Apoptose induzierte. Dies läßt auf eine hohe funktionelle und strukturelle Konservierung des DAP-3 Proteins in der Evolution schließen (Kissil et al., 1999).

1.5 Aufgabenstellung und Ziele der vorliegenden Arbeit

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war über das humane DAP-3 nur bekannt, daß es als positiver Mediator Interferon- γ induzierter Apoptose fungiert. Es war notwendig, die Funktion des murinen Homologs und der DAP-3 Proteinfamilie allgemein näher zu charakterisieren.

Zunächst sollte die pro-apoptotische Funktion des murinen DAP-3 in Abhängigkeit der funktionellen Domäne analysiert werden. Dazu sollten Apoptose-Nachweisverfahren etabliert werden.

Um eine bessere Einordnung der pro-apoptotischen Funktion von DAP-3 in den Signalweg der Apoptose zu ermöglichen, sollte die intrazelluläre Lokalisation von DAP-3 untersucht werden. Dazu wurde zunächst ein mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein verwendet. Die Lokalisation des endogenen DAP-3 sollte mit Hilfe biochemischer Methoden bestätigt werden.

Die starke Konservierung des DAP-3 Proteins innerhalb der Eukaryonten ließ auf eine zusätzliche nicht-apoptotische Funktion schließen. Diese Funktion sollte in nicht-apoptotischen Organismen, wie z.B. der Hefe, untersucht werden.

2 Material und Methoden

Materialien und Methoden werden hier nur beschrieben, wenn sie für die Durchführung der Arbeit von besonderer Bedeutung waren. Grundlegende Arbeitsmethoden - beispielsweise die Agarosegel-Elektrophorese oder die enzymatische Behandlung von DNA zu Klonierungszwecken - wurden aus den Standardwerken „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“ (Sambrook J., 1989) und „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel F. M., 1994) entnommen und teilweise in leicht abgewandelter Form durchgeführt. Sofern diese Abwandlungen keinen entscheidenden Einfluß auf die Ergebnisse hatten, sind sie hier auch nicht aufgeführt.

2.1 Chemikalien, Medienzusätze und Antikörper

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Roth und Merck bezogen. Nicht aufgeführte Enzyme wurden von der Firma Boehringer Mannheim (später Roche) und der Firma New England Biolabs bezogen.

2.1.1 Chemikalien und Medienzusätze

DMEM	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Sigma, München, Deutschland
FCS	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Mito Tracker TM	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Lyso Tracker TM	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Na ₃ VO ₄	ICN Biochemicals, Eschwege, Deutschland
RPMI	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA-Mixture	ICN Biochemicals, Eschwege, Deutschland

2.1.2 Verwendete Antibiotika

Tabelle 1: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	100 mg/ml in 80 % Ethanol	100 µg/ml
Neomycin	200 mg/ml	200 µg/ml

2.1.3 Verwendete Antikörper

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

Primärer Antikörper	Spezies und sub Typ	Endkonz. im W. B.	weitere Verwendung	Hersteller
DAP-3	Maus, monokl. IgG	1 : 1000	----	Transduction Laboratories, Lexington, USA
Cytochrom c	Kaninchen, polykl. IgG	1 : 1000	----	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
HSP60	Kaninchen, polykl.	1 : 1000	----	Gabe von W. Neupert, Institut für Physiologi- sche Chemie der LMU
AAC	Kaninchen, polykl.	1 : 1000	----	
Anti-Maus FAS	Hamster, monokl. IgG	----	FACScan Apoptose- induktion	Pharmingen, Hamburg, Deutschland
Anti-Human FAS	Maus, monokl. IgM	----	Apoptose- induktion	Biomol, Hamburg, Deutschland
Glucocorticoid Rezeptor	Kaninchen, polykl. IgG	1 : 1000	IP	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Anti GFP Living Colors	Kaninchen, polykl.	1 : 1000	----	Clontech, Heidelberg, Deutschland

2.2 Biologisches Material

Tabelle 3: Verwendete Mikroorganismen

Stamm	Bezugsquelle/Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α und HB101	Stratagene

Tabelle 4: Verwendete Säugerzellen

Zelltyp	Bezugsquelle
Maus Mesangialzellen (MMC)	(Wolf et al., 1992)
Maus Tubuluszellen (MTC)	(Haverty et al., 1988)
Jurkat-Zellen	ATCC

2.3 Spezielle Puffer

Medien und Lösungen wurden mit Wasser hergestellt, das durch eine Milli-Q^{UF Plus}-Anlage der Firma Millipore deionisiert worden war. Medien und Lösungen wurden in der Regel autoklaviert (20 min, 121 °C) oder sterilfiltriert (0,2 μ m Sterilfilter).

2.4 Methoden

2.4.1 DNA-Sequenzanalyse

2.4.1.1 DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung der DNA-Sequenz wurde nach der Methode von Sanger durchgeführt. Dazu wurde der ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.4.1.2 Überprüfung molekularbiologisch veränderter cDNAs

Das Heidelberger Unix Sequenz Analyse Ressourcen Programm (HUSAR) wurde für die Verifizierung der durch molekularbiologische Methoden veränderten cDNAs verwendet. Mit BESTFIT wurden die neu konstruierten cDNAs, nach deren Sequenzierung (s. 2.4.1.1), mit der Original cDNA verglichen.

2.4.2 Protein-Sequenzanalyse

Die Programme PROTEIN und PROSITE wurden verwendet, um die mDAP-3 Proteinsequenz zu analysieren und auf mögliche Proteinmotive zu untersuchen.

Das MITOPROT Programm (Prediction of mitochondrial targeting sequences, <http://www.mips.biochem.mpg.de/cgi-bin/proj/medgen/mitofilter>), das TargetP Programm (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) und das PSORT Programm (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp>) wurden verwendet, um die wahrscheinliche intrazelluläre Lokalisation der DAP-3 Proteine vorherzusagen. Claros und Vincens haben MITOPROT 1996 beschrieben (Claros and Vincens, 1996). TargetP wurde von Emanuelsson et al. (2000) entwickelt (Emanuelsson et al., 2000), und PSORT wurde von Nakai und Horton (Nakai and Horton, 1999) entworfen.

Das Programm PSIPRED (<http://insulin.brunel.ac.uk/psipred>) wurde verwendet, um die Sekundärstruktur des mDAP-3 Proteines zu analysieren (Jones, 1998; Jones, 1999; Jones et al., 1994).

2.4.3 RNA Isolierung aus Gewebe und Zellkulturmaterial

RNA, sowohl aus Gewebe als auch aus Zellkulturmaterial, wurde mittels der sauren Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert (Chomczynski and Sacchi, 1987). Da RNA leicht durch ubiquitär vorkommende RNAsen enzymatisch abgebaut wird, ist es während der Isolierung wichtig, die Aktivität der RNAsen zu verhindern. Während der sauren Phenol/Chloroform-Extraktion diente Guanidin Chlorid als potenter Ribonukleasen-Inhibitor. Die während der Extraktion verwendeten Reagenzien (soweit sie keine Amino-Gruppen enthalten) und Reaktionsgefäße wurden mit DEPC vorbehandelt. Nach der Isolation wurde, wenn möglich, ein Ribonukleaseinhibitor (RNasin) verwendet. Durch die Verwendung von Microcarrier-Gel, einem α -D-Glucose Polymer, wurde die RNA-Ausbeute, besonders bei geringen Probenmengen, deutlich erhöht.

Für die RNA Isolierung durch saure Phenol/Chloroform-Extraktion wurden die Gewebeprouben oder das Zellkulturmaterial in „TRI-Reagent“ (TRI; Sigma, München, Deutschland) in einem Verhältnis von 100 µg Gewebe oder 10 cm² Zellkulturflasche / ml TRI aufgenommen und bis zur weiteren Behandlung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die so gewonnenen Proben wurden mit einem Glas-Teflon-Homogenisator zerkleinert und 3x je ca. 10 sec mit Ultraschall behandelt. Nach der Zugabe von Microcarrier-Gel wurden die Proben gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Zur Extraktion der RNA wurden zunächst 0,2 ml wassergesättigtes Phenol / 1 ml TRI hinzugegeben, gemischt, 3 min bei RT inkubiert und 15 min bei 4 °C und 12000g zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Die obere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, und die Extraktion wurde wiederholt. Nach diesem zweiten Extraktionsschritt wurde zu der oberen Phase 0,5 ml Isopropanol / 1 ml TRI gegeben, gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation, 15 min bei 4 °C und 12000g, wurde die RNA einer DNase Behandlung unterzogen.

2.4.3.1 DNase Behandlung von RNA

Um eine Verunreinigung der isolierten RNA mit genomischer DNA zu vermeiden, wurde die RNA mit DNase behandelt, einem Enzym, das selektiv eventuell vorhandene DNA abbaut. Dazu wurde die isolierte RNA nach dem letzten Zentrifugationsschritt der Extraktion mit 80 % Ethanol gewaschen und in einem 50 µl DNase-Ansatz (1U DNase, RNase Inhibitor, DNase-Puffer) gelöst. Dieser Ansatz wurde 30 min unter Schütteln bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit DEPC-H₂O auf 300 µl aufgefüllt und gleiches Volumen (300 µl) saures Phenol/Chloroform dazu gegeben, gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 12000g wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt, 280 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) hinzugefügt und gemischt, bis sich eine Emulsion bildete. Danach wurde 5 min auf Eis inkubiert, bevor 5 min bei 4°C und 12000g zentrifugiert wurde, um die Phasen zu trennen. Nun wurde Ether zu dem Überstand gegeben, gemischt und zentrifugiert und der Ether-Überstand mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal durchgeführt und die untere RNA-haltige Phase wurde dann mit Natriumacetat (1/10 des vorhandenen Volumens) und dem 2,5 fachen Volumen an 100 % Ethanol versetzt und zur Fällung eine Stunde in den Gefrierschrank bei -80 °C gestellt.

2.4.3.2 Reverse Transkription der RNA

Zur weiteren Analyse wurde die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dazu wurde SUPERSORIPT Polymerase verwendet, eine reverse Transkriptase, der im Vergleich zur ursprünglichen M-MLV reversen Transkriptase die RNase-H Aktivität fehlt. Es wurden nur oligo-dT-Primer verwendet, um zu gewährleisten, daß nur messenger RNA (mRNA), für die ein polyA-Schwanz spezifisch ist, in cDNA transkribiert wurde. Zur Kontrolle auf eine eventuelle Kontamination, mit z.B. genomischer DNA, wurde jede Probe halbiert und nur zu einer Hälfte mit SUPERSORIPT Polymerase inkubiert. Die andere Hälfte, die sog. RT minus (RT-) Proben, wurden im übrigen identisch behandelt.

Die DNase behandelte RNA wurde nach dem letzten Zentrifugationsschritt mit 80 % Ethanol gewaschen und das Pellet für 10 min luftgetrocknet. Die RNA wurde dann in DEPC-H₂O und oligo-dT-Primer gelöst und 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde der RT-Ansatz (100 U M-MLV Enzym, 0,5 mM dNTP-Mix, 1x SS Puffer, 0,5 % BSA) hinzugegeben und für 1 h bei 42°C inkubiert. Nach einer Ammoniumacetat/Ethanol Fällung wurde die RNA dann in 20 µl TE gelöst.

2.4.4 Die Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte für analytische oder präparative Zwecke wurde mit Hilfe der PCR (Mullis et al., 1986; Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1985) durchgeführt. Als Template diente Plasmid DNA oder cDNA.

<u>Standard PCR-Ansatz (25 µl):</u>			<u>Temperaturprofil</u>	
H ₂ O		17,0 µl	1 x	94°C, 3,00 min
PCR-Puffer	10 x	2,5 µl	30 x	94°C, 0,45 min
dNTP	1,25 mM	4,0 µl		56°C, 1,00 min
sense Primer	10 µM	0,25 µl		72°C, 1,00 min/kb
antisense Primer	10 µM	0,25 µl	1 x	72°C, 7,00 min
<i>template</i> (ca. 100 ng)		1,0 µl		
<u>1,25 U Taq-Polymerase</u>		<u>0,125 µl</u>		
Insgesamt		25,125 µl		

Für die analytische PCR wurde Taq-Polymerase (AmpliTaq, Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland) in einem Standard 25 µl PCR-Ansatz benutzt. Für präparative PCRs wurde Pfu-Polymerase (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) in einem 50 µl PCR-Ansatz mit nur 25 Zyklen verwendet benutzt. Die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der Pfu-Polymerase sorgt für eine geringere Fehlerhäufigkeit (*proof-reading*-Eigenschaft).

2.4.5 Northern-Blot

Material:	Hybridisierungsmix:	5x Denhardt's 5x SSC 1% SDS 0,1 mg/ml Fischsperma-DNA radioaktiv markierte Sonde
	Waschpuffer 1:	1x SSC 0,1 % SDS
	Waschpuffer 2:	0,2x SSC 1 % SDS
	Strippuffer:	10 mM Tris/HCl pH7,5 1 mM EDTA 4 % SDS

Die RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe eines Kapillarblots auf eine Nylonmembran (GeneScreenTM, NEN, Köln, Deutschland) übertragen. Danach konnte die RNA durch Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde analysiert werden.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der RNA wurde sowohl das Gel als auch die Nylonmembran zunächst für 10 min gewässert. Nylonmembran, RNA-Agarosegel und Whatman-Papier wurden für 10 min in 10x SSC äquilibriert. Als Transferpuffer wurde ebenfalls 10x SSC verwendet. Der Aufbau des Kapillarblots erfolgte wie in „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel F. M., 1994) beschrieben.

Der Transfer erfolgte über Nacht. Nach Beendigung des Transfers wurde die Nylonmembran für 10 min in 2x SSC geschwenkt, 30 min auf Whatman-Papier luftgetrocknet und 1 h bei 80°C gebacken. Die RNA wurde durch „UV-Crosslinking“ an der Membran fixiert. Dazu wurde die Membran in einem speziellen Bestrahlungsgerät (GeneLinker, BioRad, München, Deutschland) mit einer Energie von 50 mJoule bestrahlt.

Vor einer erneuten Hybridisierung einer Membran wurde diese mit Strippuffer für 5 min bei 100°C behandelt.

2.4.5.1 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Die Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden erfolgte nach der „random priming“-Methode (Feinberg and Vogelstein, 1983). Sie ermöglicht eine einfache und schnelle Markierung beliebiger DNA-Sequenzen. Dazu werden kurze Hexanukleotide („random primers“) an die denaturierte DNA hybridisiert, und durch die Klenow DNA-Polymerase werden in Gegenwart radioaktiver Nukleotide neue DNA-Stränge synthetisiert. Zur Sondensynthese wurden die Reagenzien des „Prime It II, Random Primer Labeling Kit“ (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verwendet. Die Markierungsreaktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers und wurde durch eine PEI-Chromatographie überprüft.

Zur Herstellung einer mDAP-3 spezifischen Sonde wurde als Matrize ein 578 bp langes Fragment aus dem 3‘ Bereich der mDAP-3 cDNA verwendet.

Die zu markierenden DNA-Fragmente wurden zur Auftrennung in einem präparativen LMP-Agarosegel aufgetragen, ausgeschnitten und durch eine Phenol/Chloroform Extraktion aus der Agarose aufgereinigt.

2.4.5.2 PEI-Chromatographie

Material: Laufmittel 0,75 M Na₂HPO₄-Puffer, pH 3,5

Die PEI (Polyethylenimin)-Dünnschicht-Chromatographie (Miller and Kirkpatrick, 1969; Reyes, 1972) ermöglicht eine schnelle, qualitative Überprüfung radioaktiver Markierungsreaktionen. Die Methode beruht darauf, daß freies Phosphat sowie Mononukleotid-Phosphate mit einem sauren Fließmittel wandern, während höhermolekulare Nukleinsäuren in der stationären Phase verbleiben.

Zur Durchführung einer PEI-Chromatographie wurden 0,5 µl des Markierungsansatzes auf einen Streifen PEI-Zellulose (Machery-Nagel) aufgetragen. Nach Antrocknen der Lösung wurde der Streifen für 20 min in einem Becherglas, mit 0,75 M Na₂HPO₄-Puffer, pH 3,5 als Laufmittel, chromatographiert. Die Auswertung erfolgte durch eine 5-10 minütige Autoradiographie. Ein starkes Signal an der Auftragestelle zeigt dabei einen guten Einbau an.

2.4.5.3 Northern-Blot Hybridisierung und Waschen der Membran

Die Hybridisierung erfolgte nach Church und Gilbert (Church and Gilbert, 1984). Die Membran mit der daran fixierten RNA wurde kurz in H₂O geschwenkt und mit der Nukleinsäure-Seite nach innen in eine Hybridisierungsröhre überführt. In die Röhre wurden ca. 20 ml Hybridisierungsmix ohne die radioaktiv markierte Sonde gegeben. In einem Hybridisierungsofen wurde die Membran unter Rotation für 2 h bei 65°C prähybridisiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen.

Vor der eigentlichen Hybridisierung wurde die Sonde für 10 min. bei 95°C denaturiert und in 10 ml 70°C warme Hybridisierungslösung überführt. Nach Beenden der Prähybridisierung wurde die gebrauchte Lösung aus der Hybridisierungsröhre abgossen und durch die Hybridisierungslösung mit der radioaktiv markierten Sonde ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte unter Rotation bei 65°C im Hybridisierungsofen für mindestens 8 h, oder über Nacht.

Unspezifisch gebundene Sondenmoleküle wurden nach der Hybridisierung durch mehrmaliges Waschen entfernt. Dazu wurde die Hybridisierungslösung abgossen und die Membran in der Röhre zweimal mit je ca. 200 ml Waschpuffer 1 (2x SSC, 0,1% SDS) (vorgewärmt auf 70°C) gewaschen. Anschließend wurde die Membran aus der Röhre entnommen und zweimal in einem Schüttelwasserbad bei 65°C in ca. 300 ml Waschpuffer 2 für 30 min. gewaschen

Die Membran wurde anschließend in Haushaltsfolie eingeschlagen und je nach Stärke der Signale für 1 h bis mehrere Tage exponiert. Die Exposition erfolgte in Expositionskassetten eines Phosphorimagers (Molecular Dynamics, Krefeld, Deutschland), die mit Hilfe entsprechender Software (Image Quant, Molecular Dynamics, Krefeld, Deutschland) ausgewertet wurden.

2.4.6 Kultivierung und Lagerung von *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae*

Material: 10x Einfriermedium: 10 % Glycerin in H₂O

Die verschiedenen Stämme von *E. coli* und *S. cerevisiae* wurden immer zuerst auf entsprechenden Agarplatten ausgestrichen, um Einzelkolonien zu erhalten. *E. coli* wurde bei 37°C, *S. cerevisiae* bei 30°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden ausschließlich von Einzelkolonien angeimpft und wo immer dies möglich war, wurde durch entsprechende Antibiotika ein Selektionsdruck angelegt.

Glycerinkulturen von *E. coli* wurden von Übernachtskulturen der verschiedenen Stämme mit Hilfe von 10x Einfriermedium erhalten und bei - 80°C gelagert.

2.4.7 Plasmid-Konstruktion

Die cDNA-Sequenz des murinen DAP-3 (EMBL Gen Bank: AJ250375) wurde mittels PCR aus im Labor vorhandenen cDNA-Plasmiden amplifiziert. Dazu wurden Primer mit 5' Überhängen, in denen Restriktionsschnittstellen enthalten waren, verwendet. Die so neu konstruierten PCR-Produkte erlaubten eine sichere Klonierung in die „multiple cloning site“ des entsprechenden Expressionsvektors.

2.4.7.1 mDAP-3/EGFP

Das mDAP-3/Enhanced Green Fluorescent Fusionsprotein (mDAP-3/EGFP) wurde durch die PCR-Klonierung eines Fragmentes der mDAP-3 cDNA, mit den Primern T7 und mDAP-3 BamHI (*Bam*HI (vergl. 5.1.2), erhalten.

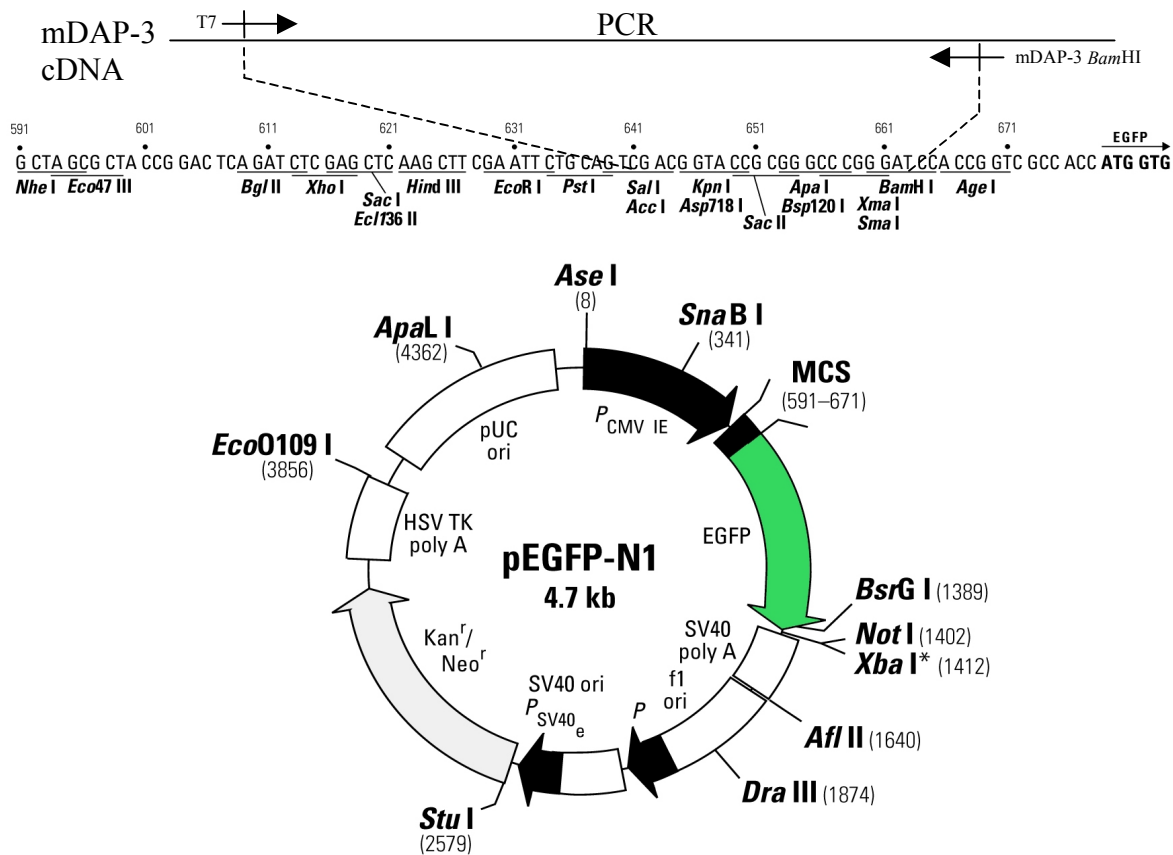


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteins. Die Vektor-Karte wurden dem Katalog der Fa. Clontech entnommen.
 Abkürzungen: pCMV IE humaner Cytomegalovirus Promoter
 MCS „multiple cloning site“
 EGFP: cDNA des `Enhanced Green Fluorescent Protein` Gens

f1 ori: Replikationsursprung des f1-Phagen
 Kan^r/Neo^r: Kanamycin-/Neomycin-Resistenz-Gen
 pUC ori: Replikationsursprung für Plasmid-Replikation in *E. coli*

Pfeile geben die Richtung der Transkription an. Der Pfeil in f1 ori zeigt in Richtung der Einzelstrang-DNA-Synthese.

Dieses PCR-Produkt enthält die Nukleotide 1-1344 der mDAP-3 cDNA. Das Stopkodon (TAA) an Position 1345-1347, das normalerweise für den Translationsstop kodiert, wurde durch den Primer mDAP-3 *Bam*HI in ein Kodon, das für die Aminosäure Serin kodiert (TCA), verändert. Abbildung 7 zeigt schematisch die Klonierung des mDAP-3 PCR Produktes in die *Sal*I und *Bam*HI Schnittstellen der „multiple cloning site“ des Vektors pEGFP-N1 (Clontech, Heidelberg, Deutschland).

An das mutierte Stopkodon schließen sich 6 Kodons aus der „multiple cloning site“ des EGFP-N1 Vektors an, bevor dann, in Fortsetzung des mDAP-3 Leserahmens, das Startkodon (ATG) des EGFPs folgt (Abbildung 8). Somit konnte die Konstruktion des Fusionsproteins gewährleistet werden.

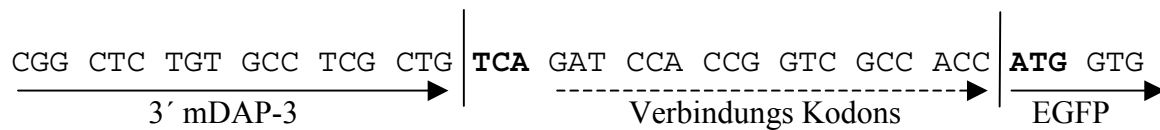


Abbildung 8: Sequenz des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteins im Übergangsbereich vom 3' Terminus des mDAP-3 Leserahmens zum EGFP Leserahmen. Das mutierte mDAP-3 Stopkodon (TAA → TCA) und das ATG Startkodon des EGFP Leserahmens sind hervorgehoben.

2.4.7.2 mDAP-3 P-Loop Mutation

Die Punktmutation im mDAP-3 P-Loop wurden mit Hilfe des „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis“ Kit (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) in die mDAP-3 cDNA eingefügt. Die Mutagenese erfolgte durch eine PCR-Reaktion unter Verwendung von Primern, die die gewünschte Mutation enthalten. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Der Basen- und Aminosäurenaustausch ist in Abbildung 9 gezeigt. Es wurden die Primer mDAP-3 KO-S und mDAP-3 Ko-AS für die Herstellung der P-Loop Mutation eingesetzt (vergl. 5.1.1).

mDAP-3		TAT	GGG	GAG	AAG	GGG	ACA	GGA	AAG	ACC	CTC	AGT	CTC
	120	Y	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	K	T	L	S	L
Δ P-Loop	mDAP-3	TAT	GGG	GAG	AAG	GGG	ACA	GGA	AGG	ACC	CTC	AGT	CTC
	120	Y	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	R	T	L	S	L

Abbildung 9: Veränderte P-Loop Sequenz der mDAP-3 cDNA. Durch einen einfachen Basenaustausch konnte die Aminosäure 127 von einem Lysin (K) zu einem Arginin (R) verändert werden. Die durch die PCR-Reaktion veränderte Base und Aminosäure sind farbig unterlegt, das P-Loop Motiv unterstrichen dargestellt.

2.4.7.3 mDAP-3 Expression in Hefe

Das Konstrukt für die Expression des murinen DAP-3 in Hefe wurde durch die PCR-Klonierung eines Fragmentes der mDAP-3 cDNA, mit den Primern M3-Start und M3-Ende (vergl. 5.1.2), in den Hefe-Expressionsvektor pYX123 (Novagen, Bad Soden, Deutschland) erhalten.

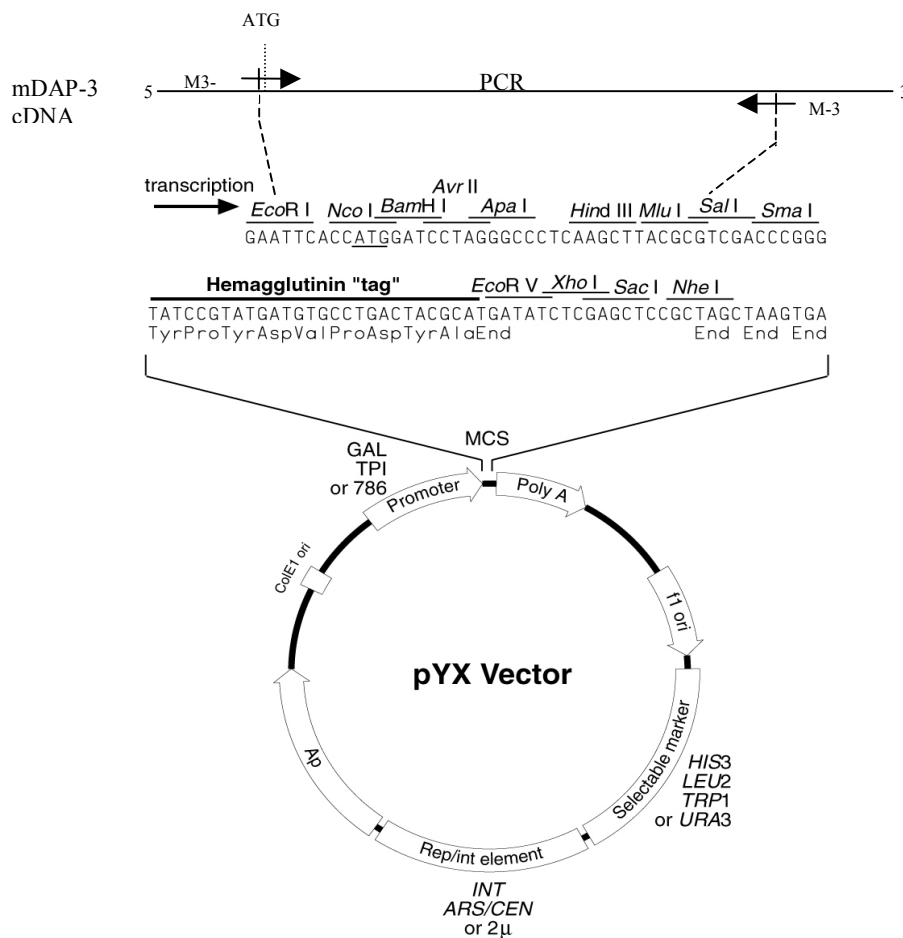


Abbildung 10: Schema der Klonierung des mDAP-3 PCR Produktes in die *SalI*- und *EcoRI*-Schnittstellen der „multiple cloning site“ des Vektors pYX. Die Vektor-Karte wurden dem

Katalog der Fa. Novagen entnommen. Der für die Expression von mDAP-3 in Hefe verwendete Vektor pYX123 hat als Promoter den TPI-Promoter und HIS3 als Selektionsmarker für die Expression in Hefe.

Abkürzungen:	TPI Promoter	Triose Phosphat Isomerase Promoter
	MCS	„multiple cloning site“
	f1 ori:	Replikationsursprung des f1-Phagen
	Selectable marker (HIS3)	Histidin als Expressions- Selektionsmarker
	Rep/int element (2 μ)	Replikations- Integriationselement
	Ap:	Ampicilin-Resistenz-Gen

Pfeile geben die Richtung der Transkription an. Der Pfeil in f1 ori zeigt in Richtung der Einzelstrang-DNA-Synthese.

Dabei wurde der 5‘ nichttranslatierte Bereich der mDAP-3 cDNA nicht mit amplifiziert, sondern der Primer M3-Start wurde so gewählt, daß das PCR-Produkt kurz vor dem Startkodon (ATG) des mDAP-3 Leserahmens begann. Es wurden also nur die Nukleotide 151 bis 1347 der mDAP-3 cDNA für die Expression in Hefe verwendet.

Der Vektor pYX123 besitzt einen der stärksten konstitutiven Promotoren für die Expression in Hefe, den Triosephosphat Isomerase Promoter (Alber and Kawasaki, 1982). Als 2 μ Vektor repliziert sich pYX123 autonom und stabil mit einer Kopienzahl von 25 – 100 pro Zelle. Um eine zuverlässige Expression des gewünschten Gens zu gewährleisten kann der Verlust des Vektors durch einen HIS3 Selektionsmarker verhindert werden.

2.4.8 Säugerkultivierung

Die Kultur von Säugerkulturen geschah unter Standardbedingungen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Konzentration. Um Kontaminationen auszuschließen, wurden die Zellen täglich lichtmikroskopisch überwacht. Kontaminationen durch Mycoplasmen wurden durch einen speziellen Assay (Ridascreen Mycoplasma IFA, r-biopharm) ausgeschlossen.

2.4.8.1 Maus Mesangialzellen (MMC)

Material:	Medium für MMC:	DMEM, 4500 mg/l Glucose, ohne Pyruvat	500 ml
		Penicillin/Streptomycin	1 %
		Serum Supreme	2,5 %
		Glutamin 200 mM	5 ml
	Trypsin/EDTA:	Trypsin	0,05 %
		EDTA	0,53 mM

Maus Mesangialzellen wurden unter bereits früher beschriebenen Bedingungen (Wolf et al., 1992) in Kompletmedium, Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM), dem 2,5 % Serum

Supreme, 1 % Penicillin/Streptomycin, und 1 % Glutamin hinzugefügt wurde, kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich mit Trypsin/EDTA-Lösung passagiert und in einem Verhältnis von 1 : 20 und 1 : 40 in 10 cm Zellkulturschalen (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland, Falcon 3003) bei 37 °C und 5 % CO₂ weiter kultiviert.

2.4.8.2 Maus Tubuluszellen (MTC)

Material:	Medium für MTC:	DMEM, 4500 mg/l Glucose, ohne Pyruvat	500 ml
		Penicillin/Streptomycin	1 %
		FCS	10 %
		Hepes 1 M	5 ml
	Trypsin/EDTA:	Trypsin	0,05 %
		EDTA	0,53 mM

Maus Tubuluszellen wurden unter bereits früher beschriebenen Bedingungen (Haverty et al., 1988) in Kompletmedium, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), dem 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 mM Hepes hinzugefügt wurde, kultiviert. Die Zellen wurden dreimal wöchentlich mit Trypsin/EDTA-Lösung passagiert und in einem Verhältnis von 1 : 10 in T25 Zellkulturflaschen (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) bei 37 °C und 5 % CO₂ weiter kultiviert.

2.4.8.3 Jurkat

Material:	Medium für Jurkat:	RPMI 1640	500 ml
		Penicillin/Streptomycin	1 %
		FCS	10 %

Jurkat-Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) erhalten und in RPMI 1640 Medium, dem 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin zugefügt wurde, bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Als Suspensionszellen wurden Jurkat zweimal wöchentlich 1 : 20 passagiert, indem ein entsprechender Teil der alten Zellsuspension in eine neue T25 Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt wurde.

2.4.9 Standard-Hefekultur

Für die Kultivierung und Manipulierung der Hefelinien wurde nach Standardtechniken durchgeführt (Guthrie and Fink, 1991).

2.4.10 Transiente Transfektion

Für die transiente Transfektion wurden sub-konfluente Zellen verwendet, da sich nur proliferierende Zellen effizient transfizieren lassen. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA (0,05 % Trypsin, 0,53 mM EDTA, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) abgelöst und in FCS-haltigem Medium aufgenommen, um die Trypsin-Wirkung abzustoppen. Dann wurden die Zellen 5 min bei 1000g zentrifugiert und in einer Konzentration von $5 - 6 \times 10^6$ /ml in PBS resuspendiert. Pro Transfektionsansatz wurden 0,5 ml dieser Zellsuspension bei 250 V und 960 μ F elektroporiert und sofort danach mit einem dem Zelltyp entsprechenden Medium aus der Elektroporationsküvette in eine 10 cm Zellkulturschale transferiert. Nach der Transfektion wurden die Zellen unter normalen Bedingungen für 24 – 48 h im Brutschrank bis zur weiteren Analyse kultiviert.

2.4.11 Proteinsolubilisierung

Material: Lysepuffer: 50 mM Tris/HCL (pH 7,4)
1 % Nonidet P-40
0,25 % Natriumdesoxycholat
150 mM NaCl
1 mM EGTA
1 mM Na₃VO₄
1 mM NaF
1 μ g/ml Leupeptin
1 μ g/ml Pepstatin

Um die für die Durchführung weiterer Analysen (z.B. Western Blot) notwendigen Proteinlysate zu erhalten wurden die Zellen zunächst, wenn notwendig, mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Lysepuffer resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde dann für 20 min mit 10.000 g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand wurde für die weiteren Untersuchungen verwendet.

2.4.12 Proteinbestimmung

Material: DC Protein Assay (BioRad):
Reagenz A: alkalische Kupfer-Tartrat Lösung
Reagenz B: Folin Reagenz
Reagenz S
Reagenz A' = 20 μ l Reagenz S/1ml Reagenz A

2.4.14 Western Blot

Material:	“Semi-dry blotting” Apparatur (BioRad, München, Deutschland)
Anodenpuffer I:	0,3 M Tris/HCl pH 10,4 20 % Methanol (v/v)
Anodenpuffer II:	25 mM Tris/HCl pH 10,4 20 % Methanol (v/v)
Kathodenpuffer:	25 mM Tris/HCl pH 9,4 20 % Methanol (v/v) 40 mM 6-Aminohexansäure
	Whatman 3 MM PVDF-Membran (Millipore, Eschborn, Deutschland)
Ponceau S-Lösung:	250 mg Ponceau S in 50 ml H ₂ O + 5 ml Essigsäure
Blockierungspuffer:	5 % Magermilchpulver in PBS
Waschpuffer:	0,1 % Tween-20 in PBS

Proteinlysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die entsprechenden SDS-Gele wurden dann für die Western-Blot-Analyse verwendet. Dazu wurden die Gele 10 min in Kathodenpuffer äquilibriert und die PVDF-Membran 10 sec in Methanol und dann ebenfalls 10 min in Kathodenpuffer äquilibriert. Der Aufbau des Blot-Systems und der Proteintransfer erfolgte gemäß der Produktvorschrift in einer „semi-dry blotting“ Apparatur (BioRad, München, Deutschland) bei 2,5 mA/cm² Gelfläche für 1 h. Nach dem Transfer wurden die Proteinbanden auf der PVDF-Membran durch 10minütiges Schwenken in der Ponceau S-Lösung reversibel angefärbt. Dabei können die Proteinmarkerbanden eingezeichnet werden, da diese nach der Antikörperinkubation nicht mehr sichtbar sind.

Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die PVDF-Membran über Nacht bei 4 °C, mindestens aber 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer geschüttelt. Der primäre Antikörper wurde dann, in Blockierungspuffer verdünnt, zugegeben und die PVDF-Membran wurde für weitere 1-2 Stunden bei RT geschwenkt. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, wurde die PVDF-Membran 6x 10min mit Waschpuffer gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Anti-Fc, Peroxidase gekoppelt) wurde für 1 Stunde bei leichtem Schwenken, ebenfalls in Blockierungspuffer verdünnt, bei RT inkubiert. Nach erneuten 6 Waschschritten erfolgte die Detektion. Hierzu wurde der „Enhanced Chemi Luminescence Kit“ (Amersham

International, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Die PVDF-Membran wurde für die Detektion 1 min mit dem ECL Reagenz inkubiert, in Haushaltsfolie eingeschlagen und das Signal mit Kodak X-OMAT Röntgenfilmen in Röntgenkassetten mit Verstärkerfolien detektiert.

2.4.15 Apoptose Induktionsmethoden

2.4.15.1 Stimulation von MMCs und MTCs mit IFN- γ und TNF- α

Damit die murinen MMCs und MTCs das Fas Antigen auf der Zelloberfläche exprimieren, ist eine vorherige Stimulation der Zellen mit Cytokinen notwendig. Dabei war eine Kombination aus Interferon- γ und TNF- α besonders geeignet (s. 3.5.3).

Die Zellen wurden für die Stimulation in 6-well-Platten in einer Konzentration von ca. 160.000 Zellen pro Well ausgesät und am nächsten Tag mit 250 U Interferon- γ und 5 ng/ml TNF- α für 24 - 36 h stimuliert.

2.4.15.2 Fas-Antikörper-Stimulation

Um für die Apoptose-Nachweis-Assays eine geeignete positive Kontrolle zur Verfügung zu haben, wurde die Methode der Apoptoseinduktion durch einen agonistischen Fas-Antikörper gewählt. Das Fas-Antigen ist ein 45 kDa Zelloberflächen-Protein, das zu der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie gehört und in der Lage ist, Apoptose zu vermitteln. Es wurden zwei verschiedene Antikörper, einer für die humanen Jurkat-Zellen, und einer für die murinen MMCs und MTCs, verwendet (s. Tabelle 2).

Humane Jurkat-Zellen exprimieren als T-Lymphozyten, das Fas-Antigen konstitutiv auf der Oberfläche. Um eine Apoptoseinduktion zu erhalten wurde der entsprechende Anti-Human Fas Antikörper (Klon CH11, Biomol, Hamburg, Deutschland), in einer Konzentration von 50 - 100 ng/ml dem Zellkulturmedium für 2 – 6 h zugefügt. Die Apoptose Induktion konnte dann mit den verschiedenen Assay-Systemen zuverlässig und reproduzierbar nachgewiesen werden.

Die murinen MMCs und MTCs exprimieren das Fas-Antigen nicht konstitutiv auf der Zelloberfläche, deshalb war eine Induktion der Fas-Expression vor einer Stimulation der Zellen mit dem Anti-Fas-Antikörper notwendig (s. 2.4.15.1). Um eine Apoptoseinduktion zu erhalten, wurde der entsprechende Anti-Maus Fas-Antikörper (Klon Jo2, Pharmingen,

2.4.16.2 Annexin-V-FLUOS Färbung

Material:	Annexin-Puffer:	10 mM HEPES pH 7,4 140 mM NaCl 5 mM CaCl ₂
	Annexin-V-FLUOS:	50 µg/ml

Für die Annexin-V-FLUOS Färbung wurden die zu untersuchenden Zellen zunächst, wenn notwendig, mit Trypsin/EDTA abgelöst und dreimal mit Annexin-Puffer gewaschen. Das Zellpellet des letzten Waschschrilles wurde in 500 µl Annexin-V-FLUOS-Markierungslösung (Annexin-Puffer + 5 µl Annexin-V-FLUOS) für 15 min bei RT, lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sofort mittels Durchflußzytometer unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von 488 nm und eines 515 nm Bandpaßfilters zur Fluorescein-Detektion analysiert. Dabei wurden 10.000 Zellen ausgewertet.

2.4.16.3 DNA-Leiter-Gel

Material:	Lysepuffer:	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA 150 mM NaCl 1 % SDS 0,2 mg/ml Proteinase K
	Probenpuffer:	10 mM 10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA 0,5 mg/ml RNase A

(nach Itoh *et al.*, (Itoh *et al.*, 1993))

Die zur Apoptoseinduktion stimulierten Zellen wurden, wenn notwendig, mit Trypsin/EDTA abgelöst, mit PBS gewaschen, pelletiert und in 300 µl Lysepuffer / 3×10^6 Zellen resuspendiert. Die Proben wurden ÜN bei 37°C inkubiert und die DNA dann mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Das Pellet wurde in 30 µl Probenpuffer resuspendiert und auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen.

2.4.17 Zellorganell Färbung

Material:	Mito Tracker™ Lyso Tracker™ Mowiol 4 % Paraformaldehyd
-----------	---

Um die intrazelluläre Lokalisation von mDAP-3 zu untersuchen, wurden Zellorganellspezifische Farbstoffe, die selektiv entweder nur Mitochondrien (Mito TrackerTM) oder nur Lysosomen (Lyso TrackerTM) anfärben, verwendet. Hierzu wurden MMCs oder MTCs, entweder direkt, oder nachdem sie mit mDAP-3/EGFP transient transfiziert worden waren, auf Glas-Deckgläschen für 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Für die Färbereaktion wurde das Zellkulturmedium durch vorgewärmtes Medium (37°C) mit dem entsprechenden Farbstoff in einer Konzentration von 100 nM ersetzt. Die Zellen wurden mit diesem Medium für 40 min unter Standardbedingungen kultiviert und dann dreimal mit PBS gewaschen. Nach einer Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd wurden die Zellen direkt in einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 410 Zeiss), entweder bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem Bandpaßfilters unterhalb von 515 nm (EGFP Fluoreszenz), oder bei einer Anregungswellenlänge von 543 nm und einem 600 nm Bandpaßfilters (Mito Tracker Red CMXRosTM) analysiert. Alternativ wurden die Zellen mit Mowiol-Lösung eingebettet und im Lichtmikroskop (Leica DMBRE) untersucht.

2.4.18 Mitochondrien-Isolierung aus Ratten- und Mäuseleber

Material:	Puffer:	250 mM Sucrose 2 mM EDTA 10 mM Triethanolamin pH 7,3
-----------	---------	--

Mitochondrien wurden nach einer etablierten Methode (Werner and Neupert, 1972) aus Rattenleber isoliert. Dazu wurde eine Ratte über Nacht gehungert, um Glykogen aus der Leber zu entfernen. Die Ratte wurde dann zunächst mit Ether betäubt und durch Genickbruch getötet, Mäuse wurden direkt durch Genickbruch getötet. Die Leber wurde möglichst rasch entnommen und sofort aufgearbeitet. Dazu wurde sie zunächst auf Eis mit Puffer gewaschen und mit einer sterilen Schere in kleine Stücke geschnitten. Diese wurden dann in einem Homogenisator bei 4°C und 300 rpm homogenisiert. Die entstandene Suspension wurde bei 4°C und 700g 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und der Zentrifugationsschritt zweimal wiederholt. Der nun von nicht homogenisiertem Material befreite Überstand wurde bei 4°C und 7000g 10 min zentrifugiert. Das Pellet, das die zu isolierenden Mitochondrien enthielt, wurde noch zweimal mit Puffer gewaschen, bevor es für weitere Experimente bei – 20°C gelagert wurde. Der Überstand wurde weiter in Cytosol- und Mikrosomen-Fraktion

aufgetrennt. Dazu wurde eine Ultra-Zentrifugation bei 4°C und 105000g für 1 h durchgeführt. Das dabei entstehende Pellet enthielt Mikrosomen und der Überstand das Cytosol.

Die Effizienz der Zellfraktionierung wurde mit Hilfe Kompartiment spezifischer Enzymaktivitätsmessung überprüft. Dazu wurden die Aktivitäten der Lactat-Dehydrogenase und Malat-Dehydrogenase mit Hilfe von Standard Enzym-Assays bestimmt:

Lactat-Dehydrogenase Aktivität:

(Nach „Praktikum der Biochemie für Mediziner und Zahnmediziner“, Institut für Physiologische Chemie der LMU)

Material:	0,2 M TRAP pH 7,6 1,2 mg/ml Pyruvate 6 mg/ml NADH
Lysepuffer:	0,5 % Triton X-100 50 mM Tris/HCl pH 7,4 1 mM PMSF

Die Proteinlösung wurde mit Lysepuffer auf eine Konzentration von 2 µg/ml eingestellt und für 10 min bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurden 500 µl TRAP, 20 µl NADH, 2 µg Proteinlösung und H₂O, in einem Endvolumen von 1 ml, für 5 min bei 25°C inkubiert. Nach einer weiteren Zugabe von 30 µl NADH wurde die spezifische Enzymaktivität für 2 min bei 340 nm und 25°C gemessen. Das Ergebnis wurde in spezifischer Enzymaktivität angegeben, die definiert ist als die Anzahl der Units Enzym pro mg Gesamtprotein. Eine Unit entspricht dabei der Menge an Enzym, die notwendig ist um 1 µmol NADH pro Minute, unter den gegebenen Bedingungen, umzusetzen.

Malat-Dehydrogenase-Aktivität:

(nach England und Siegel, (England and Siegel, 1969))

Material:	0,24 M Glycine-NaOH pH 10,0 0,85 M L-Maleinsäure pH 7,5 24,4 mM NAD ⁺ pH 6,5
Lysepuffer:	0,5 % Triton X-100 50 mM Tris-HCl pH 7,4 1 mM PMSF

Die Proteinlösung wurde mit Lysepuffer auf eine Konzentration von 2 µg/ml eingestellt und für 10 min bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurden 420 µl Glycine-NaOH, 100 µl L-Maleinsäure und H₂O, in einem Endvolumen von 1 ml, für 5 min bei 30°C inkubiert. Nach einer Zugabe von 100 µl NAD⁺ und 2 µg Proteinlösung wurde die spezifische Enzymaktivität für 2 min bei 340 nm und 30°C gemessen. Das Ergebnis wurde in spezifischer Enzymaktivität angegeben, die definiert ist als die Anzahl der Units Enzym pro mg Gesamtprotein. Eine Unit entspricht dabei der Menge an Enzym, die notwendig ist um 1 µmol NAD⁺ pro Minute, unter den gegebenen Bedingungen, umzusetzen.

2.4.19 Zellfraktionierung von Zellkulturmaterial

Material:	Lysepuffer:	5 mM HEPES 2 mM MgCl ₂ 75 mM NaCl 5 mM EDTA 1 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Pepstatin
-----------	-------------	---

Mitochondriale und cytosolische Fraktionen von MTCs oder Jurkat wurden durch eine differentielle Zentrifugation erhalten. Dazu wurden die Zellen zunächst, wenn notwendig, mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Lysepuffer resuspendiert und durch mehrfaches Passagieren durch eine 25GA1 0,5x25 Nadel aufgebrochen. Die Zellsuspension wurde bei 4°C und 2000 g für 5 min zentrifugiert, um noch intakte Zellen zu entfernen. Das Pellet wurde verworfen, und der Überstand wurde für 20 min bei 4°C und 15000g zentrifugiert. Das resultierende Pellet beinhaltete die mitochondriale Fraktion und der Überstand das Cytosol. Beide Fraktionen wurden anschließend getrennt analysiert, z.B. durch SDS/PAGE und Western Blot Analyse.

2.4.20 Digitoninbehandlung isolierter Mitochondrien

Material:	Digitonin:	rekristallisiertes Digitonin
	SEMK-Puffer:	1 M Sorbitol 20 mM EDTA 80 mM KCl 10 mM DTT

Isolierte Mitochondrien wurden mit verschiedenen Digitoninkonzentrationen (0 % - 0,4 %) in 20 µl SEMK-Puffer für zwei Minuten auf Eis inkubiert und die Reaktion wurde durch Zugabe von SEMK-Puffer abgestoppt. Anschließend wurden die Proben bei 4°C und 7000g 10 min zentrifugiert. Überstand und Pellet wurden getrennt in SDS/PAGE 2x Probenpuffer (s. 2.4.13) aufgenommen und durch SDS/PAGE und Western Blot Analyse untersucht.

2.4.21 Alkalische Proteinfractionierung

Material: 100 mM Na₂CO₃
TCA 70 %
Aceton p.A.

0,2 mg isolierte Mitochondrien wurden durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 4°C und 7000g pelletiert und das Pellet wurde in 1 ml 100 mM Na₂CO₃ resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4°C wurden die Proben geteilt. Die eine Hälfte wurde sofort mit 0,5 ml 70 % Trichloracetat (TCA) gefällt und repräsentierte den gesamten Proteingehalt. Die andere Hälfte wurde für 60 min bei 4°C und 200000g zentrifugiert. Das Pellet dieser Ultrazentrifugation beinhaltet die integralen Membranproteine und wurde direkt in SDS/PAGE 2x Probenpuffer (s. 2.4.13) aufgenommen. Der Überstand, der die löslichen und Membran assoziierten Proteine enthielt, wurde zunächst ebenfalls TCA gefällt und dann auch in SDS/PAGE 2x Probenpuffer (s. 2.4.13) aufgenommen und zusammen mit dem Gesamtprotein und der Pelletfraktion durch SDS/PAGE und Western Blot Analyse untersucht.

2.4.22 TCA-Fällung

Material: TCA 70 %
Aceton p.A.

Das zu fällende Proteinlysate wurde mit 70 % TCA versetzt. Die Fällung wurde 30 min auf Eis inkubiert und dann 10 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen. Etwaige Reste des Acetons wurden bei 37°C verdampft. Das Pellet wurde dann in 2x Probenpuffer (s. 2.4.13) aufgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 mDAP-3 Sequenzanalyse

Die mDAP-3 Volllänge cDNA wurde von M. Brigl kloniert (Berger et al., 2000; Brigl, 2000) und für diese Arbeit übernommen.

3.1.1 Northern Blot zur Bestimmung der Länge der mDAP-3 cDNA

Eine Northern-Blot-Analyse mit Gesamt-RNA aus adulten und embryonalen (17 Tage post conceptionem) Nieren wurde mit einem 578 bp langen ^{32}P -dATP random prime markierten mDAP-3 Fragment durchgeführt. Die Membran wurde mit hoher Stringenz gewaschen, auf einer Phosphorimager-Platte für 12 h exponiert und anschließend mit dem Phosphorimaging System ausgewertet. Der Northern Blot zeigt je eine spezifische Bande mit der RNA adulter und embryonaler muriner Nieren. Durch den Vergleich mit der bekannten Länge der 18S (ca. 1,8 kb) und 28S (ca. 5 kb) Banden der ribosomalen RNA ist für die mDAP-3 Volllänge-cDNA eine Länge von 1,7-1,8 kb zu erwarten.

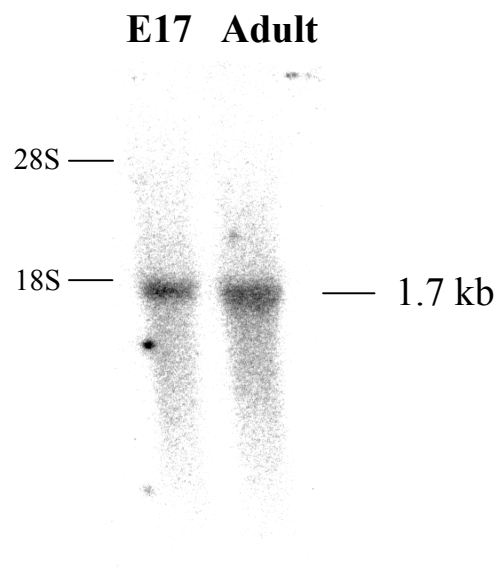


Abbildung 11: Northern Blot mit einer ^{32}P -dATP random markierten Probe eines 578 bp langen mDAP-3 Fragments. E17: 20 μg Gesamt-RNA 17,5 Tage post conceptionem alter muriner Nieren. Adult: 20 μg Gesamt-RNA adulter muriner Nieren. Die 18S und 28S Banden entsprechen jeweils einer Länge von etwa 1,8 kb und 5 kb.

3.1.2 Sequenzanalyse der mDAP-3 cDNA

Die mDAP-3 cDNA Nukleinsäure-Konsensussequenz hat eine Länge von 1656 bp. Mit dem Programm ORFSEARCH der GCG-Software wurde die Nukleinsäuresequenz auf mögliche offene Leseraster (OLR) durchsucht. Das längste durchgehend offene Leseraster beginnt mit einem ATG-Startkodon an Position 172 und geht bis zum TAA-Stopkodon an Position 1345. An Position 157 und 238 befinden sich alternative ATG-Startkodons. Das ATG-Kodon an Position 172 befindet sich als einziges unter den drei potentiellen Startkodons in einer mit einer Kozak Sequenz vereinbaren Umgebung (Abbildung 12). An Position -3, bezogen auf das A(denin) an Position 172, befindet sich ein Adenin. Im potentiell untranslatierten 5'-Bereich befindet sich kein weiteres Startkodon in allen drei Leserastern.

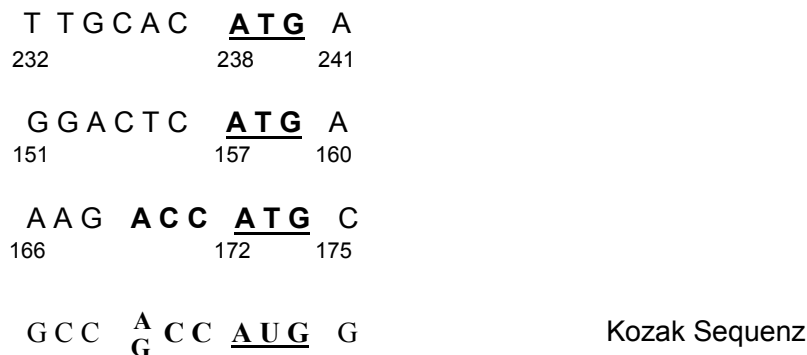


Abbildung 12: Vergleich der Umgebung der drei potentiellen ATG-Startkodons mit der Kozak-Konsensussequenz.

Das offene Leseraster endet an Position 1345 mit einem TAA-Stop-Kodon. Weiter im 3'-untranslatierten Bereich folgen in allen drei Leserastern multiple Stop Kodons. An Position 1519 befindet sich ein ATTAAA Polyadenylierungssignal. Die Polyadenylation selbst beginnt an Position 1645 (Abbildung 13).


```

1   CTCCGCTGGGCTGTGGTTGCAGCCGCGGCGACTGCGCGTTGGGTAGCTTCTGCCCACACG 60
61  ACCCGAGCTTGCTTCACAACTGCAGGACGGGTGCCTGGGATCCAGCCGCTGGCGGTGTGT 120
121 GCGGGTCACCGGAGCAGGAGTCTAGTGTGGACTCATGAGAGCAAAGACC ATG CTGACA 180
                                     M L T
181 GGAATAACAAGGCTTTTCTCCAGGGTCCAGAAGTTGGACCCGAGGTGTTTTTTGCACATG 240
    G I T R L F S R V Q K L D P ▲ R C F L H M
241 AGTGTTC AAGCGACTCAGAACAGTCCAGGTTCCAGCTGAGCGTCCAGAACTGTTTCCC GC 300
    S V Q A T Q N S Q V P A E R P R T V S R
301 ACCAGTGACAGTGACCCGGCTAAGCATGGGGAGCAGCATGAGGGTCAGCACTACAGCATC 360
    T S D S D P A K H G E Q H E G Q H Y S I
361 CCCCTCCAGGATCTGAAGACAGTGTTCCTCACGGCCTGCCTCCTCGGTACATGATGCAG 420
    P L Q D L K T V F P H G L P P R Y M M Q
421 GTGAAGACTTTTGGCGAAGCTTGTCTGATGGTCAGGAAGCCAGCTCTCGAGCTTCTGGGC 480
    V K T F G E A C L M V R K P A L E L L G
481 TACCTGAAAAATACCAATTTTGCTCATCCAGCTGTGCGATATCTTCTTTATGGGGAGAAG 540
    Y L K N T N F A H P A V R Y L L Y G E K
541 GGGACAGGAAAGACCCCTCAGTCTCTGCCATGCTGTTTATTTTGTGCAAGACATGACTGG 600
G T G K T L S L C H A V H F C A R H D W
601 CTGATTCTGCATATCCCAGATGCTCATCTTTGGGTAAAAAAAGTCCCGGGAGCTTCTACAG 660
    L I L H I P D A H L W V K N C R E L L Q
661 TCCACTCACAAACAAACAGCGCTTTGATCAACCCTTAGAGGCCTCTACCTGGCTGAAGAAT 720
    S T H N K Q R F D Q P L E A S T W L K N
721 TTCAAACACTACCAATGAGCGCTTCTGAGTCAGATAAAAAGTTCAAGAGAAGTATGTTTGG 780
    F K T T N E R F L S Q I K V Q E K Y V W
781 AATAAGAGAGAAAGCACTGAGAAAGGCAGTCTCTGGGAGAAGTTGTTGAACAGGGCCTA 840
    N K R E S T E K G S P L G E V V E Q G L
841 ACCCGAGTGAGGAATGCCACTGACGCTGTTGGGGTCGTGCTGAAGGAGCTGAAGGCTCAG 900
    T R V R N A T D A V G V V L K E L K A Q
901 AGCGCCCTAGGGCTCTTTCACCTCCTGGTGGCTGTGGATGGAGTCAATGCCTCTGGGGA 960
    S A L G L F H L L V A V D G V N A L W G
961 AGGACCACACTGAAAAAAGAAAGATAGAACCCTTGATTGCCCCAGAGGAACTCTCCCTTGTC 1020
    R T T L K K E D R T L I A P E E L S L V
1021 CACAATCTAAGGAAAAATGGTGA AAAATGACTGGCATGGAGGTGCAATCGTGTGAGCTTG 1080
    H N L R K M V K N D W H G G A I V L S L
1081 AGCCAAACCGGGTCTCTCTTTAAGTCCAGAACAGCCTATTTGCCGCATGAGCTGCTGGGA 1140
    S Q T G S L F K S R T A Y L P H E L L G
1141 AAGGAAGGATTTAATGCCCTGGAGCCTTTTTCTTCCCATCCTCATTCCCAACTATAATCCA 1200
    K E G F N A L E P F L P I L I P N Y N P
1201 AAGGAGTTTAAAAGTTCCTTCCAGTACTACTTAGAGAACAACCTGGCTTCAACATGAGAAA 1260
    K E F E S S F Q Y Y L E N N W L Q H E K
1261 GCTTCAACAGAAAGGAGGAGGAGCTGAGGTTCTGAGTAAGTCAACCTGAGCAG 1320
    A S T E E G R K E L R F L S N C N P E Q
1321 CTGGAGCGGCTCTGTGCCTCGCTGTAAGCACGGACAGCGGCGGTGGCATGCTGGGAAGAC 1380
    L E R L C A S L *
1381 AGGCTTCCTTACGCTACCGTGC GCGCATGAGGAAGTCCC AAGTTCCAAGCTGAACACCC 1440
1441 TGACCTGCAC TGATGGATATGAAATGATAGGATGTTGTTGTCCTACAGCTAACACCAGTT 1500
1501 TTCTGTTCGAGTTTTTACATTAAAGTAGATCTGCTCCTGAGTGCTGTATTGGATTTGCAA 1560
1561 CAAGGAAGGTTCTCACCTGGCCAGACTCTGTGAGTTTCTCTGGTGTTCGTTTGTCTGGC 1620
1621 ATCTGAAGAACTCAGTTCTACAGAAAAA AAAAAA 1656

```

Abbildung 13: Nukleinsäuresequenz der mDAP-3 cDNA (in den nummerierten Zeilen) und die deduzierte Aminosäuresequenz (die einzelnen Aminosäuren sind jeweils direkt unter der ersten Nukleinsäure des zugehörigen Triplets abgebildet). Das ATG-Startkodon ist eingerahmt, das potentielle P-Loop Motiv und das ATTTAAA Polyadenylierungssignal sind unterstrichen, die mögliche Abtrennungsstelle des mitochondrialen Signalpeptides ist durch einen Pfeil gekennzeichnet, und das TAA Stopkodon ist als „*“ dargestellt.

3.1.3 Analyse der Proteinsequenz von mDAP-3

Das offene Leseraster der mDAP-3 cDNA Sequenz zwischen den Nukleinsäure-Positionen 172 und 1345 kodiert für ein deduziertes Protein von 391 Aminosäuren (AS) Länge (Abbildung 13).

Die Proteinsequenz wurde unter Verwendung der PROTEIN Programme der GCG Software analysiert. Das deduzierte Protein hat ein errechnetes Molekulargewicht von 45 kDa.

Aus einem Kyte-Doolittle Plot der mDAP-3 Proteinsequenz wird ersichtlich, daß die Aminosäureresiduen 233 bis 262 einen Bereich von 30 Aminosäuren mit hoher Hydrophobizität umfassen (Abbildung 14). Von AS 246 bis AS 262 besteht die Proteinsequenz nahezu ausschließlich aus hydrophoben AS. Diese Folge von 17 hydrophoben Aminosäuren weist auf eine mögliche Interaktion des mDAP-3 Proteins mit einer Membran – der Zellmembran oder der Membran einer intrazellulären Struktur (z.B. Mitochondrium) – hin. Von Position 241 bis 245 schließt sich ein Bereich mit vorwiegend hydrophilen AS an.

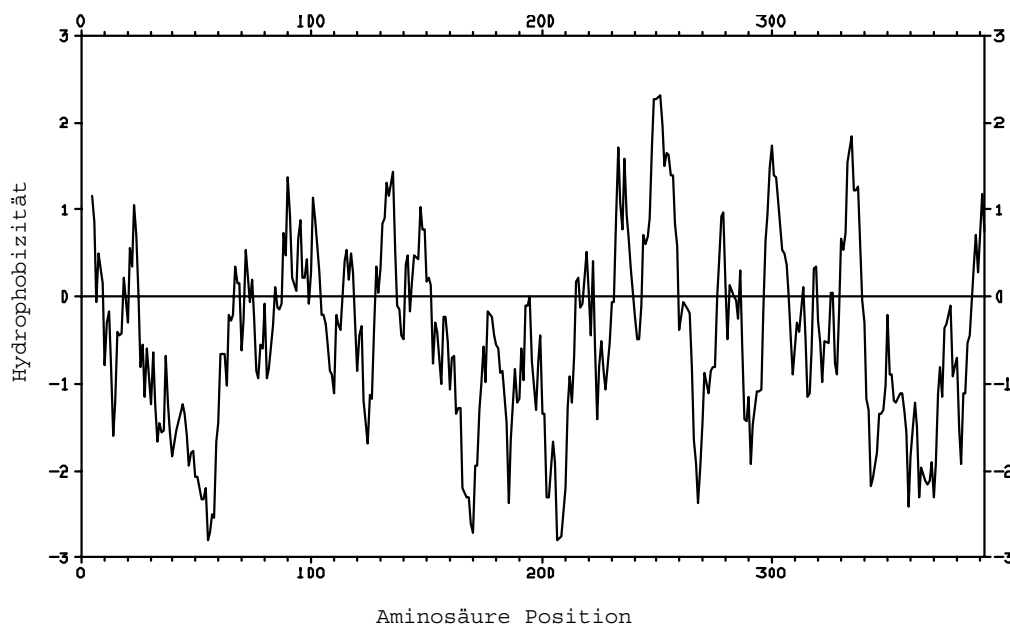


Abbildung 14: Hydrophobizitäts-Blot der deduzierten mDAP-3 Proteinsequenz.

3.1.3.1 Motive und Erkennungsstellen der mDAP-3 Proteinsequenz

Mit dem Programm PROSITE aus der GCG Software wurde die mDAP-3 Aminosäuresequenz auf mögliche funktionelle Gruppen und Motive untersucht (Abbildung 15). Es muß allerdings erwähnt werden, daß das Vorhandensein einer Konsensussequenz

nicht hinreichend ist, um die entsprechende Funktion eindeutig zu bestätigen, da weitere Faktoren, wie z.B. die Sekundärstruktur eine wichtige Rolle spielen.

```

                                MYRISTYL
                                CK2_PHOSPHO_SITE
MLTGITRLFSRVQKLDPRCFLHMSVQATQNSQVPAERPRTVSRSDSDPAKHGEQHHEGQH
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60

                                TYR_PHOSPHO_SITE
                                CK2_PHOSPHO_SITE
YSIPLQDLKTVFPHGLPPRYMMQVKTFGEACLMVRKPALELLGYLKNTNFAHPAVRYLLY
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120

    PKC_PHOSPHO_SITE
    MYRISTYL
    ATP_GTP_A
    GEKGTGKTLSLCHAVHFCARHDWLILHIPDAHLWVKNCRELLQSTHNKQRFQPLEASTW
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180

                                MYRISTYL
                                PKC_PHOSPHO_SITE
                                CK2_PHOSPHO_SITE   CAMP_PHOSPHO_SITE   ASN_GLYCOSYLATION
LKNFKTTNERFLSQIKVQEKYVWNKRESTEKGSPLGEVVEQGLTRVRNATDAVGVLKEL
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240

                                PKC_PHOSPHO_SITE
KAQSALGLFHLLVAVDGVNALWGRITLTKEDRTLIAPEELSLVHNLKMKVKNWDHGGAIW
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300

LSLSQTGSLFKSRTAYLPHELLGKEGFNALEPFLPILIPNYPNPFESSFYYLENNWLQ
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360

    AMIDATION
    CK2_PHOSPHO_SITE
    HEKASTEGRKELRFLSNCNPEQLERLCASL*
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 392

```

Abbildung 15: mDAP-3 Proteinsequenz, angegeben sind die mit dem Programm PROSITE der GCG Software erkannten funktionellen Gruppen und Motive.

3.1.3.1.1 N-Glykosylierungsstelle

An Aminosäure (AS) Position 228 enthält die mDAP-3 Aminosäuresequenz die drei Aminosäuren - N A T -. Diese kurze Sequenz ist mit der Konsensussequenz N-{P}-[ST]-{P} (N wird glykosyliert) einer N-Glykosylierungsstelle vereinbar. Wie bereits erwähnt, ist das Vorhandensein der Konsensussequenz nicht ausreichend, um auf eine Glykosylierung des Asparagin zu schließen, da die korrekte Faltung des Proteins eine wichtige Rolle bei der Regulation der N-Glykosylierung spielt (Pless and Lennarz, 1977).

3.1.3.1.2 Potentielle Phosphorylierungsstellen für verschiedene Proteinkinasen

Das Motiv - K R E S T -, an AS-Position 205, stimmt mit der Konsensussequenz [RK](2)-x-[ST] (S oder T werden phosphoryliert) für eine cAMP- oder cGMP-abhängige Proteinkinasen Phosphorylierungsstelle überein. In einer Reihe von Untersuchungen konnte gezeigt werden,

daß sowohl cAMP- als auch cGMP-abhängige Proteinkinasen diese Konsensussequenz für die Phosphorylierung von Serine oder Threonine benötigen (Feramisco et al., 1980; Glass et al., 1986; Glass and Smith, 1983). Allerdings gibt es eine große Anzahl von Ausnahmen für diese Regel.

An AS-Position 125 findet sich die Sequenz - T G K -, an Position 209 die Sequenz - T E K -, und an Position 266 die Sequenz - T L K -. Diese Motive sind mit der Konsensussequenz [ST]-x-[RK] (S oder T werden phosphoryliert) einer Proteinkinase C Phosphorylierungsstelle vereinbar. Es konnte gezeigt werden, daß die Proteinkinase C *in vivo*, Serin oder Threonin in der C-terminalen Nähe von basischen Aminosäuren bevorzugt phosphoryliert (Kishimoto et al., 1985; Woodgett et al., 1986).

An Position 45 findet sich die Sequenz - S D S D -, an Position 86 die Sequenz - T F G E -, an Position 186 die Sequenz - T T N E -, und an Position 365 die Sequenz - S T E E -. Diese vier Sequenzabschnitte sind jeweils mit der Konsensussequenz [ST]-x(2)-[DE] (S oder T werden phosphoryliert) einer Casein Kinase C Phosphorylierungsstelle vereinbar.

Die Sequenz - K P A L E L L G Y - an Position 96 ist mit den Konsensussequenzen [RK]-x(2)-[DE]-x(3)-Y oder [RK]-x(3)-[DE]-x(2)-Y (Y wird phosphoryliert) einer Tyrosin Kinase Phosphorylierungsstelle vereinbar.

3.1.3.1.3 N-Myristoylierungsstelle

Um ausgewählte, wasserlösliche Proteine vom Cytosol zu den Membranen zu dirigieren, wird das Protein N-terminal kovalent an eine Fettsäure (z.B. Myristinsäurekette, eine ungesättigte Fettsäure mit 14 Kohlenstoffatomen) gebunden, die sich in die cytoplasmatische Seite der Lipid-Doppelschicht einlagert und so das Protein in der Membran verankert.

An Position 58 findet sich die Sequenz - G Q H Y S I -, an Position 124 die Sequenz - G T G K T L -, und an Position 212 die Sequenz - G S P L G E -. Diese drei Sequenzen wären jeweils mit der Konsensussequenz einer N- Myristoylierungsstelle, G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P} (G wird myristoyliert), vereinbar. Allerdings liegen sie nicht am N-Terminus des mDAP-3 Proteins und können deshalb auch nicht N-terminal myristoyliert werden. Dieses falsch positive Ergebnis der PROSITE Motivsuche erklärt sich daraus, daß bei diesem Programm mit Absicht auch Sequenzen innerhalb eines Proteines für die Suche nach einer N-Myristoylierungsstelle Berücksichtigung finden, da es sich um ein Protein handeln könnte, bei dem, durch posttranslationale Veränderungen, interne Glycine an den N-Terminus gelangen könnten. Bei mDAP-3 ist dies aber, auch unter Berücksichtigung der Abspaltung einer möglichen N-terminalen mitochondrialen Signalsequenz, nicht der Fall.

3.1.3.1.4 Amidations Stelle

An Position 368 befindet sich die Sequenz - E G R K -, die mit der Konsensussequenz x-G-[RK]-[RK] (x ist die Stelle der Amidation) einer Amidations Stelle vereinbar ist.

3.1.3.1.5 ATP/GTP-Bindungsstellen Motiv 'A' (P-Loop)

Durch Sequenzvergleiche und Analyse kristallographischer Daten konnte gezeigt werden, daß ein großer Teil der ATP oder GTP bindenden Proteine ein bestimmtes konserviertes Aminosäuresequenz Motiv gemeinsam haben (Dever et al., 1987; Fry et al., 1986; Koonin, 1993; Moller and Amons, 1985; Saraste et al., 1990; Walker et al., 1982). Dieses Motiv ist eine glycinreiche Region, die typischerweise einen flexiblen „Loop“ zwischen einem β -Strang und einer α -Helix formt. Dieser „Loop“ interagiert mit einer der Phosphatgruppen des Nukleotids und wird im allgemeinen als 'A' Konsensussequenz (Walker et al., 1982) oder „P-Loop“ (Saraste et al., 1990) bezeichnet.

An Position 121 bis 128 der mDAP-3 Aminosäuresequenz befindet sich die Sequenz - G E K G T G K T -, die mit der Konsensussequenz [AG]-x(4)-G-K-[ST] eines solchen ATP/GTP-Bindungsstellen Motivs 'A' (P-Loop) vereinbar ist. Abbildung 17 zeigt, daß der P-Loop von mDAP-3 nicht nur die Anforderungen der Konsensussequenz erfüllt, sondern auch, wie oben beschrieben, zwischen einem β -Strang und einer α -Helix liegt.

Die mDAP-3 P-Loop Sequenz hat außerdem eine 100 %ige Übereinstimmung zu der P-Loop Sequenz des humanen DAP-3, dessen P-Loop essentiell für die pro-apoptotische Funktion ist, und eine hohe Ähnlichkeit zu der Sequenz des *Drosophila melanogaster* Genproduktes CG3633 (im Weiteren als DmDAP-3 bezeichnet). Ebenfalls eine hohe Homologie besteht zu dem *C. elegans* Proteins cec14a_4.2 (im Weiteren als CeDAP-3 bezeichnet), für das bereits eine funktionelle Homologie zu hDAP-3 gezeigt werden konnte (Kissil et al., 1999).

Verwendet man für eine Homologiesuche in der EMBL Proteindatenbank nur die mDAP-3 P-Loop Sequenz, so findet man zwei weitere Proteine, die eine deutliche Homologie in diesem Bereich zeigen. Diese Proteine sind das *C. elegans* Protein CED-4 (cell death gene 4) und das Säugerhomolog Apaf-1 (Apoptose Protease Activating Factor 1). Ein Alignment der P-Loop Sequenzen dieser verschiedenen pro-apoptotischen Proteine zeigt (Abbildung 16), daß die Homologie, die für ein P-Loop Motiv notwendig ist (XXGXXXXGK(S/T)), übertroffen wird und durch eine neue Konsensussequenz für den P-Loop dieser Proteine ersetzt werden kann ((L/I)XGXXGXGK(S/T)). Aus der großen P-Loop Sequenzähnlichkeit zwischen der DAP-3 Proteinfamilie und anderen pro-apoptotischen Proteinen läßt sich allerdings keine identische oder ähnliche Funktion dieser Proteine ableiten, da die Übereinstimmung nicht über die P-

Loop Sequenz hinausgeht und viele Proteine mit ähnlicher P-Loop Sequenz völlig unterschiedliche Funktionen haben.

	X X G X X X X G K [TS]		P-Loop Konsensus
119	L Y G E K G T G K T	128	mDAP-3
126	L Y G E K G T G K T	135	hDAP-3
120	L Y G E N G T G K T	129	DmDAP-3
096	L W G A F G T G K S	105	CeDAP-3
141	I H G N A G C G K S	150	Apaf-1
157	L H G R A G S G K S	166	CED-4
186	I T G E P G V G K T	195	γDAP-3

Abbildung 16: Alignment der P-Loop Konsensussequenz und der P-Loop Sequenz von mDAP-3, hDAP-3, DmDAP-3, CeDAP-3, Apaf-1, CED-4 und γDAP-3. Identische oder ähnliche Aminosäuren sind fett dargestellt. Die P-Loop Homologie dieser Proteine untereinander ist größer als für die Konsensussequenz notwendig. Dies läßt auf eine ähnliche Funktion des P-Loops dieser Proteine schließen, wenn auch in verschiedenen Bereichen der Apoptosekaskade.

3.1.3.2 Sekundärstruktur von mDAP-3

Mit Hilfe des Programmes PSIPRED wurde eine Vorhersage über die mögliche Sekundärstruktur von mDAP-3 gemacht. Dabei konnte ein weiteres Indiz für die Lage des P-Loops zwischen einem β-Strang und einer α-Helix erbracht werden. Abbildung 17 zeigt auch das Vorhandensein von α-Helices am N-Terminus von mDAP-3, die für die Struktur von mitochondrialen Signalpeptiden typisch sind.

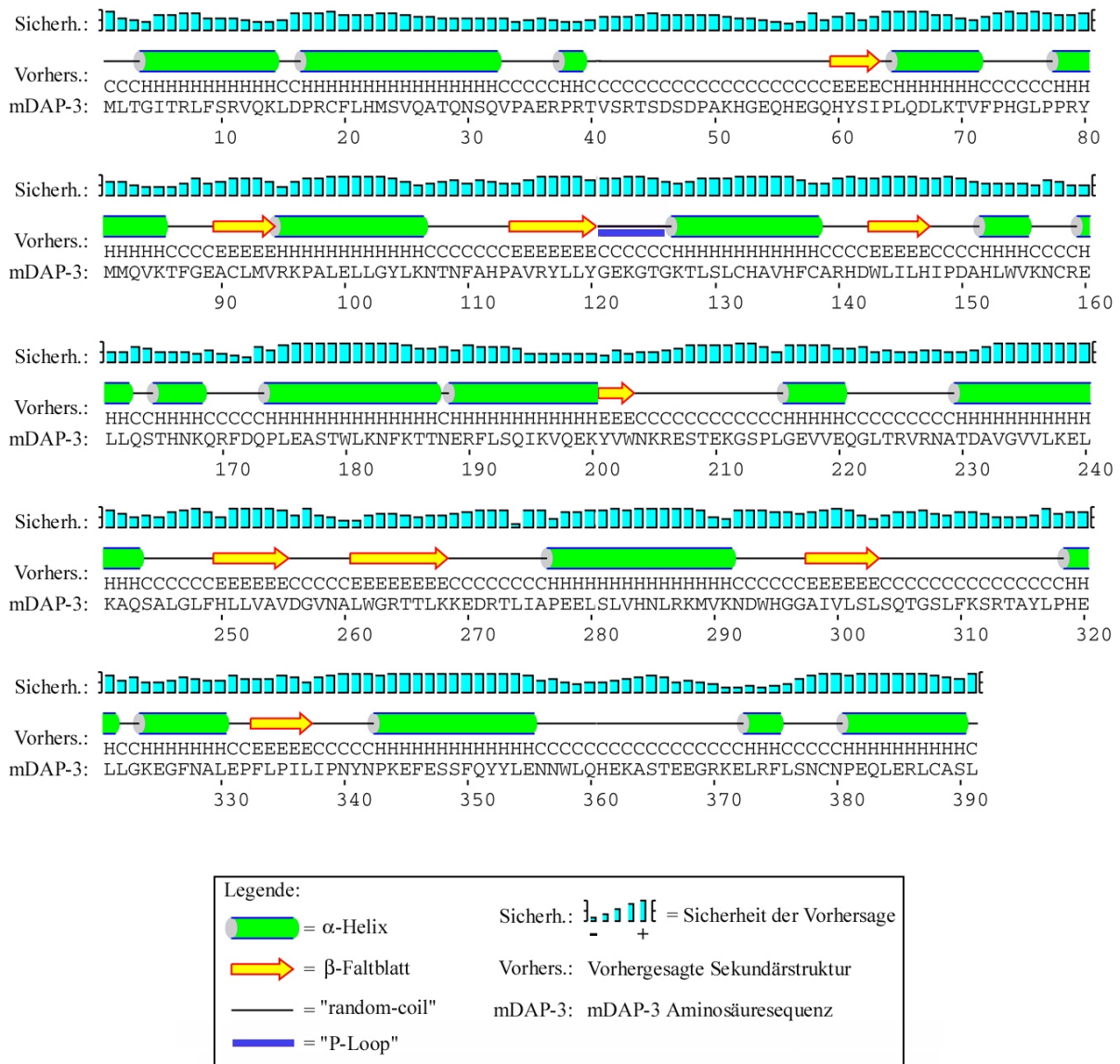


Abbildung 17: Vorhersage der möglichen Sekundärstruktur von mDAP-3. Die Vorhersage wurde mit Hilfe des Programmes PSIPRED durchgeführt. Gezeigt wird die wahrscheinliche Sekundärstruktur (α -Helix, β -Faltblatt und „random-coil“ Struktur), die dazugehörige Aminosäuresequenz von mDAP-3 und die Sicherheit der Vorhersage. Der P-Loop ist durch eine blaue Box gekennzeichnet.

3.2 Homologie von mDAP-3 zu anderen Genen

Eine Homologie-Suche der EMBL Proteindatenbank mit Hilfe des BLAST Algorithmus und der mDAP-3 Protein-Gesamtsequenz ergab mehrere zu mDAP-3 homologe Proteine von verschiedenen Organismen. Sie werden im einzelnen kurz dargestellt, ihre Funktion, soweit bekannt, wurde bereits in der Einleitung beschrieben.

mDAP-3	WHGGAIIVLSLSQTGSLFKSRTAYLPHELLGKEGFNALEPFLPILIPNYNPKEFESSFQYY	353
	
hDAP-3	WHGGAIVSALSQTGSLFKPKAYLPQELLGKEGFDALDPFIPILVSNYNPKEFESCIOYY	360
mDAP-3	LENNWLQHEKASTEEGRKELRFLSNCNPEQLERLCASL	391
	.	
hDAP-3	LENNWLQHEKAPTEEGKKELLFLSNANPSLLERHCAYL	398

Abbildung 18: Vergleich der Aminosäuresequenz von mDAP-3 und hDAP-3. „|“ bedeutet identische, „.“ bedeutet ähnliche Aminosäuren. Die Ähnlichkeit zwischen den beiden Sequenzen ist 89 %, die Identität 81 %.

3.2.2 Ionizing Radiation Resistance Confering Gene (IRRCG)

Das Ionizing Radiation Resistance Confering Gene ist ein, im Rahmen einer Doktorarbeit in Stanford, USA, von K.A. Henning beschriebene, 1648 bp und 383 Aminosäuren lange humane cDNA- und Proteinsequenz. Die Identität zur cDNA Sequenz von mDAP-3 beträgt über eine Länge von 1119 bp 86 %. Die Aminosäuresequenzen sind über 334 Aminosäuren zu 75 % identisch und zu 86 % ähnlich. IRRCG ist über 348 Aminosäuren zu 100 % identisch zu hDAP-3. Diese Identität beginnt am N-Terminus der Proteine und reicht bis zur Aminosäure 348. Die folgenden 34 (IRRCG) bzw. 50 (hDAP-3) C-terminalen Aminosäuren sind dann jedoch komplett verschieden. Die Ähnlichkeit von mDAP-3 zu IRRCG beschränkt sich ebenfalls nur auf den Bereich der Übereinstimmung von IRRCG mit hDAP-3. Eine Computeranalyse des humanen Genoms konnte zeigen, daß es sich bei dem IRRCG um ein Klonierungsartefakt handelt.

3.2.3 *Drosophila melanogaster* CG3633 Gen Produkt

mDAP-3 zeigt eine 38 %ige Identität und eine 57 %ige Ähnlichkeit zu dem 392 Aminosäuren langen *Drosophila melanogaster* Gen Produkt CG3633. Die Übereinstimmung erstreckt sich über die gesamte Länge der beiden Proteine und ist besonders im Bereich des P-Loops stark konserviert. Auf Grund dieser großen Homologie wird dieses Protein als Mitglied der DAP-3 Proteinfamilie eingestuft und im Weiteren als DmDAP-3 bezeichnet.

3.2.4 *C. elegans* cec14a_4.2 Gen Produkt

Eine weitere Suche ergab eine 34 %ige Identität und 55 %ige Ähnlichkeit von mDAP-3 zu dem 375 Aminosäuren langen *C. elegans* Protein cec14a_4.2. Die Übereinstimmung erstreckt

sich ebenfalls über die gesamte Länge der beiden Proteine und ist besonders im Bereich des P-Loops stark konserviert. Auf Grund dieser hohen Homologie und der bereits beschriebenen funktionellen Homologie zu hDAP-3 (Kissil et al., 1999), wird auch dieses Protein als Mitglied der DAP-3 Proteinfamilie, im Weiteren als CeDAP-3 bezeichnet.

3.2.5 Hypothetisches *Saccharomyces cerevisiae* Protein YGL129c

Eine Homologiesuche über das Hefegenom ergab einen offenen Leserahmen (YGL129c) mit einer Identität von 22 % und einer Ähnlichkeit von 33 % zu mDAP-3. Eine hohe Homologie dieses, mit 488 Aminosäuren längsten Mitgliedes der DAP-3 Proteinfamilie, findet sich besonders im Bereich des P-Loops. Die funktionelle Homologie von YGL129c, eines bisher unbekanntem hypothetischen *Saccharomyces cerevisiae* Proteins (im weiteren als yDAP-3 bezeichnet), zu den bekannten Mitgliedern der DAP-3 Proteinfamilie und damit die Zugehörigkeit zu dieser Proteinfamilie, wird in Abschnitt 3.9 beschrieben

3.2.6 Zusammenfassung der Homologie von mDAP-3 zu anderen Genen

In Tabelle 6 und in Abbildung 19 ist die Homologie von mDAP-3 zu den oben beschriebenen Proteinen noch einmal zusammengefaßt.

Tabelle 6: DNA- und Proteinsequenzhomologie zwischen mDAP-3 und hDAP-3, DmDAP-3, CeDAP-3, yDAP-3 und IRRCG.

mDAP-3	DNA	Protein	
	% Identität	% Identität	% Ähnlichkeit
hDAP-3	86	81	89
DmDap-3	--	38	57
CeDAP-3	--	34	55
yDAP-3	--	22	33
IRRCG	86	75	86

3.3 mDAP-3 mRNA Verteilung

3.3.1 Northern-Blot-Analyse zur Organverteilung der mDAP-3 mRNA

Zur Untersuchung der organspezifischen Expression der mDAP-3 mRNA wurde eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt. Die Gesamt-RNA aus verschiedenen Organen einer adulten Maus wurde isoliert und jeweils 20 µg pro Spur in einem denaturierenden Gel aufgetrennt. Die RNA wurde auf eine Membran transferiert, mit einer mit ³²P-dCTP random prime markierten 578 bp langen mDAP-3 Probe hybridisiert und unter Standardbedingungen gewaschen. Mit der Membran wurde über Nacht eine Phosphorimagerplatte exponiert und diese anschließend mit Hilfe des Phosphorimagers analysiert. Zum Nachweis der eingesetzten RNA-Mengen wurde die Membran nach der spezifischen Hybridisierung gestrippt (vergl. 2.4.5) und mit einer Probe für β-Aktin hybridisiert.

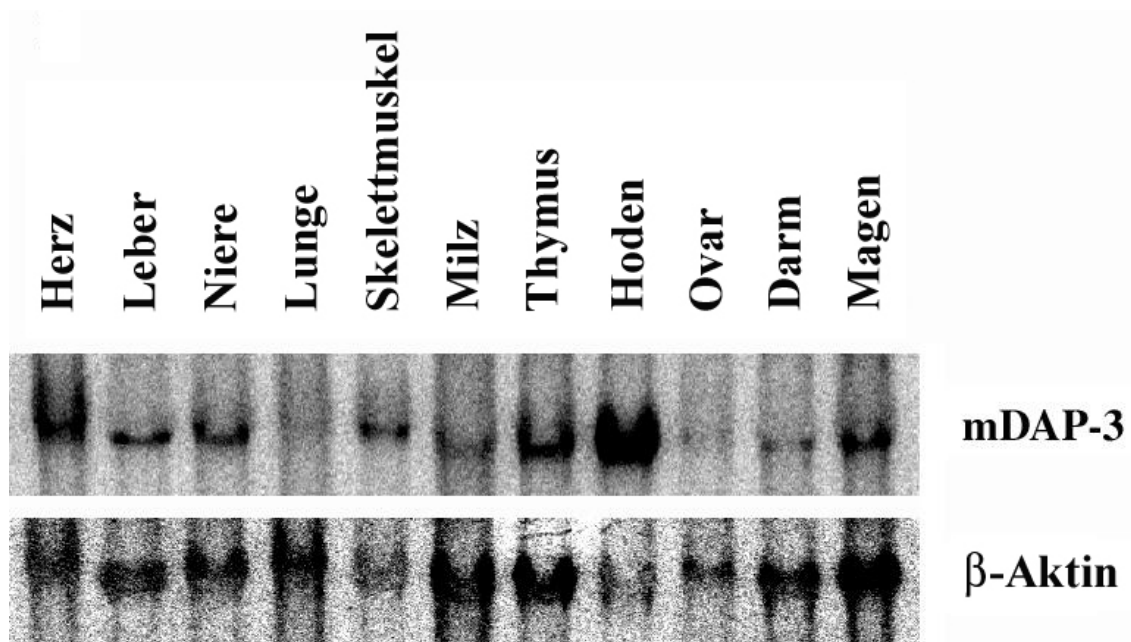


Abbildung 20: Northern Blot von 20 µg adulter Maus Gesamt-RNA der angegebenen Organe mit einer 578 bp langen mDAP-3 Ribo-Sonde. Oberer Blot: 578 bp mDAP-3 Probe, unterer Blot: β-Aktin Kontrollhybridisierung. Eine mDAP-3 Expression ist in einer großen Anzahl von Organen nachweisbar. Ein Expressionsmaximum ist im Hoden und geringe bis keine Expression ist in der Lunge und im Ovar erkennbar.

Wie in Abbildung 20 gezeigt war bei der Northern-Hybridisierung eine Expression der mDAP-3 mRNA in nahezu allen untersuchten Organen nachzuweisen. Verglichen zur Expression in der Niere ist die mDAP-3 RNA im Hoden, im Thymus, und im Herz deutlich stärker, in der Leber, im Skelettmuskel, und im Magen vergleichbar exprimiert. In der Lunge,

im Ovar und im Darm ist mit Northern-Hybridisierung nur eine sehr geringe Expression nachweisbar. Insgesamt läßt sich jedoch sagen, daß die mDAP-3 mRNA in sehr vielen Organen exprimiert wird und keinesfalls eine organspezifische Expression zeigt. Es handelt sich bei mDAP-3 also wahrscheinlich um ein wichtiges für grundlegende zelluläre Mechanismen benötigtes Protein.

3.3.2 In situ-Hybridisierung

Im Rahmen der Untersuchungen zur Organverteilung der mDAP-3 mRNA wurden in unserer Arbeitsgruppe auch *in situ* Hybridisierungs Experimente an Schnitten von 17,5 d p.c. alten Mäuseembryos durchgeführt. Diese Experimente wurden von V. Vielhauer durchgeführt (Berger et al., 2000) und die Ergebnisse werden hier nur kurz aufgeführt. Die *in situ* Hybridisierung mit einer mDAP-3 spezifischen Ribo-Probe zeigte eine reichlich vorhandene und weit verbreitete Expression im untersuchten Mäuseembryo. Ein starkes Signal war vor allem in sich entwickelnden epithelialen Kompartimenten wie dem Oropharynx, dem gastrointestinalen Trakt, der Dermis, und dem urogenital System nachzuweisen. Eine sehr starke Expression wurde in Derivaten der Schlundtaschen (Glandulae thyreoidae und sublingualis) gefunden und die maximale Expression fand sich im olfaktorischen Epithel.

3.4 Etablierung und Evaluierung verschiedener Apoptose Nachweismethoden

Zu Beginn dieser Arbeit war über die Funktion von hDAP-3 bekannt, daß es sich um einen positiven humanen Apoptosemediator handelt, der in der Interferon- γ vermittelten Apoptose eine wichtige Rolle spielt. Auf Grund der hohen Sequenzidentität zwischen hDAP-3 und mDAP-3 konnte auch eine identische Funktion der beiden Proteine vermutet werden. Da in unserer Arbeitsgruppe aber noch keine Erfahrung mit den verschiedenen Apoptose-Nachweismethoden vorlag, wurden zunächst einige Methoden evaluiert. Dazu war eine positive Kontrolle für die Apoptoseinduktion, in den uns zur Verfügung stehenden murinen Zelllinien, unbedingt notwendig. Als besonders geeignete positive Kontrolle erwiesen sich humane T-Lymphozyten (Jurkat-Zellen). Die in Suspension wachsenden immortalisierten Zellen ließen sich leicht, durch z.B. einen agonistischen Fas-Antikörper, zur Apoptose induzieren und dienten zunächst als Referenz.

3.4.1 Bestimmung des DNA-Gehaltes mit Propidiumiodid (PI)

Ein wichtiger Schritt in der Apoptose ist die Kondensation und anschließende Degradation der DNA. In der FACScan-Analyse läßt sich der DNA-Gehalt von Zellen mit Hilfe einer Propidiumiodid (PI)-Färbung gut und zuverlässig nachweisen. In unstimulierten Kontrollzellen erhält man dabei eine typische Verteilung der Zellen in die verschiedenen Phasen des Zellzyklus (G_1 , S, G_2/M). Enthält die zu untersuchende Zellpopulation jedoch apoptotische Zellen, so entsteht ein zusätzlicher Peak, der sogenannte sub G_1/G_0 Peak. Er erklärt sich daraus, daß in apoptotischen Zellen die DNA in kondensiertem Zustand vorliegt und in dieser Form nur noch wenig Farbstoff (PI) binden kann. Ein weiterer Vorteil der FACScan-Analyse besteht in der Möglichkeit, bestimmte Zellpopulationen getrennt von anderen zu untersuchen. Deshalb wurden zunächst Jurkat-Zellen mit Fas-Antikörper in zwei unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert, mit Ethanol fixiert und anschließend mit PI gefärbt und in der FACScan-Analyse untersucht.

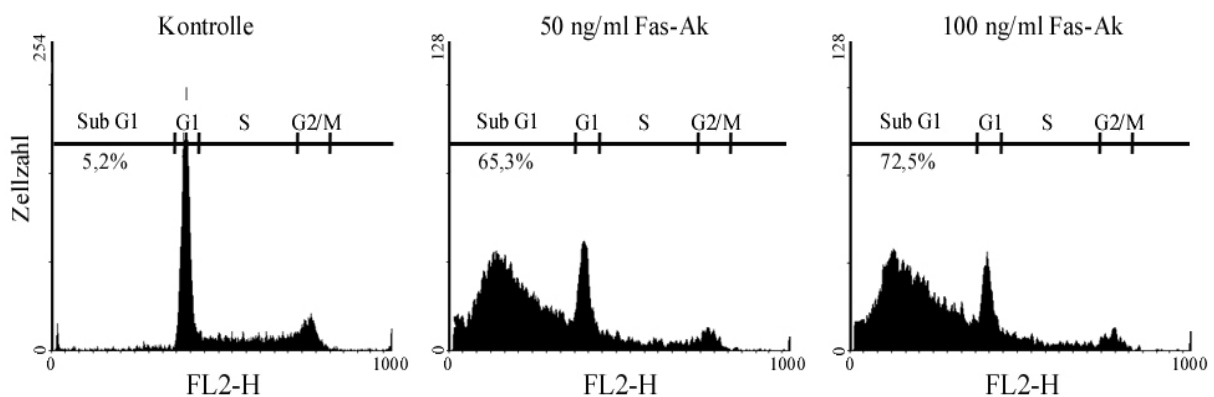


Abbildung 21: Apoptoseinduktion bei Jurkat-Zellen mit Hilfe eines agonistischen Fas-Antikörpers und Nachweis der Apoptosehäufigkeit durch Propidiumiodid (PI) Färbung. Kontrolle: unstimulierte Zellen, 50 ng/ml Fas-Ak: Jurkat-Zellen stimuliert für 4 h mit 50 ng/ml Fas-Antikörper, 100 ng/ml Fas-Ak: Jurkat-Zellen stimuliert für 4 h mit 100 ng/ml Fas-Antikörper. Das FACScan Histogramm zeigt die Zellzahl vs. DNA-Gehalt (FL2-H). Die verschiedenen Zellzyklusphasen und die Fraktion der Zellen mit einem sub G_1 DNA Gehalt sind angegeben.

Abbildung 21 zeigt ein typisches Beispiel einer solchen Apoptoseinduktion von Jurkat-Zellen mit Hilfe eines agonistischen Fas-Antikörpers. Deutlich erkennt man bei den stimulierten Zellen den sub G_1/G_0 Peak jener Zellen, die einen geringen bzw. kondensierten DNA-Gehalt aufweisen. Dies sind die apoptotischen Zellen. Gut zu verfolgen ist ebenfalls der Anstieg der Anzahl der apoptotischen Zellen von 5,2 % bei Kontrollzellen auf 65,3 % bei Zellen, die für 4 h mit 50 ng/ml Fas-Antikörper stimuliert wurden, bis zu 72,5 % bei Zellen, die für 4 h mit 100

ng/ml Fas-Antikörper stimuliert wurden. Ein großer Vorteil dieser Nachweismethode der Apoptose ist, daß sie sehr einfach eine genaue Quantifizierung der Anzahl der apoptotischen Zellen in einer gegebenen Zellpopulation erlaubt. Der Nachteil PI-Färbung besteht darin, daß eine Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen nicht möglich ist.

3.4.2 Annexin-V-FLUOS-Färbung

In frühen Apoptose-Stadien finden Veränderungen in der Zellmembran statt (Andree et al., 1990; Creutz, 1992; Fadok et al., 1992). Eine dieser Änderungen der Plasmamembran ist die Translokation von Phosphatidylserin (PS), welches normalerweise nur auf der cytoplasmatischen Innenseite der Membran lokalisiert ist, auf die Außenseite der Membran (Vermes et al., 1995). Annexin V ist ein Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität für PS (Vermes et al., 1995). Dieses Protein kann somit als empfindliche Sonde für die PS-Exposition auf der Membranaußenseite apoptotischer Zellen eingesetzt werden und ist deswegen zur Detektion apoptotischer Zellen in Zellpopulationen geeignet. Auch diese Methode erlaubt eine Auswertung durch FACScan-Analyse, wodurch sie ebenfalls einfach zu quantifizierende Ergebnisse liefert.

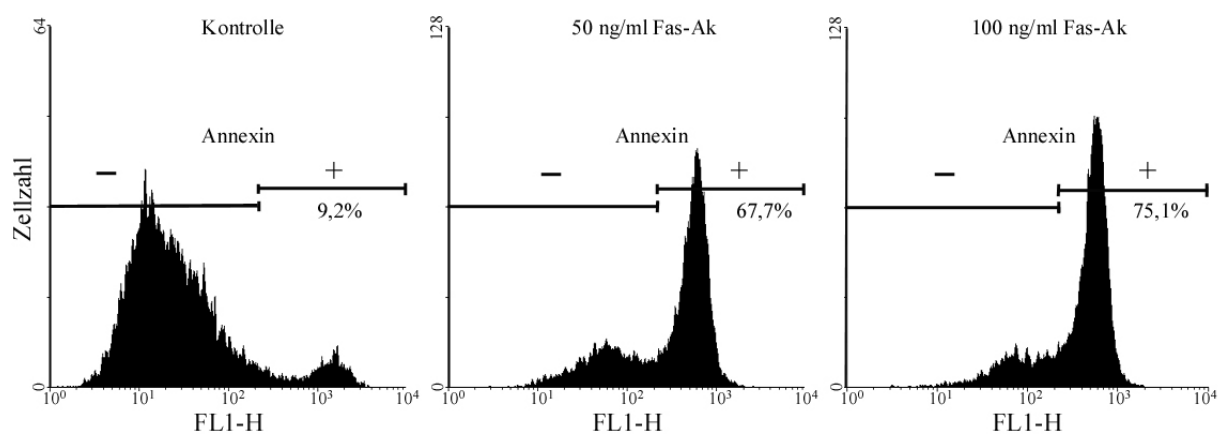


Abbildung 22: Apoptoseinduktion bei Jurkat-Zellen mit Hilfe eines agonistischen Fas-Antikörpers und Nachweis der Apoptosehäufigkeit durch Annexin-V-FLUOS-Färbung. Kontrolle: unstimulierte Zellen, 50 ng/ml Fas-Ak: Jurkat-Zellen stimuliert für 4 h mit 50 ng/ml Fas-Antikörper, 100 ng/ml Fas-Ak: Jurkat-Zellen stimuliert für 4 h mit 100 ng/ml Fas-Antikörper.

Abbildung 22 zeigt den Nachweis der Apoptoseinduktion bei Jurkat-Zellen durch Annexin-V-FLUOS-Färbung. Die Zellen stammen aus dem selben Stimulationsansatz wie die Zellen, die für die PI Färbung verwendet wurden (Abbildung 21). Man erkennt eine deutliche Zunahme

an Annexin-V-FLUOS positiven Zellen nach Stimulation mit dem agonistischen Fas-Antikörper. Die quantitative Auswertung zeigt eine zur PI-Färbung sehr ähnliche Zunahme der apoptotischen Zellen von 9,2 %, bei Annexin-positiven unstimulierten Kontrollzellen, auf 67,7 % bzw. 75,1% in Zellen, die für 4 h mit 50 ng/ml bzw. 100 ng/ml Fas-Antikörper stimuliert wurden (Abbildung 23). Beide Methoden zeigen ein quantitativ fast identisches Ergebnis und können in diesem System der Apoptoseinduktion als gleichwertig in ihrer Aussagekraft über die Anzahl von apoptotischen Zellen in einer zu untersuchenden Zellpopulation angesehen werden.

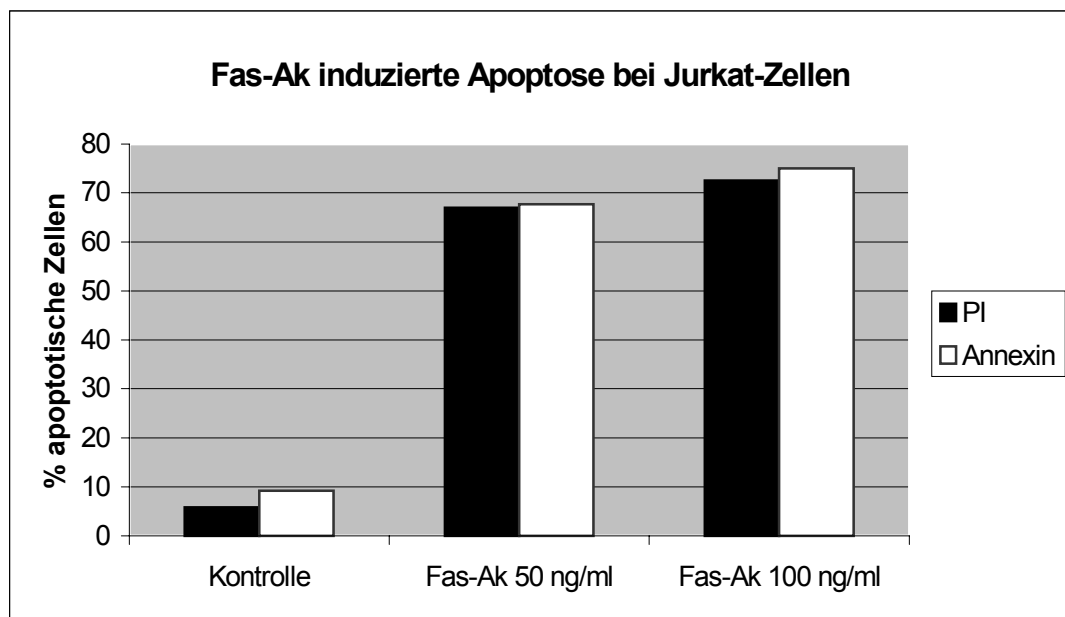


Abbildung 23: Vergleich der Propidiumiodid und der Annexin-V-FLUOS Färbemethode für den Nachweis der Apoptoseinduktion bei Jurkat-Zellen. Beide Methoden liefern ein fast identisches Ergebnis.

3.4.3 DNA-Fragmentierung (DNA-Leiter)

Einer der klassischen Tests für das Auftreten von Apoptose ist der Nachweis der DNA Fragmentierung. Als einer der wichtigen Schritte des geordneten, programmierten Zelltodes wird dabei die DNA von einer Caspase aktivierten DNase (CAD), auch DNA Fragmentierungs Faktor (DFF) genannt, in ca. 180 bp große Fragmente zerlegt. Für den Nachweis dieser Fragmente wurden die zu untersuchenden Zellen lysiert und die DNA wurde isoliert und auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. In Abbildung 24 erkennt man eine deutliche DNA Fragmentierung bei Jurkat-Zellen die mit einem agonistischen Fas-

Antikörper stimuliert wurden. Die Fragmentgrößen entsprechen dem erwarteten Vielfachen von 180 bp.

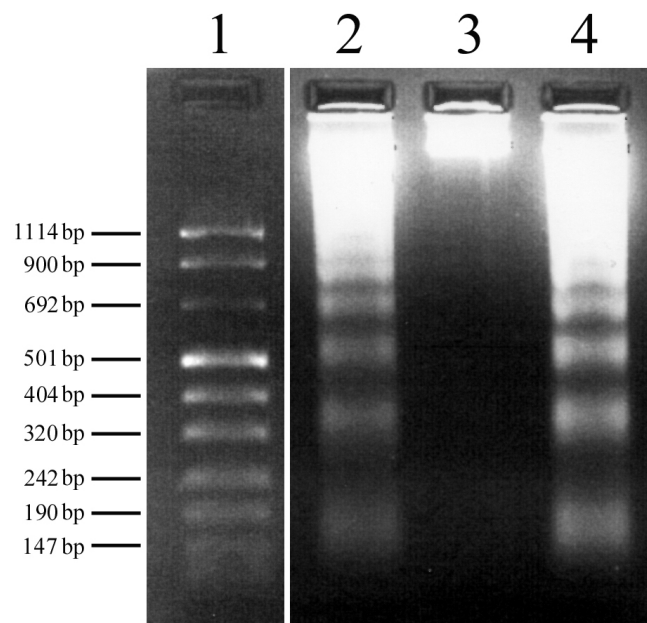


Abbildung 24: DNA Fragmentierung bei Fas-Ak stimulierten Jurkat-Zellen. **1:** DNA Längenstandard, **2:** 50 ng/ml Fas-Ak, **3:** unstimulierte Kontrollzellen, **4:** 100 ng/ml Fas-Ak. Es ist eine deutliche Fragmentation der DNA bei Fas-Antikörper stimulierten Zellen erkennbar. Die Fragmentgrößen entsprechen dem erwarteten Vielfachen von 180 bp.

Die Zellen dieses Versuches stammen aus demselben Stimulationsansatz wie die Zellen, die für die PI- und Annexin-V-FLUOS-Färbung verwendet wurden (s. 3.4.1, 3.4.2). Damit konnte bestätigt werden, daß mit den beiden bereits gezeigten Methoden (PI- und Annexin-V-FLUOS-Färbung) tatsächlich Apoptose nachgewiesen werden kann. Nachteile der DNA-Leiter-Methode bestehen darin, daß sie rein qualitativ ist und keinerlei Aussagen über die Anzahl apoptotischer Zellen in einer Zellpopulation erlaubt. Außerdem ist es nur schwer möglich, bestimmte Zell-Subpopulationen getrennt von dem Rest der Zell-Gesamtpopulation zu untersuchen.

3.5 Etablierung der Apoptoseinduktion in MMC und MTC

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die PI-Färbung eine zuverlässige und quantitative Methode für den Nachweis von Apoptose darstellt, wurde nun die Apoptoseinduktion in den im Labor zur Verfügung stehenden murinen Zelllinien (Maus-Mesangialzellen (MMC) und Maus-Tubuluszellen (MTC)) etabliert.

3.5.1 Stimulation von MMCs mit IFN- γ , TNF- α , oder Fas-Ak

Zunächst wurden MMCs mit Interferon- γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), oder Fas-Antikörper (Fas-Ak) stimuliert und Apoptose quantitativ durch PI-Färbung gemessen. Dabei konnte keine ausreichende Apoptoserate im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen erreicht werden (Abbildung 25).

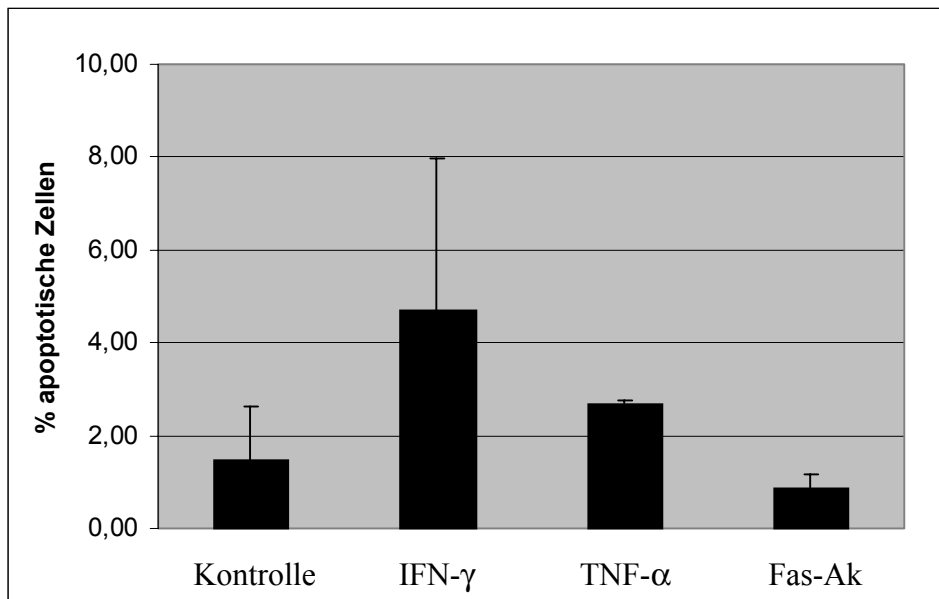


Abbildung 25: Stimulation von MMCs mit 250 U/ml IFN- γ , 10 ng/ml TNF- α , oder 1 μ g/ml Fas-Antikörper für 48 h zeigt im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen keine oder nur sehr geringe Apoptoseinduktion. Der Apoptose-Nachweis erfolgte durch FACScan-Analyse nach PI-Färbung.

Die höchste Apoptoserate (4,7 % \pm 3,3 %) konnte mit der IFN- γ Stimulation (250 U/ml) erzielt werden. Allerdings waren die erzielten Werte als positive Kontrolle deutlich zu niedrig und die Schwankungen zwischen den einzelnen Experimenten waren eindeutig zu stark. Eine Stimulation der MMCs mit 10 ng/ml TNF- α (2,7 % \pm 0,1 % apoptotische Zellen) oder 1 μ g/ml Fas-Antikörper (0,9 % \pm 0,3 % apoptotische Zellen) zeigte keinen Unterschied im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen (1,5 % \pm 1,2 % apoptotische Zellen). Es mußte also eine andere Stimulationsmöglichkeit gefunden werden, die eine höhere Apoptoserate erbrachte und gleichzeitig den IFN- γ Apoptoseinduktionsweg beinhaltet.

3.5.2 Fas-Expression durch IFN- γ und TNF- α Stimulation von MMC und MTC

Eine Erklärung dafür, daß die Fas-Antikörper-Stimulation der MMCs zu keinerlei Apoptoseinduktion geführt hatte, wäre die Möglichkeit, daß MMCs unter Standard Zellkulturbedingungen keinen Fas-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren. Sollte es aber gelingen, die Fas-Rezeptor-Expression durch Stimulation der MMCs mit Cytokinen, wie z.B. IFN- γ und TNF- α zu induzieren, so würde eine anschließende Stimulation der Zellen mit Fas-Antikörper wahrscheinlich zu der gewünschten Apoptoseinduktion führen. Die Annahme, daß MMCs unter Standard-Zellkulturbedingungen keinen Fas-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren, konnte mittels FACScan-Analyse bestätigt werden. Wie in Abbildung 26 gezeigt, ist das Fas-Rezeptor Expressionsniveau auf der Zelloberfläche der MMCs unter Standard Zellkulturbedingungen sehr niedrig. Wurden die Zellen jedoch mit IFN- γ alleine oder mit IFN- γ und TNF- α zusammen für 36 h stimuliert, so zeigte sich eine deutlich gesteigerte Fas-Rezeptor Expression.

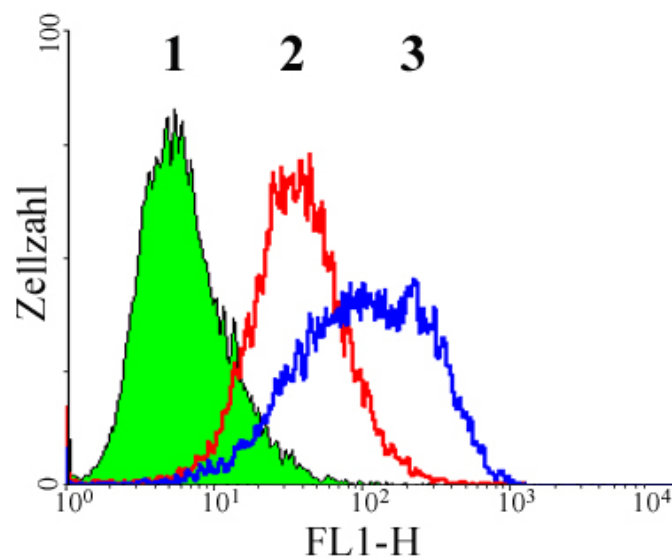


Abbildung 26: FACScan-Analyse der Fas-Rezeptor-Expression auf der Zelloberfläche von MMCs. Zellen die mit IFN- γ stimuliert wurden zeigen eine deutliche Steigerung der Fas-Rezeptor Expression, die bei gemeinsamer Stimulation mit IFN- γ und TNF- α sogar noch gesteigert werden kann. **1:** unstimulierte Kontrollzellen, **2:** Stimulation mit 250 U/ml IFN- γ für 48 h, **3:** Stimulation mit 250 U/ml IFN- γ und 10 ng/ml TNF- α für 48 h.

3.5.3 Apoptoseinduktion in MMC und MTC durch IFN- γ , TNF- α und Fas-Ak Stimulation

Die Stimulation von MMCs mit IFN- γ und TNF- α ergab eine deutlich gesteigerte Fas-Rezeptor-Expression, daher wurden die in dieser Weise vorstimulierten Zellen zusätzlich mit einem agonistischen Fas-Antikörper stimuliert. Bereits eine Vorstimulation der Zellen mit IFN- γ und TNF- α ohne eine anschließende Fas-Antikörper-Stimulation führte zu einer deutlichen Apoptoseinduktion von 1,5 % apoptotischer Zellen bei unstimulierten Kontrollen auf 22,5 % apoptotische Zellen. Eine Vorstimulation nur mit IFN- γ für 36 h und anschließende Fas-Antikörper-Stimulation für 8 h führte zu 18,8 % apoptotischen Zellen (Abbildung 27). Eine Stimulation der Zellen in den ersten 36 Stunden mit IFN- γ und TNF- α und eine anschließende Stimulation für 8 h mit Fas-Antikörper ergab sogar eine Apoptoseinduktion bei einem Drittel der Zellen (33,3 %).

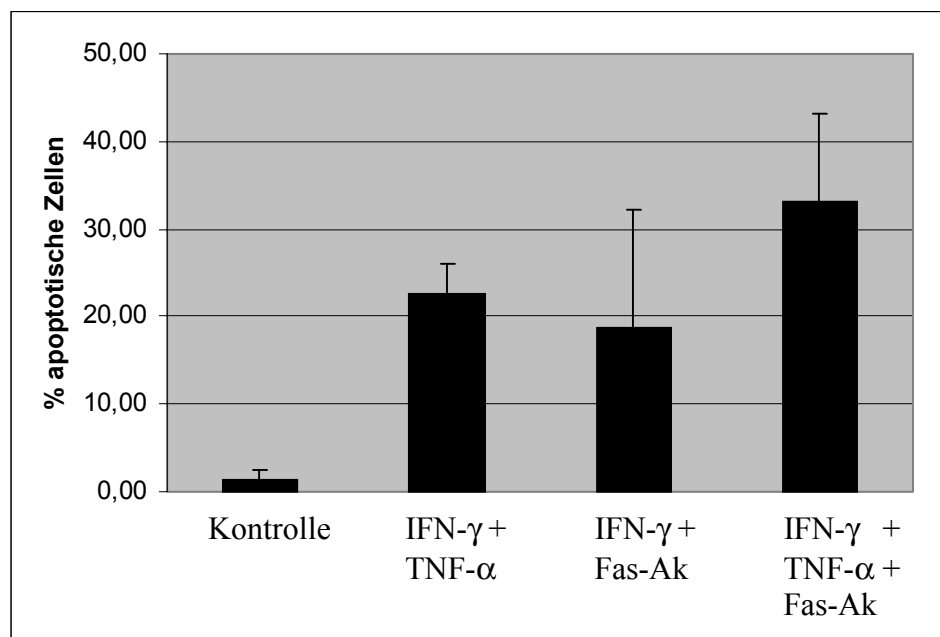


Abbildung 27: Apoptoseinduktion von MMCs. Stimulation mit 250 U/ml IFN- γ und 10 ng/ml TNF- α alleine zeigt im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen (1,5 %) eine Apoptoseinduktion von 22,5 %. Durch eine Vorstimulation der Zellen mit 250 U/ml IFN- γ oder 250 U/ml IFN- γ und 10 ng/ml TNF- α , für 36 h und eine anschließende Stimulation mit 1 μ g/ml Fas-Antikörper für 8 h wird eine Apoptoserate von 18,8 % bzw. 33,3 % erreicht. Der Apoptose Nachweis erfolgte durch FACScan-Analyse nach PI-Färbung.

Diese Methode der Apoptoseinduktion bei MMCs zeigte eine ausreichend hohe Apoptoserate, um als positive Kontrolle zu dienen und erlaubte eine weitergehende Analyse des Expressionsniveaus von mDAP-3 in apoptotischen Zellen.

Diese zuverlässige und reproduzierbare Methode der Apoptoseinduktion für MMCs wurde auch an einer zweiten stabilen murinen Nierenzelllinie, den Maus Tubuluszellen (MTC), angewandt. Die in unserem Labor zur Verfügung stehende MTC Zelllinie verhielt sich empfindlicher als die MMCs, und es konnte eine stärkere Apoptoseinduktion unter den gleichen Bedingungen wie für die MMCs erzielt werden. Eine Stimulation der MTCs mit IFN- γ und TNF- α für 48 h führte bereits zu 63 % apoptotischen Zellen, so daß eine Vorstimulation der Zellen für 36 h mit IFN- γ und TNF- α und eine anschließende Stimulation mit Fas Antikörper für 6 h keine weiter gesteigerte Apoptoserate erbrachte. Stimulation der MTCs mit IFN- γ oder TNF- α alleine zeigte ebenfalls eine deutlich erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen (Abbildung 28). Diese Ergebnisse verdeutlichen die höhere Empfindlichkeit dieser Zelllinie gegenüber den beiden eingesetzten Cytokinen im Vergleich zu den MMCs.

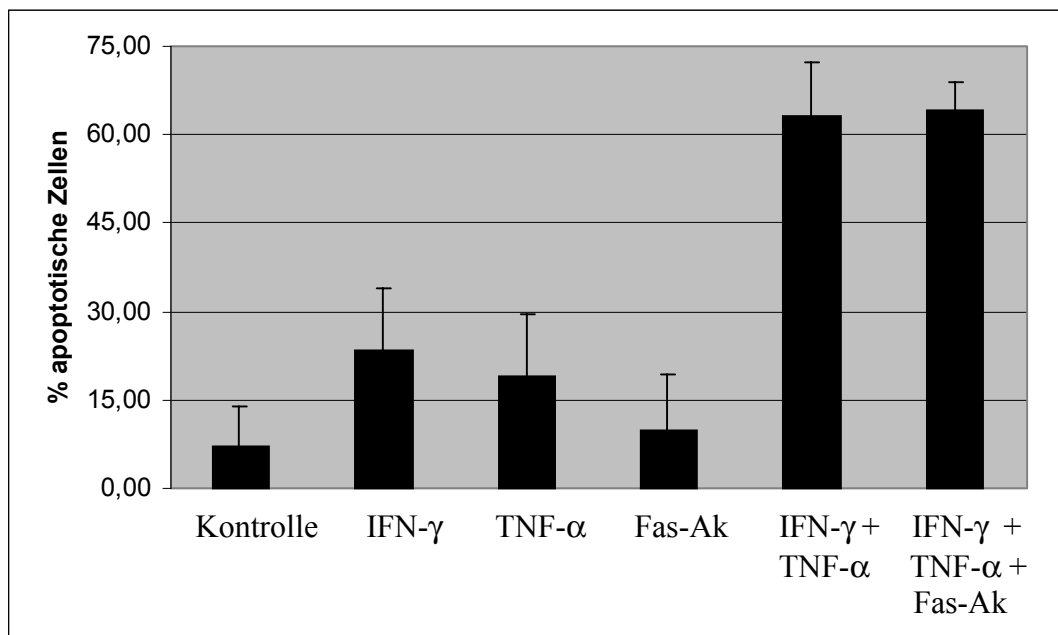


Abbildung 28: Apoptoseinduktion von MTCs. Stimulation der Zellen mit 250 U/ml IFN- γ und 10 ng/ml TNF- α für 48 h führt zu 63 % apoptotische Zellen. Durch eine Vorstimulation der Zellen mit 250 U/ml IFN- γ und 10 ng/ml TNF- α für 36 h und eine anschließende Stimulation mit 1 μ g/ml Fas-Antikörper für 6 h wird keine gesteigerte Apoptoserate erreicht. Stimulation mit 250 U/ml IFN- γ oder 10 ng/ml TNF- α alleine zeigt, im Vergleich zu der MMC Stimulation, eine deutlich gesteigerte Apoptoseinduktion. Apoptose Nachweis durch FACScan-Analyse nach PI-Färbung.

3.6 Analyse der mDAP-3 Expression in apoptotischen Zellen

Viele pro-apoptische Proteine, wie z.B. die Caspasen, liegen in der Zelle als inaktive Proformen vor und werden erst nach einem apoptotischen Stimulus in ihre enzymatisch aktive

Form umgewandelt. Dies geschieht meist durch proteolytische Abspaltung einer Pro-Domäne. Eine einfache Nachweismöglichkeit für die Aktivierung des entsprechenden Proteins ist dann durch eine Western-Blot-Analyse möglich. Dabei kann auf Grund der unterschiedlichen Größe sehr leicht das kleinere aktive Protein von der längeren Proform unterschieden.

Eine Proteinneusynthese ist für die meisten apoptotischen Vorgänge nicht notwendig, da, wie gerade beschrieben, viele wichtige pro-apoptotische Proteine konstitutiv in ihrer inaktiven Form in der Zelle vorhanden sind.

Ein erster Schritt, um die potentielle pro-apoptotische Funktion von mDAP-3 näher zu charakterisieren, war daher, das Expressionsniveau von mDAP-3, sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene, während der Apoptoseinduktion in den beiden murinen Nierenzelllinien MMC und MTC zu untersuchen.

3.6.1 mDAP-3 mRNA-Expression nach Apoptosestimulation

Die Expression von mDAP-3 mRNA wurde in MTCs, die durch Stimulation mit IFN- γ , TNF- α , Fas-Antikörper, IFN- γ und TNF- α , oder IFN- γ und Fas-Antikörper, zur Apoptoseinduktion gebracht wurden, untersucht. Die Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen wie in 3.5.3 beschrieben stimuliert, und anschließend wurde die gesamte RNA isoliert und durch oligo (dT) geprimete reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Durch PCR mit spezifischen Primern für das Housekeepinggen β -Aktin wurde die cDNA-Ausgangsmenge der einzelnen Stimulationsansätze auf ein vergleichbares Niveau eingestellt. Von dieser standardisierten cDNA wurde dann eine mDAP-3-spezifische PCR mit den Primern mDAP-3 D2AS und MERM3 AS (vergl. 5.1.2) mit einer seriellen Verdünnung der jeweiligen cDNA durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mit dem Phosphorimager quantitativ ausgewertet. Ein in Abbildung 29 gezeigtes repräsentatives Gel und die entsprechende quantitative Auswertung von zwei unabhängigen Versuchen zeigen einen Rückgang der mDAP-3 mRNA Expression in apoptotischen MTCs, der gut mit der Stärke des apoptotischen Stimulus korreliert. Zellen die mit IFN- γ und TNF- α oder mit IFN- γ und Fas-Antikörper stimuliert wurden und bei denen in den bisherigen Versuchen die höchste Apoptoserate gezeigt werden konnte, haben hier einen deutlich verringerten mDAP-3 mRNA Anteil im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen und Zellen, die nur einen geringen apoptotischen Stimulus bekommen haben.

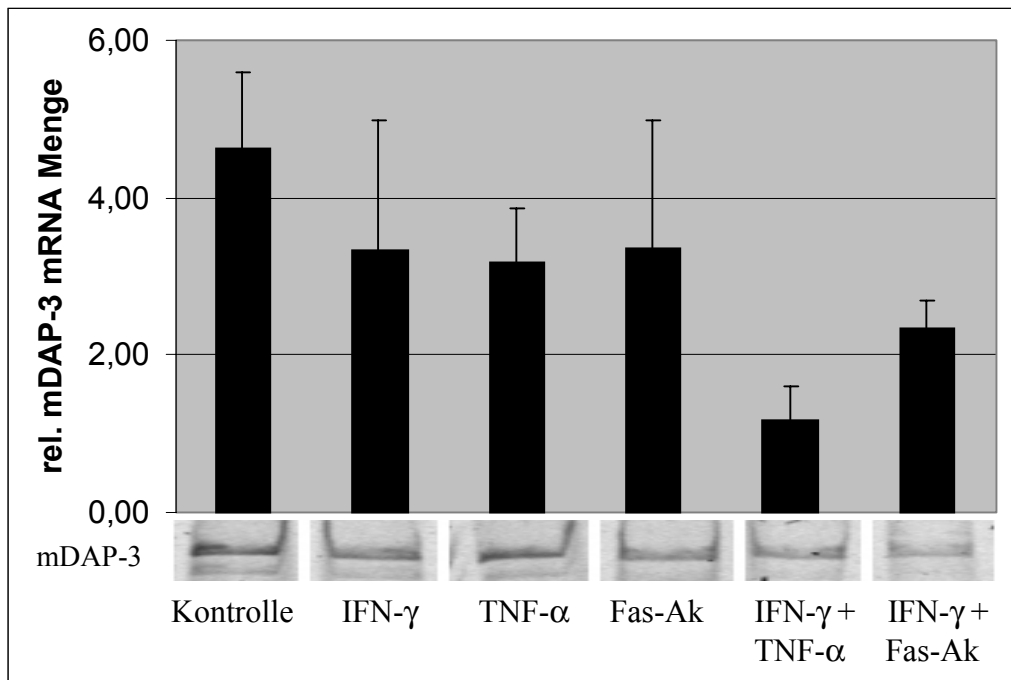


Abbildung 29: Quantitative RT-PCR zur Bestimmung der mDAP-3 mRNA nach Apoptoseinduktion von MTCs. Die Zellen wurden wie angegeben stimuliert. Die cDNA Menge wurde zunächst mit Hilfe einer PCR für ein ubiquitäres Gen (β -Aktin) auf ein vergleichbares Niveau eingestellt und anschließend wurden mDAP-3 spezifische PCRs durchgeführt und quantitativ ausgewertet (repräsentatives Beispiel unter der quantitativen Auswertung gezeigt).

Während der Apoptose ist also eine Erhöhung der mDAP-3 mRNA-Menge nicht nachzuweisen, sondern es ist sogar eine relative Abnahme der mDAP-3 mRNA-Transkripte erkennbar. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Reduzierung der metabolischen Aktivität der stimulierten Zellen sein. Eine zweite denkbare Erklärung für den Rückgang der mDAP-3 mRNA könnte eine Zunahme der mRNA des gewählten „house-keeping“ Genes β -Aktin sein, wodurch das Ergebnis der mDAP-3 RNA Analyse verfälscht werden könnte. Wichtiger für die Funktion von mDAP-3 ist daher eine mögliche Veränderung des mDAP-3 Proteins, bzw. der mDAP-3 Proteinmenge während der Apoptose.

3.6.2 mDAP-3 Protein-Expression nach Apoptosestimulation

Mögliche während der Apoptose auftretende Veränderungen der mDAP-3-Protein-Expression, oder posttranslationale Veränderungen des mDAP-3-Proteins, z.B. durch interagierende pro-apoptotische Proteine, wurden an MMCs und MTCs, die durch die verschiedenen bereits beschriebenen Stimuli zur Apoptose gebracht wurden, untersucht. Dazu wurden die Zellen unter den gleichen Bedingungen wie in 3.5.3 beschrieben stimuliert und anschließend lysiert, um das Gesamtprotein zu erhalten. Die Proteinmenge der einzelnen, aus

den unterschiedlichen Stimulationen stammenden Lysate wurde mit Dreifachwerten je Probe bestimmt. Je zwei unabhängige Proben der selben Stimulationsbedingungen wurden in einer seriellen Verdünnung durch SDS-PAGE aufgetrennt und der mDAP-3 Gehalt mit Western Blot Analyse untersucht. Dabei zeigte sich in MMCs (Abbildung 30), unabhängig von der Stärke des apoptotischen Stimulus, keine Veränderung der mDAP-3 Proteinmenge.

In MTCs, bei denen unter den gewählten Stimulationsbedingungen eine höhere Apoptoserate als bei MMCs erreicht wird, läßt sich eine schwache Verringerung der mDAP-3-Protein-Expression nach Stimulation der Zellen mit IFN- γ und TNF- α (Abbildung 31 V) und IFN- γ , TNF- α und Fas-Antikörper (Abbildung 31 VI) erkennen. Allerdings ist diese Veränderung zu gering, um aussagekräftig zu sein, zumal eine quantitative Auswertung eines Western-Blots nur bei sehr deutlichen Unterschieden der jeweiligen spezifischen Proteinmenge verlässlich möglich ist. Eine eventuelle während der Apoptose induzierte proteolytische Veränderung des mDAP-3 Proteins, wie z.B. das Abspalten einer Pro-Domäne, ist in beiden Zelllinien nicht erkennbar. mDAP-3 wird also, unter den hier gewählten Bedingungen, während der Apoptose nicht verstärkt exprimiert und zeigt auch keine posttranslationalen Veränderungen.

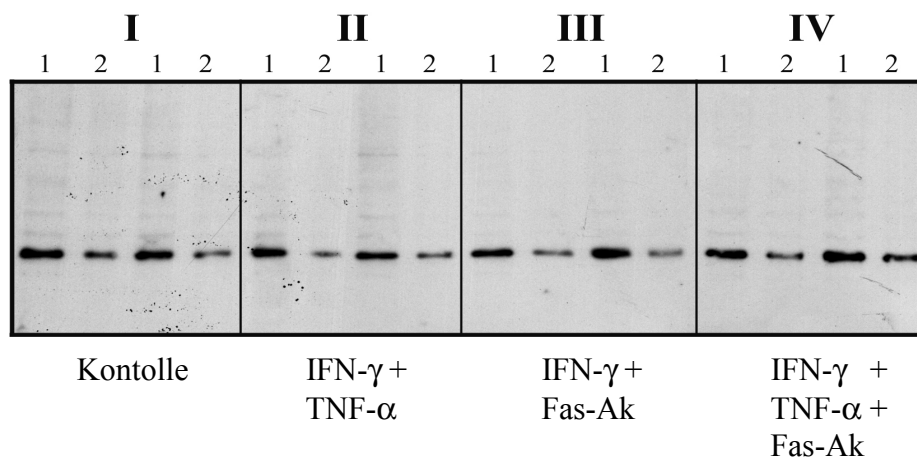


Abbildung 30: Analyse der mDAP-3 Protein Expression nach Apoptoseinduktion von MMCs. Für jede Stimulationsbedingung (I – IV) sind zwei unabhängige Versuche gezeigt. Für jeden Versuchsansatz wurden zwei unterschiedlichen Mengen (1 = 8 μ g, 2 = 4 μ g) aufgetragen. Die jeweiligen Stimulationsbedingungen der Zellen sind angegeben. Es ist keine Veränderung der mDAP-3 Proteinmenge erkennbar.

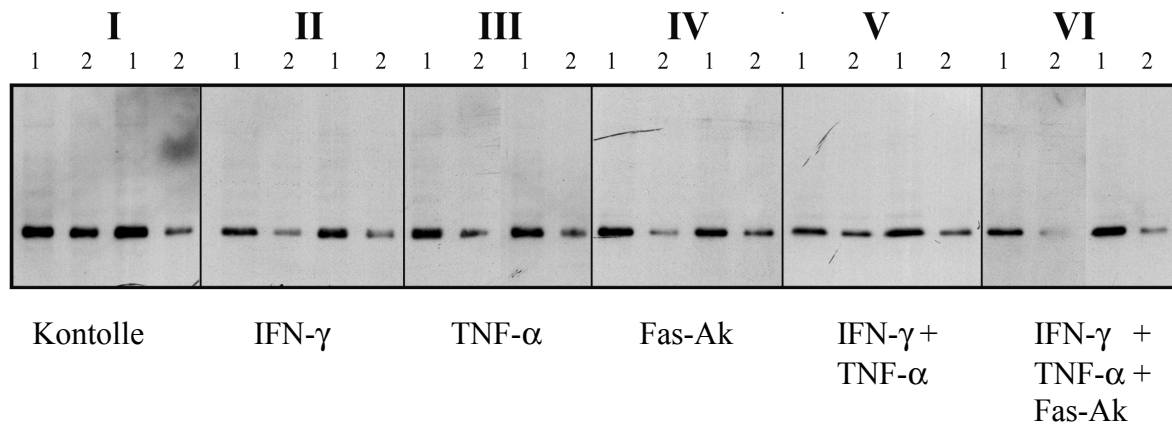


Abbildung 31: Analyse der mDAP-3 Protein Expression nach Apoptoseinduktion von MTCs. Für jede Stimulationsbedingung (I – VI) sind zwei unabhängige Versuche gezeigt. Für jeden Versuchsansatz wurden zwei unterschiedlichen Mengen (1 = 8 μ g, 2 = 4 μ g) aufgetragen. Die jeweiligen Stimulationsbedingungen der Zellen sind angegeben. Es ist eine geringe Reduktion der mDAP-3 Proteinmenge nach Stimulation der Zellen mit IFN- γ und TNF- α (V) und IFN- γ , TNF- α und Fas-Antikörper (VI) erkennbar.

3.7 Analyse der mDAP-3-Funktion durch transiente Überexpression

Die hohe Sequenzübereinstimmung zwischen dem murinen DAP-3 und seinem humanen Ortholog, hDAP-3, ließ auf eine ebenfalls gleiche Funktion der beiden Proteine schließen. Die Funktion eines Proteines läßt sich häufig an Hand einer, durch transiente Überexpression erzielten, gesteigerten Expression analysieren. So konnte, durch die Arbeitsgruppe um A. Kimchi, sowohl für hDAP-3 als auch für CeDAP-3 eine pro-apoptotische Funktion bei Überexpression der entsprechenden Proteine gezeigt werden (s. 1.4.2). Zeitgleich wurden in unserer Arbeitsgruppe, als erster Schritt für die Charakterisierung der Funktion von mDAP-3, ebenfalls Überexpressionsexperimente durchgeführt.

Die bereits beschriebene Methode des Apoptosenachweises, durch Propidiumiodid-Färbung des DNA-Gehaltes der einzelnen Zellen und anschließende quantitative FACScan-Analyse, hat als einen wesentlichen Vorteil die Möglichkeit, bestimmte Zellpopulationen, die sich durch ein im FACScan erkennbares Merkmal voneinander unterscheiden, auch bei der Auswertung von anderen zu trennen. Solch ein erkennbares Merkmal wäre z.B. die unterschiedliche Größe von Zellen, wenn es sich bei der zu untersuchenden Probe nicht um homogenes Zellkulturmaterial sondern z.B. um Blut von Versuchstieren handelt. Ein weiteres Merkmal wäre die Expression eines durch eine zusätzliche Fluoreszenzfärbung sichtbar gemachten Proteins, das nur auf einem Teil der Zellpopulation exprimiert wird. Bei einer transienten Überexpression eines Proteins besteht die Möglichkeit einer Ko-Transfektion

eines solchen Markerproteines. Dies ist besonders hilfreich, wenn der zu untersuchende Effekt der Überexpression nur gering ist. Da der Anteil der transient transfizierten Zellen meist nicht höher als 30 – 40 % ist, wäre solch eine geringe Wirkung in einer gesamten durch transiente Transfektion manipulierten Zellpopulation nicht oder nur schwer nachweisbar. Die FACScan-Analyse erlaubt es, gezielt nur die durch transiente Transfektion veränderten Zellen in einer Gesamtpopulation zu untersuchen, indem zunächst nur Zellen analysiert werden, die das Markerprotein exprimieren. Damit wird gewährleistet, daß alle Zellen, die daran anschließend analysiert werden auch tatsächlich mit der zu analysierenden cDNA transfiziert wurden. Dazu ist es notwendig, den Marker in einer ca. 5fach geringeren Konzentration als die cDNA, deren Funktion man untersuchen möchte, in den Transfektionsansatz einzusetzen. Damit wird gewährleistet, daß alle Zellen die mit dem Markergen transfiziert wurden, auch gleichzeitig mit dem zu untersuchenden Gen transfiziert wurden. Ein Protein, das häufig als ein solcher Marker verwendet wird, ist das „Green Fluorescent Protein“ (GFP), das aus der Qualle *Aequorea victoria* stammt und stark autofluoresziert. Dadurch ist eine aufwendige zusätzliche Fluoreszenzmarkierung dieses Proteines nicht notwendig. Ein weiterer Vorteil des GFP besteht darin, daß es sehr gut als Fusionsprotein mit dem zu untersuchenden Protein einsetzbar ist, da es trotz seiner Größe, in vielen Fällen die Funktion des zu untersuchenden Proteines nicht beeinträchtigt.

3.7.1 Expression eines mDAP-3/EGFP-Fusionsproteines

Um die Funktion von mDAP-3 durch transiente Transfektion zu untersuchen, wurde zunächst ein mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein kloniert (vergl. 2.4.7.1). Ein Vorteil des Fusionsproteines besteht darin, daß sich die Expression dieses Konstruktes leicht durch Fluoreszenzmikroskopie und Western Blot Analyse nachweisen läßt. Für die Western Blot Analyse kann man zum Einen einen EGFP spezifischen Antikörper verwenden, zum Anderen ist der Größenunterschied zwischen dem endogenen mDAP-3 und dem mDAP-3/EGFP so groß (27 kDa), daß beide Proteine leicht bei Einsatz eines DAP-3 Antikörpers zu unterscheiden sind.

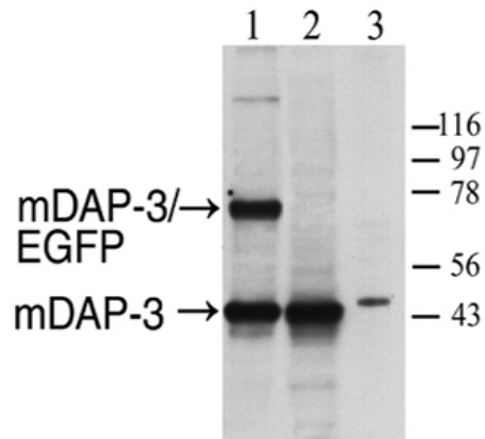


Abbildung 32: Western-Blot-Analyse von MMCs, die transient mDAP-3/EGFP überexprimieren. Es wurden 20 µg Zellysat pro Spur verwendet und mit dem anti-hDAP-3 Antikörper analysiert. Die Spuren enthalten **1:** Zellen transfiziert mit dem Vektor für das mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein; **2:** Zellen transfiziert mit dem Vektor für EGFP alleine; **3:** humanes sw 13 Zellysat, das von dem kommerziellen Anbieter des hDAP-3 Antikörpers als positive Kontrolle zur Verfügung gestellt wurde. Das Signal bei einer Größe von ca. 45 kDa entspricht dem endogenen mDAP-3 und die Bande von ca. 75 kDa in Spur 1 entspricht dem mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein.

Dieses Experiment (Abbildung 32) unterstreicht weiterhin die hohe Homologie zwischen dem murinen mDAP-3 und dem humanen hDAP-3, da der monoklonale anti-hDAP-3 Antikörper das murine mDAP-3 Protein detektiert. Der kommerziell erhältliche anti-hDAP-3 Antikörper kann daher weiterhin für die Analyse des murinen Materials verwendet werden.

3.7.2 Apoptoseinduktion in MMCs durch transiente Überexpression des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteines

Der Effekt von mDAP-3 auf die Überlebensfähigkeit von Zellen wurde durch transiente Transfektion von MMCs mit dem mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein getestet. Als negative Kontrolle diente der EGFP-Vektor ohne Insertion. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit Ethanol fixiert und die Apoptoserate wurde mit Hilfe der Propidiumiodid-Färbung des DNA-Gehaltes der Zellen bestimmt und mittels FACScan-Analyse quantitativ ausgewertet. Um eine Analyse nur der transfizierten Zellen zu ermöglichen, wurde das Experiment so entworfen, daß zusätzlich ein Vektor, der für eine membrangebundene EGFP-Variante kodiert, zusammen mit dem mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein oder dem leeren EGFP-Vektor transfiziert wurde. Diese Ko-Transfektion war notwendig, da das native EGFP bei der Fixierung der Zellen mit Ethanol aus den Zellen entwich und so in der FACScan-Analyse

nicht mehr detektierbar war, um als negative Kontrolle zu fungieren. Die transiente Überexpression des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteines führte zu einer Zunahme der apoptotischen Zellen von $11,9 \% \pm 2,8 \%$ in Kontrollen auf $27,6 \% \pm 2,6 \%$ in Zellen, die mit dem mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein transfiziert wurden ($n=3$). Abbildung 33 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines Transfektionsexperiments. Dabei ist erkennbar, daß sich die Zellzyklusverteilung der nicht-apoptotischen Zellen nicht signifikant ändert. Die Überexpression von mDAP-3 in MMCs erhöht also die Zahl der apoptotischen Zellen und bestätigt damit die pro-apoptotische Funktion von mDAP-3, die bereits für das humane Ortholog beschrieben worden war.

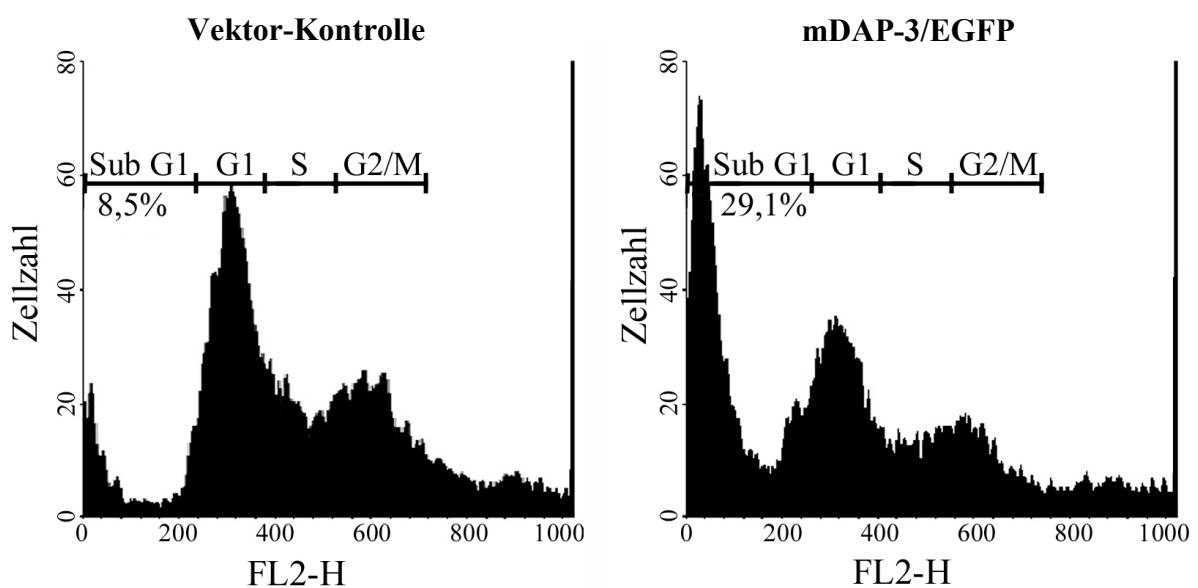


Abbildung 33: Die Überexpression des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteines induziert Apoptose in MMCs. Gezeigt ist die Verteilung des DNA-Gehaltes in MMCs, die entweder mit dem mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein oder einer leeren Vektor-Kontrolle mit einem membranverankerten EGFP transfiziert wurde. Das FACSscan Histogramm zeigt die Zellzahl vs. DNA-Gehalt (FL2-H). Die verschiedenen Zellzyklusphasen und die Fraktion der Zellen mit einem sub G₁ DNA-Gehalt sind angegeben.

3.7.3 Ein funktioneller P-Loop ist essentiell für die Apoptoseinduktion durch mDAP-3

Um den pro-apoptotischen Effekt von mDAP-3 näher zu untersuchen, wurden transiente Transfektionen mit dem Wildtyp mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein und einem P-Loop mutierten mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein, bei dem die Aminosäure 127 von Lysin zu Arginin verändert worden war, durchgeführt. Diese Mutation der funktionellen Domäne des mDAP-3 Proteins führte zu einer kompletten Inhibierung des pro-apoptotischen Effektes von mDAP-3. In

Abbildung 34 ist ein exemplarisches Beispiel eines Überexpressionsexperimentes gezeigt. In MTCs, die mit dem Wildtyp mDAP-3 transfiziert wurden, sind nach 48 h 25 % apoptotische Zellen nachweisbar. Die durch die P-Loop Mutation inaktivierte mDAP-3 Variante zeigt jedoch, bei Überexpression in MTCs, keinerlei pro-apoptotische Funktion (4.1 % apoptotische Zellen), und unterscheidet sich nicht von Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert wurden (8,6 % apoptotische Zellen).

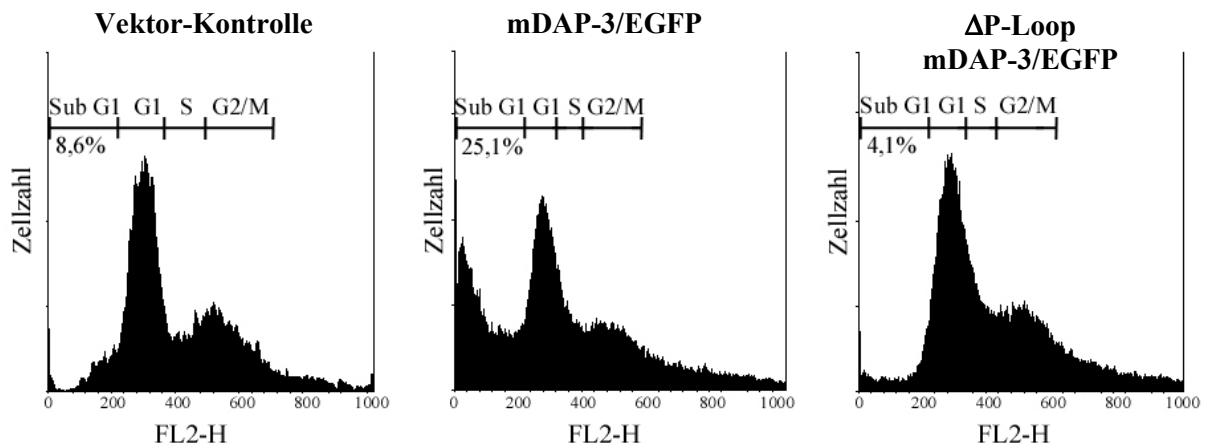


Abbildung 34: Die P-Loop Mutation verhindert den pro-apoptotischen Effekt des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteines bei Überexpression in MTCs. Gezeigt ist die Verteilung des DNA-Gehaltes in MTCs, die entweder mit einer Vektor-Kontrolle, dem mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein, oder mit einer P-Loop mutierten Variante des mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein transfiziert wurde. Das FACScan Histogramm zeigt die Zellzahl vs. DNA-Gehalt (FL2-H). Die verschiedenen Zellzyklusphasen und die Fraktion der Zellen mit einem sub G₁ DNA Gehalt sind angegeben.

3.7.4 mDAP-3 Überexpression bewirkt die Freisetzung von Cytochrom c

Ein entscheidender Schritt im Ablauf der Apoptose ist die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytoplasma. Eine Möglichkeit, diese Freisetzung von Cytochrom c experimentell nachzuweisen, besteht in der Durchführung einer differentiellen Zentrifugation. Dabei erhält man eine Auftrennung der zu untersuchenden Zellen in ein Mitochondrien reiches Pellet und den cytoplasmatischen Überstand. Die Fraktionen können durch einen anschließenden Western Blot für das gesuchte Protein analysiert werden. Führt man eine solche differentielle Zentrifugation mit Zellen durch, die wie in Abschnitt 3.7.3 beschrieben transfiziert wurden, so ist eine Freisetzung von Cytochrom c, aus den Mitochondrien in das Cytoplasma, nur in mDAP-3 Wildtyp transfizierten Zellen nachweisbar. Wurden die Zellen mit der, durch eine P-Loop Mutation inaktivierten Variante des mDAP-3 transfiziert, konnte keine Freisetzung von Cytochrom c nachgewiesen werden. Kontrollzellen zeigen ebenfalls

keine Freisetzung von Cytochrom c (Abbildung 35). Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Resultaten der Apoptoseinduktion überein und unterstreichen die Notwendigkeit eines funktionellen P-Loops für die pro-apoptotische Funktion von mDAP-3. Weiterhin ermöglichen sie eine Einordnung der pro-apoptotischen Funktion von mDAP-3 in den Ablauf der Apoptose. Da die Überexpression von mDAP-3 eine Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytoplasma bewirkt, muß die Funktion von mDAP-3 in der Apoptose oberhalb der Cytochrom c Freisetzung liegen.

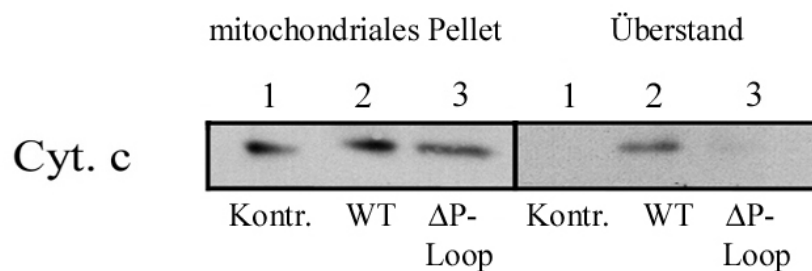


Abbildung 35: Western Blot der mitochondrialen und cytosolischen Fraktion von MTCs. Die Zellen wurden durch transiente Transfektion der angegebenen Konstrukte stimuliert. Die Apoptoserate der einzelnen Stimulationen entspricht Abbildung 34. Es wurden 40 µg Zellysat pro Spur verwendet und mit dem anti-Cytochrom c Antikörper analysiert. Die Spuren enthalten **1:** (Kontr.) MTCs transfiziert mit dem Kontrollvektor; **2:** (WT) MTCs transfiziert mit dem mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein; **3:** (ΔP-Loop) MTCs transfiziert mit dem P-Loop mutierten mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein. Nur Zellen, die mit dem Wildtyp mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein transfiziert wurden, zeigen eine Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (Überstand, Spur 2).

3.8 Lokalisation von mDAP-3

Die in 3.7.4 beschriebene Freisetzung von Cytochrom c durch mDAP-3 Überexpression, läßt vermuten, daß die Funktion von mDAP-3 in Verbindung mit den bei Apoptose entstehenden Veränderungen der Mitochondrien stehen könnte. Deshalb wurde die intrazelluläre Lokalisation des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteines zunächst mit Hilfe von Computerprogrammen untersucht.

3.8.1 Computer gestützte Vorhersage der intrazellulären DAP-3 Lokalisation

Eine Vorhersage der intrazellulären Lokalisation von mDAP-3 und weiteren Mitgliedern der DAP-3 Proteinfamilie mit den Computerprogrammen MITOPROT, TargetP und PSORT

ergab eine mögliche mitochondriale Lokalisation aller untersuchten DAP-3 Proteinfamilienmitglieder.

Spezies	Wahrscheinlichkeit der mitochondrialen Lokalisation von DAP-3			
	MITOPROT	PSORT	TargetP	
			Score	Reliability class
<i>Mus musculus</i>	0,7593	30,4	0,813	3
<i>Homo sapiens</i>	0,8964	69,6	0,869	3
<i>Drosophila m.</i>	0,9852	47,8	0,938	1
<i>C. elegans</i>	0,9927	73,9	0,867	2
<i>S. cerevisiae</i>	0,9990	39,1	0,883	2

Tabelle 7: Wahrscheinlichkeit der mitochondrialen Lokalisation von DAP-3, analysiert mit den Computerprogrammen MITOPROT, PSORT und TargetP. Alle drei Programme lokalisieren die untersuchten DAP-3 Proteinfamilienmitglieder in die Mitochondrien. Für TargetP gibt die „Reliability Class“ die Zuverlässigkeit der Vorhersage an, es gibt die Klassen 1 bis 5, wobei 1 die höchste Zuverlässigkeit anzeigt.

Das PSORT-Programm ergab für alle untersuchten DAP-3 Proteine die geringste Wahrscheinlichkeit für eine mitochondriale Lokalisation. Dennoch wurde allen DAP-3 Proteinen eine mitochondriale Lokalisation durch die unterschiedlichen Computerprogramme vorhergesagt. Daher wurde die intrazelluläre Lokalisation des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteines zunächst im Fluoreszenz-Mikroskop weiter untersucht.

3.8.2 Subzelluläre Lokalisation des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteines

Für die fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen wurden MMCs und MTCs mit dem mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein oder dem EGFP-N1 Kontrollvektor transfiziert, und auf Glasplättchen für 24 h unter Standard-Zellkulturbedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, in Mowiol eingebettet und in einem Leica-DMBRE Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Die gezeigten Abbildungen wurden mit einer an das Mikroskop angeschlossenen Spiegelreflexkamera und einem 1600 ASA Diafilm erstellt und mit Hilfe eines Nikon Coolscan III Dia-Scanners digitalisiert.

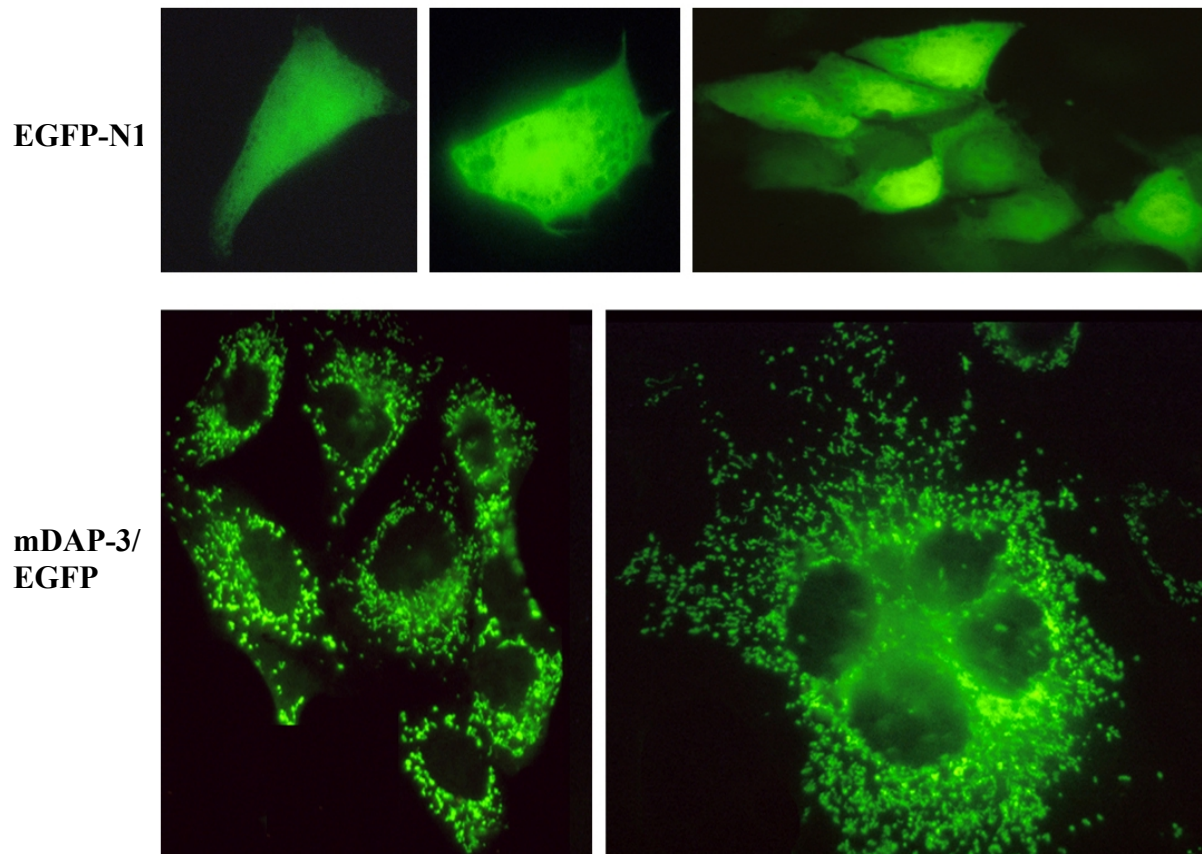


Abbildung 36: Lokalisation des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteines. Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von MTCs, transfiziert mit dem EGFP-N1 Kontrollvektor (obere Reihe) oder dem mDAP-3/EGFP-Fusionsproteinvektor (untere Reihe). Transfektion mit dem EGFP-N1 Vektor ergab das erwartete diffuse Fluoreszenz-Signal typisch für EGFP. Im Gegensatz dazu zeigen MTCs transfiziert mit dem mDAP-3/EGFP-Fusionsproteinvektor ein punktiertes Fluoreszenz-Signal.

Zellen, die mit dem mDAP-3/EGFP-Fusionsproteinvektor transfiziert wurden, zeigten ein stark unterschiedliches Fluoreszenz-Signal zu Zellen, die mit dem EGFP-N1 Kontrollvektor transfiziert wurden. Kontrolltransfektionen ergaben eine diffuse Fluoreszenz, die sich gleichmäßig über den gesamten Bereich der transfizierten Zellen verteilt. Zellen, die weniger EGFP exprimieren, zeigen dabei ein abgeschwächtes diffuses Signal, das aber weiterhin gleichmäßig im Cytoplasma verteilt ist und keinerlei spezifische Lokalisation zeigt. Im Gegensatz dazu erkennt man in Zellen, die mit dem mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein transfiziert wurden, ein punktförmiges, scharf abgegrenztes Fluoreszenz-Signal, das verstärkt um den nicht fluoreszierenden Zellkern lokalisiert ist (Abbildung 36).

3.8.3 Mito-Tracker-Red CMXRosTM Färbung

Diese punktförmige Fluoreszenz des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteines wurde mit Hilfe von Zellorganell spezifischen Farbstoffen näher charakterisiert. Dazu wurden Zellen zunächst mit dem mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein transfiziert und für 24 h unter Standard-Zellkulturbedingungen kultiviert, anschließend wurden sie mit Mito-Tracker-Red CMXRosTM, einem Mitochondrien spezifischen Farbstoff, oder mit Lyso-Tracker-RedTM, einem Lysosomen spezifischen Farbstoff gefärbt. Die Färbung erfolgte durch den Austausch des normalen Zellkulturmediums durch ein Medium, das den entsprechenden Farbstoff enthielt und eine Kultivierung der Zellen in diesem Medium für 40 min unter Standardbedingungen. Anschließend wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen, mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, in Mowiol eingebettet und im Fluoreszenz-Mikroskop untersucht.

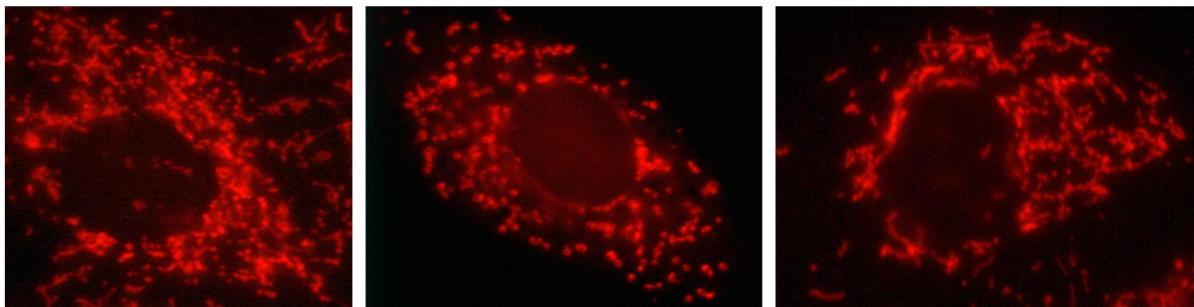


Abbildung 37: Färbung von MTCs mit Mito-Tracker-Red CMXRosTM. Das Muster dieser mitochondrialen Färbung zeigt eine große Ähnlichkeit zu dem Fluoreszenz Signal des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteins.

Abbildung 37 zeigt drei repräsentative Bilder der Mitochondrien Färbung von MTCs mit Mito-Tracker-Red CMXRosTM. Die Färbung zeigt eine große Ähnlichkeit zu dem Fluoreszenz-Signal des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteins. Es ist ein deutlich abgegrenztes punkt- oder röhrenförmiges Fluoreszenz-Signal erkennbar, das, ähnlich wie das mDAP-3/EGFP Signal, verstärkt perinukleär auftritt. Dabei zeigt der Zellkern selber ebenfalls keine Anfärbung.

MTCs, die zunächst mit dem mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein transfiziert und dann mit Mito-Tracker-Red CMXRosTM gefärbt wurden, zeigen im Fluoreszenz-Mikroskop eine übereinstimmende Lokalisation der beiden Fluoreszenz-Signale. Wurde im Fluoreszenz-Mikroskop zunächst der Bandpaßfilter für den roten mitochondrialen Farbstoff verwendet, so konnte eine gleichmäßige punktierte Färbung der Zellen detektiert werden. Wechselt man

dann auf den Bandpaßfilter für das grüne EGFP-Signal, so sieht man in transfizierten Zellen keinerlei grüne Fluoreszenz, sondern ein deutlich gelbes Signal, das aus der vollständigen Überlagerung der grünen Fluoreszenz des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteines und aus der roten Fluoreszenz des Mito-Tracker-Red CMXRosTM resultiert (Abbildung 38).

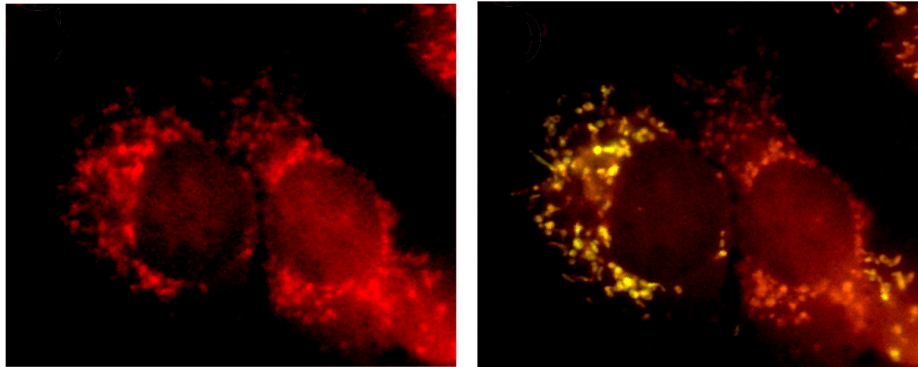


Abbildung 38: Übereinstimmende Lokalisation des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteins und der mitochondrialen Mito-Tracker-Red CMXRosTM Färbung in MTCs. Für die linke Abbildung wurde der Bandpaßfilter für den roten Mito-Tracker-Red CMXRosTM Farbstoff verwendet, die rechte Abbildung zeigt die gleichen Zellen unter Verwendung des grünen EGFP Bandpaßfilters. In der rechten Abbildung ist keine grüne Fluoreszenz erkennbar, sondern es hat eine vollständige Überlagerung der beiden Fluoreszenzen stattgefunden, die in einem gelben Signal der linken Zelle resultiert. Die rechte der beiden Zellen ist negativ für das mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein und erscheint daher weiterhin rot.

In einer zweiten Abbildung (Abbildung 39) ist ein identisches Experiment gezeigt. Leider war es häufig sehr schwierig, ein scharfes Bild mit der Mito-Tracker-Red CMXRosTM Färbung zu erhalten. Trotz vieler Verbesserungen der Konzentration des Farbstoffes und der Färbedauer war das resultierende Bild meist von einem roten Schleier überlagert. Deshalb war eine klare strukturelle Anfärbung der Mitochondrien leider nur bedingt möglich. Trotzdem erkennt man auch in dieser Abbildung eine eindeutige Überlagerung der beiden Fluoreszenz Signale. Bei Verwendung des grünen EGFP Bandpaßfilters ist wiederum keine grüne Fluoreszenz, sondern nur ein gelbes Signal erkennbar. In der gezeigten Ausschnittsvergrößerung erkennt man, daß tatsächlich identische Strukturen in der Zelle, sowohl von dem mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein, als auch von dem Mito-Tracker-Red CMXRosTM angefärbt wurden (Abbildung 39, Pfeil, Pfeilspitze). In beiden Ausschnitten deutlich erkennbare identische Strukturen sind zum einen eine langgestreckte Struktur, die von der Pfeilspitze markiert wird, und zum anderen zwei parallel verlaufende längliche Strukturen, die an ihrem linken unteren Ende kreisförmig erscheinen. Sie sind durch den Pfeil markiert. Diese Ergebnisse deuten somit auf eine mitochondriale Lokalisation des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteins hin.

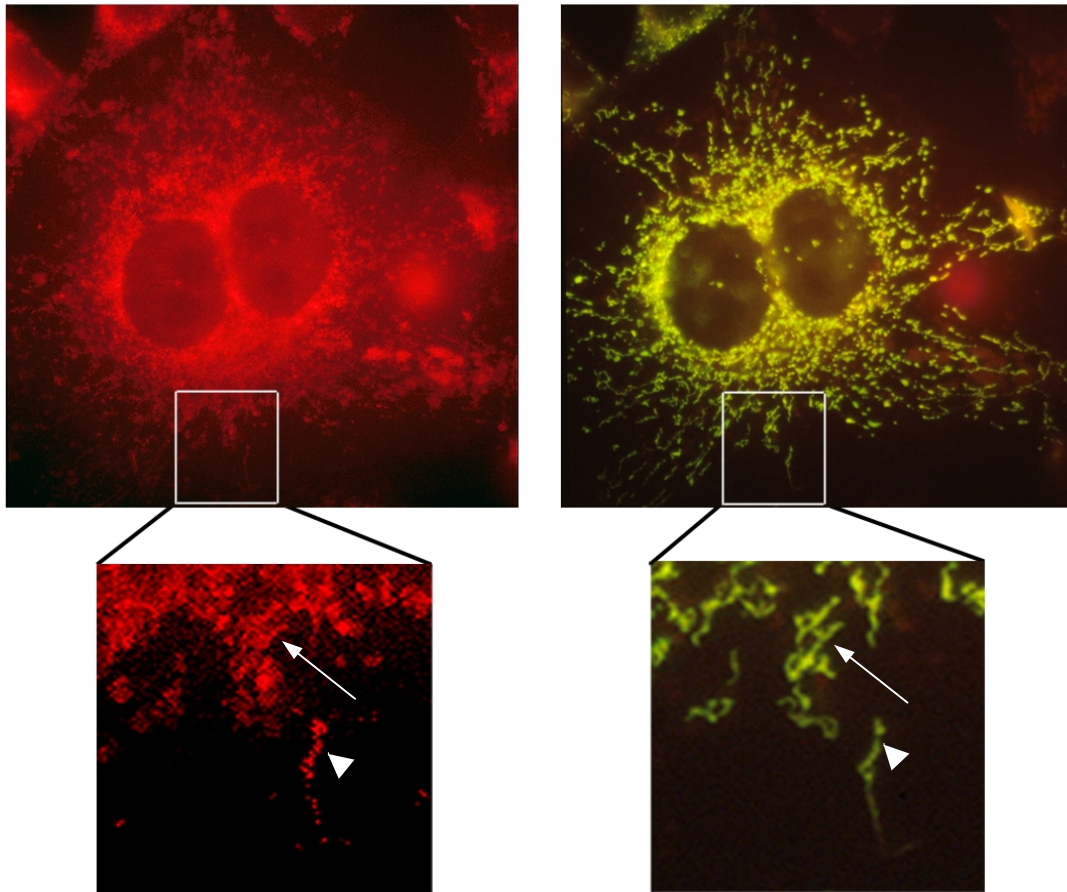


Abbildung 39: Übereinstimmende Lokalisation des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteins und der mitochondrialen Mito-Tracker-Red CMXRosTM Färbung in MTCs. Für die linke Abbildung wurde der Bandpaßfilters für den roten Mito-Tracker-Red CMXRosTM Farbstoff verwendet, die rechte Abbildung zeigt die gleichen Zellen unter Verwendung des grünen EGFP Bandpaßfilters. In der Ausschnittsvergrößerung erkennt man eine Anfärbung identischer Strukturen (Pfeil u. Pfeilspitze).

3.8.4 Lyso-Tracker-RedTM Färbung

Als negative Kontrolle wurden MTCs mit mDAP-3EGFP transfizierte und mit einem Lysosomen spezifischen Farbstoff (Lyso-Tracker-RedTM) gefärbt. Auch hier zeigt sich, unter Verwendung des entsprechenden Bandpaßfilters für den lysosomalen Farbstoff, eine punktierte Färbung in der gesamten Zelle. Allerdings ist keine verstärkt perinukleär auftretende Fluoreszenz erkennbar, sondern die stärkste Fluoreszenz tritt in den Zellausläufern auf. Unter Verwendung des Bandpaßfilters für das EGFP wird allerdings deutlich, daß die beiden Signale nicht überlagern. Es ist eine deutliche grüne Fluoreszenz des mDAP-3/EGFP-

Fusionsproteins, neben der etwas gelblich abgeschwächten Fluoreszenz des Lyso-Tracker-RedTM erkennbar (Abbildung 40).

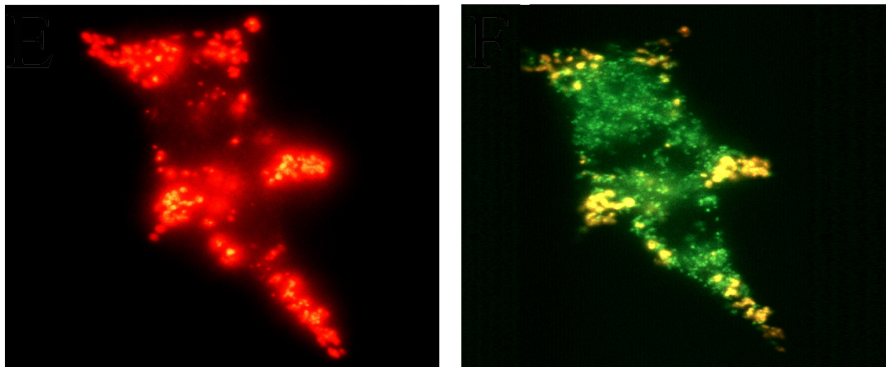


Abbildung 40: Lyso-Tracker-RedTM Färbung in MTCs. Für die linke Abbildung wurde der Bandpaßfilter für den roten Lyso-Tracker-RedTM Farbstoff verwendet, die rechte Abbildung zeigt die gleiche Zelle unter Verwendung des grünen EGFP Bandpaßfilters. Die grüne Fluoreszenz des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteins ist trotz Färbung der Zelle mit dem roten Lyso-Tracker-RedTM sichtbar, es findet also keine Überlagerung der beiden Fluoreszenzen statt.

3.8.5 Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie

Die mitochondriale Lokalisation des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteins konnte mit Hilfe eines Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskops (LSM 410, Zeiss) bestätigt werden. Für diese Analyse wurden MTCs erneut mit dem mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein transfiziert und anschließend, wie schon für die Fluoreszenz-Mikroskopie, mit dem Mito-Tracker-Red CMXRosTM gefärbt. Der Vorteil des Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskops besteht darin, daß zum Einen ganz gezielt eine Ebene innerhalb der Zelle untersucht werden kann. Dabei ist die Dicke dieser Ebene frei wählbar und nur wenige nm groß. Durch diese Technik kann ausgeschlossen werden, daß zwei scheinbar sich überlagernde Fluoreszenz-Signale in Wirklichkeit nur zufällig übereinanderliegen, da sie zu zwei verschiedenen zellulären Strukturen gehören, die sich in unterschiedlichen Ebenen in der dreidimensionalen Zelle befinden. Zum Anderen ist es möglich, zwei Laser mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen gleichzeitig zu verwenden. Es konnte daher ein Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm für die Anregung des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteins verwendet werden. Ein Bandpaßfilter unterhalb von 515 nm verhinderte dabei das Überstrahlen der EGFP-Fluoreszenz in den höheren Wellenlängenbereich. Mit einem zweiten Laser, mit einer Anregungswellenlänge von 543 nm und einem 600 nm Bandpaßfilter, konnte das Fluoreszenz-Signal des Mito Tracker Red CMXRosTM analysiert werden. Die

Steuerungssoftware des Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskop erlaubte dann eine Überlagerung der beiden unabhängig voneinander entstandenen Bilder. In Abbildung 41 ist ein Übersichtsbild einer Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskopaufnahme von mDAP-3/EGFP transfizierten und Mito-Tracker-Red CMXRosTM gefärbten, MTCs gezeigt. Die linke Aufnahme zeigt die Fluoreszenz des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteines, die mittlere Aufnahme, die Fluoreszenz des mit Mito-Tracker-Red CMXRosTM, und das rechte Bild ist aus der Überlagerung der beiden Bilder entstanden. Deutlich zu erkennen ist das gelbe Fluoreszenz-Signal, resultierend aus der Überlagerung der grünen EGFP- und der roten Mito-Tracker-Red CMXRosTM-Fluoreszenz. In der mittleren Abbildung sind deutlich mehr Zellen erkennbar als in der Linken. Dies liegt daran, daß zwar alle Zellen durch den mitochondrialen Farbstoff angefärbt wurden, aber, wie zu erwarten, nicht alle Zellen mit dem mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein transfiziert wurden.

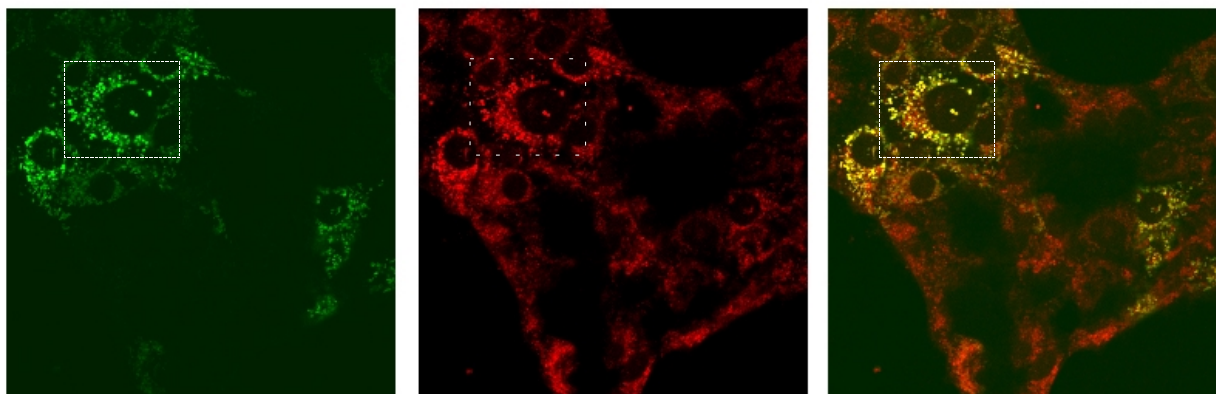


Abbildung 41: Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie von MTCs transfiziert mit mDAP-3/EGFP und gefärbt mit Mito-Tracker-Red CMXRosTM. In der rechten Abbildung ist die gelb erscheinende Überlagerung der beiden Fluoreszenz-Signale und damit eine gemeinsame mitochondriale Lokalisation erkennbar. Für die linke Abbildung wurde ein Laser mit einer Anregungswellenlänge für das grüne EGFP Fluoreszenz Signal verwendet, die mittlere Abbildung zeigt die selben Zellen unter Verwendung eines zweiten Lasers mit der entsprechende Anregungswellenlänge für den roten Mito-Tracker-Red CMXRosTM Farbstoff. Der gestrichelte Kasten markiert den Ausschnitt der in Abbildung 42 vergrößert gezeigt wird.

Eine Ausschnittsvergrößerung von Abbildung 41 ist in Abbildung 42 gezeigt. Wie schon bei den lichtmikroskopischen Abbildungen wird deutlich, daß der mitochondriale Farbstoff einige mitochondriale Strukturen anfärbt, in denen kein mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein nachzuweisen ist (Beispiel, Pfeilspitze). Wichtiger ist jedoch, daß alle Mitochondrien, die mDAP-3/EGFP enthalten und in der linken Abbildung grün erscheinen, in der rechten Abbildung gelb fluoreszieren. Es sind in der rechten Abbildung keine grün fluoreszierenden

Strukturen mehr erkennbar, d.h. das gesamte in der Zelle vorhandene mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein ist in den Mitochondrien lokalisiert.

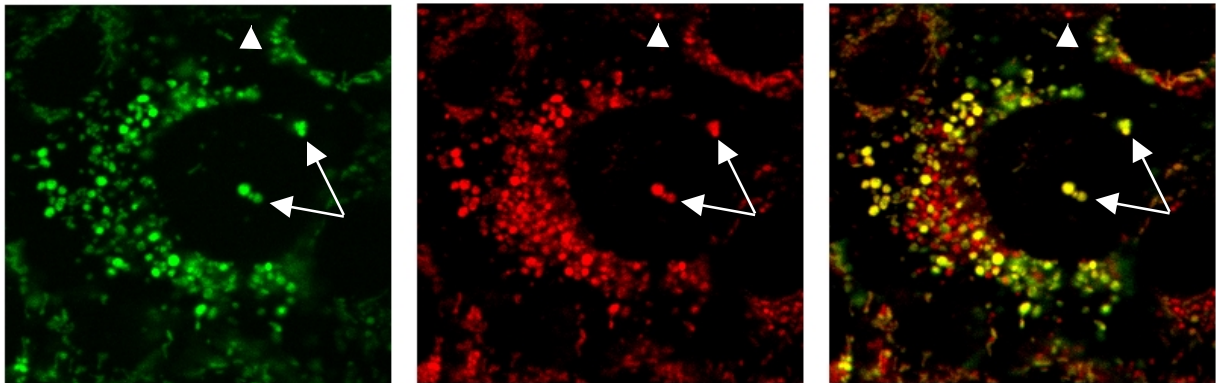


Abbildung 42: Ausschnittsvergrößerung der Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskopie Abbildung von MTCs transfiziert mit mDAP-3/EGFP und gefärbt mit Mito-Tracker-Red CMXRosTM (Abbildung 41). In der rechten Abbildung ist die gelb erscheinende Überlagerung der beiden Fluoreszenz-Signale und damit eine gemeinsame mitochondriale Lokalisation erkennbar. Die beiden Pfeile markieren zwei mitochondriale Strukturen die klar positiv für den mitochondrialen Farbstoff und für das mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein sind und deshalb in der Überlagerung gelb erscheinen. Die Pfeilspitze markiert eine Struktur, die positiv für den mitochondrialen Farbstoff und negativ für das mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein ist und deshalb in der rechten Abbildung weiterhin rot erscheint.

3.8.6 Mitochondriale Lokalisation des endogenen mDAP-3 durch Zellfraktionierung

Die bisherigen Untersuchungen zur Lokalisation von mDAP-3 wurden in Zellen durchgeführt, die mit dem mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein transfiziert worden waren. Dabei wurde nur die Lokalisation des durch transiente Transfektion in die Zelle eingebrachten Proteins untersucht. Die Lokalisation des endogenen mDAP-3 wurde daher mit Hilfe von Zellfraktionierungs Experimenten analysiert. Nach einem etablierten Protokoll wurden Cytosol-, Mitochondrien- und Endoplasmatisches-Reticulum- (ER) Fraktionen aus Rattenleber isoliert und biochemisch auf ihren jeweiligen DAP-3 Gehalt durch Western Blot untersucht. Das spezifische mDAP-3 Signal konnte bei diesen Experimenten nur in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen werden (Abbildung 43 A). Damit konnten die mikroskopischen Daten zur mitochondrialen Lokalisation des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteines für das endogene mDAP-3 bestätigt werden.

Um die mitochondriale Lokalisation von mDAP-3 näher einzugrenzen, wurde zunächst untersucht, ob mDAP-3 an die äußere Mitochondrienmembran bindet, z.B. durch Interaktion

mit mitochondrialen Membranproteinen, selbst aber im Cytosol der Zelle lokalisiert ist. Eine kurze Behandlung der mitochondrialen Fraktion mit Proteasen sollte eine Detektion von mDAP-3 im Western Blot verhindern. Die proteolytische Behandlung der mitochondrialen Fraktion mit zwei unterschiedlichen Proteinase K Konzentrationen zeigte aber keine Reduktion der mDAP-3 Signalintensität im Vergleich zur schein behandelten Kontrolle (Abbildung 43 B). mDAP-3 wurde also durch die mitochondriale(n) Membran(en) vor einem Proteinase K Verdau geschützt und ist deshalb intra-mitochondrial lokalisiert .

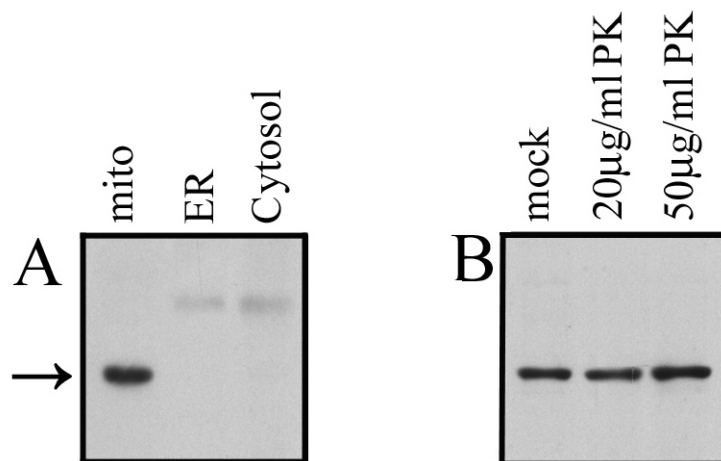


Abbildung 43: Zellfraktionierung homogenisierter Rattenleber. **A:** Western Blot der verschiedenen subzellulären Kompartimente: Mitochondria (mito), Endoplasmatisches Reticulum (ER) und Cytosol (Cytosol). Das spezifische mDAP-3 Signal ist nur in der mitochondrialen Fraktion nachweisbar (Pfeil). **B:** Western Blot nach Proteinase K (PK) Verdau der mitochondrialen Fraktion. Aliquots der mitochondrialen Fraktion wurden entweder schein behandelt (mock), oder mit 20 µg bzw. 50 µg Proteinase K behandelt. Die Intensität der mDAP-3 Bande verändert sich nicht, gleichbedeutend mit einer intra-mitochondrialen Lokalisation von mDAP-3.

Die Effizienz der gezeigten Zellfraktionierung wurde durch Messung der Aktivität Kompartiment spezifischer Enzyme kontrolliert. Für die Cytosol-Fraktion wurde die Lactat-Dehydrogenase- und für die Mitochondrien-Fraktion die Malat-Dehydrogenase-Aktivität gemessen. Abbildung 44 zeigt, daß eine effiziente Zellfraktionierung ohne Kontamination der Fraktionen untereinander durchgeführt worden war. Die mitochondriale Lokalisation von mDAP-3 konnte durch diese Kontrollen bestätigt werden.

Die intra-mitochondriale Lokalisation von mDAP-3 wurde mit Hilfe einer Digitonin-Behandlung isolierter Mitochondrien näher untersucht. Durch diese Behandlung strömt, digitoninkonzentrationsabhängig, Wasser bzw. Puffer in den Matrixraum der Mitochondrien und erweitert diesen stark. Während es die Cristae der mitochondrialen Innenmembran dieser erlauben, sich zu entfalten und so der Ausdehnung zunächst nachzugeben, reißt die

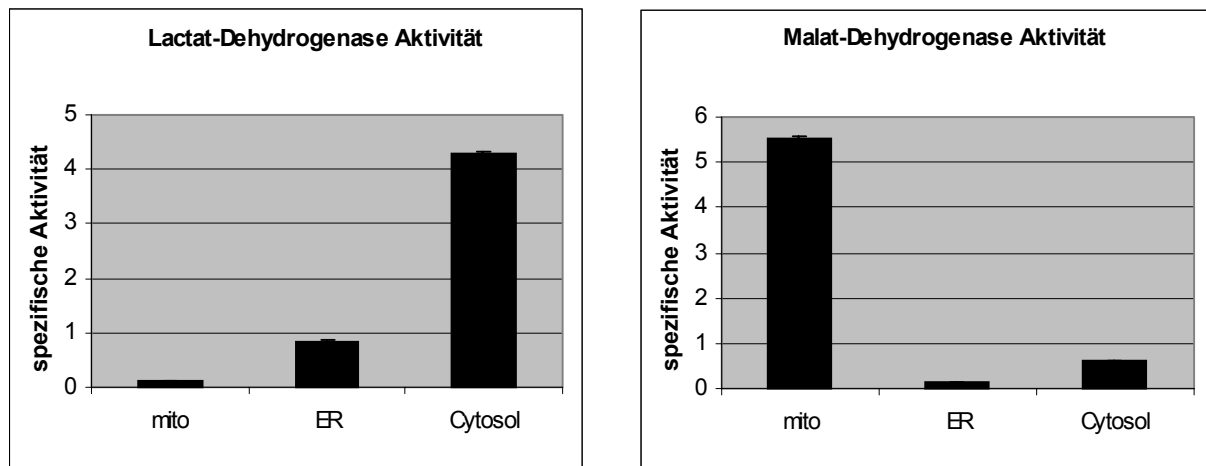


Abbildung 44: Aktivität Kompartiment spezifischer Enzyme zur Kontrolle der Zellfraktionierung homogenisierter Rattenleber. Für die Cytosol-Fraktion wurde die Lactat-Dehydrogenase- und für die Mitochondrien-Fraktion die Malat-Dehydrogenase-Aktivität gemessen. Die Enzyme zeigen in den für sie spezifischen Fraktionen eine deutlich erhöhte spezifische Aktivität und bestätigen damit die Zellfraktionierung.

mitochondriale Außenmembran – die ja keine Falten hat – schneller und die löslichen Proteine des Intermembranraumes gelangen in den Überstand. Bei steigender Digitonin-Konzentration reißt dann auch die Innenmembran und lösliche Proteine der mitochondrialen Matrix gelangen ebenfalls in den Überstand. Als Kontrollen für diese Fraktionierung gereinigter Mitochondrien wurden Proteine spezifisch für die verschiedenen Mitochondrien-Kompartimente verwendet. Cytochrom c diente als Marker für lösliche Proteine aus dem Intermembranraum. Das Hitzeschock-Protein 60 (HSP60) diente als Kontrolle für lösliche Proteine aus der mitochondrialen Matrix und der ADP/ATP Translokator (AAC) wurde als Marker für integrale Membranproteine der mitochondrialen Innenmembran verwendet. Wie in Abbildung 45 A zu erkennen, wurde mDAP-3 erst bei relativ hohen Digitonin-Konzentrationen aus den Mitochondrien in den Überstand freigesetzt (0,3 %, Spur 8). Das mitochondriale Matrixprotein HSP60 (0,2% Spur 7) und das integrale Membranprotein der mitochondrialen Innenmembran AAC (0,3% Spur 8) verhielten sich bei diesem Experiment ähnlich wie mDAP-3 und waren ebenfalls erst bei den beiden höchsten Digitonin-Konzentrationen deutlich im Überstand detektierbar. Im Gegensatz dazu konnte Cytochrom c als lösliches Protein des mitochondrialen Intermembranraumes bereits bei der niedrigsten Digitonin-Konzentration von nur 0,075% (Spur 2) im Überstand nachgewiesen werden. Diese Daten deuten auf eine Lokalisation von mDAP-3 in der mitochondrialen Matrix, ähnlich wie HSP60, oder in der mitochondrialen Innenmembran, ähnlich wie AAC, hin.

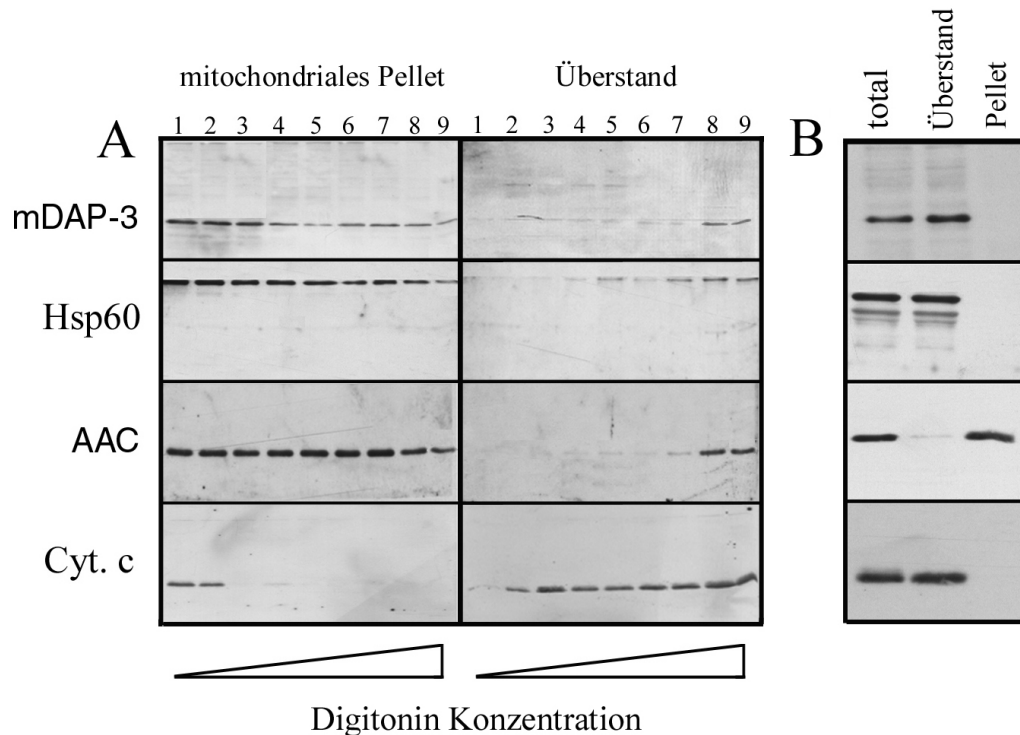


Abbildung 45: Digitonin- und Karbonat-Behandlung isolierter Mitochondrien. **A:** Western Blot des mitochondrialen Pellets und des Überstandes nach Digitonin-Behandlung isolierter Mitochondrien. Jede Spur (1 bis 9) entspricht der Inkubation mit einer unterschiedlichen Digitonin Konzentration, von 0 % (Spur 1) über 0,075 %, 0,1 %, 0,125 %, 0,137 %, 0,15 %, 0,2 %, 0,3 %, bis 0,4 % (Spur 9). Nach der Inkubation wurden die Mitochondrien pelletiert und der Überstand und die Mitochondrien wurden durch Western Blot auf ihren Gehalt an mDAP-3, Hitzeschock Protein 60 (HSP60), ADP/ATP Translokator (AAC) und Cytochrom c (Cyt c) analysiert. **B:** Isolierte Mitochondrien wurden für 30 min mit 0,1 M Na_2CO_3 behandelt und in zwei gleiche Volumina aufgeteilt. Ein Volumen wurde direkt mit TCA gefällt und repräsentiert die Gesamtproteinmenge (total). Das zweite Volumen wurde durch Zentrifugation in Pellet und Überstand aufgeteilt. Das Pellet enthält die integralen Membranproteine und der Überstand die löslichen und Membran assoziierten Proteine. Die drei Fraktionen wurden für die gleichen Proteine wie in A analysiert. mDAP-3 konnte, genau wie HSP60 und Cytochrom c, im Überstand nachgewiesen werden, AAC befand sich, als integrales Membranprotein, im Pellet.

Die Analyse der Aminosäuresequenz von mDAP-3 hatte keine Hinweise auf eine Membrandomäne ergeben. Durch eine Karbonat-Behandlung isolierter Mitochondrien konnte bestätigt werden, daß mDAP-3 ein lösliches Protein und kein integrales Membranprotein ist. mDAP-3 verhielt sich bei diesem Experiment wie die beiden anderen untersuchten löslichen Proteine Cytochrom c und HSP60, nicht jedoch wie das integrale Membranprotein AAC (Abbildung 45 B).

Zusammenfassend deuten diese Daten auf eine Lokalisation von mDAP-3 in der mitochondrialen Matrix hin. Eine Lokalisation im mitochondrialen Intermembranraum mit einer gleichzeitigen Interaktion mit integralen Membranproteinen der mitochondrialen Innenmembran läßt sich allerdings nach den gezeigten Ergebnissen nicht ausschließen.

Um zwischen einer möglichen Lokalisation von mDAP-3 in der mitochondrialen Matrix und dem mitochondrialen Intermembranraum zu unterscheiden, wurden isolierte Mitochondrien mit Ultraschall behandelt. Durch dieses Experiment kann die Interaktion von löslichen Proteinen mit Membranproteinen analysiert werden. mDAP-3 war nach der Ultraschallbehandlung isolierter Mitochondrien zu gleichen Teilen im Überstand und im Pellet nachweisbar. Ganz im Gegensatz zu Cytochrom c, das nur im Überstand nachweisbar war. AAC als integrales Membranprotein war, wie zu erwarten, nur im Pellet detektierbar (Abbildung 46). Dieses Ergebnis ist vereinbar mit einer Bindung der einen Hälfte von mDAP-3, zum untersuchten Zeitpunkt, an ein oder mehrere andere Proteine, während die andere Hälfte nicht mit anderen Proteinen interagiert.

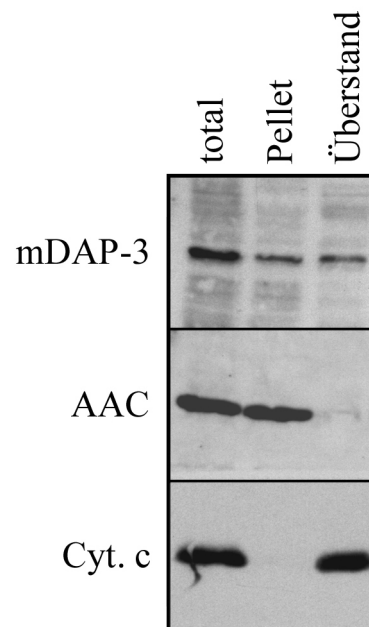


Abbildung 46: Ultraschall-Behandlung isolierter Mitochondrien. Die behandelten Mitochondrien wurden in zwei gleiche Volumina aufgeteilt. Ein Volumen wurde direkt mit TCA gefällt und repräsentiert die Gesamtproteinmenge. Das zweite Volumen wurde durch Zentrifugation in Pellet und Überstand aufgeteilt. Das Pellet enthält integrale Membranproteine und Membran assoziierte Proteine und der Überstand die löslichen Proteine. Die drei Fraktionen wurden durch Western Blot auf ihren Gehalt an mDAP-3, ADP/ATP Translokator (AAC) und Cytochrom c (Cyt c) analysiert.

Zusammenfassend läßt sich hieraus für die Lokalisation von mDAP-3 schlußfolgern, daß mDAP-3 ein lösliches Protein der mitochondrialen Matrix ist. Ein großer Teil der vorhandenen mDAP-3 Proteine interagiert dabei mit anderen bisher unbekannt Proteinen. Eine Lokalisation im mitochondrialen Intermembranraum läßt sich nun ausschließen, da sonst bereits bei niedrigen Digitonin-Konzentrationen, zumindest die eine nicht gebunden

vorliegende Hälfte der mDAP-3 Proteine frühzeitig im Überstand hätte nachweisbar sein müssen.

Alle bisherigen Zellfraktionierungsexperimente wurden aus technischen Gründen an Rattenleber-Material durchgeführt. Da die Ähnlichkeit innerhalb der Nagetiere zwar relativ groß ist, mDAP-3 aber ein Maus-Protein ist, wurde zusätzlich eine Zellfraktionierung aus Mäuseleber durchgeführt. Es wurde eine Mitochondrien reiche-Fraktion und eine Fraktion mit den restlichen Zellbestandteilen hergestellt und auf den jeweiligen mDAP-3 Gehalt hin untersucht. Wie in Abbildung 47 zu sehen, konnten die bisherigen Ergebnisse bestätigt werden. Auch hier lokalisierte mDAP-3 ausschließlich mitochondrial.

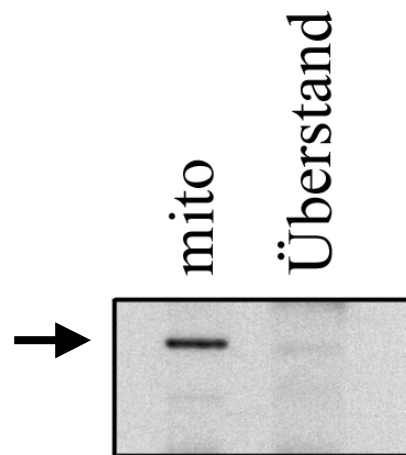


Abbildung 47: Mäuseleber Zellfraktionierung. Western Blot der mitochondrienreichen Fraktion (mito), und der übrigen Zellbestandteile (Überstand). Das spezifische mDAP-3 Signal ist nur in der mitochondrialen Fraktion nachweisbar (Pfeil).

3.8.7 DAP-3 bleibt bei Apoptose mitochondrial lokalisiert

Viele bereits bekannte pro-apoptotische Proteine, wie z.B. Cytochrom c oder der Apoptose induzierende Faktor (AIF), werden bei Apoptoseinduktion aus den Mitochondrien in das Cytosol freigesetzt. Cytochrom c bindet dann im Cytosol an Apaf-1, wodurch die Procaspase-9 in ihre aktivierte Form umgewandelt werden kann. AIF transloziert nach Apoptoseinduktion aus den Mitochondrien in den Nukleus der Zelle. Daher erschien es interessant herauszufinden, ob sich die Lokalisation von DAP-3 innerhalb der Zelle nach einem apoptotischen Stimulus ebenfalls verändert. Dazu wurden die Fraktionen des gleichen Experimentes, mit dem bereits die Cytochrom c Freisetzung durch eine transiente mDAP-3 Überexpression gezeigt wurde (Abbildung 35), auf ihren mDAP-3 Gehalt untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß mDAP-3 auch bei Apoptosestimulation durch transiente mDAP-3

Überexpression, immerhin 25 % apoptotische Zellen (Abbildung 34), innerhalb der Mitochondrien verbleibt (Abbildung 48). Im Gegensatz zu Cytochrom c, das bei mDAP-3 Überexpression, nicht aber bei Δ P-Loop mDAP-3 Überexpression, aus den Mitochondrien in das Cytosol freigesetzt wurde.

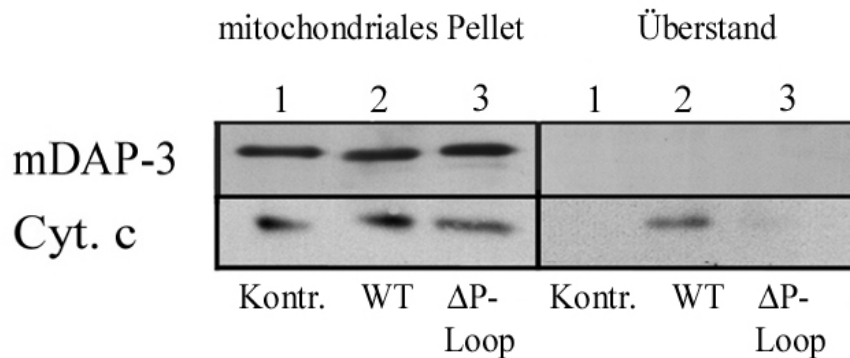


Abbildung 48: Western Blot der mitochondrialen und cytosolischen Fraktion von MTCs. Die Zellen wurden durch transiente Transfektion der angegebenen Konstrukte stimuliert. Die Apoptoserate der einzelnen Stimulationen entspricht Abbildung 34. Es wurden 40 μ g Zellysat pro Spur verwendet und mit dem anti-hDAP-3 und dem anti-Cytochrom c Antikörper analysiert. Die Spuren enthalten **1:** (Kontr.) MTCs transfiziert mit dem Kontrollvektor; **2:** (WT) MTCs transfiziert mit dem mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein; **3:** (Δ P-Loop) MTCs transfiziert mit dem P-Loop mutierten mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein. Eine Freisetzung von mDAP-3 aus den Mitochondrien kann auch nach Apoptoseinduktion von 25 % der Zellen (Überstand, Spur 2) nicht detektiert werden. (Zur Verdeutlichung ist noch einmal Abbildung 35, diesmal zusammen mit dem mDAP-3 Blot, gezeigt.)

Für das humane DAP-3 war in der Literatur eine Beteiligung an der Fas vermittelten Apoptose beschrieben worden. Deshalb wurde in einem weiteren Experiment untersucht, ob hDAP-3, bei Fas vermittelter Apoptoseinduktion in humanen T-Zellen (Jurkat-Zellen), ebenfalls mitochondrial verbleibt. Dazu wurde, wie bereits ausführlich in Abschnitt 3.4 beschrieben, Apoptose in Jurkat-Zellen durch eine 3- bzw. 5-stündige Stimulation mit einem agonistischen Fas-Antikörper induziert und anschließend eine Zellfraktionierung durchgeführt. Die Apoptoseinduktion wurde mit einer PI-Färbung im FACScan kontrolliert und betrug 45 % nach 3 h und 54 % nach 5 h (Abbildung 49 B). Die Zellfraktionen wurden durch Western Blot Analyse auf den Gehalt an hDAP-3 untersucht. Cytochrom c diente als positive Kontrolle für Proteine, die bei Apoptose aus den Mitochondrien ins Cytosol freigesetzt werden. Als negative Kontrolle für mitochondrial verbleibende Proteine wurden HSP60 und AAC verwendet. In der cytosolischen Fraktion der mit Fas-Antikörper stimulierten Jurkat-Zellen, ist weder bei 45 % noch bei 54 % apoptotischer Zellen, das hDAP-3 nachweisbar. HSP60 und AAC verbleiben ebenfalls in den Mitochondrien. Im Gegensatz

dazu kann auch durch diese Form der Apoptosestimulation eine Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytosol gezeigt werden (Abbildung 49 A). Dieses Experiment bestätigte den bereits für das murine DAP-3 gezeigten Verbleib von DAP-3 in den Mitochondrien während der Anfangsstadien der Apoptose.

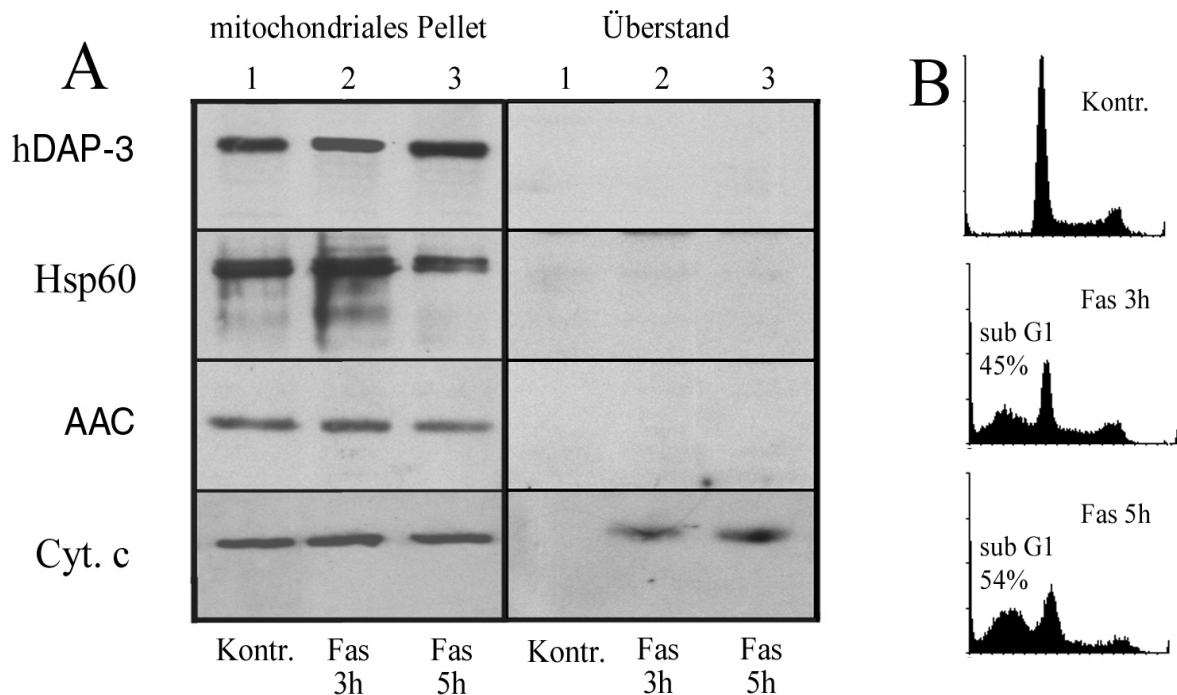


Abbildung 49: hDAP-3 verbleibt während der Fas vermittelten Apoptose in den Mitochondrien.

A: Western Blot der mitochondrialen und cytosolischen Fraktion von Jurkat-Zellen. Die Fraktionen wurden mit den entsprechenden Antikörper gegen die angegebenen Proteine analysiert. Nur Cytochrom c wird bei Apoptoseinduktion aus den Mitochondrien in das Cytosol freigesetzt (Cyt c: Überstand, Spur 2, 3). **B:** Die Zellen wurden durch einen agonistischen Fas-Antikörper stimuliert und die Apoptoserate wurde mit einer PI-Färbung im FACScan kontrolliert. Sie betrug 45 % nach 3 h und 54 % nach 5 h.

Schlußfolgernd läßt sich sagen, daß DAP-3 sowohl in murinen als auch in humanen Zellen bei Apoptoseinduktion nicht in das Cytosol freigesetzt wird und damit als ein Protein der mitochondrialen Matrix seine pro-apoptotische Funktion innerhalb der Mitochondrien ausübt.

3.8.8 Eine konservierte N-terminale Sequenz ist verantwortlich für die mitochondriale Lokalisation von mDAP-3

Da das P-Loop ATP/GTP Bindungsmotiv das einzige funktionelle Motiv war, das mit Computerprogrammen, wie z.B. MOTIF, in der mDAP-3 Sequenz gefunden werden konnte, mußte eine weitere Analyse der Funktion und der Lokalisation von mDAP-3 durch eine

experimentelle Sektion des mDAP-3 Proteins erfolgen. Um die verschiedenen Regionen von mDAP-3 näher zu untersuchen wurden daher zwei Gruppen von N- und C-terminalen Deletionsmutanten hergestellt. Die eine Gruppe wurde aus der Wildtyp mDAP-3 cDNA und die andere aus der P-Loop mutierten mDAP-3 cDNA, jeweils als EGFP-Fusionsproteine, hergestellt. Die verschiedenen Deletionsmutanten sind in Abbildung 50 gezeigt.

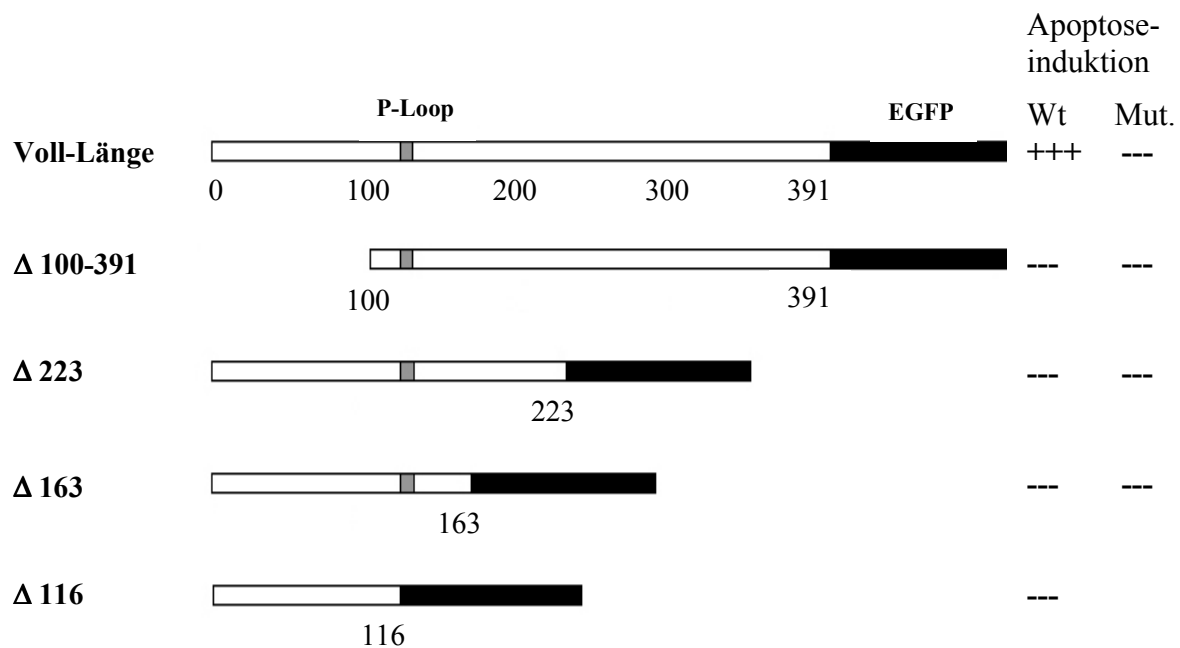


Abbildung 50: mDAP-3 Deletionsmutanten. Schematische Darstellung der verschiedenen Deletionsmutanten, die in dem mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein gemacht wurden. Der P-Loop ist durch die graue und das EGFP durch die schwarze Box gekennzeichnet. Die Apoptoseinduktion wurde für alle Mutanten durch Überexpression in MTCs untersucht (vergl. 3.7.2). (Wt: Wildtyp mDAP-3; Mut.: P-Loop mutiertes mDAP-3; +++ = induziert Apoptose, --- = induziert keine Apoptose).

Die Sequenz der einzelnen Konstrukte wurde überprüft, und alle Mutanten wurden zunächst auf ihre jeweilige Expression nach transienter Transfektion in MTCs untersucht. Abbildung 51 zeigt eine Expression der verschiedenen Deletionsmutanten, die den erwarteten Größen der Proteine entspricht.

Durch transiente Transfektion der Deletionsmutanten wurde dann ihre Apoptoseinduktionsfähigkeit untersucht. Diese Experimente wurden wie bereits für das Volllänge mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein beschrieben (3.7.2) durchgeführt, und zeigten keine Apoptoseinduktion durch die Deletionsmutanten (Abbildung 50). Dieser Verlust der Apoptoseinduktion war unabhängig von der Funktionalität des P-Loops. Für die proapoptische Funktion von mDAP-3 ist also das Volllänge Protein notwendig. Bereits eine

Deletion von 100 Aminosäuren am N-Terminus oder 168 Aminosäuren am C-Terminus des Proteins führt zu einem vollständigen Verlust der pro-apoptotischen Funktion von mDAP-3.

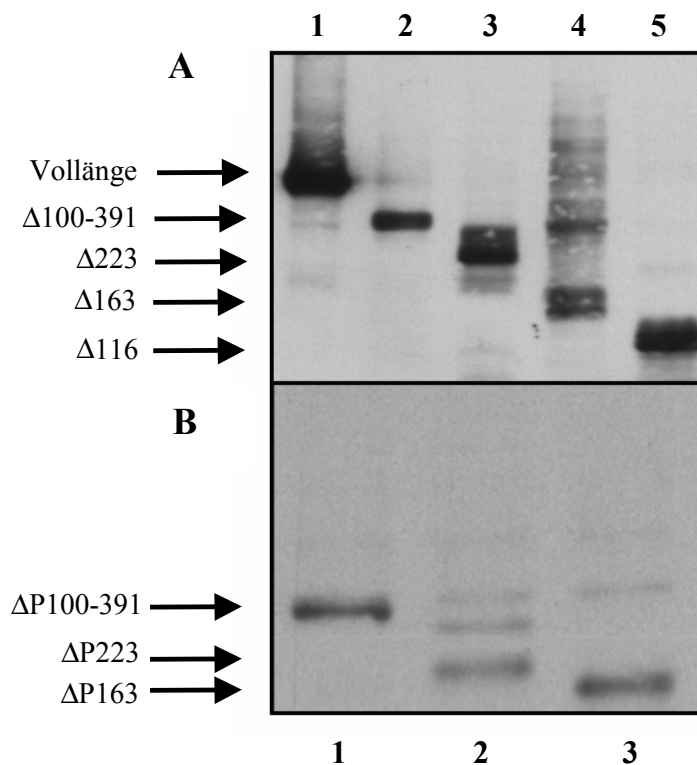


Abbildung 51: Western Blot der mDAP-3 Deletionsmutanten. **A:** Gruppe der Deletionsmutanten die aus der Wildtyp mDAP-3 cDNA hergestellt wurden. **B:** Gruppe der Deletionsmutanten die aus der P-Loop mutierten mDAP-3 cDNA hergestellt wurden. Die Konstrukte wurden als EGFP Fusionsproteine erstellt. Daher wurde der Western Blot mit einem anti-EGFP-Antikörper inkubiert.

Interessant erschien nun zu untersuchen, ob der Verlust der pro-apoptotischen Funktion der mDAP-3 Deletionsmutanten mit einer veränderten Lokalisation einhergeht. Die verschiedenen Deletionsmutanten wurden daher im Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Das Fluoreszenz-Signal der Deletionsmutanten unterscheidet sich jedoch nicht von dem des Volllänge mDAP-3/EGFP. In allen Mutanten ist ein punktiertes Signal erkennbar, daß weiterhin auf eine mitochondriale Lokalisation schließen läßt. In Abbildung 52 sind als Beispiele einige fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der $\Delta 223$, $\Delta 163$ und $\Delta 116$ Mutanten gezeigt. Es ist kein Unterschied zu dem Fluoreszenz-Signal des mDAP-3/EGFP Volllänge Proteins (vergl. Abbildung 36) erkennbar.

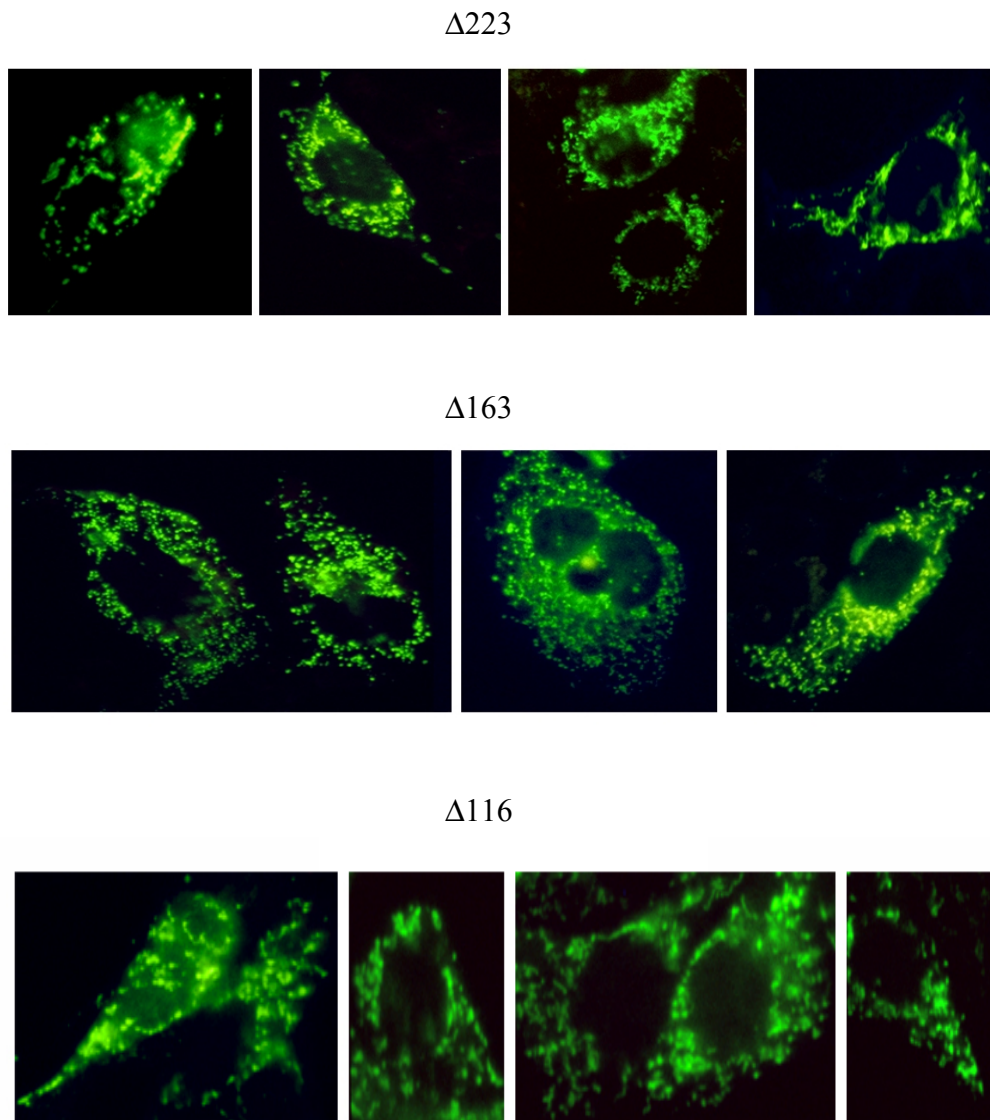


Abbildung 52: Lokalisation der mDAP-3/EGFP Deletionsmutanten. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MTCs, transfiziert mit der $\Delta 223$, der $\Delta 163$ oder der $\Delta 116$ Mutante zeigen ein punktiertes Fluoreszenz-Signal, das sich nicht von dem des Volllänge mDAP-3/EGFP unterscheidet (vergl. Abbildung 36).

Die mitochondriale Lokalisation der verschiedenen mDAP-3/EGFP Deletionsmutanten konnte durch eine zusätzliche Färbung der mit den Deletionsmutanten transfizierten Zellen mit Mito-Tracker-Red CMXRosTM bestätigt werden. Für die Lokalisation war die Funktionalität des P-Loops dabei unerheblich. Deletionsmutanten, die aus der P-Loop mutierten mDAP-3 cDNA konstruiert worden waren, zeigten das gleiche Fluoreszenz Muster und damit die gleiche Lokalisation wie die Mutanten mit einem funktionellen P-Loop (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 53 sind als Beispiele die Aufnahmen der $\Delta 163$ und $\Delta 116$ Mutanten gezeigt. Die Transfektion von MTCs mit diesen beiden Deletionsmutanten und eine anschließende Mito-Tracker-Red CMXRosTM Färbung zeigt eine eindeutige Überlagerung der beiden Fluoreszenzen.

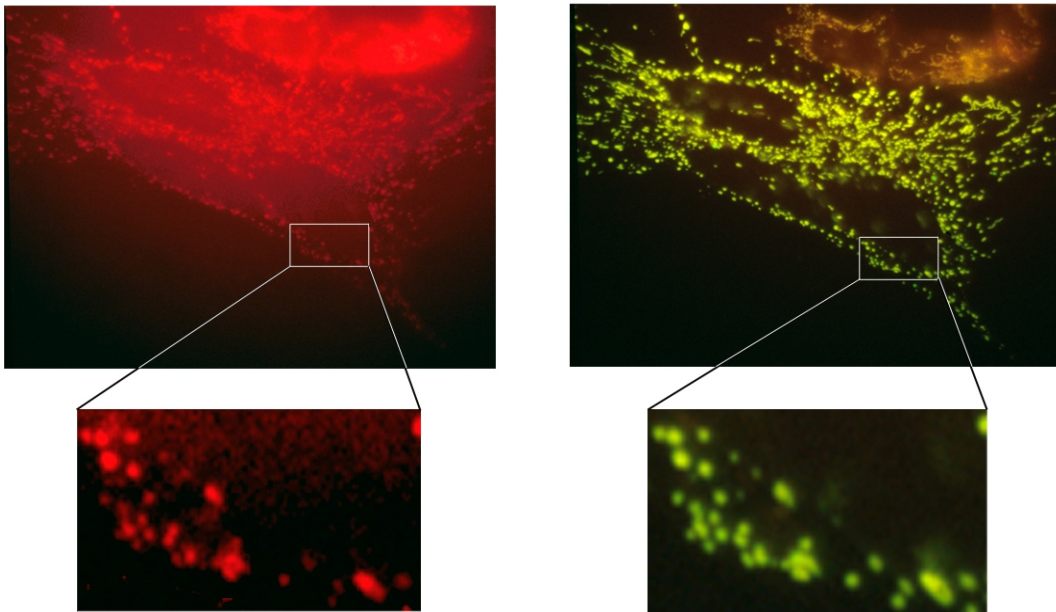
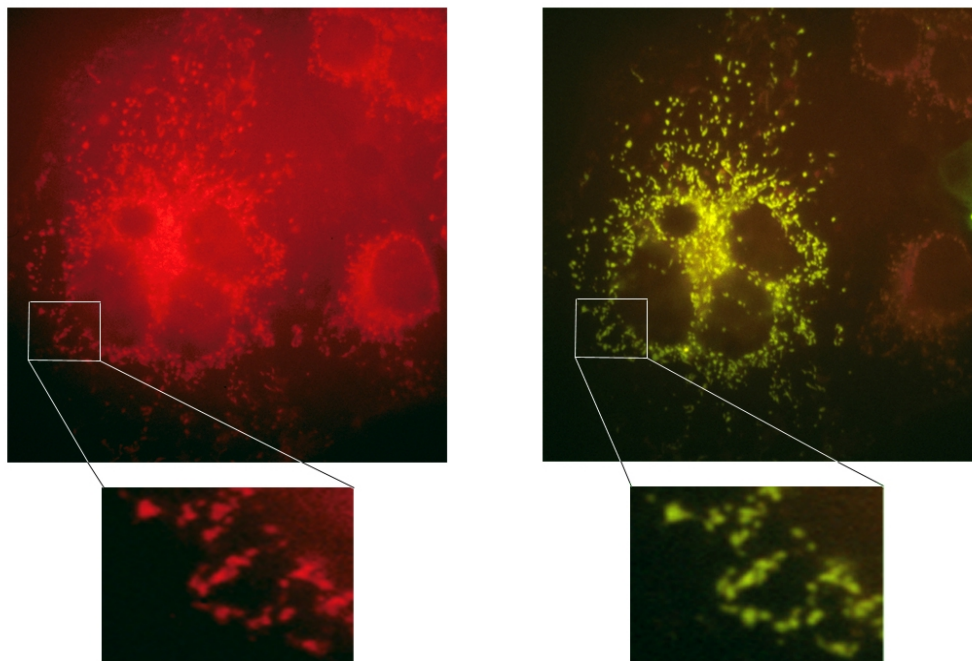
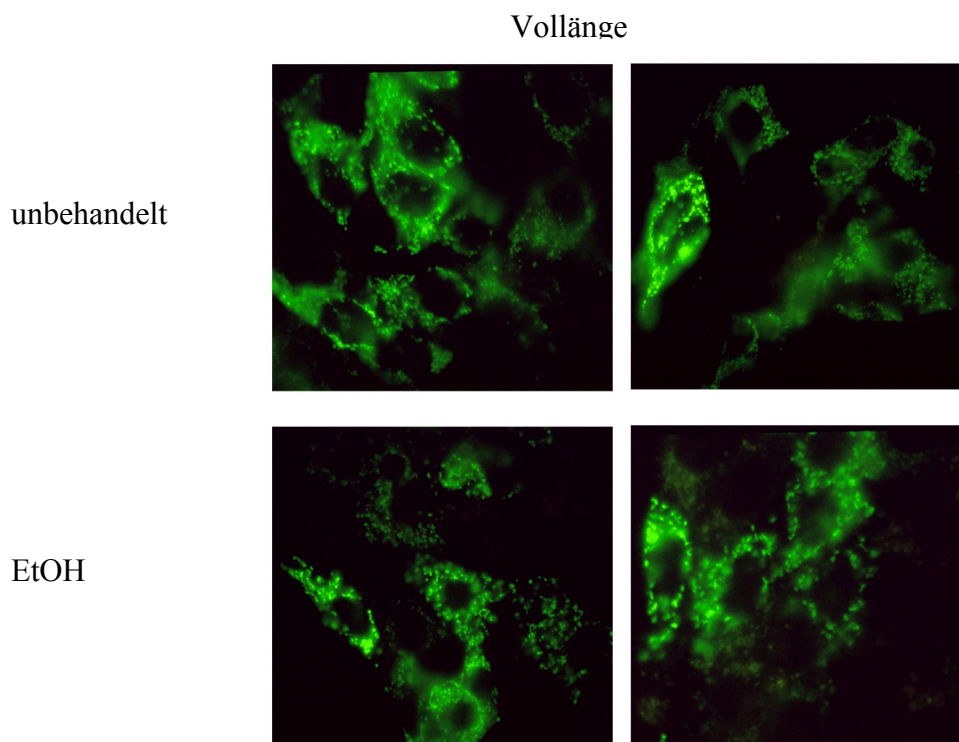
$\Delta 163$  $\Delta 116$ 

Abbildung 53: Lokalisation der mDAP-3/EGFP Deletionsmutanten. Übereinstimmende Lokalisation der $\Delta 163$ und der $\Delta 116$ mDAP-3/EGFP Mutante und der mitochondrialen Mito-Tracker-Red CMXRosTM Färbung in MTCs. Für die linke Abbildung wurde der Bandpaßfilter für den roten Mito-Tracker-Red CMXRosTM Farbstoff verwendet, die rechte Abbildung zeigt die gleichen Zellen unter Verwendung des grünen EGFP Bandpaßfilters. In der Ausschnittsvergrößerung erkennt man eine Anfärbung identischer Strukturen.

Die Ausschnittsvergrößerungen lassen dabei deutlich erkennen, daß, genau wie bei dem Volllänge mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein, auch hier identische Strukturen in der Zelle angefärbt wurden.

Die Lokalisation der mDAP-3/EGFP Deletionsmutanten unterscheidet sich also wahrscheinlich nicht von der des Wildtyp mDAP-3. Der Verlust der pro-apoptotischen Funktion der mDAP-3/EGFP Deletionsmutanten hängt daher vermutlich mit dem Verlust der dreidimensionalen Struktur und/oder der Unfähigkeit, mit anderen Proteinen interagieren zu können, zusammen. Eine andere eher unwahrscheinliche Erklärung für den Funktionsverlust der Deletionsmutanten wäre ein unvollständiger Import in die Mitochondrien.

Die Ultraschallbehandlung isolierter Mitochondrien hatte bereits einen Hinweis darauf gegeben, daß mDAP-3 in großem Maße mit anderen Proteinen interagiert (vergl. 3.8.6). Bei den Analysen der mDAP-3/EGFP Deletionsmutanten fiel auf, daß diese Proteine bei einer Permeabilisierung der Zellen durch Ethanol, wie sie für die PI-Färbung zur Analyse der Apoptoserate notwendig ist, sehr stark aus den Zellen entwichen. Das Volllänge mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein bleibt bei dieser Art der Zellfixierung jedoch zum allergrößten Teil in den Zellen. Dieser Unterschied ist in Abbildung 54 gezeigt. Da es sich bei der Beobachtung des Rückganges der Fluoreszenz um eine negative Aussage handelt, ist es schwierig, diese als eine mikroskopische Abbildung darzustellen. Trotzdem läßt sich erkennen, daß die Intensität der Fluoreszenz in Zellen, die mit einer der mDAP-3/EGFP Deletionsmutanten transfiziert wurden, in Vergleich zum Volllänge mDAP-3/EGFP, deutlich zurückgeht.



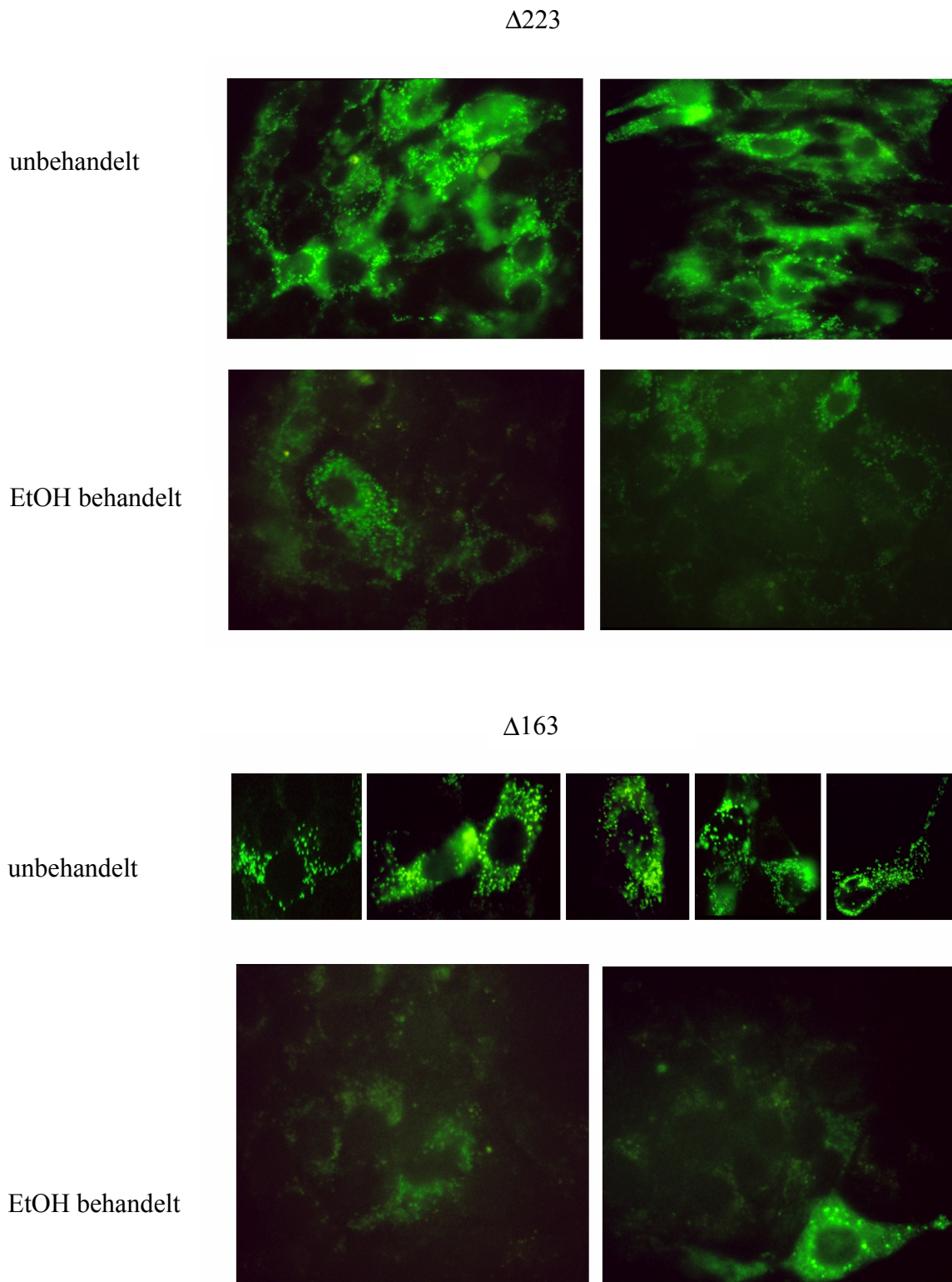


Abbildung 54: Ethanol-Permeabilisierung von MTCs transfiziert mit dem Volllänge mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein oder mit der $\Delta 223$ oder der $\Delta 163$ mDAP-3/EGFP Deletionsmutante. Nur das Volllänge mDAP-3/EGFP zeigt keinen Rückgang der Fluoreszenzintensität nach Ethanol Behandlung. Bei den beiden Deletionsmutanten ist eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität erkennbar. Nur noch einige wenige Zellen zeigen eine intensive Fluoreszenz, in den meisten Zellen ist nur noch ein sehr schwaches verschwommenes Signal nach der Ethanol Behandlung erkennbar.

In den Aufnahmen der mit den Deletionsmutanten transfizierten und dann mit Ethanol behandelten Zellen sind nur noch vereinzelt intensiv fluoreszierende Zellen erkennbar. Die meisten Zellen zeigen eine sehr schwache und verschwommene grüne Fluoreszenz, und das gepunktete mitochondriale Fluoreszenz Muster ist nur noch andeutungsweise erkennbar. Aus diesen Zellen ist also der größte Teil der vorher vorhanden gewesenen mutierten mDAP-3/EGFP-Proteins durch die Ethanol-Permeabilisierung entwichen.

Die FACScan-Analyse erlaubt die Quantifizierung einer spezifischen Fluoreszenzintensität und ist damit hervorragend geeignet, diese Besonderheit der mDAP-3/EGFP Deletionsmutanten zu analysieren. Dazu wurden MTCs mit den in Abbildung 50 schematisch gezeigten mDAP-3/EGFP Deletionsmutanten transient transfiziert und anschließend für 48 h unter Standard-Zellkulturbedingungen kultiviert. Nach einer Permeabilisierung mit 50 % Ethanol für 30 min bei RT wurde die EGFP Fluoreszenzintensität der Zellen im FACScan analysiert. In Abbildung 55 sind die Ergebnisse aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen gezeigt.

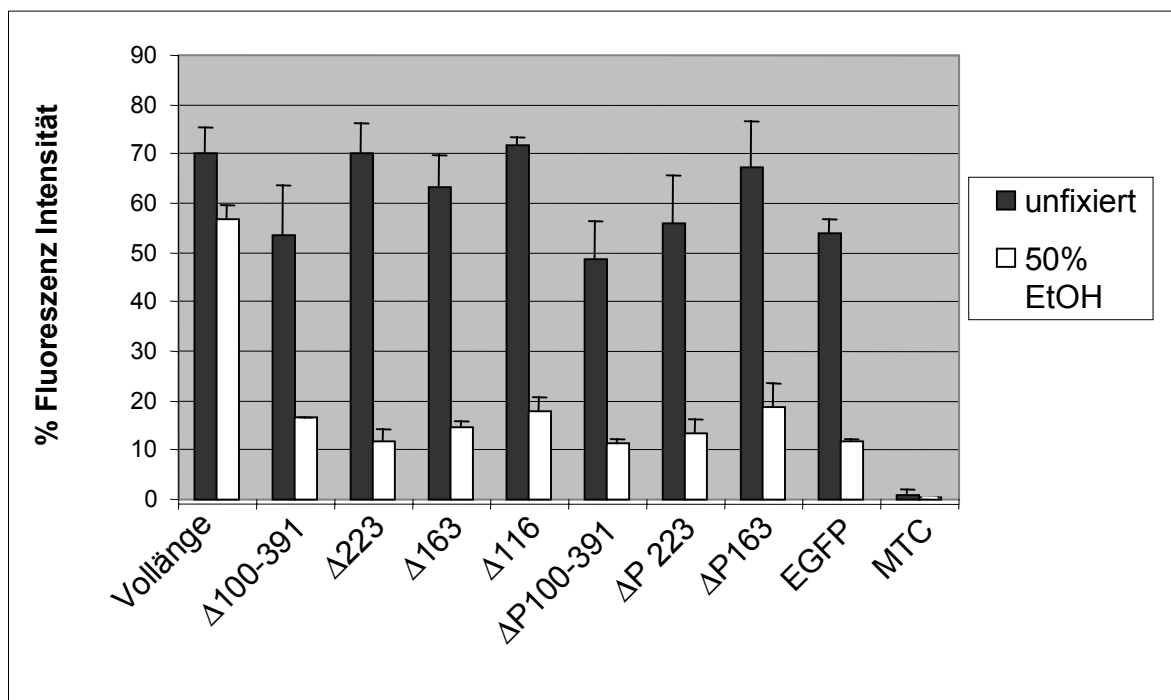


Abbildung 55: Rückgang der Fluoreszenzintensität nach Ethanol Permeabilisierung von MTCs transfiziert mit den mDAP-3/EGFP Deletionsmutanten. Nur das Volllänge mDAP-3/EGFP zeigt keinen bzw. nur einen sehr geringen Rückgang der Fluoreszenzintensität. Bei allen untersuchten Deletionsmutanten ist eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität auf ca. ein Fünftel bis ein Siebtel der Intensität vor der Ethanol Permeabilisierung erkennbar. Das im Cytosol lokalisierte EGFP zeigt einen zu den Deletionsmutanten vergleichbaren Rückgang der Fluoreszenzintensität. Die Eigenfluoreszenz der MTCs liegt deutlich niedriger als alle gemessenen Werte und ist als Kontrolle in der letzten Spalte gezeigt.

Nur das Volllänge mDAP-3/EGFP zeigt keinen bzw. nur einen sehr geringen Rückgang der Fluoreszenzintensität. Bei allen untersuchten Deletionsmutanten ist eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität auf ca. ein Fünftel bis ein Siebtel der Intensität vor der Ethanol Permeabilisierung erkennbar. Bemerkenswert ist, daß die P-Loop mutierte Variante des mDAP-3/EGFP Volllänge Proteines ebenfalls aus den Zellen entweicht. Das im Cytosol lokalisierte EGFP zeigt einen zu den Deletionsmutanten vergleichbaren Rückgang der Fluoreszenzintensität. Diese ungewöhnliche Beobachtung des Rückganges der Fluoreszenzintensität der verschiedenen mDAP-3/EGFP Deletionsmutanten nach einer Ethanol Permeabilisierung der Zellen könnte den Verlust der pro-apoptotischen Funktion der Deletionsmutanten und der P-Loop mutierten Variante des mDAP-3/EGFP erklären. Denn offensichtlich ist das Wildtyp-Volllänge mDAP-3 Protein notwendig, um mit anderen Proteinen in Wechselwirkung zu treten und funktionell aktiv zu sein. Wurde jedoch entweder der P-Loop mutiert, oder eine Deletion von 100 Aminosäuren am N-Terminus oder von 168 oder mehr Aminosäuren am C-Terminus des Proteins durchgeführt, so war das entstandene Protein nicht mehr in der Lage, mit seinen molekularen Partner zu interagieren und konnte nach einer Permeabilisierung der Zellmembran, einschließlich der mitochondrialen Membranen mit Ethanol, aus der Zelle entweichen. Das Volllänge mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein hingegen bindet an seine molekularen Partner und bildet dabei wahrscheinlich einen genügend großen Komplex, um durch die Ethanol Behandlung nicht aus den Mitochondrien und der Zelle herausgespült zu werden. Der trotzdem vorhandene geringe Rückgang der Fluoreszenzintensität des Volllänge mDAP-3/EGFP wäre dadurch zu erklären, daß nicht 100 % der in der Zelle vorhandenen mDAP-3/EGFP Moleküle ständig in gebundener Form vorliegen, sondern, wie auch schon durch die Ultraschallbehandlung isolierter Mitochondrien (vergl. Abbildung 46) gezeigt, nur ein Teil zum Zeitpunkt der Untersuchung gerade an seinen molekularen Partner bindet.

3.9 Charakterisierung des Hefe mDAP-3 Homologs

Da die DAP-3 Proteinfamilie unter Eukaryonten stark konserviert ist und auch Homologe in Organismen besitzt, die keine klassischen Apoptoseprogramme besitzen, wie z.B. in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, müssen die DAP-3 Proteine eine weitere nicht apoptotische Funktion besitzen. Die mitochondriale Lokalisation von DAP-3 ließ vermuten, daß diese zusätzliche, phylogenetisch ältere Funktion von DAP-3, für die Funktion dieser Zellorganellen wichtig sein könnte. *S. cerevisiae* schien ein geeignetes Untersuchungssystem

zu sein, um diese nicht-apoptotische Funktion von DAP-3 zu analysieren, da die Abwesenheit von Apoptose bei Hefe die Interpretation der Ergebnisse erleichtert. Um die Funktion des mDAP-3 Homologen der Hefe (YGL129c, im Weiteren als yDAP-3 bezeichnet) näher zu charakterisieren, wurde eine yDAP-3 Nullmutation verwendet.

3.9.1 YGL129c Nullmutation führt zu mtDNA-Verlust

Die yDAP-3 Nullmutanten waren freundlicherweise von E. Cerdan (La Coruna, Spanien; (Tizon et al., 1999)) zur Verfügung gestellt worden. Diese Mutante enthielt keine mitochondriale DNA (mtDNA) und wurde deshalb zunächst mit einer YPH500 Wildtyp Hefelinie (Sikorski and Hieter, 1989) gekreuzt. Die anschließende Sporulation ergab Nullmutanten, die mtDNA enthielten. Diese Mutanten wurden für die weiteren Versuche verwendet.

Eine Disruption des yDAP-3 Gens führte nicht zu einer Beeinträchtigung des Wachstums auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen, wie Glycerol oder Lactat. Diese Beobachtung macht eine direkte Beteiligung von yDAP-3 am Elektronentransfer der Atmungskette unwahrscheinlich.

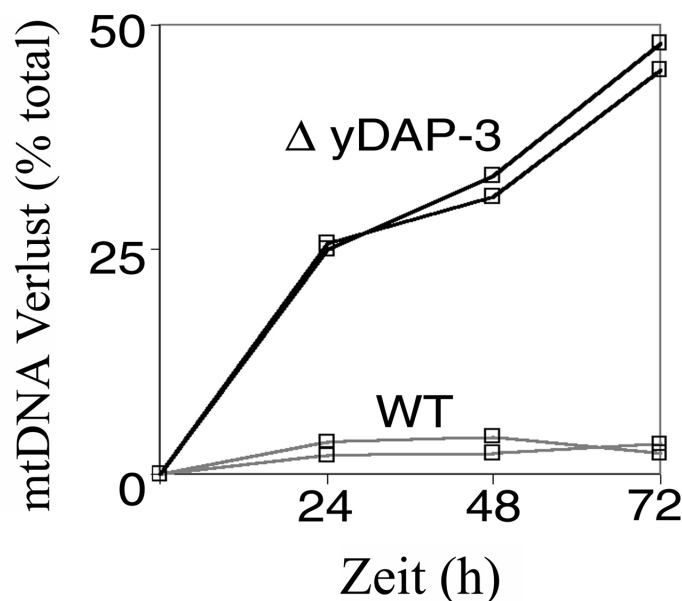


Abbildung 56: Verlust der mitochondrialen DNA (mtDNA) bei yDAP-3 Nullmutanten ($\Delta yDAP-3$). $\Delta yDAP-3$ Hefen zeigen einen signifikanten Verlust der mtDNA (~ 46 % nach 72 h) im Vergleich zu Wildtyp (WT) Kontrollen (3 % nach 72 h).

Wurden mtDNA enthaltende γ DAP-3 Nullmutanten jedoch für längere Zeit (72 h) in Glucose-Medium (YPD) kultiviert und anschließend auf Glucose-Medium enthaltenden Kulturplatten ausplattiert, so zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp ein signifikanter Verlust der mtDNA (Abbildung 56). Der Verlust der mtDNA führt dabei zu einem sogenannten PET-Phänotyp, der durch ein langsames Wachstum und damit kleinere Koloniegrößen leicht erkennbar ist. Durch Auszählen der kleinen und großen Kolonien konnte so der prozentuale mtDNA Verlust festgestellt werden. Bei $\Delta\gamma$ DAP-3 Hefen betrug der Verlust der mtDNA 46 % nach 72 h im Vergleich zu 3 % nach 72 h bei Wildtyp (WT) Kontrollen. Als zusätzliche Kontrolle wurden die Platten nach der Auszählung auf Glycerol-Medium-Platten (YPG) gestempelt und die als klein gezählten Kolonien wuchsen auf diesem Medium nicht, da für ein Wachstum auf Glycerol mitochondriale Atmung und damit mtDNA notwendig ist. Die molekulare Funktion von γ DAP-3 ist mit diesem Versuch zwar noch nicht eindeutig bestimmt, aber eine essentielle funktionelle Beteiligung von DAP-3 an der Biogenese des mitochondrialen Genoms ist wahrscheinlich.

3.9.2 mDAP-3 Transfektion rettet den mtDNA-Verlust der γ DAP-3 Nullmutanten

Um nun zu testen, ob die Säuger DAP-3 Homologe eine ähnliche, zusätzliche, nicht-apoptotische Funktion wie das γ DAP-3 besitzen, wurde das murine DAP-3 in *S. cerevisiae* exprimiert. In der Western Blot Analyse konnte gezeigt werden, daß das murine DAP-3 effizient zu seiner kürzeren reifen Form prozessiert wurde (Abbildung 57 B), wie es bei einem erfolgreichen Import in die Hefe Mitochondrien zu erwarten gewesen war. Der Verlust des mitochondrialen Genoms konnte durch die Expression des murinen DAP-3 in den γ DAP-3 Nullmutanten deutlich reduziert werden (Abbildung 57 A). Zwar ist im Vergleich zum Wildtyp weiterhin ein stärkerer mtDNA-Verlust feststellbar, im Vergleich zu den untransfizierten Nullmutanten ging der Verlust der mtDNA, durch die Expression des murinen DAP-3, jedoch signifikant zurück. Mit diesem Ergebnis konnte zum einen gezeigt werden, daß es sich bei dem Hefegen YGL129c tatsächlich um ein DAP-3 Homolog handelt, denn nur so war es möglich, daß das murine Protein die Funktion des deletierten Hefeproteins übernehmen konnte. Zum anderen konnte bewiesen werden, daß auch das murine Protein eine weitere nicht-apoptotische Funktion besitzt, die innerhalb der Eukaryonten stark konserviert ist und für die Biogenese des mitochondrialen Genoms essentiell zu sein scheint.

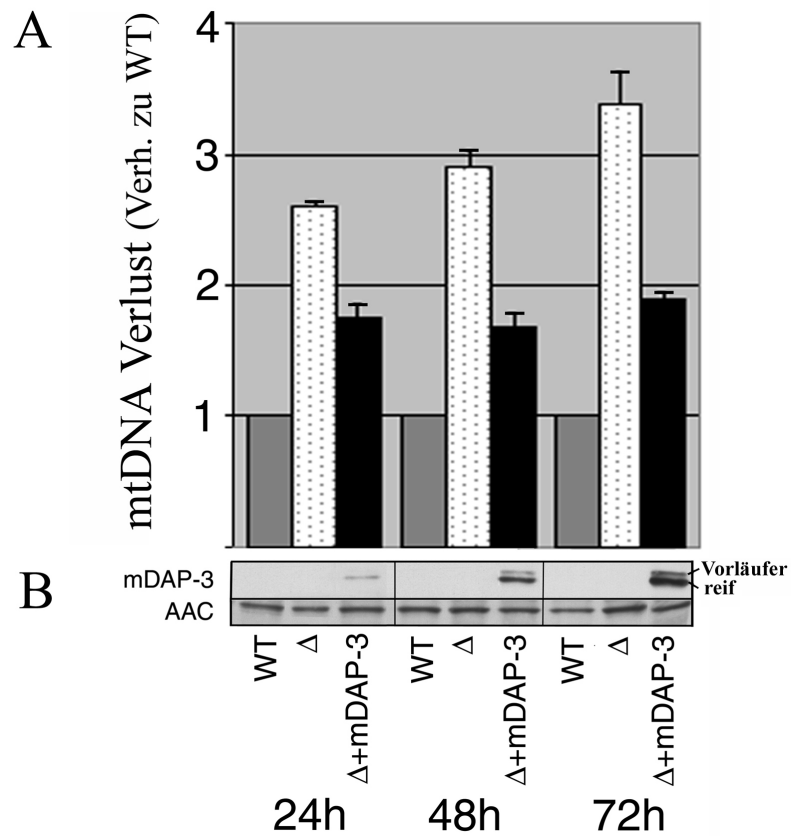


Abbildung 57: Transfektion der γ DAP-3 Nullmutanten (Δ) mit dem murinen DAP-3 (Δ + mDAP-3) reduzierte den Verlust der mtDNA (**A**). Die Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und sind als Verhältnis zum Wildtyp (WT) \pm Standardabweichung angegeben. **B:** Im Western Blot erkennt man, daß mDAP-3 zu seiner reifen Form prozessiert wurde, was auf einen Import des murinen Homologes in die Hefe-Mitochondrien hinweist. Der Vergleich zu der Expression des Hefe ADP/ATP Translokators (AAC) zeigt, daß mDAP-3 nur in den transfizierten Zellen exprimiert wurde.

4 Diskussion

Der vorliegenden Arbeit gehen wesentliche Vorarbeiten von M. Kretzler (Kretzler et al., 1996) und M. Brigl (Berger et al., 2000; Brigl, 2000) voraus. Ausgangspunkt war die Entdeckung von 19 neuen murinen embryonalen Nierenmarker Genprodukten (MERMs für Mouse Embryonic Renal Marker), deren differentielle Expression während der Nephrogenese mit Hilfe einer modifizierten Differential-Display-PCR (DD-PCR) Methode festgestellt worden war (Kretzler et al., 1996). Eines dieser kurzen Genprodukte, MERM3, wurde dann im Rahmen einer medizinischen Dissertation von M. Brigl in dem Labor von Prof. Schlöndorff unter Anleitung von M. Kretzler kloniert und initial charakterisiert. Die vollständige Klonierung des murinen MERM3 zeigte eine hohe Sequenzhomologie zu dem humanen Apoptosemediator DAP-3. Auf Grund dieser interessanten Entwicklung, daß ein während der murinen Nephrogenese differentiell exprimiertes Gen wahrscheinlich das murine Homolog eines zu Beginn der vorliegenden Arbeit nur teilweise beschriebenen, humanen putativen Apoptosemediators ist, wurde die molekulare Charakterisierung dieser cDNA durchgeführt. (MERM3 wird im Weiteren wieder als mDAP-3 bezeichnet).

4.1 Etablierung von Apoptose- Induktion und -Nachweis

4.1.1 IFN- γ induzierte Apoptose in murinen Zelllinien

hDAP-3 wurde durch Experimente isoliert, in denen nach Molekülen gesucht worden war, deren anti-sense Expression in HeLa-Zellen die pro-apoptotischen Effekte von IFN- γ aufheben (Kissil et al., 1995). Daher wurde, zur Untersuchung der Expression von mDAP-3 während der Apoptose, zunächst eine zuverlässige Methode für die Apoptoseinduktion in den zur Verfügung stehenden murinen Zelllinien (MMC und MTC) etabliert. Es zeigte sich, daß eine Stimulation der murinen Zellen mit IFN- γ alleine nicht zu dem gewünschten Ergebnis einer hohen Apoptoserate führte. Daher wurden weitere Stimuli getestet und es gelang, mit einer kombinierten Stimulation von IFN- γ und TNF- α eine deutlich erhöhte Apoptoserate zu erzielen. Eine zusätzliche Stimulation der Zellen mit einem agonistischen Fas-Antikörper führte zu einer weiter gesteigerten Apoptoserate. In MMCs konnten so 33 % und in MTCs sogar 60 % apoptotische Zellen nachgewiesen werden.

4.1.2 Vergleich verschiedener Apoptosenachweisverfahren

Es gibt zahlreiche verschiedene Apoptosenachweisverfahren, die alle unterschiedliche Vor- und Nachteile haben. Es war daher notwendig, ein für das in dieser Arbeit verwendete System der Apoptoseinduktion und für die verwendeten Zelllinien geeignetes Verfahren zu finden. Da die Apoptoseinduktion in den murinen Zellen gleichzeitig mit der Evaluierung des Nachweisverfahrens untersucht wurde, diente ein in der Literatur bereits bekanntes humanes System der Apoptoseinduktion durch Fas-Antikörper Stimulation humaner T-Lymphozyten (Jurkat-Zellen), zunächst als Referenz für die verschiedenen Apoptosenachweisverfahren. Mit Hilfe der Fas-Antikörper induzierten Apoptose bei Jurkat-Zellen wurde die Apoptoserate durch Propidiumiodid-Färbung, Annexin-V-FLUOS-Färbung und DNA-Fragmentierung bestimmt.

Bei der PI Färbung wird der-DNA Gehalt der Zellen analysiert. Da apoptotische Zellen, im Gegensatz zu normal proliferierenden Zellen, DNA in kondensiertem Zustand aufweisen, ist in der FACScan-Analyse PI gefärbter Zellen ein zu dem normalen Zellzyklusprofil zusätzlicher Peak erkennbar. Dies ist der so genannte sub G_1 Peak, der im Histogramm unterhalb (d.h. links) des G_1 Peaks zu erkennen ist. Dieser Peak spiegelt die apoptotischen Zellen wieder, deren DNA weniger PI binden kann. Diese Methode des Apoptosenachweises hat mehrere Vorteile. Zum Einen ist sie sehr gut quantifizierbar, da für die Auswertung ein FACScan verwendet wird. Zum Anderen ist es eine Methode, die in der Praxis schnell, einfach und flexibel durchzuführen ist. So können z.B. die zu untersuchenden Zellen nach der Ethanol Fixierung und vor der PI Färbung längere Zeit (über Nacht) bei 4°C aufbewahrt werden, ohne einen Verlust der Qualität des Ergebnisses befürchten zu müssen. Weiterhin war die Methode des Apoptosenachweises durch PI Färbung sehr gut reproduzierbar, so zeigten z.B. unstimulierte Kontrollzellen einen konstant niedrigen Anteil apoptotischer Zellen. Auch war sie sehr gut für verschiedene Zelllinien einsetzbar und ergab gleich zuverlässige Ergebnisse sowohl für adherente- als auch für Suspensionszellen. Ein sehr wichtiger Punkt war auch die Möglichkeit, daß diese Methode für Zellen verwendet werden konnte, die mit einem EGFP markierten Protein transfiziert worden waren. Denn das rot fluoreszierende PI und das grün fluoreszierende EGFP erlauben eine gleichzeitige Verwendung beider Fluoreszfarbstoffe. Dadurch war eine gezielte Untersuchung nur der tatsächlich transfizierten Zellen möglich.

Ein Nachteil der Methode besteht darin, daß es nicht möglich ist, eventuelle nekrotische Zellen von apoptotische Zellen zu unterscheiden. Allerdings haben zahlreiche Beispiele in der

Literatur die Zuverlässigkeit dieser Methode, in Bezug auf die Erkennung apoptotischer Zellen, gezeigt (Darzynkiewicz et al., 1992; Kalejta et al., 1997; Lamm et al., 1997; Nicoletti et al., 1991; Ormerod et al., 1992; Telford et al., 1991; Telford et al., 1992), so daß sie als wichtigste Methode für den Apoptosenachweis in dieser Arbeit verwendet wurde.

Eine zweite getestete Methode des Apoptosenachweises ist die Annexin-V-FLUOS-Färbung. Wie bereits beschrieben (vergl. 3.4.2) tritt bei Apoptose eine Translokation von Phosphatidylserin (PS) von der cytoplasmatischen Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite der Membran auf. Annexin-V, als ein mit hoher Affinität an Phospholipide bindendes Protein, kann somit als empfindliche Sonde für die PS-Exposition auf der Membranaußenseite apoptotischer Zellen dienen (Vermes et al., 1995). Diese Methode erlaubt ebenfalls eine einfache und schnelle quantitative Auswertung mittels FACScan-Analyse. Die zunächst getesteten Jurkat-Zellen zeigten bei diesem Nachweisverfahren eine nahezu identische Apoptoserate wie mit der PI Färbung (vergl. Abbildung 23). Ein Vorteil der Annexin-V-FLUOS-Färbung ist die Möglichkeit, nekrotische Zellen, durch eine gleichzeitige Färbung, der nicht mit Ethanol fixierten Zellen, mit PI, von den apoptotischen Zellen zu trennen. Allerdings überwogen die Nachteile, die bei dieser Methode auftraten. So war bei den verwendeten adherenten murinen Zellen der Anteil der Annexin positiven Zellen unter den Kontrollzellen häufig sehr hoch.

Daß die beiden beschriebenen durchflußcytometrischen Methoden tatsächlich apoptotische Zellen detektierten, zeigte eine Überprüfung mit der klassischen Methode des Apoptose-Nachweises, der DNA-Fragmentierung. Diese Überprüfung wurde allerdings nur zu Beginn der Arbeit eingesetzt, bis sichergestellt war, daß die PI-Färbung zuverlässige Ergebnisse lieferte, da der Nachweis der DNA-Fragmentierung eine relativ aufwendige Methode ist, die zudem keinerlei quantitative Auswertungen erlaubt.

4.2 mDAP-3 Expression während der Apoptose

4.2.1 mDAP-3 mRNA Veränderung während IFN- γ und TNF- α induzierter Apoptose

Zellen, die mit Cycloheximid (CHX) behandelt wurden, um eine Proteinneusynthese zu unterbinden, sind weiterhin in der Lage, mit den charakteristischen Anzeichen von Apoptose zu sterben. Daraus läßt sich schließen, daß alle für die Apoptose notwendigen Proteine konstitutiv in der Zelle exprimiert werden und daher bei einem eintretenden Apoptosestimulus

nicht neu synthetisiert werden müssen (Steller, 1995; Weil et al., 1996). Eine Zunahme der mRNA pro-apoptotischer Proteine ist daher bei Apoptose nicht zwingend notwendig.

Für mDAP-3 (bzw. MERM3) war in Vorarbeiten bereits die mRNA-Expression in der akuten Tubulusnekrose der Maus untersucht worden (Brigl, 2000). Diese Untersuchungen waren aus zwei Gründen durchgeführt worden. Zum einen gibt es Hinweise, daß die Mechanismen der Regeneration der geschädigten Niere denen ihrer Generation ähneln können (Bacallao and Fine, 1989). Deshalb ist es denkbar, daß während der Nephrogenese differentiell exprimierte Gene, die anschließend in der adulten Niere konstitutiv exprimiert sind, nach einer Schädigung wieder differentiell exprimiert werden. Zum anderen spielt Apoptose beim Untergang der geschädigten Zellen in der akuten Tubulusnekrose eine wichtige Rolle (Thadhani et al., 1996). Mit quantitativer PCR konnte jedoch, nach einer durch Folsäure-Injektion induzierten akuten Tubulusnekrose der Niere in der Maus, keine Veränderung der mDAP-3 mRNA Expression nachgewiesen werden (Brigl, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde die mDAP-3 mRNA-Expression nach Apoptoseinduktion in murinen Zelllinien, die eine bessere Stimulation und Untersuchung erlauben, als dies bei einem Tiermodell der Fall ist, untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die mDAP-3 mRNA-Expression während IFN- γ und TNF- α induzierter Apoptose nicht erhöht, sondern eher erniedrigt ist. Obwohl DAP-3 für die Vermittlung sowohl IFN- γ als auch TNF- α induzierter Apoptose notwendig ist (Kissil et al., 1999; Kissil et al., 1995), ist eine erhöhte Proteinmenge, zumindest reguliert durch erhöhte mRNA-Spiegel damit nicht notwendig.

4.2.2 mDAP-3 Protein Veränderung während IFN- γ , TNF- α und Fas-Antikörper induzierter Apoptose

Die meisten während der Apoptose auftretenden morphologischen Veränderungen werden durch eine Familie von Cystein-Proteasen, den Caspasen, die während der Apoptose spezifisch aktiviert werden, hervorgerufen. Der Verlust der gesamten Zell-Form und -Struktur wird z.B. durch eine Caspasen abhängige Spaltung von Cytoskelettproteinen, wie dem Fodrin und Gelsolin hervorgerufen (Kothakota et al., 1997). Das Spalten des nukleären Lamins ist notwendig für die Kondensation des Nukleus während der Apoptose (Buendia et al., 1999; Rao et al., 1996). In den letzten Jahren sind fast 100 weitere Substrate für Caspasen beschrieben worden, und es gibt sicher eine ganze Reihe weitere (Earnshaw et al., 1999; Nicholson, 1999). Daher erschien es sinnvoll, neben einer eventuell veränderten mDAP-3 Expression, auch zu überprüfen, ob mDAP-3 während der Apoptose enzymatisch gespalten

wird. Die Western Blot Analyse des Gesamtproteins unterschiedlich Apoptose stimulierter MMCs und MTCs zeigte keine Erhöhung der mDAP-3 Proteinmenge. Tendenziell war eher eine leichte Verringerung der mDAP-3 Proteinmenge nachweisbar. Eine enzymatische Spaltung von mDAP-3 konnte mit dem zur Verfügung stehenden monoklonalen anti-hDAP-3 Antikörper ebenfalls nicht gezeigt werden. Dies wäre auch auf Grund der kaum vorhandenen Abnahme des Volllänge mDAP-3 Proteines sehr unwahrscheinlich. Diese Resultate der Western Blot Analyse apoptotischer Zellen verdeutlichen weiterhin, daß keine erhöhte mDAP-3 Proteinmenge für die Vermittlung sowohl IFN- γ als auch TNF- α induzierter Apoptose notwendig ist.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß die mDAP-3 Expression, basierend auf den entscheidenden Western-Blot-Daten, während der Apoptose kaum verändert ist. Eine proteolytische Veränderung und dadurch eventuell resultierende Aktivierung des Proteins ist sehr unwahrscheinlich.

4.3 Überexpression von mDAP-3 bestätigt die pro-apoptische Funktion von mDAP-3

Die pro-apoptische Funktion von mDAP-3 wurde durch transiente Überexpression eines mDAP-3/EGFP-Fusionsproteines untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß eine transiente Überexpression von mDAP-3 zu einer vermehrten Apoptoserate in den verwendeten murinen Zelllinien führt. Diese pro-apoptische Funktion von mDAP-3 war dabei abhängig von der Funktionalität des P-Loops. Eine P-Loop mutierte Variante des mDAP-3 war nicht in der Lage, Apoptose durch Überexpression zu induzieren. Identische Ergebnisse wurden für das humane DAP-3 beschrieben. Eine an der Nukleotidbindungsstelle (P-Loop) defekte Mutante des hDAP-3 war ebenfalls nicht in der Lage, Apoptose zu induzieren (Kissil et al., 1999).

Verschiedene N- oder C-terminal verkürzte mDAP-3/EGFP-Fusionsproteine zeigten keine pro-apoptische Funktion bei Überexpression. Auch das humane DAP-3 benötigt für die Induktion von Apoptose durch Überexpression das Volllänge Protein. N- oder C-terminal verkürzte hDAP-3 Proteine waren nicht in der Lage, Apoptose durch Überexpression zu induzieren. Ein N-terminal verkürztes hDAP-3 (Δ 230) zeigte sogar eine dominant negative Funktion und führte bei Überexpression zu einem Schutz der Zellen vor einem externen Apoptosestimulus (Kissil et al., 1999). Für diese protektive Funktion war interessanterweise wiederum ein funktioneller P-Loop notwendig. Erklärt wird diese anti-apoptische Funktion

durch eine eventuelle Konkurrenz mit dem Wildtyp hDAP-3 und einer dadurch hervorgerufenen Inaktivierung des DAP-3 abhängigen Apoptoseweges.

Die hDAP-3 vermittelte Apoptose konnte durch Caspase Inhibitoren verhindert werden, und dominant negative Formen des MORT-1/FADD Adapter Proteins oder der Caspase-8 waren nicht in der Lage, die pro-apoptotische Funktion von hDAP-3 zu verhindern (Kissil et al., 1999). Die Daten dieser Arbeit zeigen eine Cytochrom c Freisetzung bei Apoptoseinduktion durch Überexpression des murinen DAP-3. Diese Cytochrom c Freisetzung war spezifisch für die pro-apoptotische Funktion von mDAP-3, und nur dann nachweisbar, wenn auch eine gesteigerte Apoptoserate auftrat. Die Transfektion der Zellen mit der P-Loop mutierten mDAP-3 Variante führte nicht zur Apoptoseinduktion und auch nicht zu einer Cytochrom c Freisetzung aus den Mitochondrien in das Cytosol. Zusammen deuten diese Daten auf eine Lage der DAP-3 Moleküle in der Apoptosekaskade unterhalb der Caspase-8 und oberhalb der Cytochrom c Freisetzung und der Effektor Caspasen hin (Abbildung 58). Genau an der Stelle, an der das Entscheidungszentrum über Leben und Tod, das Mitochondrium, liegt (Desagher and Martinou, 2000; Green and Kroemer, 1998).

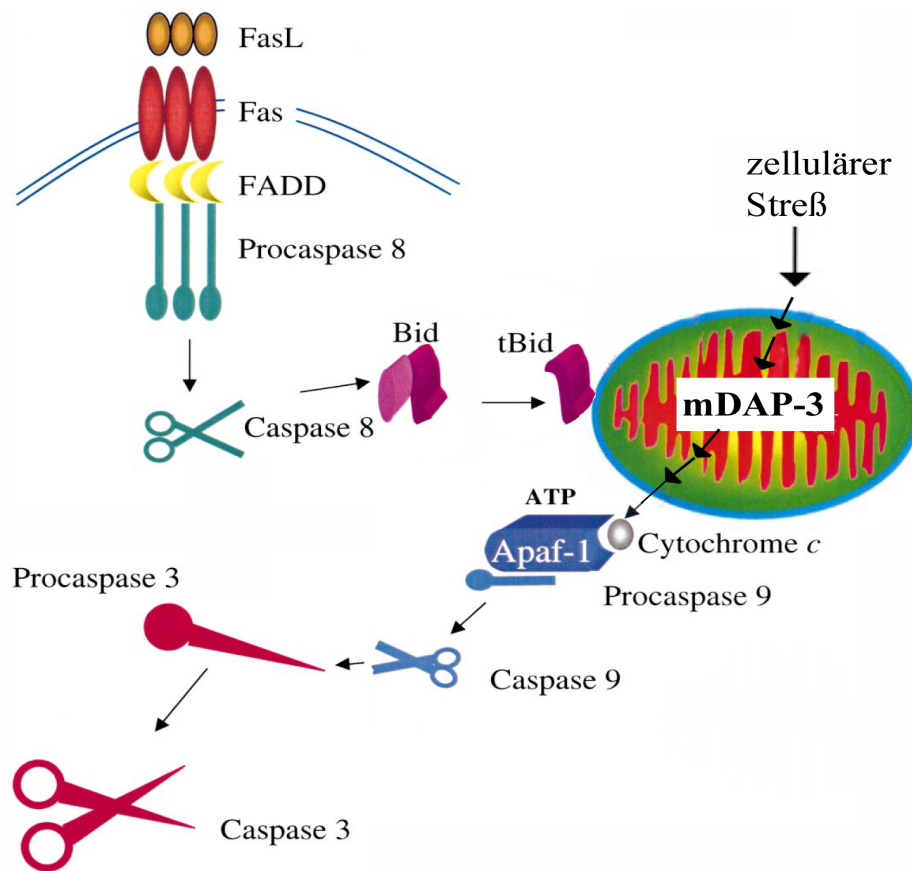


Abbildung 58: Die DAP-3 Moleküle lokalisieren in der Apoptosekaskade unterhalb der Caspase-8 und oberhalb der Cytochrom c Freisetzung und der Effektor Caspasen (modifiziert nach Gottlieb, (Gottlieb, 2000)).

4.4 Intrazelluläre Lokalisation von mDAP-3

4.4.1 Drei unterschiedliche Experimente bestätigen die mitochondriale Lokalisation

Die Analyse der mDAP-3 Aminosäuresequenz mit den Computerprogrammen MITOPROT, PSORT und TargetP ergab eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine mitochondriale Lokalisation. Ähnliche Ergebnisse wurden für die weiteren untersuchten Mitglieder der DAP-3 Proteinfamilie, hDAP-3, DmDAP-3, CeDAP-3 und yDAP-3 erzielt. Diese mitochondriale Lokalisation von mDAP-3 wurde im Weiteren durch drei unabhängige Experimente bestätigt. Erstens zeigte das mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein im Fluoreszenz-Mikroskop ein punktiertes Muster, das sehr stark einem mitochondrialen Fluoreszenz Muster ähnelt. Zweitens konnte ein eindeutige Ko-Lokalisation des mDAP-3/EGFP-Fusionsproteines und eines Mitochondrien spezifischen Farbstoffes, Mito-Tracker-Red CMXRosTM, durch Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie gezeigt werden. Drittens konnte durch eine Leberzellfraktionierung die mitochondriale Lokalisation des endogenen DAP-3 biochemisch bestätigt werden. Weiterhin erbrachte die Proteinase K Behandlung isolierter Mitochondrien den Hinweis auf eine intra-mitochondriale Lokalisation von mDAP-3. Durch eine Digitonin Behandlung isolierter Mitochondrien konnte die Lokalisation von mDAP-3 auf die mitochondriale Matrix eingegrenzt werden. Karbonat-Behandlung isolierter Mitochondrien bestätigte, daß es sich bei DAP-3 nicht um ein membranständiges, sondern um ein lösliches Protein handelt, das wahrscheinlich zu einem großen Teil mit Proteinen der Mitochondrien-Innenmembran interagiert, wie durch Ultraschall-Behandlung isolierter Mitochondrien gezeigt werden konnte.

4.4.2 Das Volllänge mDAP-3 Protein ist für eine Proteininteraktion notwendig

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse verschiedener C- und N-terminal verkürzter mDAP-3/EGFP-Fusionsproteine ergab eine mitochondriale Lokalisation aller untersuchten Deletionsmutanten. Eine pro-apoptische Funktion konnte jedoch nur für das Volllänge-Protein gezeigt werden. Ethanol Behandlung von Zellen, die mit den Deletionsmutanten transfiziert worden waren, zeigte dann einen deutlichen Unterschied zwischen dem Volllänge DAP-3 und allen Deletionsmutanten, einschließlich der P-Loop mutierten Volllänge Variante. Diese wurden durch die, bei der Ethanol Behandlung entstehende Permeabilisierung der Zellmembran, und wahrscheinlich auch der mitochondrialen Membranen, aus der Zelle

herausgespült. Ein identisches Phänomen ist für das EGFP Protein in der Literatur beschrieben. Es wurde beschrieben, daß das im Cytosol lokalisierte EGFP Protein nicht geeignet ist, um als Transfektionsmarker zu dienen, wenn die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt werden sollen und deshalb mit Ethanol permeabilisiert wurden (Kalejta et al., 1997). Das EGFP wird durch die Ethanol Behandlung aus den Zellen herausgespült. Ein ähnliches Problem hatte es auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten Ko-Transfektionen gegeben und deshalb wurde für diese Experimente ein membranständiges EGFP als Transfektionsmarker verwendet (Kalejta et al., 1997). Dieser Verlust der mDAP-3/EGFP Deletionsmutanten bei der Ethanol Behandlung transfizierter Zellen läßt sich so erklären, daß nur das Volllänge Protein in der Lage ist, mit seinem(n) molekularen Partner(n) zu interagieren und das diese Interaktion das Protein in den Mitochondrien zurückhält. Für diese Interaktion ist ein funktioneller P-Loop essentiell, denn der Austausch einer Aminosäure in der P-Loop Region reicht bereits aus, um diese Interaktion zu verhindern und ein Auswaschen der P-Loop mutierten mDAP-3/EGFP Volllänge Proteines zu ermöglichen. Bei den Deletionsmutanten ist die Interaktionsfähigkeit mit dem oder den molekulare(n) Partner(n) P-Loop unabhängig. Wahrscheinlich fehlt den Deletionsmutanten die nötige dreidimensionale Struktur, um mit den oder dem molekularen DAP-3 Partner(n) interagieren zu können. Wird die Zellmembran und die Mitochondrienmembran durch die Ethanol Behandlung permeabilisiert, so können die Deletionsmutanten nicht in der Zelle zurückgehalten werden, und es tritt ein deutlicher Rückgang der Fluoreszenz auf.

4.5 Identifizierung einer zweiten phylogenetisch älteren Funktion der DAP-3 Proteine

Genau wie für Cytochrom c, so deutet auch für die DAP-3 Proteinfamilie das Vorhandensein von DAP-3 Homologen in nicht apoptotischen Eukaryonten wie der Hefe auf eine weitere Funktion dieser Proteine hin. Die Charakterisierung dieser Funktion ist ein wichtiger Schritt, um die molekulare Rolle von DAP-3 sowohl für die Biogenese der Mitochondrien als auch für die Apoptoseinduktion, zu verstehen. Bereits das weit verbreitete Vorkommen des murinen DAP-3 (diese Arbeit) und des humanen DAP-3 (Kissil et al., 1995), sowie seine Entdeckung durch eine differentielle Expression in der Nephrogenese der Maus mit einer maximalen Expression in der adulten Mausniere (Kretzler et al., 1996), deuten auf eine weitere nicht apoptotische Funktion von DAP-3 hin. Während der Nephrogenese, zu einem Zeitpunkt, zu dem viel Apoptose stattfindet, ist mDAP-3 nur basal exprimiert. In der adulten differenzierten Niere, in der man nur noch ein geringes Ausmaß an Apoptose erwarten würde,

ist mDAP-3 jedoch vergleichbar am stärksten exprimiert. Dieses Expressionsmuster steht im Gegensatz zu anderen Apoptosemediatoren, für die bisher nur eine pro-apoptotische Funktion beschrieben wurde. So zeigen die Apoptosemediatoren CED-3 und CED-4 des Nematoden *C. elegans* ein zu dem Vorkommen von Apoptose parallelen Expressionsverlauf. Sie sind während der frühen Embryogenese, wenn der größte Anteil der apoptotischen Zellen auftritt, stark exprimiert und im Gegensatz dazu im adulten Tier verhältnismäßig schwach exprimiert (Yuan and Horvitz, 1992; Yuan et al., 1993).

mDAP-3 zeigt eine signifikante Sequenzhomologie zu dem *S. cerevisiae* offenen Leserahmen YGL129c, der hier als yDAP-3 bezeichnet wird. Dieses Molekül enthält die gleiche konservierte P-Loop Sequenz wie mDAP-3 und hDAP-3. yDAP-3 Nullmutanten wurden bereits beschrieben und zeigten eine Unfähigkeit, auf Glycerol als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen (Tizon et al., 1999). Diese Beobachtung ähnelt einem Hefe Phänotyp der häufig bei mitochondrialen Störungen auftritt (Lawson and Douglas, 1988). Obwohl die in dieser Arbeit gezeigten Daten eine direkte Beteiligung von yDAP-3 an der mitochondrialen Atmung nicht unterstützen, zeigen sie doch, daß bei Abwesenheit des yDAP-3 Gens die Hefezellen vermehrt die mitochondriale DNA (mtDNA) verlieren. Dabei scheint eine direkte Rolle von yDAP-3 für die Replikation der mtDNA unwahrscheinlich, da der Verlust der mtDNA relativ langsam eintrat und nach 3 Tagen nur bei ca. der Hälfte der Zellen nachzuweisen war. Eine Reihe anderer Hefemutanten, deren Gene für unterschiedliche mitochondriale Prozesse notwendig sind, zeigt als Phänotyp einen Verlust der mtDNA. So haben z.B. Mutanten mit einer veränderten mitochondrialen Morphologie ebenfalls ein instabiles mitochondriales Genom (Rapaport et al., 1998). Dies war bei den Δ yDAP-3 Hefemutanten jedoch nicht der Fall. Die Mitochondrien dieser Nullmutanten zeigten keine veränderte Morphologie, was durch Transfektion eines mitochondrial lokalisierten EGFP überprüft worden war (Daten nicht gezeigt).

Die molekulare Funktion von yDAP-3 für die Biogenese der Mitochondrien scheint jedoch innerhalb der DAP-3 Proteinfamilie erhalten geblieben zu sein. Denn der mtDNA Verlust der Δ yDAP-3 Hefemutanten konnte durch eine Transfektion der Hefen mit dem murinen DAP-3 teilweise verhindert werden. Dieses Experiment bestätigt zum einen, daß YGL129c das Hefehomolog zu DAP-3 ist und es beweist zum anderen, daß auch das Säuger DAP-3, und damit wahrscheinlich auch die weiteren Vertreter der DAP-3 Proteinfamilie, eine zweite, phylogenetisch ältere, nicht-apoptotische Funktion besitzen. Diese Funktion ist, wie die Daten gezeigt haben, wichtig für die Biogenese der Mitochondrien, aber nicht essentiell für das Überleben, zumindest das der Hefe Nullmutanten.

4.6 Mögliche Einordnung der DAP-3 Funktion in die Apoptose

4.6.1 Regulation der dualen DAP-3 Funktion

Wie bereits mehrfach erwähnt, spielen Mitochondrien bei der Regulation der Apoptose eine entscheidende Rolle (Alnemri, 1999; Green and Reed, 1998; Kroemer and Reed, 2000; Martinou, 1999; Susin et al., 1998). Viele evolutionär konservierte Moleküle, die für die oxidative Phosphorylierung von Bedeutung sind, spielen eine zusätzliche pro-apoptotische Rolle. Diese mitochondrialen Faktoren sind bisher nur in den mitochondrialen Intermembranraum oder an bzw. in die mitochondriale Außenmembran lokalisiert worden. Cytochrom c, ein hoch konserviertes Protein, das für den Elektronen Transport entlang der mitochondrialen Innenmembran notwendig ist, war eines der ersten Proteine, für das eine zweite Funktion zusätzlich zu der „normalen“ mitochondrialen Funktion identifiziert wurde. Es stellte sich heraus, daß Cytochrom c, nachdem es aus den Mitochondrien freigesetzt wird, eines der entscheidenden Proteine für die Aktivierung von Caspasen ist (Liu et al., 1996).

Ein anderer Elektronen Transporter, das Flavoprotein AIF (Apoptosis Inducing Factor) vermittelt Apoptose, nachdem es aus den Mitochondrien in den Zellkern transloziert ist (Susin et al., 1999b). Unter normalen Bedingungen ist das Vorkommen von AIF auf den mitochondrialen Intermembranraum beschränkt, durch einen apoptotischen Stimulus wird es jedoch aus den Mitochondrien freigesetzt und gelangt auf Grund mehrerer in der Sequenz vorhandener nuklearer Importsequenzen in den Zellkern. Dort induziert AIF Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung (Loeffler et al., 2001). Die apoptotische Funktion von AIF tritt also erst nach einem pro-apoptotischen Stimulus durch eine veränderte Lokalisation von AIF auf.

Diese beiden phylogenetisch alten Proteine haben also eine „normale“, intra-mitochondriale Funktion als Elektronen Akzeptoren / Donatoren und eine zweite pro-apoptotische Funktion, nachdem sie ihre „normale“ zelluläre Umgebung, den mitochondrialen Intermembranraum, verlassen haben. Die Regulation der pro-apoptotischen Funktion dieser beiden Proteine erfolgt also offensichtlich durch eine gut regulierte Kompartimentierung und damit Trennung der beiden so unterschiedlichen Funktionen. DAP-3 hingegen behält während der Apoptose seine mitochondriale Lokalisation. Dies konnte sowohl bei Apoptoseinduktion durch mDAP-3 Überexpression, als auch bei Apoptose in humanen T-Lymphozyten, die durch Fas-Antikörper induziert worden war, gezeigt werden. Offensichtlich übt DAP-3 seine pro-

apoptotische Funktion also innerhalb der Mitochondrien, also in der gleichen zellulären Umgebung, in der es auch seine nicht-apoptotische Funktion hat, aus. Die pro-apoptotische DAP-3 Funktion muß daher durch andere Mechanismen als bei Cytochrom c und AIF kontrolliert und reguliert werden. ANT-1, eines der am häufigsten exprimierten Moleküle des mitochondrialen ADP-ATP-Antiport-Systems in der mitochondrialen Innenmembran, kann ebenfalls Apoptose induzieren, wenn es überexprimiert oder durch einen sekundäres Signal stimuliert wird (Bauer et al., 1999). Dies deutet auf eine Inhibierung der pro-apoptotischen Funktion von ANT-1 durch andere Proteine des ADP-ATP-Antiport-Systems hin. Für die Inhibierung der Apoptose scheint eine labile stöchiometrische Balance zwischen den verschiedenen Proteinen dieses Komplexes notwendig zu sein. Eine ähnliche Inhibierung der pro-apoptotischen Funktion von mDAP-3 durch interagierende Proteine während der „normalen“ zellulären Funktion kann auch für DAP-3 hypothetisiert werden, denn auch DAP-3 wird in „normalen“ Mitochondrien stark exprimiert und zeigt durch Überexpression seine pro-apoptotische Funktion (Abbildung 59).

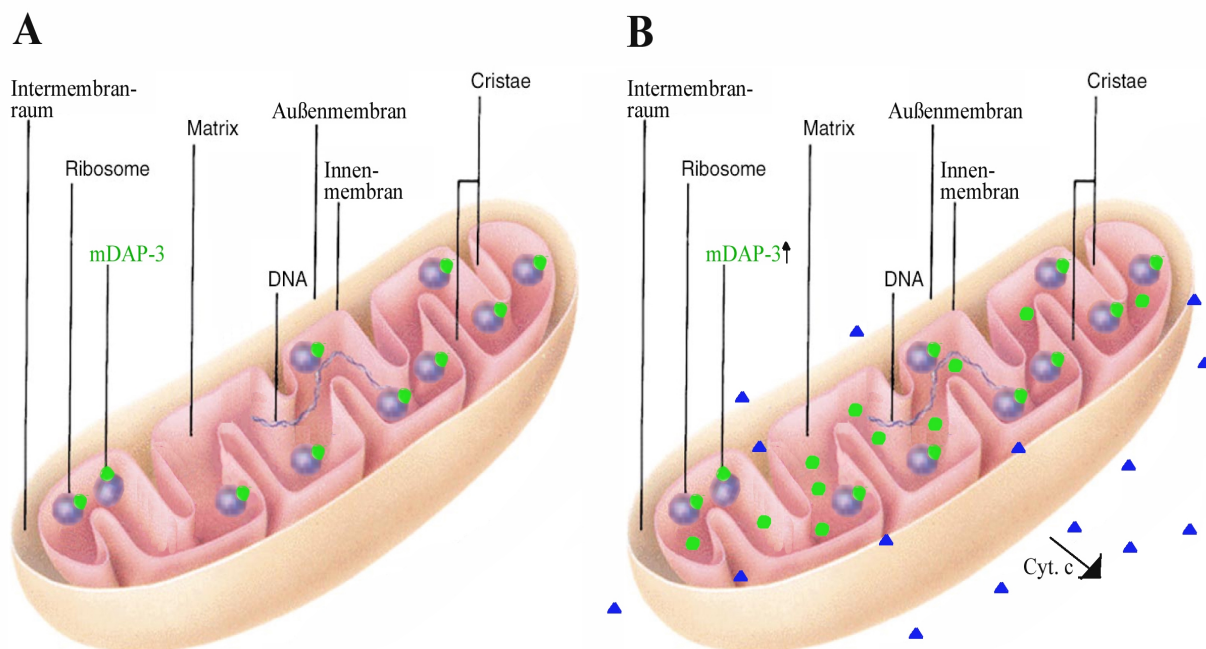


Abbildung 59: Überexpression von mDAP-3 (grün) führt zu Cytochrom c Freisetzung und Apoptose. **A:** In „normalen“ Mitochondrien interagiert mDAP-3 mit seinen molekularen Partnern in den mitochondrialen Ribosomen. **B:** mDAP-3 Überexpression führt zu einem stöchiometrischen Ungleichgewicht und Störung der mitochondrialen Funktion, dies hat eine Cytochrome c Freisetzung und Apoptoseinduktion zur Folge (modifiziert nach Frey und Manella, (Frey and Mannella, 2000)).

4.6.2 Interagiert DAP-3 mit dem Glucocorticoid-Rezeptor ?

In einer vor kurzem veröffentlichten Arbeit einer schwedischen Arbeitsgruppe wird die mögliche Interaktion von DAP-3 mit dem Glucocorticoid-Rezeptor (GR) beschrieben (Hulkko et al., 2000). Mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid Systems wurde eine HeLa-Zellen cDNA Bank mit der durch Liganden aktivierten GR Ligandenbindungsdomäne (LBD) als Köder analysiert. Eines der dabei isolierten Fragmente kodierte für DAP-3. Weiterhin wurde beschrieben, daß das Volllänge DAP-3 ebenfalls mit dem GR interagiert (Hulkko et al., 2000). In Ko-Transfektionsexperimenten in COS-7 Zellen konnte ein stimulatorischen Effekt von DAP-3 auf die Liganden induzierte transkriptionelle Aktivierung durch GR gezeigt (Hulkko et al., 2000). Für diese Interaktion zwischen DAP-3 und dem GR war keine ATP Hydrolyse notwendig, daraus läßt sich schließen, daß der P-Loop nicht für die Bindung von DAP-3 an den GR notwendig ist.

Dies steht im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Beobachtungen nach Ethanol Behandlung transfizierter Zellen. Für einen Verbleib der mDAP-3/EGFP-Fusionsproteine in den Zellen war nicht nur das gesamte Volllänge Protein, sondern auch ein funktioneller P-Loop notwendig. Hulkko *et al.* konnten weiterhin zeigen, daß DAP-3 in der Lage ist, Homodimere zu formen und daß ein N-terminales DAP-3 Fragment (AS 1-230) für die Dimer Bildung mit dem Volllänge Protein ausreicht (Hulkko et al., 2000). Diese Beobachtung könnte den dominant negativen Effekt der $\Delta 230$ DAP-3 Mutante erklären, wie er von Kissil *et al.* beschrieben wurde (Kissil et al., 1999), indem nämlich diese Deletionsmutante mit dem endogenen DAP-3 Dimere formt und so die pro-apoptotische Funktion von DAP-3 unterbindet. In der Arbeit von Hulkko *et al.* wird allerdings keine Erklärung für einen möglichen funktionellen Zusammenhang zwischen der pro-apoptotischen Funktion von DAP-3 und der Interaktion mit dem GR gegeben. Auch erscheint eine mögliche Interaktion von DAP-3 mit einem cytosolisch / nukleären Protein, wie dem GR, auf den ersten Blick auf Grund „geographischer“ Unvereinbarkeiten der intrazellulären Lokalisierung der beiden Proteine unmöglich. In unstimuliertem Zustand liegt der GR im Cytoplasma vor und wird nach einer Ligandenbindung sehr schnell in den Zellkern importiert. In einigen Arbeiten wurde aber auch ein Import des GR in die Mitochondrien, nach einer Ligandenaktivierung, beschrieben (Demonacos et al., 1993; Scheller et al., 2000). Zusätzlich sind auch mitochondriale Hormon-Antwort-Elemente (Hormone Response Elements, HRE) innerhalb der mitochondrialen DNA beschrieben worden. Dies sind DNA-Bindungsstellen über die der GR seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausübt. In Gel-Shift Analysen konnten eine

Interaktion des GR mit diesen HRE nachgewiesen werden (Demonacos et al., 1995; Demonacos et al., 1996; Tsiriyotis et al., 1997). Eine Interaktion des GR mit DAP-3 scheint also nicht unmöglich und könnte eine Erklärung für die pro-apoptotische Wirkung von Glucocorticoiden in Thymozyten sein. Ebenso wie für die DAP-3 vermittelte Apoptose, so sind auch für die GR vermittelte Apoptose die genauen molekularen Mechanismen bisher noch größtenteils unbekannt (Cidlowski et al., 1996; Planey and Litwack, 2000).

4.6.2.1 Eigene Untersuchungen zur Interaktion von DAP-3 mit dem Glucocorticoid Rezeptor

In ersten eigenen Untersuchungen zu einer möglichen Interaktion zwischen DAP-3 und dem Glucocorticoid Rezeptor wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Die bisherigen Daten von Hulkko *et al.* beruhten auf *in vitro* Experimenten, bei denen eine Interaktion mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid Systems gezeigt worden war. Es wurde daher versucht, dieses Ergebnis *in vivo* zu bestätigen. Ko-Immunpräzipitationen, bei denen MTC Zellysat zunächst mit einem Agarose gekoppelten anti-GR-Antikörper inkubiert wurde, ergaben im anschließenden, mit dem anti hDAP-3 Antikörper analysierten, Western Blot ein deutliches Signal für DAP-3. Diese Interaktion von DAP-3 mit dem GR war Liganden abhängig. Wurden die Zellen vor der Immunpräzipitation mit 100 nM Dexamethasone inkubiert, so konnte eine Erhöhung der DAP-3 Proteinmenge durch die GR Immunpräzipitation nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine Interaktion von DAP-3 mit dem in die Mitochondrien translozierten Glucocorticoid Rezeptor scheint also tatsächlich möglich zu sein. Allerdings sind die eigenen Ergebnisse bisher nur vorläufig und bedürfen einer weitergehenden Untersuchung und Kontrolle. Weitergehende Analysen, in Zusammenarbeit mit Prof. Schütz vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg, mit Hilfe von Zelllinien von GR knock-out Mäusen und von Mäusen die einen Defekt in der GR-Dimerisierung haben, können es ermöglichen, die funktionellen Zusammenhänge der DAP-3-GR-Interaktion aufzuklären (s. 4.7).

4.6.3 DAP-3 ist ein mitochondriales ribosomales Protein

Nachdem die experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden Arbeit abgeschlossen waren, erschien eine Veröffentlichung einer Arbeitsgruppe aus North Carolina, USA, in der DAP-3 als ein mitochondriales ribosomales Protein identifiziert wurde (Koc et al., 2001). Mitochondriale ribosomale Proteine (MRP) sind die Gegenstücke zu den cytoplasmatischen ribosomalen Proteinen der gleichen Spezies. Die Anzahl der Proteine in den mitochondrialen

Ribosomen ist höher als in den cytoplasmatischen Ribosomen. Es wird geschätzt, daß mitochondriale Ribosomen bis zu 100 verschiedene Proteine enthalten (Graack and Wittmann-Liebold, 1998; Matthews et al., 1982). Bisher sind nur wenige dieser Proteine auf molekularer Ebene identifiziert und charakterisiert worden. Da die MRP eine sehr heterologe Gruppe von Proteinen sind und häufig nur eine geringe Sequenzhomologie zwischen entfernt verwandten Spezies vorhanden ist, ist es schwierig, homologe Proteine in Säugern mit der Hilfe von z.B. bekannten Hefe Sequenzen zu finden. Deshalb wurde ein direkter Ansatz für die Suche nach neuen MRP in der Arbeit von Koc. *et al.* verwendet. Es wurden mitochondriale Rinderleber-Ribosomen isoliert und proteolytisch verdaut. Die entstandenen Peptide wurden dann mit Hilfe von „Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry“ analysiert. Eine BLAST-Sequenzanalyse ergab, daß neun der gefundenen Peptide homolog zu hDAP-3 waren (Koc et al., 2001). Da keine bisher bekannten MRPs von anderen Spezies eine Ähnlichkeit zu MRP-S29, wie DAP-3 auf Grund der Nomenklatur für mitochondriale ribosomale Proteine von Koc. *et al.* bezeichnet wird, aufweisen, bildet die DAP-3 Proteinfamilie eine neue Klasse ribosomaler Proteine. Die Funktion von DAP-3 in den mitochondrialen Ribosomen wird in der Arbeit von Koc. *et al.* nicht näher beschrieben. Die Autoren spekulieren jedoch, daß DAP-3 auf Grund des P-Loops und zweier weiterer Motive ein GTP-bindendes Protein sein könnte. Interessanterweise ist unter den bisher bekannten MRP in der kleinen Untereinheit der mitochondrialen Ribosomen kein Protein, das ähnliche Sequenzmotive, die auf eine GTP Bindungsstelle hindeuten würden, hat (Koc et al., 2001). Für die pro-apoptotische Funktion von DAP-3 offerieren die Autoren zwei mögliche Funktionsweisen. Zum einen spekulieren sie, daß DAP-3 eventuell während der Apoptose aus den mitochondrialen Ribosomen freigesetzt und aus den Mitochondrien exportiert wird, um dann seine pro-apoptotische Funktion im Cytoplasma auszuüben. Eine These die in dieser Arbeit und der begleitenden Veröffentlichung (Berger et al., 2000) widerlegt wurde. Zum anderen postulieren Koc. *et al.* eine Interaktion von DAP-3 mit Proteinen der mitochondrialen Transitions-pore (mtPTP) (Koc et al., 2001). Dies ist eine interessante Überlegung, zumal bereits eine Assoziation großer Teile der mitochondrialen Ribosomen mit der mitochondrialen Innenmembran beschrieben wurde (Liu and Spremulli, 2000). Lui *et al.* beschreiben, daß etwa die Hälfte der Ribosomen in Rinderleber Mitochondrien mit der mitochondrialen Innenmembran assoziiert sind, und daß ein kleinerer Teil der mitochondrialen Ribosomen (15 %) wahrscheinlich nicht mit Fettsäureresten der mitochondrialen Innenmembran, sondern mit einem oder mehreren großen Proteinkomplexen interagiert (Liu and Spremulli, 2000).

Nur wenige Tage nach dem Erscheinen der Arbeit von Lui *et al.* wurde von einer französischen Arbeitsgruppe, um A. Jacquier am Institut Pasteur in Paris, das Hefe Homolog zu DAP-3 (YGL129c) ebenfalls als mitochondriales ribosomales Protein identifiziert (Saveanu et al., 2001). Saveanu et al. isolierten insgesamt 20 Proteine aus der kleinen mitochondrialen ribosomalen Untereinheit, von denen 12 bisher unbekannt waren (Saveanu et al., 2001). Die Identifizierung von YGL129c (yDAP-3) als mitochondriales ribosomales Protein bestätigt erneut die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Sequenz- und Funktionshomologien zwischen DAP-3 und YGL129c (yDAP-3). Der für die yDAP-3 Nullmutanten beschriebene Phänotyp des mtDNA Verlustes läßt sich nun sehr gut mit einem Verlust der mitochondrialen Proteinsynthesefähigkeit in diesen Mutanten erklären. Dies stimmt gut überein mit Berichten, daß eine funktionierende mitochondriale Proteinsynthese in der Hefe *S. cerevisiae* notwendig ist, um ein intaktes mitochondriales Genom zu behalten (Myers et al., 1985).

Diese neuen Erkenntnisse bestätigen die Hypothese, daß DAP-3 ein Protein mit zwei Funktionen ist. Die eine Funktion als mitochondriales ribosomales Protein, auf die bisher nur die Analyse der Hefe Nullmutanten einen Hinweis gab, konnte durch die Isolierung von DAP-3 aus mitochondrialen Ribosomen bestätigt werden. Die zweite, pro-apoptotische Funktion von DAP-3 konnte bisher leider nur unzureichend charakterisiert werden. Die Lokalisation von DAP-3 in die mitochondriale Matrix und der Verbleib in derselben während der Apoptose, identifizieren DAP-3 als ein Protein, das, sowohl seine „normale“ Funktion bei der mitochondrialen Proteinsynthese, als auch seine pro-apoptotische Funktion innerhalb der Mitochondrien ausübt. Bisher konnten allerdings keine molekularen Partner für DAP-3 während der Apoptose identifiziert werden. Die Interaktion von DAP-3 mit dem Glucocorticoid-Rezeptor könnte eine Möglichkeit für die pro-apoptotische Funktion von DAP-3 sein. Denn auch durch Glucocorticoide induzierte Apoptose führt zu einem Verlust des mitochondrialen Potentials, was eine Beteiligung der Mitochondrien an Glucocorticoid induzierter und Glucocorticoid-Rezeptor vermittelter Apoptose zeigt (Marchetti et al., 1996; Petit et al., 1995). Weiterhin wurde beschrieben, daß Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 in Lymphozyten, Glucocorticoid induzierte Apoptose blockieren kann. Bcl-2 Überexpression verhindert Apoptose durch eine Inhibierung der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien (Alnemri et al., 1992; Armstrong et al., 1996; Chinnaiyan et al., 1996), und impliziert so wiederum eine Involvierung der Glucocorticoid induzierten Apoptose in einen mitochondrialen Apoptoseweg. Allerdings sind sowohl die Mechanismen der

Glucocorticoid induzierten Apoptose, als auch die Interaktion von DAP-3 mit dem Glucocorticoid Rezeptor nicht ausreichend geklärt, um eine genauere Funktion zu postulieren. Die Identifizierung von DAP-3 als mitochondriales ribosomales Protein und die teilweise Lokalisation der mitochondrialen Ribosomen an der Matrixseite der mitochondrialen Innenmembran läßt vermuten, daß DAP-3 vielleicht direkt mit Proteinen der mitochondrialen Transitions-pore interagiert. Die mitochondriale Transition Pore wird aus mehreren Proteinen gebildet, die sich teilweise in der mitochondrialen Außenmembran (wie z.B. das Porin oder voltage dependent anion channel, VDAC), oder in der mitochondrialen Innenmembran (wie z.B. der Adenin Nukleotid Translokator, ANT-1) oder in der mitochondrialen Matrix (wie z.B. Cyclophilin D, CD) befinden. Zusammen mit dem pro-apoptotischen Protein Bax, das vermutlich mit dem anti-apoptotischen Bcl2 und dem Benzodiazepine Rezeptor interagiert, bilden sie die mtPTP an Kontaktpunkten der mitochondrialen Innen- und Außenmembran. Die Öffnung der mtPTP steht in Zusammenhang mit der Freisetzung von Cytochrom c und AIF aus den Mitochondrien und der daran anschließenden Aktivierung weiterer Apoptosevorgänge, wie z.B. die Aktivierung von Procaspase-9 durch Cytochrom c und Apaf-1 (Brustovetsky and Klingenberg, 1996; Green and Reed, 1998; Petit et al., 1996; Zoratti and Szabo, 1995). Die Apoptoseinduktion durch DAP-3 Überexpression hatte ebenfalls eine Cytochrom c Freisetzung ergeben (diese Arbeit) und die Inhibierung von Caspasen konnte Apoptoseinduktion durch DAP-3 verhindern (Kissil et al., 1999). Einen möglichen Einfluß von DAP-3 auf die mtPTP könnte somit die pro-apoptotische Funktion von DAP-3 erklären.

4.7 Ausblick

Eine Vielzahl von Möglichkeiten steht zur Auswahl, um die Funktion von DAP-3 weiter zu analysieren. Auf der einen Seite erscheint es wichtig, die genaue Lage im mitochondrialen Ribosom zu analysieren, um so die Funktion für die Proteinbiosynthese aufzuklären. Für diese Fragestellung bietet sich das Hefesystem auf Grund der einfacheren Handhabung an. Auch sind in der Hefe bereits eine größere Zahl der mitochondrialen ribosomalen Proteine charakterisiert, als in Säugern, so daß eine Zuordnung der Funktion einfacher sein sollte.

Die mögliche Interaktion von DAP-3 mit dem Glucocorticoid-Rezeptor soll, wie bereits beschrieben, in Zusammenarbeit mit Prof. Schütz vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg erfolgen. Mit Hilfe von Zelllinien, sowohl von GR knock-out Mäusen, als auch von Mäusen, die einen Defekt in der GR-Dimerisierung haben, könnte es möglich sein, zu untersuchen, ob die Apoptoseinduktion durch DAP-3 abhängig ist von dem

Vorhandensein des GRs oder von der DNA-Bindungsfähigkeit des GRs. Diese ist in den Zellen der GR-Dimerisierungsmutanten defekt (Reichardt et al., 1998).

Ein zeitlich längerfristiger Ansatz wäre die Generierung von mDAP-3 Null-Mutanten Mäusen, die eine Vielzahl von Analysen für die Funktion von mDAP-3 ermöglichen sollten.

5 Anhang

5.1 Sequenzen der verwendeten PCR-Primer

5.1.1 Site-Directed Mutagenesis Primer

mDAP-3 KO-S: 5'-GGG AGA AGG GGA CAG GAA GGA CCC TCA GTC TCT G-3'

mDAP-3 KO-AS: 5'-CAG AGA CTG AGG GTC CTT CCT GTC CCC TTC TCC C-3'

5.1.2 mDAP-3/EGFP-Fusionsprotein Primer

T7

mDAP-3 *Bam*HI: 5'-AGT CTG ACG TAG ATC TGA CAG CGA GGC ACA GAG CCG-3'

mDAP-3 223 *Bam*HI: 5'-AGT CTG ACG TAG ATC TGA TAG GCC CTG TTC AAC AAC-3'

mDAP-3 163 *Bam*HI: 5'-AGT CTG ACG TAG ATC TGA CTG TAG AAG CTC CCG GCA-3'

mDAP3 100ab 5'-GCA CCT CGA GCA TGG TCT TTG CTC TCA T-3'

5.1.3 mDAP-3 Hefeexpression

M3-Start: 5'-CCC TCT AGA CTC ATG AGA GCA AAG ACC-3'

M3-Ende: 5'-TAT GTC GAC TTA CAG CGA GGC ACA GAG-3'

5.2 Sequenzen der verwendeten Sequenzier-Primer

5.2.1 Sense Primer

mDAP-3 S: 5'-GAA AAA TGA CTG GCA TGG AGG-3'

mDAP-3 D1AS: 5'-AAC TAC CAA TGA GCG CTT CC-3'

mDAP-3 D2AS: 5'-CCC TTG TCC ACA ATC TAA GG-3'

mDAP-3 D2ISH: 5'-CAG CAT GAG GGT CAG CAC TA-3'

5.2.2 Antisense Primer

mDAP-3 AS: 5'-AGG CAC AGA GCC GCT CCA-3'

mDAP-3 D1S: 5'-ACA GCC ACC AGG AGGTGA AA-3'

mDAP-3 D2S: 5'-CTG GGA TAT GCA GAA TCA GC-3'

mDAP-3 D3S: 5'-CAT GCT GCT CCC CAT GCT TA-3'

MERM-3 AS 5'-AGA GAA ACT GAC AGA GTC TG-3'

6 Literaturverzeichnis

- Aguilar, H. I., Botla, R., Arora, A. S., Bronk, S. F. and Gores, G. J.** (1996). Induction of the mitochondrial permeability transition by protease activity in rats: a mechanism of hepatocyte necrosis. *Gastroenterology* **110**, 558-66.
- Alber, T. and Kawasaki, G.** (1982). Nucleotide sequence of the triose phosphate isomerase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Appl Genet* **1**, 419-34.
- Alnemri, E. S.** (1999). Hidden powers of the mitochondria. *Nature Cell Biol.* **1**, E40-E42.
- Alnemri, E. S., Fernandes, T. F., Haldar, S., Croce, C. M. and Litwack, G.** (1992). Involvement of BCL-2 in glucocorticoid-induced apoptosis of human pre-B-leukemias. *Cancer Res* **52**, 491-5.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. and Yuan, J.** (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**, 171.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F. et al.** (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457-65.
- Andree, H. A., Reutelingsperger, C. P., Hauptmann, R., Hemker, H. C., Hermens, W. T. and Willems, G. M.** (1990). Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 4923-4928.
- Ardail, D., Privat, J. P., Egret-Charlier, M., Levrat, C., Lerme, F. and Louisot, P.** (1990). Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J Biol Chem* **265**, 18797-802.
- Armstrong, R. C., Aja, T., Xiang, J., Gaur, S., Krebs, J. F., Hoang, K., Bai, X., Korsmeyer, S. J., Karanewsky, D. S., Fritz, L. C. et al.** (1996). Fas-induced activation of the cell death-related protease CPP32 Is inhibited by Bcl-2 and by ICE family protease inhibitors. *J Biol Chem* **271**, 16850-5.
- Ausubel F. M., B. R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl K.** (1994). *Current Protocols in Molecular Biology* , Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Bacallao, R. and Fine, L. G.** (1989). Molecular events in the organization of renal tubular epithelium: from nephrogenesis to regeneration. [Review] [89 refs]. *American Journal of Physiology* **257**, F913-24.

- Bal-Price, A. and Brown, G. C.** (2000). Nitric-oxide-induced necrosis and apoptosis in PC12 cells mediated by mitochondria. *J Neurochem* **75**, 1455-64.
- Bauer, M. K., Schubert, A., Rocks, O. and Grimm, S.** (1999). Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *J Cell Biol* **147**, 1493-502.
- Beere, H. M., Wolf, B. B., Cain, K., Mosser, D. D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Tailor, P., Morimoto, R. I., Cohen, G. M. and Green, D. R.** (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* **2**, 469-75.
- Berger, T., Brigl, M., Herrmann, J. M., Vielhauer, V., Luckow, B., Schlondorff, D. and Kretzler, M.** (2000). The apoptosis mediator mDAP-3 is a novel member of a conserved family of mitochondrial proteins. *J Cell Sci* **113**, 3603-12.
- Bernardi, P.** (1996). The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochim Biophys Acta* **1275**, 5-9.
- Beutner, G., Ruck, A., Riede, B., Welte, W. and Brdiczka, D.** (1996). Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Lett* **396**, 189-95.
- Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V. and Wallach, D.** (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85**, 803-815.
- Brdiczka, D., Beutner, G., Ruck, A., Dolder, M. and Wallimann, T.** (1998). The molecular structure of mitochondrial contact sites. Their role in regulation of energy metabolism and permeability transition. *Biofactors* **8**, 235-42.
- Brenner, C., Cadiou, H., Vieira, H. L., Zamzami, N., Marzo, I., Xie, Z., Leber, B., Andrews, D., Duclohier, H., Reed, J. C. et al.** (2000). Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* **19**, 329-36.
- Brigl, M.** (2000). Klonierung von MERM3 aus muriner Niere und initiale Charakterisierung des putative Apoptose-Mediators. In *Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin Medizinische Fakultät der*, (ed. . Ludwig-Maximilians-Universität: München.

- Broekemeier, K. M., Klocek, C. K. and Pfeiffer, D. R.** (1998). Proton selective substate of the mitochondrial permeability transition pore: regulation by the redox state of the electron transport chain. *Biochemistry* **37**, 13059-65.
- Brookes, P. S., Salinas, E. P., Darley-USmar, K., Eiserich, J. P., Freeman, B. A., Darley-USmar, V. M. and Anderson, P. G.** (2000). Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. *J Biol Chem* **275**, 20474-9.
- Bruey, J. M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S. A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A. P., Kroemer, G., Solary, E. et al.** (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* **2**, 645-52.
- Brustovetsky, N. and Klingenberg, M.** (1996). Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca²⁺. *Biochemistry* **35**, 8483-8.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. and Wang, X.** (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 269-90.
- Buendia, B., Santa-Maria, A. and Courvalin, J. C.** (1999). Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci* **112**, 1743-53.
- Cai, J., Yang, J. and Jones, D. P.** (1998). Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* **1366**, 139-49.
- Cain, K., Bratton, S. B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D. G., Sun, X. M. and Cohen, G. M.** (2000). Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* **275**, 6067-70.
- Cain, K., Brown, D. G., Langlais, C. and Cohen, G. M.** (1999). Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem* **274**, 22686-92.
- Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T. A., March, C. J., Kronheim, S. R., Druck, T., Cannizzaro, L. A. et al.** (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* **256**, 97-100.
- Chernyak, B. V., Dedov, V. N. and Chernyak, V.** (1995). Ca(2+)-triggered membrane permeability transition in deenergized mitochondria from rat liver. *FEBS Lett* **365**, 75-8.

- Chinnaiyan, A. M., Chaudhary, D., O'Rourke, K., Koonin, E. V., Dixit and VM.** (1997). Role of CED-4 in the activation of CED-3 [letter] [see comments]. *Nature* **388**, 728-729.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M. and Dixit, V. M.** (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-512.
- Chinnaiyan, A. M., Tepper, C. G., Seldin, M. F., O'Rourke, K., Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Krammer, P. H., Peter, M. E. and Dixit, V. M.** (1996). FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 4961-4965.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9.
- Church, G. M. and Gilbert, W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1991-5.
- Cidlowski, J. A., King, K. L., Evans-Storms, R. B., Montague, J. W., Bortner, C. D. and Hughes, F. M., Jr.** (1996). The biochemistry and molecular biology of glucocorticoid-induced apoptosis in the immune system. *Recent Prog Horm Res* **51**, 457-90.
- Cikala, M., Wilm, B., Hobmayer, E., Bottger, A. and David, C. N.** (1999). Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr Biol* **9**, 959-62.
- Claros, M. G. and Vincens, P.** (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* **241**, 779-86.
- Cohen, O., Feinstein, E. and Kimchi, A.** (1997). DAP-kinase is a Ca²⁺/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *EMBO Journal* **16**, 998-1008.
- Conradt, B. and Horvitz, H. R.** (1998). The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* **93**, 519-29.
- Creutz, C. E.** (1992). The annexins and exocytosis. [Review] [84 refs]. *Science* **258**, 924-931.
- Crompton, M.** (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* **341**, 233-49.
- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, MA, Lassota, P. and Traganos, F.** (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. [Review] [63 refs]. *Cytometry* **13**, 795-808.

- Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S. A., Zamzami, N. and Kroemer, G. (2000a).** Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett* **476**, 118-23.
- Daugas, E., Susin, S. A., Zamzami, N., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, M. C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J. et al. (2000b).** Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *Faseb J* **14**, 729-39.
- de Vries, H. and Koogh-Schuuring, R. (1973).** Physicochemical characteristics of isolated 55-S mitochondrial ribosomes from rat-liver. *Biochem Biophys Res Commun* **54**, 308-14.
- Deiss, L. P. and Kimchi, A. (1991).** A genetic tool used to identify thioredoxin as a mediator of a growth inhibitory signal. *Science* **252**, 117-120.
- Demonacos, C., Djordjevic-Markovic, R., Tsawdaroglou, N. and Sekeris, C. E. (1995).** The mitochondrion as a primary site of action of glucocorticoids: the interaction of the glucocorticoid receptor with mitochondrial DNA sequences showing partial similarity to the nuclear glucocorticoid responsive elements. *J Steroid Biochem Mol Biol* **55**, 43-55.
- Demonacos, C., Tsawdaroglou, N. C., Djordjevic-Markovic, R., Papalopoulou, M., Galanopoulos, V., Papadogeorgaki, S. and Sekeris, C. E. (1993).** Import of the glucocorticoid receptor into rat liver mitochondria in vivo and in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* **46**, 401-13.
- Demonacos, C. V., Karayanni, N., Hatzoglou, E., Tsiriyiotis, C., Spandidos, D. A. and Sekeris, C. E. (1996).** Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones. *Steroids* **61**, 226-32.
- Desagher, S. and Martinou, J. C. (2000).** Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* **10**, 369-77.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B. and Martinou, J. C. (1999).** Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* **144**, 891-901.
- Desnoyers, S. and Hengartner, M. O. (1997).** Genetics of apoptosis. *Adv Pharmacol* **41**, 35-56.
- Dever, T. E., Glynias, M. J. and Merrick, W. C. (1987).** GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 1814-8.

- Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S. and Reed, J. C.** (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J* **17**, 2215-23.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X.** (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M. and Kaufmann, S. H.** (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**, 383-424.
- Ellis, H. M. and Horvitz, H. R.** (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* **44**, 817-29.
- Ellis, R. E. and Horvitz, H. R.** (1991). Two *C. elegans* genes control the programmed deaths of specific cells in the pharynx. *Development* **112**, 591-603.
- Ellis, R. E., Jacobson, D. M. and Horvitz, H. R.** (1991). Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **129**, 79-94.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. and von Heijne, G.** (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**, 1005-16.
- Englard, S. and Siegel, L.** (1969). *Methods Enzymol.* **13**, 99-106.
- Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Mazzei, G., Nichols, A. and Martinou, J. C.** (1998). Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *J Cell Biol* **143**, 217-24.
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B. and Martinou, J. C.** (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* **20**, 929-35.
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L. and Henson, P. M.** (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of Immunology* **148**, 2207-2216.

- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B.** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**, 6-13.
- Feramisco, J. R., Glass, D. B. and Krebs, E. G.** (1980). Optimal spatial requirements for the location of basic residues in peptide substrates for the cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **255**, 4240-5.
- Fontaine, E., Eriksson, O., Ichas, F. and Bernardi, P.** (1998). Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex i. *J Biol Chem* **273**, 12662-8.
- Frey, T. G. and Mannella, C. A.** (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* **25**, 319-24.
- Fry, D. C., Kuby, S. A. and Mildvan, A. S.** (1986). ATP-binding site of adenylate kinase: mechanistic implications of its homology with ras-encoded p21, F1-ATPase, and other nucleotide-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 907-11.
- Glass, D. B., el-Maghrabi, M. R. and Pilkis, S. J.** (1986). Synthetic peptides corresponding to the site phosphorylated in 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as substrates of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol Chem* **261**, 2987-93.
- Glass, D. B. and Smith, S. B.** (1983). Phosphorylation by cyclic GMP-dependent protein kinase of a synthetic peptide corresponding to the autophosphorylation site in the enzyme. *J Biol Chem* **258**, 14797-803.
- Goldmacher, V. S., Bartle, L. M., Skaletskaya, A., Dionne, C. A., Kedersha, N. L., Vater, C. A., Han, J., Lutz, R. J., Watanabe, S., McFarland, E. D. et al.** (1999). A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12536-41.
- Goping, I. S., Gross, A., Lavoie, J. N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K., Korsmeyer, S. J. and Shore, G. C.** (1998). Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol* **143**, 207-15.
- Gottlieb, R. A.** (2000). Mitochondria: execution central. *FEBS Lett* **482**, 6-12.
- Graack, H. R. and Wittmann-Liebold, B.** (1998). Mitochondrial ribosomal proteins (MRPs) of yeast. *Biochem J* **329**, 433-48.
- Green, D. and Kroemer, G.** (1998). The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* **8**, 267-71.

Green, D. R. and Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-12.

Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C. and Korsmeyer, S. J. (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Embo J* **17**, 3878-85.

Grossman, L. I. and Shoubridge, E. A. (1996). Mitochondrial genetics and human disease. *Bioessays* **18**, 983-91.

Guthrie, C. and Fink, G. R. (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol* **194**, 1-863.

Halestrap, A. P., Kerr, P. M., Javadov, S. and Woodfield, K. Y. (1998). Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta* **1366**, 79-94.

Hausmann, G., O'Reilly, L. A., van Driel, R., Beaumont, J. G., Strasser, A., Adams, J. M. and Huang, D. C. (2000). Pro-apoptotic apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-x(L). *J Cell Biol* **149**, 623-34.

Haverty, T. P., Kelly, C. J., Hines, W. H., Amenta, P. S., Watanabe, M., Harper, R. A., Kefalides, N. A. and Neilson, E. G. (1988). Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. *Journal of Cell Biology* **107**, 1359-1368.

Haworth, R. A. and Hunter, D. R. (1980). Allosteric inhibition of the Ca²⁺-activated hydrophilic channel of the mitochondrial inner membrane by nucleotides. *J Membr Biol* **54**, 231-6.

Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-6.

Hengartner, M. O., Ellis, R. E. and Horvitz, H. R. (1992). *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* **356**, 494-9.

Hirsch, T., Marzo, I. and Kroemer, G. (1997). Role of the mitochondrial permeability transition pore in apoptosis. *Biosci Rep* **17**, 67-76.

Hirsch, T., Susin, S. A., Marzo, I., Marchetti, P., Zamzami, N. and Kroemer, G. (1998). Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. *Cell Biol Toxicol* **14**, 141-5.

Horvitz, H. R., Sternberg, P. W., Greenwald, I. S., Fixsen, W. and Ellis, H. M. (1983). Mutations that affect neural cell lineages and cell fates during the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **48**, 453-63.

- Hu, Y., Benedict, M. A., Wu, D., Inohara, N. and Nunez, G.** (1998). Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4386-91.
- Hulkko, S. M., Wakui, H. and Zilliacus, J.** (2000). The pro-apoptotic protein death-associated protein 3 (DAP3) interacts with the glucocorticoid receptor and affects the receptor function. *Biochem J* **349**, 885-893.
- Inbal, B., Cohen, O., Polak-Charcon, S., Kopolovic, J., Vadai, E., Eisenbach, L. and Kimchi, A.** (1997). DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature* **390**, 180-184.
- Inohara, N., Gourley, T. S., Carrio, R., Muniz, M., Merino, J., Garcia, I., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S. and Nunez, G.** (1998). Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3- independent cell death. *J Biol Chem* **273**, 32479-86.
- Irmler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C. et al.** (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**, 190-5.
- Isenberg, J. S. and Klaunig, J. E.** (2000). Role of the mitochondrial membrane permeability transition (MPT) in rotenone-induced apoptosis in liver cells. *Toxicol Sci* **53**, 340-51.
- Itoh, N., Tsujimoto, Y. and Nagata, S.** (1993). Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *Journal of Immunology* **151**, 621-627.
- Jacotot, E., Ravagnan, L., Loeffler, M., Ferri, K. F., Vieira, H. L., Zamzami, N., Costantini, P., Druillennec, S., Hoebeke, J., Briand, J. P. et al.** (2000). The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J Exp Med* **191**, 33-46.
- Jones, D. T.** (1998). Do transmembrane protein superfolds exist? *FEBS Lett* **423**, 281-5.
- Jones, D. T.** (1999). GenTHREADER: an efficient and reliable protein fold recognition method for genomic sequences. *J Mol Biol* **287**, 797-815.
- Jones, D. T., Taylor, W. R. and Thornton, J. M.** (1994). A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *Biochemistry* **33**, 3038-49.

- Jurgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D. and Reed, J. C.** (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4997-5002.
- Kalejta, R. F., Shenk, T. and Beavis, A. J.** (1997). Use of a membrane-localized green fluorescent protein allows simultaneous identification of transfected cells and cell cycle analysis by flow cytometry. *Cytometry* **29**, 286-91.
- Kelekar, A. and Thompson, C. B.** (1998). Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* **8**, 324-30.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R.** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H. and Peter, M. E.** (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* **14**, 5579-88.
- Kishimoto, A., Nishiyama, K., Nakanishi, H., Uratsuji, Y., Nomura, H., Takeyama, Y. and Nishizuka, Y.** (1985). Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **260**, 12492-9.
- Kissil, J. L., Cohen, O., Raveh, T. and Kimchi, A.** (1999). Structure-function analysis of an evolutionary conserved protein, DAP3, which mediates TNF-alpha- and Fas-induced cell death. *Embo J* **18**, 353-62.
- Kissil, J. L., Deiss, L. P., Bayewitch, M., Raveh, T., Khaspekov, G. and Kimchi, A.** (1995). Isolation of DAP3, a novel mediator of interferon-gamma-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 27932-27936.
- Kissil, J. L. and Kimchi, A.** (1997). Assignment of death associated protein 3 (DAP3) to human chromosome 1q21 by in situ hybridization. *Cytogenetics & Cell Genetics* **77**, 252.
- Kluck, R. M., Bossy-Wetzell, E., Green, D. R. and Newmeyer, D. D.** (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis [see comments]. *Science* **275**, 1132-1136.
- Koc, E. C., Ranasinghe, A., Burkhart, W., Blackburn, K., Koc, H., Moseley, A. and Spremulli, L. L.** (2001). A new face on apoptosis: death-associated protein 3 and PDCD9 are mitochondrial ribosomal proteins. *FEBS Lett* **492**, 166-70.

- Koonin, E. V.** (1993). A superfamily of ATPases with diverse functions containing either classical or deviant ATP-binding motif. *J Mol Biol* **229**, 1165-74.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T. J., Kirschner, M. W., Kohts, K., Kwiatkowski, D. J. et al.** (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* **278**, 294-8.
- Krajewski, S., Krajewska, M., Ellerby, L. M., Welsh, K., Xie, Z., Deveraux, Q. L., Salvesen, G. S., Bredesen, D. E., Rosenthal, R. E., Fiskum, G. et al.** (1999). Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5752-7.
- Kretzler, M., Fan, G., Rose, D., Arend, L. J., Briggs, J. P. and Holzman, L. B.** (1996). Novel mouse embryonic renal marker gene products differentially expressed during kidney development. *Am J Physiol* **271**, F770-7.
- Kristal, B. S. and Brown, A. M.** (1999). Apoptogenic ganglioside GD3 directly induces the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* **274**, 23169-75.
- Kroemer, G.** (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis [published erratum appears in *Nat Med* 1997 Aug;3(8):934]. [Review] [64 refs]. *Nature Medicine* **3**, 614-620.
- Kroemer, G. and Reed, J. C.** (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* **6**, 513-9.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lamm, G. M., Steinlein, P., Cotten, M. and Christofori, G.** (1997). A rapid, quantitative and inexpensive method for detecting apoptosis by flow cytometry in transiently transfected cells. *Nucleic Acids Res* **25**, 4855-7.
- Larochette, N., Decaudin, D., Jacotot, E., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S. A., Zamzami, N., Xie, Z., Reed, J. and Kroemer, G.** (1999). Arsenite induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Exp Cell Res* **249**, 413-21.
- Latta, M., Kunstle, G., Leist, M. and Wendel, A.** (2000). Metabolic depletion of ATP by fructose inversely controls CD95- and tumor necrosis factor receptor 1-mediated hepatic apoptosis. *J Exp Med* **191**, 1975-85.

- Lawson, J. E. and Douglas, M. G.** (1988). Separate genes encode functionally equivalent ADP/ATP carrier proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and analysis of AAC2. *J Biol Chem* **263**, 14812-8.
- Leist, M. and Nicotera, P.** (1997). The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **236**, 1-9.
- Leist, M., Single, B., Naumann, H., Fava, E., Simon, B., Kuhnle, S. and Nicotera, P.** (1999a). Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Exp Cell Res* **249**, 396-403.
- Leist, M., Single, B., Naumann, H., Fava, E., Simon, B., Kuhnle, S. and Nicotera, P.** (1999b). Nitric oxide inhibits execution of apoptosis at two distinct ATP- dependent steps upstream and downstream of mitochondrial cytochrome c release. *Biochem Biophys Res Commun* **258**, 215-21.
- Levy-Strumpf, N., Deiss, L. P., Berissi, H. and Kimchi, A.** (1997). DAP-5, a novel homolog of eukaryotic translation initiation factor 4G isolated as a putative modulator of gamma interferon- induced programmed cell death. *Molecular & Cellular Biology* **17**, 1615-1625.
- Li, C. Y., Lee, J. S., Ko, Y. G., Kim, J. I. and Seo, J. S.** (2000). Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* **275**, 25665-71.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. and Wang, X.** (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-89.
- Liu, M. and Spremulli, L.** (2000). Interaction of mammalian mitochondrial ribosomes with the inner membrane. *J Biol Chem* **275**, 29400-6.
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. and Wang, X.** (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**, 147-57.
- Loeffler, M., Daugas, E., Susin, S. A., Zamzami, N., Metivier, D., Nieminen, A. L., Brothers, G., Penninger, J. M. and Kroemer, G.** (2001). Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *Faseb J* **15**, 758-67.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-75.

- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X.** (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-90.
- Mancini, M., Machamer, C. E., Roy, S., Nicholson, D. W., Thornberry, N. A., Casciola-Rosen, L. A. and Rosen, A.** (2000). Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol* **149**, 603-12.
- Mancini, M., Nicholson, D. W., Roy, S., Thornberry, N. A., Peterson, E. P., Casciola-Rosen, L. A. and Rosen, A.** (1998). The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol* **140**, 1485-95.
- Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S. A., Zamzami, N., Hirsch, T., Macho, A., Haeflner, A., Hirsch, F., Geuskens, M. and Kroemer, G.** (1996). Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med* **184**, 1155-60.
- Martinou, J. C.** (1999). Apoptosis. Key to the mitochondrial gate [news; comment]. *Nature* **399**, 411-2.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J. M., Susin, S. A., Vieira, H. L., Prevost, M. C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J. C. et al.** (1998a). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* **281**, 2027-31.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S. A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z. H., Reed, J. C. and Kroemer, G.** (1998b). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* **187**, 1261-71.
- Matthews, D. E., Hessler, R. A., Denslow, N. D., Edwards, J. S. and O'Brien, T. W.** (1982). Protein composition of the bovine mitochondrial ribosome. *J Biol Chem* **257**, 8788-94.
- Miller, R. A. and Kirkpatrick, J. W.** (1969). Column chromatography of phosphorylated nucleosides and deoxynucleosides on PEI-cellulose. *Anal Biochem* **27**, 306-10.
- Moller, W. and Amons, R.** (1985). Phosphate-binding sequences in nucleotide-binding proteins. *FEBS Lett* **186**, 1-7.

- Moriishi, K., Huang, D. C., Cory, S. and Adams, J. M.** (1999). Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9683-8.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**, 263-73.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.
- Murchison, D. and Griffith, W. H.** (2000). Mitochondria buffer non-toxic calcium loads and release calcium through the mitochondrial permeability transition pore and sodium/calcium exchanger in rat basal forebrain neurons. *Brain Res* **854**, 139-51.
- Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S. and Dixit, V. M.** (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* **273**, 2926-30.
- Myers, A. M., Pape, L. K. and Tzagoloff, A.** (1985). Mitochondrial protein synthesis is required for maintenance of intact mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **4**, 2087-92.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A. and Yuan, J.** (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**, 98-103.
- Nakai, K. and Horton, P.** (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* **24**, 34-6.
- Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R. J., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y.** (1998). Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14681-6.
- Newmeyer, D. D., Bossy-Wetzell, E., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Beere, H. M. and Green, D. R.** (2000). Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell Death Differ* **7**, 402-7.
- Nicholson, D. W.** (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **6**, 1028-42.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. and Riccardi, C.** (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* **139**, 271-279.

- Nomura, K., Imai, H., Koumura, T., Kobayashi, T. and Nakagawa, Y.** (2000). Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem J* **351**, 183-93.
- Oltvai, Z. N., Millman, C. L. and Korsmeyer, S. J.** (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-619.
- Ormerod, M. G., Collins, M. K., Rodriguez-Tarduchy, G., Robertson and D.** (1992). Apoptosis in interleukin-3-dependent haemopoietic cells. Quantification by two flow cytometric methods. *Journal of Immunological Methods* **153**, 57-65.
- Pan, G., O'Rourke, K. and Dixit, V. M.** (1998). Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* **273**, 5841-5.
- Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S. M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E. S., Kufe, D. et al.** (2000). Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *Embo J* **19**, 4310-22.
- Pastorino, J. G., Chen, S. T., Tafani, M., Snyder, J. W. and Farber, J. L.** (1998). The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* **273**, 7770-5.
- Petit, P. X., Lecoecur, H., Zorn, E., Dauguet, C., Mignotte, B. and Gougeon, M. L.** (1995). Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol* **130**, 157-67.
- Petit, P. X., Susin, S. A., Zamzami, N., Mignotte, B. and Kroemer, G.** (1996). Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett* **396**, 7-13.
- Planey, S. L. and Litwack, G.** (2000). Glucocorticoid-induced apoptosis in lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **279**, 307-12.
- Pless, D. D. and Lennarz, W. J.** (1977). Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci US A* **74**, 134-8.
- Porter, A. G.** (1999). Protein translocation in apoptosis. *Trends Cell Biol* **9**, 394-401.
- Rao, L., Perez, D. and White, E.** (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* **135**, 1441-55.

- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W. and Westermann, B.** (1998). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**, 20150-5.
- Reed, J. C.** (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene* **17**, 3225-36.
- Reichardt, H. M., Kaestner, K. H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P. et al.** (1998). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival [see comments]. *Cell* **93**, 531-41.
- Reyes, P.** (1972). PEI-cellulose thin-layer chromatography: a highly versatile system for separating purine and pyrimidine nucleotides from nucleosides and free bases. *Anal Biochem* **50**, 35-9.
- Rodriguez, J. and Lazebnik, Y.** (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* **13**, 3179-84.
- Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B. and Borner, C.** (1998). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* **391**, 496-9.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-4.
- Saleh, A., Srinivasula, S. M., Balkir, L., Robbins, P. D. and Alnemri, E. S.** (2000). Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* **2**, 476-83.
- Sambrook J., F. E. F. a. M. T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* , Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Saraste, M., Sibbald, P. R. and Wittinghofer, A.** (1990). The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. [Review] [31 refs]. *Trends in Biochemical Sciences* **15**, 430-434.
- Saveanu, C., Fromont-Racine, M., Harington, A., Ricard, F., Namane, A. and Jacquier, A.** (2001). Identification of twelve new yeast mitochondrial ribosomal proteins including six which have no prokaryotic homologues. *J Biol Chem* **14**, 14.
- Scheller, K., Sekeris, C. E., Krohne, G., Hock, R., Hansen, I. A. and Scheer, U.** (2000). Localization of glucocorticoid hormone receptors in mitochondria of human cells [In Process Citation]. *Eur J Cell Biol* **79**, 299-307.

- Scorrano, L., Petronilli, V., Colonna, R., Di Lisa, F. and Bernardi, P.** (1999a). Chloromethyltetramethylrosamine (Mitotracker Orange) induces the mitochondrial permeability transition and inhibits respiratory complex I. Implications for the mechanism of cytochrome c release. *J Biol Chem* **274**, 24657-63.
- Scorrano, L., Petronilli, V., Di Lisa, F. and Bernardi, P.** (1999b). Commitment to apoptosis by GD3 ganglioside depends on opening of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* **274**, 22581-5.
- Shaham, S. and Horvitz, H. R.** (1996). Developing *Caenorhabditis elegans* neurons may contain both cell-death protective and killer activities. *Genes Dev* **10**, 578-91.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Funahashi, Y., Mignon, A., Lacronique, V., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y.** (1998). Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1455-9.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Waguri, S., Uchiyama, Y., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y.** (1996). Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. *Oncogene* **13**, 21-9.
- Shimizu, S., Narita, M. and Tsujimoto, Y.** (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483-7.
- Shimizu, S. and Tsujimoto, Y.** (2000). Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 577-82.
- Sikorski, R. S. and Hieter, P.** (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.
- Single, B., Leist, M. and Nicotera, P.** (1998). Simultaneous release of adenylate kinase and cytochrome c in cell death. *Cell Death Differ* **5**, 1001-3.
- Song, Q., Kuang, Y., Dixit, V. M. and Vincenz, C.** (1999). Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *Embo J* **18**, 167-78.
- Spector, M. S., Desnoyers, S., Hoepfner, D. J. and Hengartner, M. O.** (1997). Interaction between the *C. elegans* cell-death regulators CED-9 and CED-4. *Nature* **385**, 653-6.

- Steller, H.** (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. [Review] [54 refs]. *Science* **267**, 1445-1449.
- Stennicke, H. R., Deveraux, Q. L., Humke, E. W., Reed, J. C., Dixit, V. M. and Salvesen, G. S.** (1999). Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* **274**, 8359-62.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M. C., Alzari, P. M. and Kroemer, G.** (1999a). Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* **189**, 381-94.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M. et al.** (1999b). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor [see comments]. *Nature* **397**, 441-6.
- Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M. and Kroemer, G.** (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* **184**, 1331-41.
- Susin, S. A., Zamzami, N. and Kroemer, G.** (1998). Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* **1366**, 151-65.
- Takeyama, N., Matsuo, N. and Tanaka, T.** (1993). Oxidative damage to mitochondria is mediated by the Ca(2+)-dependent inner-membrane permeability transition. *Biochem J* **294**, 719-25.
- Telford, W. G., King, L. E. and Fraker, P. J.** (1991). Evaluation of glucocorticoid-induced DNA fragmentation in mouse thymocytes by flow cytometry. *Cell Proliferation* **24**, 447-459.
- Telford, W. G., King, L. E. and Fraker, P. J.** (1992). Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry* **13**, 137-43.
- Thadhani, R., Pascual, M. and Bonventre, J. V.** (1996). Acute renal failure. *N Engl J Med* **334**, 1448-60.
- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J. et al.** (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**, 768-74.

- Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P. et al. (1997).** A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 17907-11.
- Tizon, B., Rodriguez-Torres, A. M. and Cerdan, M. E. (1999).** Disruption of six novel *Saccharomyces cerevisiae* genes reveals that YGL129c is necessary for growth in non-fermentable carbon sources, YGL128c for growth at low or high temperatures and YGL125w is implicated in the biosynthesis of methionine. *Yeast* **15**, 145-54.
- Tsiriyotis, C., Spandidos, D. A. and Sekeris, C. E. (1997).** The mitochondrion as a primary site of action of glucocorticoids: mitochondrial nucleotide sequences, showing similarity to hormone response elements, confer dexamethasone inducibility to chimaeric genes transfected in L_{ATK}- cells. *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 349-54.
- Tsujimoto, Y. and Shimizu, S. (2000).** Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* **466**, 6-10.
- Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Schumacker, P. T. and Thompson, C. B. (1999).** Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell* **3**, 159-67.
- Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Williamson, E. K., Schumacker, P. T. and Thompson, C. B. (1997).** Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* **91**, 627-37.
- Vander Heiden, M. G. and Thompson, C. B. (1999).** Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol* **1**, E209-16.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J. and Vaux, D. L. (2000).** Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43-53.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger and C. (1995).** A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* **184**, 39-51.

- Virbasius, J. V. and Scarpulla, R. C.** (1994). Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1309-13.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. and Gay, N. J.** (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**, 945-51.
- Weil, M., Jacobson, M. D., Coles, H. S., Davies, T. J., Gardner, R. L., Raff, K. D. and Raff, M. C.** (1996). Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *Journal of Cell Biology* **133**, 1053-1059.
- Werner, S. and Neupert, W.** (1972). Functional and biogenetical heterogeneity of the inner membrane of rat- liver mitochondria. *Eur J Biochem* **25**, 379-96.
- Wolf, G., Haberstroh, U. and Neilson, E. G.** (1992). Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultured murine mesangial cells. *American Journal of Pathology* **140**, 95-107.
- Woodgett, J. R., Gould, K. L. and Hunter, T.** (1986). Substrate specificity of protein kinase C. Use of synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements. *Eur J Biochem* **161**, 177-84.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. and Currie, A. R.** (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**, 251-306.
- Xiang, J., Chao, D. T. and Korsmeyer, S. J.** (1996). BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14559-63.
- Xue, D., Shaham, S. and Horvitz, H. R.** (1996). The *Caenorhabditis elegans* cell-death protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of the human CPP32 protease. *Genes Dev* **10**, 1073-83.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P. and Wang, X.** (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked [see comments]. *Science* **275**, 1129-1132.

- Yuan, J. and Horvitz, H. R.** (1992). The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* **116**, 309-20.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. and Horvitz, H. R.** (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* **75**, 641-52.
- Zamzami, N., Marzo, I., Susin, S. A., Brenner, C., Larochette, N., Marchetti, P., Reed, J., Kofler, R. and Kroemer, G.** (1998). The thiol crosslinking agent diamide overcomes the apoptosis-inhibitory effect of Bcl-2 by enforcing mitochondrial permeability transition. *Oncogene* **16**, 1055-63.
- Zhivotovsky, B., Samali, A., Gahm, A. and Orrenius, S.** (1999). Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ* **6**, 644-51.
- Zhou, G. and Roizman, B.** (2000). Wild-type herpes simplex virus 1 blocks programmed cell death and release of cytochrome c but not the translocation of mitochondrial apoptosis-inducing factor to the nuclei of human embryonic lung fibroblasts. *J Virol* **74**, 9048-53.
- Zoratti, M. and Szabo, I.** (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* **1241**, 139-76.
- Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A. and Wang, X.** (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3 [see comments]. *Cell* **90**, 405-413.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Thorsten Berger
Geburtsdatum/-ort	10.11.1968 in Bonn
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

SCHULE

1974 - 1978	Gemeinschaftsgrundschule der Stadt Bonn an der Rheinallee
1978 – 1987	Amos-Comenius Gymnasium in Bonn-Bad Godesberg; Staatlich anerkanntes Gymnasium der evangelischen Kirche im Rheinland Abitur: Juni 1987

WEHRDIENST

07/87 - 09/88	Entlassung als Obergefreiter im Sanitätsdienst
---------------	--

AUSLANDSAUFENTHALT

01/89 – 06/89	Aufenthalt als au-pair in einer französischen Familie mit zwei Kindern in Paris; in der Zeit Besuch einer Sprachschule
---------------	--

STUDIUM

10/89 - 01/97	Biologie-Diplom , Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
SoSe 1992	Vordiplom
09/93 - 06/94	Biologie Studium an der Brock-University in St. Catharines, Ontario, Kanada <u>Bachelor of Science Thesis:</u> „Hybridization of a fimbrial cDNA to genomic DNAs from four fungal species.“ Abschluß : Bachelor of Science (honours)
05/96 - 01/97	<u>Diplomarbeit:</u> „Charakterisierung klonierter Chalkon- und Stilben-Synthasen.“ Institut für Biologie II, Biochemie der Pflanzen Prof. Dr. J. Schröder
01/97	<u>Abschluß:</u> Diplom-Biologe Gesamturteil „gut“ (1,8)

BERUFSPRAXIS

08/97 – 01/99 Wissenschaftlicher Angestellter im Forschungslabor der Medizinischen Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München.

02/99 – 06/01 Stipendiat im Graduiertenkolleg Vaskuläre Biologie in der Medizin (GK 438)

Thema der Doktorarbeit:

Untersuchungen zur Apoptose :

Charakterisierung von mDAP-3, eines pro-apoptotischen, konservierten, mitochondrialen Proteins.

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei:

Prof. Dr. Detlef Schlöndorff für die Möglichkeit, die Experimente der vorliegenden Arbeit in den Labors der Medizinischen Poliklinik durchführen zu können.

Prof. Dr. Charles N. David für das Vertreten meiner Arbeit vor der Fakultät für Biologie der LMU München, seine Diskussionsbereitschaft und seine Unterstützung und sehr guten Anregungen.

Dr. Matthias Kretzler für die hervorragende Betreuung und Anleitung, für seine ständige Gesprächsbereitschaft und seinen besonderen Einsatz und Unterstützung für diese Arbeit.

Dr. Johannes M. Herrmann für die Anleitung und Hilfe bei der Mitochondrienisolierung und den Hefeexperimenten

Dr. Bruno Luckow, Dr. Holger Maier, Dr. Sabine Fessele, Dr. Guillermo Pérez de Lema und Dr. Peter Nelson für ihre ständige Gesprächsbereitschaft und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Gabriele Fuhrer und Ilka Edenhofer für die Unterstützung bei der Pflege der Zellen.

Allen Mitgliedern des Labors der Klinische Biochemie, besonders der Arbeitsgruppe Kretzler, für das hervorragende Arbeitsklima und die große Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Laboralltag.

Tanja Schieweck für ihr Verständnis für die unregelmäßigen Arbeitszeiten und den ständigen Drang die mDAP-3 Forschung weiterzutreiben.